Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluation of genetic diversity of *Alhagi maurorum* ecotypes using ISSR and SCoT markers in Razavi, Northern and Southern Khorasan provinces

Mohammad Zabet

*Corresponding author. Associate professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail address: mzabet@birjand.ac.ir

Samane Pishghadam

MSc Student of plant breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail address: Smn.pishghadam@birjand.ac.ir

Zohre Alizadeh

Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail address: zoalizadeh@birjand.ac.ir

Abstract

Objective

The camelthorn (*Alhagi maurorum*) is one of the compatible plant species with arid and semi-arid regions that is important for forage production, soil protection and medicine. This research was carried out in order to investigate the genetic diversity of camelthorn ecotypes, to determine the similarities and differences between ecotypes and to recognize the genetic structure of different camelthorn ecotypes using ISSR and SCoT markers.

Materials and methods

The 22 ecotypes from different regions of North, Razavi and South Khorasan provinces were studied. The DNA was extracted by the CTAB method. The 12 ISSR and 18 SCoT primers were used in the molecular analysis.

Results

The polymorphism percentages in the two markers were 99.42% and 95.42%, respectively. In the ISSR and SCoT markers, the IS5, IS8, IS10 and S2, S4, S6, S7, and S10 primers amplified the highest number of bands, respectively, and the IS1, IS2, IS3, IS6 and S1 amplified the lowest bands, respectively. In the ISSR and SCoT markers, the IS6 (0.44) and S12 (0.44) primers had

the highest PIC value, respectively, and the IS4 (0.09) and S1(0.04) primers had the lowest PIC value. In the ISSR marker, the IS6 primer had the highest and the IS2, and IS10 primers had the lowest Nei genetic diversity index and Shannon information index, respectively. In the SCoT marker, the S14 primer had the highest, and the S1 primer had the lowest Nei genetic diversity index and Shannon information index, respectively. The cluster analysis classified the ecotypes into three groups. The molecular analysis of variance showed that the 9%, 14% and 91%, 86% of the total genetic variation were related to the within and between groups in ISSR and SCoT markers, respectively.

Conclusions

This study demonstrated the accuracy of the ISSR and SCoT markers in identifying high levels of polymorphism and was appropriate for investigating the genetic diversity amongst camelthorn ecotypes. The IS6 and S12, and S14 primers were recognized as the best primers in this study, and it is suggested that these primers be considered in future studies. In total, the results showed that the diversity within populations was higher than the diversity between populations, which indicates that the geographical distribution does not follow of genetic diversity in the camelthorn plant.

Keywords: Cluster analysis, Molecular Index, Nei and Shannon Indices, Polymorphism

Paper Type: Research Paper.

Citation: Zabet M, Pishghadam S, Alizadeh Z (2023) Evaluation of genetic diversity of Alhagi maurorum ecotypes using ISSR and SCoT markers in Razavi, Northern and Southern Khorasan provinces *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 81-106.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 81-106. DOI: 10.22103/jab.2022.18997.1383

Received: November 20, 2022. Received in revised form: December 28, 2022.

Accepted: December 29, 2022. Published online: February 18, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های خارشتر در سه استان خراسان شمالی، رضوی و جنوبی با استفاده از نشانگرهای ISSR و SCoT

محمد ضابط

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: mzabet@birjand.ac.ir

سمانه پیش‌قدم

دانشجوی اسبق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: Smn.pishghadam@birjand.ac.ir

زهره علیزاده

استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: zoalizadeh@birjand.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸

چکیده

هدف: خارشتر یکی از گونه‌های گیاهی سازگار با مناطق خشک و نیمه خشک است که از لحاظ تولید علوفه، حفاظت خاک و دارویی اهمیت دارد. این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های خارشتر، تعیین شباهت و تفاوت بین اکوتیپ‌ها و مشخص نمودن ساختار ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف خارشتر با استفاده از نشانگرهای ISSR و SCoT صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: ۲۲ اکوتیپ خارشتر از نواحی مختلف سه استان خراسان شمالی، رضوی و جنوبی مورد مطالعه قرار گرفت. استخراج DNA به روش CTAB صورت گرفت. از ۱۲ آغازگر ISSR و ۱۸ آغازگر SCoT در تجزیه‌های مولکولی استفاده شد.

