رستنیها ۲۲(۱): ۱۴۶–۱۳۴ (۱۴۰۰) ـ مقاله پژوهشی Rostaniha 22(1): 134–146 (2021) - Research Article

DOI: 10.22092/BOTANY.2021.355344.1260

مطالعه ریخت‌شناسی و ژنتیکی *Halocnemum strobilaceum* در اکوسیستم‌های مرتعی استان گلستان

دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۳ / پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

ابوالفضل طهماسبی✉: استادیار گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران (ab_tahmasebi@gonbad.ac.ir)

فاطمه نصرالهی: دانش‌آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

چکیده

گیاهان شورپسند قادرند چرخه زندگی خود را در اراضی شور کامل کنند و در صورت وجود برنامه‌های مدیریتی صحیح، می‌توان از آن‌ها به نحو مطلوب بهره‌برداری نمود. *Halocnemum strobilaceum*، چندساله و اغلب بوته‌ای است که در شمال‌غرب، مرکز و جنوب‌شرق ایران می‌روید و در استان گلستان نیز پراکنش دارد. اهمیت این گیاه در حفاظت از خاک و تولید علوفه با بیشترین درصد ترکیب گیاهی در مناطق شور و قلیایی استان ایجاب می‌نماید تا با شناخت تنوع ژنتیکی آن، نسبت به انتخاب ژنوتیپ‌های برتر اقدام نمود. در این مطالعه، تنوع ریخت‌شناسی و ژنتیکی ۱۳ جمعیت از این گونه در استان گلستان بررسی شد. تعداد ۱۹ صفت کمّی و کیفی برای مطالعات مورفومتری انتخاب شد و سپس آنالیزهای آماری چندمتغیره انجام گرفت. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، از چهار آغازگر استفاده شد که در مجموع، ۲۷ باند تولید کردند. مطالعه حاضر، ثابت کرد که ویژگی‌های ریخت‌شناسی و داده‌های مولکولی ISSR در تمایز جمعیت *H. strobilaceum* مورد بررسی مفید است. همچنین، هر دو ویژگی ریخت‌شناسی کمّی و کیفی برای تمایز جمعیت گونه مورد مطالعه مهم و مناسب بوده و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین جمعیتی را نشان داد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای Ward براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و داده‌های مولکولی، اطلاعات قابل توجهی را در روابط جامعه مورد مطالعه نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، تاج‌خروسیان، داده‌های مولکولی، شورپسند، مورفومتری، ISSR

Morphological and genetical study of *Halocnemum strobilaceum* in rangeland ecosystems of Golestan province (north of Iran)

Received: 25.07.2021 / Accepted: 28.08.2021

Abolfazl Tahmasebi✉**:** Assistant Prof., Department of Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran (ab_tahmasebi@gonbad.ac.ir)

Fatemeh Nasrollahi: PhD Graduate, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, Iran

Summary

Halophytes are able to complete their life cycle in saline soils and can be used optimally if there are proper management plans. *Halocnemum strobilaceum* (*Amaranthaceae*) is a perennial and often shrub that grows in the northwest, center and southeast of Iran. The importance of this plant is in soil protection and forage production with the highest percentage of plant composition in saline and alkaline areas of the Golestan province (north of Iran). Therefore, recognizing its genetic diversity, to select the best genotypes is necessary. In this study, the morphological and genetic diversity of 13 populations in Golestan province was investigated. Nineteen quantitative and qualitative traits were selected for biometric and morphological studies and then multivariate statistical analyzes were performed. Four primers were used to assess genetic diversity, producing a total of 27 bands. The present study proved that, morphological characteristics as well as molecular data of ISSR are useful in differentiating *H. strobilaceum* populations. Both quantitative and qualitative morphological features are important and appropriate for the population differentiation. The present study also showed a high level of inter-population genetic diversity. Ward Cluster Analysis, based on morphological features and molecular data, showed significant information on the relationships of the studied populations.

Keywords: *Amaranthaceae*, biometri, genetic diversity, halophyte, ISSR, molecular data

مقدمه

استان گلستان سرزمینی وسیع و از نظر پوشش گیاهی بسیار متنوع است که به دلیل جایگاه جغرافیایی ویژه خود، از آب و هوای متنوعی برخوردار است. بخش خشک و نیمه‌خشک نیمه شمالی استان، به دلیل بهره‌مندی از بارش‌های کم‌تر و همچنین تبخیر زیاد آب، زمین‌های شور و کم‌بازده بسیاری دارد.

گیاه *Halocnemum strobilaceum* M. Bieb. (Pall.) متعلق به تیره تاج‌خروسیان (زیرتیره *Chenopodioideae*)، از جمله گونه‌های کلیدی مراتع شور و قلیایی شمال استان گلستان به شمار می‌رود (Hosseini & Shahmoradi 2011). این گیاه با دارا بودن جثه‌ای بزرگ، به ویژه تاج نسبتا وسیع، نقش حفاظتی مهمی داشته و از جابجایی خاک‌های قلیایی و دارای نمک جلوگیری می‌کند و در نتیجه در مقابله با بیابان‌زایی و تخریب خاک بسیار موثر است. این گیاه، از زمره گیاهان آب‌دار است که با انداختن قسمت‌هایی از برگ‌ها و ساقه‌های سرشار از نمک خود، برای حفاظت از خود و تطابق با شرایط شوری اقدام می‌کند (Toranjzar & Fathi 2016). گونه *H. strobilaceum* گیاهی چندساله، اغلب بوته‌ای، به ندرت درختچه‌ای، به ارتفاع ۲۵ تا ۵۰ و به ندرت تا ۸۰ سانتی‌متر، از پایین منشعب، بدون کرک، به رنگ سبز متمایل به زرد، ارغوانی و یا رنگ‌های بین سبز و ارغوانی، انشعابات مسن بند بند با بندهایی به طول ۴ و قطر حدود ۳ میلی‌متر، انشعابات جوان گوشتی با بندهای کوتاه‌تر، برگ‌ها تحلیل رفته، متقابل، گل‌آذین سنبله‌ای به طول تا ۴۰ میلی‌متر و قطر ۲ تا ۴ میلی‌متر، متقابل، بدون پایک، برگه‌ها لوزوی پهن به طول ۲ و قطر ۳ میلی‌متر، در داخل با سه دیواره تیغه مانند. گل‌ها کوزه‌ای، به طول حدود ۱/۵ میلی‌متر. بساک تا میانه شکافته، بدون زایده، دانه به طول ۰/۸ تا ۰/۹ میلی‌متر، تخم‌مرغی نامنظم، قهوه‌ای متمایل به نارنجی که زمان گل‌دهی و رسیدن میوه گیاه در فصل پاییز است. این گونه در شمال‌غرب، مرکز، شمال‌شرق، جنوب و جنوب‌شرق ایران پراکنش دارد (Assadi 2001).

ال‌سنوسی و همکاران (El-Senosy *et al.* 2015) به مطالعه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نشانگرهای مولکولی در ارتباط با مقاومت به شوری گیاه *H. strobilaceum* در کشور مصر پرداختند که طی آن مشخص گردید با استفاده از نشانگرهای مولکولی و فعالیت آنزیم‌ها، می‌توان مناسب‌ترین ژنوتایپ‌ها را برای مقاومت در تنش‌های محیطی انتخاب کرد. بیوندی و همکاران (Biondi *et al.* 2013) به بررسی جنس *Halocnemum* در منطقه مدیترانه پرداختند و طی آن دو گونه *H. strobilaceum* و (Forssk.) Tod. *H. cruciatum* شناسایی شد و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. حسینی و همکاران (Hosseini *et al.* 2016) به بررسی نحوه حضور گونه *H. strobilaceum* در مراتع شور و قلیایی در شمال استان گلستان پرداختند و نشان دادند که فراوانی این گونه در سایت‌های مختلف بین ۸۶/۶ و ۹۶/۶٪ است. حسینی و شاهمرادی (Hosseini & Shahmoradi 2011) اوتاکولوژی این گونه در مراتع شور و قلیایی استان گلستان را مورد مطالعه قرار دادند و اثبات کردند که این گیاه در خاک‌هایی با بافت سیلتی، سیلتی لوم و سیلتی رشد بسیاری دارد. تورنج زر و فتحی (Toranjzar & Fathi 2016) ویژگی‌های مورفومتری تیپ گیاهی برهداغ (*H. strobilaceum*) در کویر میقان (اراک) را مطالعه نمودند و پارامترهایی مانند طول، عرض و ارتفاع نبکاها و تاج پوشش گیاهی هر کدام به صورت جداگانه مورد اندازه‌گیری قرار دادند که نتایج تحقیقات نشان داد ابعاد نبکاهای تشکیل شده قابل توجه بوده و باعث جلوگیری از فرسایش خاک می‌شود. کادریت و همکاران (Kadereit *et al.* 2006) فیلوژنی سالیکورنوییده را براساس توالی‌های آی.تی.اس. و *atpB-rbcL* مورد مطالعه قرار دادند که ضمن عدم تایید درخت‌های مولکولی قبایل شناخته شده کنونی، پیشنهاد کردند که بایستی تنها قبیله *Salicornieae* به رسمیت شناخته شود. پاپینی و همکاران (Papini *et al.* 2004) دیدگاه‌های جدیدی را براساس توالی هسته‌ای آی.تی.اس. روی *Salicornia* و دیگر جنس‌های مرتبط ارایه نمودند. نتایج نشان داد که جنس یک‌ساله *Salicornia* آرایه خواهری جنس‌های چندساله *Arthrocnemum*، *Sarcocornia* و *Halocnemum* می‌باشد و گونه‌های *Salicornia* براساس سطح پلوییدی در دو گروه مجزا قرار گرفتند.

با توجه به پیشینه اندک تحقیقات در رابطه با گیاه *Halocnemum* در ایران و پراکنش وسیع آن در سطح استان گلستان و همچنین، با توجه به عدم وجود گزارشی مبنی بر ارزیابی تنوع ریخت‌شناسی و ژنتیکی این گیاه، پژوهش حاضر به عنوان نخستین مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی گیاه مذکور در رویشگاه‌های استان گلستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR مؤثر در تفکیک جمعیت آن‌ها انجام گرفت.

روش بررسی

- تهیه و جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

داده‌های ژنتیکی و ریخت‌شناسی بررسی شده در مطالعه حاضر، براساس ۶۵ نمونه از ۱۳ جمعیت *Halocnemum strobilaceum* از نقاط مختلف استان گلستان می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- جمعیت‌های بررسی شده *Halocnemum strobilaceum* در این مطالعه

Table 1. Investigated *Halocnemum strobilaceum* populations in this study

Population	Locality	Collector	Altitude (m)	Longitude	Latitude	Voucher No.
1	Golestan province: Gonbad-e Kavus, Incheboron	Hosseini	1257	54 72 06	37 45 51	804350 (GKUH)
2	Golestan province: Gonbad-e Kavus	Hosseini	1100	55 09 30	37 15 00	804361 (GKUH)
3	Golestan province: East of Gonbad-e Kavus	Hosseini	1320	55 18 02	37 17 14	804357 (GKUH)
4	Golestan Province: Gonbad-e Kavus, Dashli-Boroon	Hosseini	1245	54 80 99	37 63 66	804354 (GKUH)
5	Golestan province: Gomish Tape	Mohamadi	1324	54 07 66	37 07 01	804366 (GKUH)
6	Golestan province: Gomishan	Naeini	1870	54 06 24	37 16 23	804364 (GKUH)
7	Golestan province: Gomishan to Incheboron	Naeini	1754	54 53 12	37 21 02	804372 (GKUH)
8	Golestan province: Aq Qala	Mohamadi	1640	54 45 12	37 01 31	804370 (GKUH)
9	Golestan province: W of Aq Qala	Mohamadi	1573	54 15 13	37 14 02	804351 (GKUH)
10	Golestan province: N of Bandar Torkaman	Naeini	1875	54 09 39	36 89 80	804353 (GKUH)
11	Golestan province: W of Bandar Torkaman	Naeini	1643	54 12 02	36 53 12	804379 (GKUH)
12	Golestan province: Gonbad-e Kavus, Agh Abad	Hosseini	1268	54 20 70	37 12 26	804379 (GKUH)
13	Golestan province: Aq Qala, Anbar Olum	Mohamadi	1354	54 16 12	36 56 12	804368 (GKUH)

شکل ۱ – نقشه توزیع جمعیت‌های *H. strobilaceum* مورد مطالعه در استان گلستان (جمعیت‌ها با توجه به کددهی جدول ۱ از ۱۳-۱ مشخص شده‌اند).