نتایج: در کل درصد چندشکلی در دو نشانگر به ترتیب ۹۹/۴۲ و ۹۵/۴۲ درصد بود. بیشترین تعداد باند در نشانگر ISSR متعلق به آغازگرهای IS5، IS8 و IS10 و در نشانگر SCoT متعلق به آغازگرهای S2، S4، S6، S7 و S10 و کمترین تعداد باند تکثیر شده در نشانگر ISSR متعلق به آغازگرهای IS1، IS2، IS3 و IS6 و در نشانگر SCoT متعلق به آغازگر S1 بود. در نشانگر ISSR بیشترین میزان PIC محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به آغازگر IS6 (۰/۴۴) و کمترین میزان مربوط به آغازگر IS4

(۰/۰۹) و در نشانگر SCoT بیشترین میزان مربوط به آغازگر S12 (۰/۴۴) و کمترین میزان مربوط به آغازگر S1 (۰/۰۴) بود. در نشانگر ISSR بیشترین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به آغازگر IS6 و کمترین آن مربوط به آغازگر IS2 و IS10 و در نشانگر SCoT بیشترین مقدار مربوط به آغازگر S14 و کمترین مقدار مربوط به آغازگر S1 بود. در نشانگرهای ISSR و SCoT تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌ها را در ۳ و ۶ گروه دسته‌بندی نمود. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۹ و ۱۴ درصد از تغییرات مربوط به بین گروه‌ها و ۹۱ و ۸۶ درصد به درون گروه‌ها به ترتیب در نشانگر ISSR و SCoT بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که نشانگرهای ISSR و SCoT نشانگرهای قابل اعتمادی در شناسایی سطوح بالایی از چندشکلی و برای بررسی تنوع ژنتیکی خارشتر نشانگرهای مناسبی بودند. آغازگر IS6 و آغازگرهای S12 و S14 به عنوان بهترین آغازگرها در این مطالعه شناخته شدند و پیشنهاد می شود در مطالعات آتی مد نظر قرار گیرند. به طور کل نتایج نشان داد که تنوع درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها بوده که دلالت بر عدم تبعیت تنوع جغرافیایی از تنوع زنتیکی در گیاه خارشتر می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: تجزیه‌خوشه‌ای، چندشکلی، شاخص‌مولکولی، شاخص نی و شانون

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ضابط محمد، پیش‌قدم سمانه، علیزاده زهره (۱۴۰۲) ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های خارشتر در سه استان خراسان شمالی، رضوی و جنوبی با استفاده از نشانگرهای ISSR و SCoT. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۸۱-۱۰۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

خارشتر با نام علمی *Alhagi maurorum*، متعلق به خانواده نیام‌داران[1] است (Adnaei et al. 2013). خارشتر گیاهی چند ساله و پایا است. فرم رویشی آن به صورت بوته‌ای، نیمه درختچه‌ای و نیمه‌چوبی است. ارتفاع آن بین ۵۰ تا ۸۰ سانتی متر، ساقه سبز رنگ، منشعب و دارای خار، برگ‌ها ساده، به تعداد کم، متناوب، کامل، مستطیلی یا تخم‌مرغی شکل است (Zargari 1996). خارشتر را در خاک‌های خشک، صخره‌ای و نمکی می‌توان یافت (Hassanein & Mazen 2001). به‌دلیل پوست سخت دانه و وزن ۱۰۰۰ دانه زیاد براحتی توسط بذر تکثیر و گسترش نمی‌یابند و بیشتر از طریق تکثیر رویشی گسترش می‌یابد (Barati et al. 2006; Zargari 1996). نوعی زنجرک با نام علمی نام پوفیلوس نبولوس[2] با فرو کردن خرطوم