Fig. 1. Distribution map of the studied *H. strobilaceum* populations in Golestan province (based on table 1, populations are marked with numbers 1–13).

- مطالعات ریخت‌شناسی

پس از انجام مطالعات مورد نظر، تعداد ۱۹ صفت کمّی و کیفی برای مطالعات مورفومتری انتخاب شدند (جدول‌های ۲ و ۳). سپس با استفاده از استریومیکروسکوپ دیجیتال Dino-Lite (مدل AM413T) و میکروسکوپ نوری Olympus (مدل B × 51) بررسی‌های لازم صورت گرفت. به منظور انجام آنالیزهای آماری چندمتغیره، برای صفات کمّی از میانگین اندازه‌گیری‌ها در واحدهای جمعیتی استفاده شد و برای صفات کیفی به صورت دو- یا چندحالته کدگذاری شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver. 16 (1988)، بررسی‌های آماری مقدماتی با استفاده از صفات کمّی و کیفی و سپس آنالیزهای آماری چندمتغیره انجام گرفت. همچنین، برای تعیین میزان قرابت گونه‌ها و واحدهای جمعیتی مطالعه شده از روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای و رسته‌بندی براساس مؤلفه‌های اصلی (PCA) حاصل از تجزیه به عامل‌ها استفاده گردید. در واقع، تجزیه به عامل‌ها به منظور مشخص نمودن متنوع‌ترین صفات بین واحدهای جمعیتی مورد بررسی صورت گرفت.

جدول ۲- صفات کمّی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در این مطالعه

Table 2. The quantitative morphological characteristics in this study

Character (mm)	Code
Length of under leaf	l.u.l
Length of middle leaf	l.m.l
Length of upper leaf	l.up.l
Width of under leaf	w.u.l
Width of middle leaf	w.m.l
Width of upper leaf	w.up.l
Length of folia	l.f
Length of branch	l.b
Length of pedicle	l.p
Length of inflorescence	l.inf
Width of inflorescence	w.inf
Length of nutlet	l.n
Width of nutlet	w.n

جدول ۳- صفات کیفی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در این مطالعه

Table 3. The qualitative morphological characteristics in this study

Character	Code	State of character and coding
Vegetation form	p.v.f	Bush (1), Shrub (2)
Leaf shape	s.u.l	Connate (0), oblong (1), oblong-connate (2)
Color of herbage	c.h	Green (1), yellow (2)
Seed shape	s.sh	Oblong (0), elliptic (1), elliptic-ovate (2)
Seed color	s.c	Brown (1), orange (2)
Nutlet shape	sh.n	Ovate (0), elliptic (1), round (2), elliptic-ovate (3)

- استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA کل ژنوم از برگ‌های خشک شده نمونه‌های هرباریومی بر مبنای روش CTAB (Doyle & Doyle 1987) انجام گرفت. به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA از دستگاه نانودراپ استفاده شد. به این منظور، تعداد چهار آغازگر به روش زیر مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۴).

برای انجام واکنش، مقدار ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر (۲۰ نانوگرم DNA) به ۱۳ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل Taq پلیمراز (۱ واحد)، آغازگرها (۱۰pmol)، کلریدمنیزیم (۲ mM)، مخلوط نوکلئوتید (۲/۰ mM)، فرمامید (۳٪)، بافر PCR (۱ X) و آب دو بار تقطیر سترون افزوده شد و در نهایت حجم محلول واکنش PCR به ۱۵ میکرولیتر رسید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Master cycler gradient) با برنامه حرارتی یک سیکل ۳ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در ۵۹-۴۸ درجه سلسیوس برحسب نوع آغازگر، یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و مرحله تکثیر نهایی با ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد و سرانجام محصولات PCR روی ژل آگارز ۲/۵ ٪ الکتروفورز شدند. اندازه قطعات با استفاده از نردبان اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت باز ارزیابی شد. آزمایش با سه بار تکرار و از نوارهای ثابت ISSR برای تجزیه و تحلیل بعد استفاده شد. امتیازبندی نوارها به صورت حضور (۱) و عدم حضور (۰) برای هر نوار صورت گرفت.

- تجزیه و تحلیل داده‌ها (مطالعات مولکولی)

باندهای ISSR مشاهده شده به صورت صفات دوحالته کدگذاری شدند (حضور باند = ۱، عدم حضور = ۰). پارامترهای تنوع ژنتیکی در هر جمعیت مشخص شدند (Freeland *et al*. 2011, Weising *et al*. 2005). قرابت گونه‌ها با استفاده از فاصله ژنتیکی Nei و Li محاسبه شد و از طریق درخت NJ (Neighbor Joining) به دست آمد. فاصله بین جمعیت‌ها با آنالیز PCoA (Principle Coordinate Analysis) (Freeland *et al*. 2011) و MDS (Multidomrimtional Scaling) (Podani 2000) با نرم‌افزار PAST Ver. 2.17 (Hammer *et al*. 2012) انجام شد. آزمون AMOVA (Analysis of Molecular Variance) با نرم‌افزار GENALEX Ver. 6.4 انجام و برای نشان دادن تنوع مولکولی بین جمعیت‌ها استفاده شد (Peakall & Smouse 2006). آزمون Mantel برای مطالعه ارتباط بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی جمعیت‌ها استفاده شد. با استفاده از این آزمون، ضرایب کوفنتیک بین دندروگرام‌ها و ماتریس‌های مربوطه با کمک نرم‌افزار NTSYS محاسبه شد و در نهایت دندروگرامی که بالاترین ضریب همبستگی را با ماتریس مربوطه دارا بود، به عنوان قوی‌ترین درخت برای تجزیه و تحلیل روابط بین جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Podani 2000).

نتیجه

- مطالعات ریخت‌شناسی

آزمون ANOVA تفاوت معنی‌داری را برای تمامی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد ($P < 0.01$). در واقع، صفات مورد استفاده، اختلاف معنی‌داری را بین جمعیت‌ها نشان دادند. انجام تجزیه و تحلیل واریانس، معرف آن است که کلیه صفات مورد استفاده دارای تنوعی معنی‌دار و غیراتفاقی بود (جدول ۷).

فنوگرام رسم شده به روش تجزیه خوشه‌ای (Ward Cluster Analysis)، نشان‌دهنده وجود دو خوشه اصلی می‌باشد (شکل ۲). جمعیت‌های ۴-۱ و ۱۲ شباهت ریخت‌شناسی را نشان داده و خوشه اصلی اول را تشکیل می‌دهند. از طرف دیگر، جمعیت‌های ۱۱-۵ و ۱۳ خوشه اصلی دوم را تشکیل دادند.

نمودار رسته‌بندی PCA (Principle Component Analysis) براساس دو مؤلفه اصلی اول در شکل ۳ بیانگر میزان نزدیکی یا

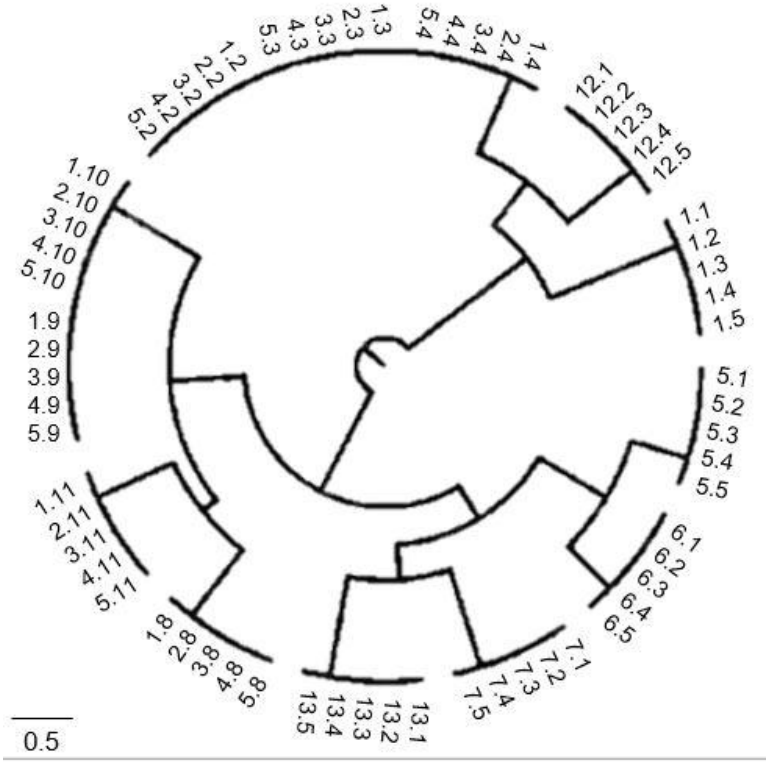
واگرایی جمعیت‌های مطالعه شده براساس این دو مؤلفه می‌باشد. با بررسی تجزیه به عامل‌ها و مقایسه سهم هر یک در تنوع حاصله مشخص شد که دو عامل اول در مجموع سبب ۴۸/۹۹٪ تنوع مشاهده شده هستند. در فاکتور اول که حدود ۲۶/۸۹٪ کل تنوع را نشان می‌دهد، طول انشعاب، شکل دانه و طول گل‌آذین بیشترین ضریب همبستگی (۰/۷ <) را نشان می‌دهند. در فاکتور دوم که ۲۲/۱۰٪ کل تنوع را نشان می‌دهد رنگ گیاه، شکل فندقه، طول برگه و عرض فندقه بیشترین ضریب هبستگی (۰/۷ <) را نمایان می‌سازد.

آزمون Mantel، پس از ۱۰۰۰۰ بار جای‌گشت، ارتباط معنی‌داری (r =۰/۹۸۸، P =۰/۰۰۲۸) بین فاصله جغرافیایی و فاصله ریخت‌شناسی در جمعیت‌ها نشان داد. بنابراین، با انحراف جمعیت‌ها از یکدیگر، از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، واگرایی بیشتری پیدا می‌کنند.

جدول ۴- آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

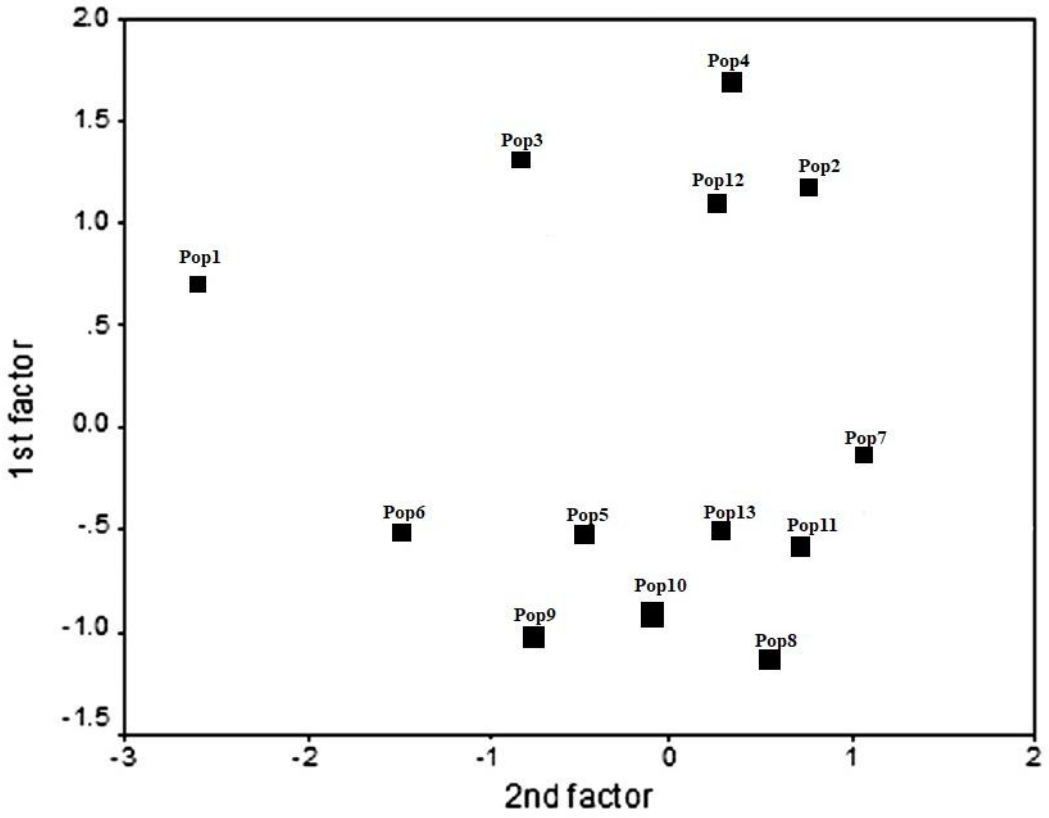
Table 4. The used ISSR primers in this study

Code	Sequence
ISSR13	(ACG) 6Ga
ISSR826	CCCGGATCC (CA)8
ISSR810	(GA) 8T
ISSR7	(AC) 8AG



شکل ۲- فنوگرام رسم شده به روش Ward براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی.

Fig. 2. Ward dendrogram of the studied populations based on morphological traits.



شکل ۳- نمودار رسته‌بندی براساس داده‌های ریخت‌شناختی.

Fig. 3. PCA analysis of morphological data.

جدول ۵- نتایج تجزیه به عامل براساس ویژگی‌های کمّی و کیفی ریخت‌شناختی

Table 5. Results of factor analysis based on quantitative and qualitative morphological traits

Parameter	% Variance	% Cumulative
1	26.89	26.89
2	22.10	48.99

جدول ۶- داده‌های ریخت‌شناختی براساس تجزیه به عامل

Table 6. Morphological data based on factor analysis

Character	Factor 1	Factor 2
Length of branch	0.76	-
Seed shape	0.75	-
Length of inflorescence	0.74	-
Color of herbage	-	0.85
Nutlet shape	-	0.72
Length of folia	-	0.71
Width of nutlet	-	0.70

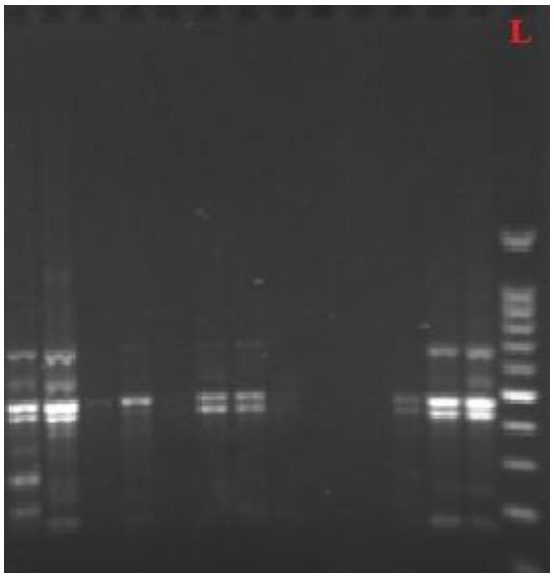
جدول ۷- تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) صفات ریخت‌شناختی

Table 7. Analysis of variance (ANOVA) for morphological characters ANOVA

Morphological trait	Position	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Length of under leaf	Between groups	22506.375	6	3751.062	16.217	0.000
	Within groups	3007.029	13	231.310		
	Total	25513.403	19			
Length of middle leaf	Between groups	3851.237	7	550.177	1.170	0.391
	Within groups	5173.500	11	470.318		
	Total	9024.737	18			
Length of upper leaf	Between groups	1400.433	4	350.108	2.703	0.092
	Within groups	1295.167	10	129.517		
	Total	2695.600	14			
Width of under leaf	Between groups	175.881	6	29.313	2.884	0.052
	Within groups	132.135	13	10.164		
	Total	308.015	19			
Width of middle leaf	Between groups	71.593	7	10.228	1.970	0.151
	Within groups	57.122	11	5.193		
	Total	128.716	18			
Width of upper leaf	Between groups	173.543	4	43.386	7.766	0.004
	Within groups	55.866	10	5.587		
	Total	229.409	14			
Length of calyx	Between groups	69.400	10	6.940	10.962	0.000
	Within groups	12.029	19	0.633		
	Total	81.429	29			
Length of folia	Between groups	244.403	11	22.218	5.473	0.001
	Within groups	73.069	18	4.059		
	Total	317.472	29			
Length of pedicle	Between groups	6.654	10	0.665	3.762	0.011
	Within groups	2.653	15	0.177		
	Total	9.308	25			
Length of inflorescence	Between groups	13.821	11	1.256	3.982	0.003
	Within groups	6.941	22	0.316		
	Total	20.763	33			
Width of inflorescence	Between groups	1.105	11	0.100	6.830	0.000
	Within groups	0.324	22	0.015		
	Total	1.429	33			
Length of nutlet	Between groups	62.920	6	10.487	92.790	0.000
	Within groups	1.243	11	0.113		
	Total	64.163	17			
Width of nutlet	Between groups	3.388	6	0.565	9.065	0.001
	Within groups	0.685	11	0.062		
	Total	4.074	17			

- مطالعات مولکولی

آغازگرهای ISSR ۲۷ باند تولید کردند. قدرت تمایز مکان‌های ISSR نشان داد که تقریبا همه جایگاه‌های ISSR قدرت تفکیک عالی دارند (شکل ۴). بنابراین، نشانگرهای ISSR در تمایز جمعیت گیاه *H. strobilaceum* مورد مطالعه کارآمد هستند. آزمون AMOVA تفاوت ژنتیکی قابل توجهی را بین جمعیت‌های مورد مطالعه به وجود آورد (P = 0.001) که نشان می‌دهد جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر ژنتیکی متفاوت هستند (جدول ۸). AMOVA نشان داد که ۹۴٪ از کل اختلاف ژنتیکی به دلیل تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها و ۶٪ به دلیل تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بود. این نتایج سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های *H. strobilaceum* را نشان می‌دهد.



شکل ۴- تعدادی از نمونه‌های تفکیک شده توسط نشانگر ISSR7.

Fig. 4. Some species fragmented by ISSR7 marker.

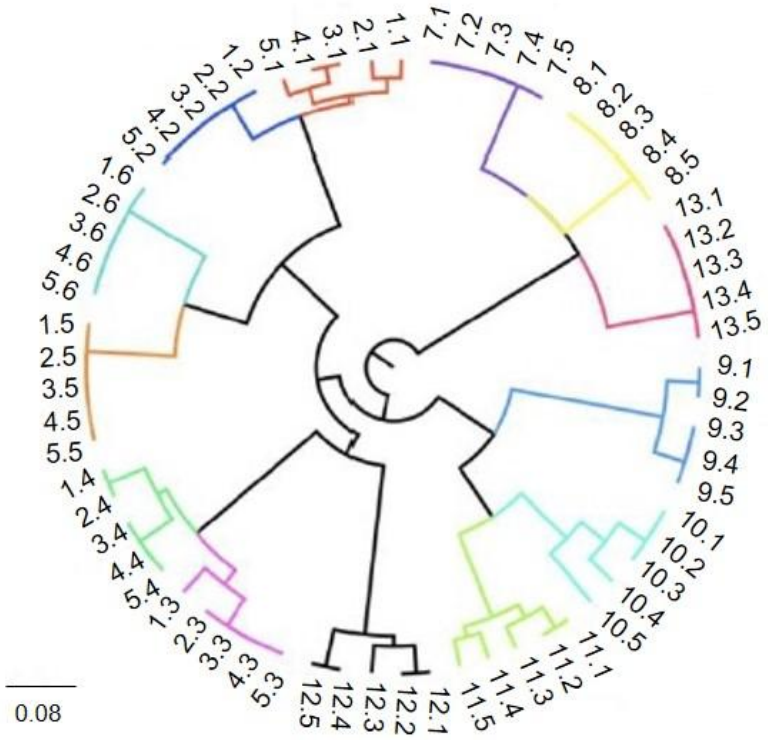
جدول ۸- نتایج آزمون AMOVA برای جمعیت‌های مورد مطالعه

Table 8. Pair-wise AMOVA between *Halocnemum strobilaceum* populations

AMOVA	Pop. 1	Pop. 2	Pop. 3	Pop. 4	Pop. 5	Pop. 6	Pop. 7	Pop. 8	Pop. 9	Pop. 10	Pop. 11	Pop. 12	Pop. 13
Pop. 1	0.000	0.0100	0.020	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.020	0.0100	0.010	0.010	0.020
Pop. 2	0.584	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.010	0.010	0.010
Pop. 3	0.594	0.310	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.000	0.010	0.020	0.010	0.010
Pop. 4	0.755	0.524	0.336	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.020	0.000	0.010	0.030	0.010
Pop. 5	0.715	0.428	0.343	0.520	0.000	0.010	0.010	0.010	0.324	0.245	0.010	0.020	0.010
Pop. 6	0.724	0.560	0.619	0.732	0.591	0.000	0.010	0.010	0.574	0.010	0.020	0.623	0.030
Pop. 7	0.632	0.505	0.527	0.676	0.506	0.351	0.000	0.030	0.424	0.020	0.010	0.010	0.000
Pop. 8	0.519	0.448	0.453	0.591	0.485	0.467	0.223	0.000	0.220	0.030	0.010	0.020	0.010
Pop. 9	0.434	0.320	0.210	0.520	0.010	0.030	0.010	0.010	0.313	0.020	0.010	0.010	0.000
Pop. 10	0.623	0.234	0.410	0.650	0.316	0.010	0.220	0.010	0.524	0.020	0.010	0.010	0.010
Pop. 11	0.504	0.310	0.497	0.513	0.330	0.010	0.210	0.010	0.584	0.010	0.010	0.010	0.000
Pop. 12	0.484	0.200	0.310	0.718	0.443	0.010	0.010	0.020	0.284	0.020	0.010	0.010	0.010
Pop. 13	0.598	0.300	0.416	0.515	0.340	0.010	0.020	0.030	0.752	0.010	0.010	0.010	0.010

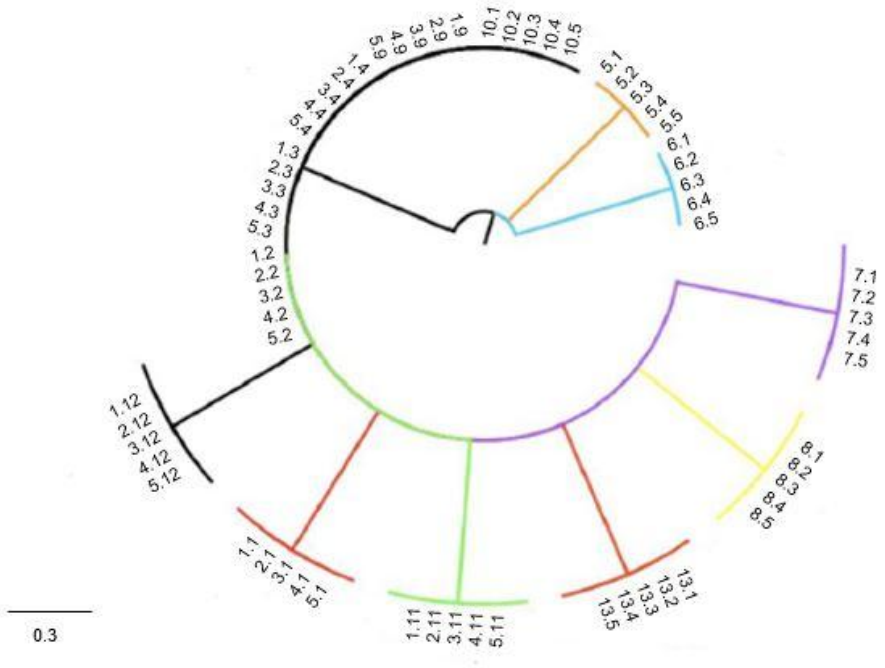
رابطه جمعیت‌ها توسط نشانگرهای Ward نشان داده شده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی (شکل ۲) و داده‌های مولکولی (شکل ۵) در برخی موارد ناسازگار ولی در بیشتر موارد سازگار است. به عنوان مثال، کلاد حاوی جمعیت‌های ۸-۷ و ۱۳ در درخت ریخت‌شناسی و درخت مولکولی تفاوت نشان می‌دهد. احتمالا این مطلب به دلیل آن است که برخی از صفات ریخت‌شناسی انتخاب شده بیشتر تحت تاثیر محیط و نه ژنوتیپ هستند. این یافته در درخت اجماع (شکل ۶) نیز به خوبی نشان داده شده است. همچنین، این درخت نشان داد که در بیشتر موارد (به غیر از جمعیت ۱۱)، جمعیت‌های مورد مطالعه هم در درخت ریخت‌شناسی و هم در درخت مولکولی رابطه یکسانی را نمایان می‌سازند. به عنوان مثال، جمعیت‌های ۴-۱ و ۱۲ نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند. همین امر در مورد جمعیت‌های ۸-۵ و ۱۳ و همچنین در جمعیت‌های ۹ و ۱۰ صدق می‌کند.

آزمون Mantel پس از ۱۰۰۰۰ بار جای‌گشت، بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه، ارتباط همبستگی معنی‌داری را به دست آورد ($P < ۰/۰۱$). این نتایج نشان می‌دهد که جمعیت‌هایی که از هم مجزا می‌شوند، از نظر ویژگی‌های ژنتیکی نیز متفاوت هستند.



شکل ۵- فنوگرام رسم شده به روش Ward براساس داده‌های مولکولی.

Fig. 5. Ward dendrogram of the studied populations based on ISSR data.



شکل ۶- درخت اجماع براساس دندروگرام‌های ریخت‌شناسی و مولکولی در جمعیت‌های مورد مطالعه.
Fig. 6. Consensus tree based on morphological- and ISSR dendrograms in studied populations.

بحث

تنوع ژنتیکی در تداوم گونه‌های گیاهی از اهمیت اساسی برخوردار است، زیرا برای ایجاد سازگاری لازم برای کنار آمدن با تغییرات محیطی مورد استفاده قرار می‌گیرد. جمعیت‌هایی که دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند، در مقایسه با جمعیت‌هایی که درجه تنوع ژنتیکی کمتری دارند، شانس زنده ماندن بیشتری دارند (Sheidai *et al*. 2012, 2013, 2014) این امر به ویژه در *H. strobilaceum* با توزیع جغرافیایی گسترده در ایران انتظار می‌رود.

سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین جمعیتی (۹۴٪) در *H. strobilaceum* مشاهده شد. ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌های داخل یک گونه برای درک بهتر فرایندهای تکاملی و ماهیت گونه حیاتی است. آزمون AMOVA تفاوت ژنتیکی قابل توجهی را در بین جمعیت‌های مورد مطالعه نمایان ساخت (P=0.001) که نشان می‌دهد جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر ژنتیکی متفاوت هستند. با توجه به این که گونه *H. strobilaceum* باد گرده افشان است، دارای پراکنش بسیار وسیع بوده و دامنه صفات بسیار گسترده در بخش بزرگی از جهان قدیم دارد و تاکنون هم به صورت گونه‌های مجزا یا زیرگونه‌ها و واریته‌ها در این گستره وسیع جغرافیایی تفکیک نشده و انتظار می‌رفت که دارای شارش ژنتیکی بین جمعیتی بالا برای حفظ پیوستگی درون گونه‌ای و هویت گونه‌ای خود باشد. احتمال دارد با توجه به این که این مطالعه در محدوده جغرافیایی کم و تنها در سطح استان گلستان انجام گرفته، این فرضیه محقق نشده است. احتمالا به دلیل درجه کم جریان ژن در بین جمعیت‌های مورد مطالعه، اختلافات ژنتیکی افزایش می‌یابد. در مواردی که فقدان کامل یا مقدار بسیار کم جریان ژن وجود دارد، رانش ژنتیکی یک نیروی تکاملی قوی است و سطح بالایی از همگنی ژنتیکی درون جمعیتی را ایجاد می‌کند که ممکن است به سازگاری لازم با زیستگاه‌های محلی منجر شود (Hou & Lou 2011). در واقع، بسیاری از گونه‌های گیاهی در محدوده‌ای از زیستگاه‌های مشخص رشد می‌کنند و استراتژی‌های سازگارانه متناسب با زیستگاه خاص آن‌ها را توسعه داده‌اند (Schneller & Liebt 2007).

نصرالهی و طهماسبی (Nasrollahi & Tahmasebi 2021)، با روش تحلیل متفاوت به مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه *H. strobilaceum* پرداختند و در مجموع نتایج نشان دادند که نشانگر ISSR، نشانگری قابل اطمینان در آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاه مذکور در مطالعات اصلاحی آینده مناسب می‌باشد که این مطلب با نتایج تحقیق حاضر نیز سازگاری دارد.

داده‌های ISSR مشابهت ژنتیکی بین جمعیت‌های ۴-۱ و ۱۲ را نشان داد. در واقع، این جمعیت‌ها از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی نیز با جمعیت‌های دیگر متفاوت هستند. این جمعیت‌ها از نظر جغرافیایی نزدیک یکدیگر قرار دارند و در شرق استان گلستان واقع شده‌اند (شکل ۱). همین طور، داده‌های ISSR مشابهت ژنتیکی بین جمعیت‌های ۱۱-۷ و ۱۳ را نشان داد. این نتیجه نیز با داده‌های ریخت‌شناسی همخوانی دارد. این جمعیت‌ها، منطقه پراکندگی یکسانی دارند و در غرب استان گلستان قرار می‌گیرند (شکل ۱). لذا، می‌توان نتیجه گرفت که ویژگی‌های محیطی (عرض و طول جغرافیایی و ارتفاع) به طور هم‌زمان جریان ژن و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، جمعیت‌های واگرا ممکن است گروه‌های مختلف طبقه‌بندی زیر سطح گونه در *H. strobilaceum* را نشان دهند. در بسیاری از مطالعات، به دلیل اختلافات ژنتیکی بین جمعیتی و به دنبال آن واگرایی ریخت شناسی جمعیت، اکوتایپ‌های مختلفی گزارش شده است (Sheidai *et al*. 2012, 2013, 2014, Minaeifar *et al.* 2015, 2016).

ارزیابی سطح تغییرات ژنتیکی بین جمعیتی برای اولویت‌بندی جمعیت‌ها برای اقدامات حفاظتی استفاده می‌شود (Toro & Caballero 2005). اگر همه جمعیت‌ها یکسان باشند، وزن بیشتر به آن‌هایی داده می‌شود که سطوح بالاتری از تغییر در بین جمعیت را نشان می‌دهند و یا از نظر ژنتیکی از دیگران متفاوت هستند. نتایج تجزیه و تحلیل ژنتیکی نشان می‌دهد که همراه با رانش ژنتیکی، سطح پایین جریان ژن و مهاجرت، مکان‌های سازگار نیز به جمعیت‌ها کمک می‌کند تا این جمعیت‌ها را از هم جدا کرده و با شرایط محلی خود سازگار کنند (Sheidai *et al*. 2012).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر ثابت کرد که ویژگی‌های ریخت‌شناسی و داده‌های مولکولی ISSR، در تمایز جمعیت *H. strobilaceum* مورد مطالعه مفید است. همچنین، هر دو ویژگی ریخت‌شناسی کمّی و کیفی برای تمایز جمعیت گونه مورد مطالعه نیز مهم و مناسب هستند. بررسی تجزیه به عامل‌ها نشان داد که در فاکتور اول صفات طول انشعاب، شکل دانه، طول گل‌آذین و در فاکتور دوم صفات رنگ گیاه، شکل فندقه، طول برگه و عرض فندقه بیشترین ضریب همبستگی را نشان می‌دهند. مطالعه حاضر، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین جمعیتی را در گیاه مورد نظر نشان داد. همچنین، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به روش Ward براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و داده‌های مولکولی، اطلاعات قابل توجهی را در روابط جامعه مورد مطالعه نمایان ساخت.

References

Assadi, M. 2001. Chenopodiaceae. Pp. 27–65. *In*: Assadi, M., Maassoumi, A.A. & Khatamsaz, M. (eds), Flora of Iran 38. Tehran.

Biondi, E., Casavecchia, S., Estrelles, E. & Soriano, P. 2013. *Halocnemum* M. Bieb. Vegetation in the Mediterranean basin. Plant Biosystems. DOI: 10.1080/11263504.2013.832709.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19(1): 11–15.

El-Senosy Neima, K., Younis, A., Rania, A., Khalil, A., Rasha, M. & Mohamed, M. Abd El-Maboud. 2015. Antioxidant Enzymes and Molecular Markers Associated with Salinity Tolerance of *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) Bieb. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 15(4): 648–658.

Freeland, J.R., Kirk, H. & Peterson, S.D. 2011. Molecular Ecology, 2nd. ed. Wiley-Blackwell, UK, 449 pp.

Hammer, Q., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. 2012. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 9.

Hosseini, S.A. & Shahmoradi, A.A. 2011. Autecology of *Halocnemum strobilaceum* (Pall.) M. Bieb. in Saline and Alkaline Rangelands of Golestan Province. Journal on Plant Science Researches 22(6): 18–30.

Hosseini, S.A., Shahmoradi, A.A. & Abarsaji, Gh. 2016. An Investigation on the Presence Form of *Halocnemum strobilaceum* in Saline and Alkaline Rangelands of Northern Golestan Province. Iranian Journal of Range and Desert Research 14(2): 110–123.

Hou, Y. & Lou, A. 2011. Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). PLOS ONE. doi.org/10.1371/journal.pone.0024497.

Kadereit, G., Mucina, L. & Freitag, H. 2006. Phylogeny of Salicornioideae (Chenopodiaceae): diversification, biogeography, and evolutionary trends in leaf and flower morphology. Taxon 55(3): 617–642.

Minaeifar, A., Sheidai, M. & Attar, F. 2015. Genetic and morphological diversity in *Cousinia cylindracea* (Asteraceae) populations: Identification of gene pools. Biodiversitas 16: 288–294.

Minaeifar, A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z. & Ghasemzadeh-Baraki, S. 2016. Biosystematic study in the genus *Cousinia* Cass. (Asteraceae), section *Cousinia*. Biochemical Systematics and Ecology 69(1): 252–260.

Nasrollahi, F. & Tahmasebi, A. 2021. Genetic study of *Halocnemum strobilaceum* (Amaranthaceae) with the use of ISSR molecular markers in Golestan province. The 2nd. International and 5th National Conference on Conservation of Natural Resources and Environment.

Papini, A., Trippanera, G.B., Maggini, F., Filigheddu, R.S. & Biondi, E. 2004. Plant Biosystems 138(3): 215–223.

Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6(1): 288–295.

Podani, J. 2000. Introduction to the Exploration of Multivariate Data. Backhuyes: Leiden, 407 pp.

Schneller, J. & Liebst, B. 2007. Patterns of variation of a common fern (*Athyrium filix-femina*; Woodsiaceae). population structure along and between altitudinal gradients. American Journal of Botany 94(1): 965–971.

Sheidai, M., Seif, E., Nouroozi, M. & Noormohammadi, Z. 2012. Cytogenetic and molecular diversity of *Cirsium arvense* (Asteraceae) populations in Iran. Journal of Japanese of Botany 87(2): 193–205.

Sheidai, M., Zanganeh, S., Haji-Ramezanali, R., Nouroozi, M., Noormohammadi, Z. & Ghasemzadeh-Baraki, S. 2013. Genetic diversity and population structure in four *Cirsium* (Asteraceae) species. Biologia 68(1): 384–397.

Sheidai, M., Ziaee, S., Farahani, F., Talebi, S.M., Noormohammadi, Z., Hasheminejad & Ahangari Farahani, Y. 2014. Infra-specific genetic and morphological diversity in *Linumalbum* (Linaceae). Biologia 69(2): 32–39.

Toranjzar H. & Fathi, A. 2016. Study of the Morphometric Characteristics of *Halocnemum strobilaceum* Nebkhas type in Mighan Playa (Arak). The Desert Ecosystem Engineering Journal 4(9): 35–42.

Toro, M.A. & Caballero, A. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 360(2): 1367–1378.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. & Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods, and Applications, 2nd ed. 472. CRC Press, Boca Rayton, Fl, USA, pp. 1–17.