[1]. Fabaceae
[2]. Poophilus nebulosus Leth

خود در داخل کیسه‌های ترشحی گیاه و تغذیه کردن از آن مان یا ترنجبین را بر روی برگ گیاه ترشح می‌کند (Yaghmaei and Karimpour 2008). خارشتر یکی از فـراورده‌هـای مـورد مصـرف در داروسازی و طب‌سنتی است و امکان صادرات آن بـه خارج کشور وجود دارد (Barati et al. 2006). به‌نژادی گیاهان بر پایه ایجاد تنوع و گزینش ژنوتیپ مطلوب استوار است. داشتن تنوع یکی از ابزارهای اولیه در به‌نژادی گیاهان است (Bagheri et al. 2012). اولین قدم در اصلاح خصوصیات گیاهی، شناخت خصوصیات ژنتیکی نمونه‌های موجود در خزانه ژنی است (Mohammadi 2006). به منظور حفظ، ارزیابی و استفاده از خزانه ژنی کارآمد و موثر برای بازده و ایجاد ثبات تولید در هنگام مواجه با تنش‌های محیطی و شـیوع بیماریها نیاز به بررسـی میزان تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی/ژنتیکی می‌باشد (Gept 1993).

نشـانگر مولکولی[3] SCoT یا کدون‌های آغاز مورد هدف، بر اسـاس توالی‌های آغاز (ATG) طراحی می‌شـوند و نواحی بین کدون‌های آغاز طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و تفاوت‌ها آشـکار می‌شـود. آغازگرهای SCoT معمولاً ۲۴-۱۸ نوکلئوتیدی هستند و محتوای C و G آنها ۵۰ تا ۷۲ درصد است (Kalendar 2007). سیستم این نشانگر غالب بوده، آغازگر تک رشته‌ای به رشته‌های مخالف DNA الگو، در جهت عکس هم متصل می‌شوند و فاصله بین آنها تکثیر می‌شود. اگر جهش‌های حذف یا اضافه در محل اتصـال آغازگر رخ دهد، شـاهد عدم اتصـال آغازگر و عدم سـنتز قطعه DNA خواهیم بود (Davis et al. 1995). نشـانگرهای SCoT در مقایسـه با ISSR و RAPD از تکرارپذیری بیشـتری برخوردارند و عقیده بر این اسـت که طول و دمای اتصـال آغازگرها تنها عواملی نیسـتند که در تکرارپذیری الگوی باندبندی آنها نقش دارند. از مزایای این نشـانگر می‌توان به آسـان بودن و کم هزینه بودن، چند شکلی بالا، آ شکار سازی اطلاعات ژنتیکی و سیع و فراگیر بودن آغازگرهای آن در ژنوم گیاهان ا شاره کرد، افزون بر این، در طراحی آغازگرهای این نشـانگر به اطلاع از توالی نوکلئوتیدی ژنوم نیاز نیسـت (Collard & Mackill 2009). این نشانگرها علاوه بر گیاهان در دامنه وسیعی از جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Askari et al. 2010; Ghasemi et al. 2010; Askari et al. 2011; Zamani et al. 2011; Mohammadabadi and Askari, 2012; Zamani et al. 2015; Bahador et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2021). به طور کل مطالعات اندکی در زمینه خارشـتر و تنوع ژنتیکی آن صـورت گرفته اسـت، لذا در ذیل به مطالعات مشـابه در گیاهان دیگر اشـاره می‌گردد. مطالعه جمعیت‌های مختلف گونه‌های *A. pseudoalhagi* و *A. graecorum* خارشـتر از نظر رفتار میوزی نشـان داد که تعداد کروموزوم‌ها در همه گونه‌ها 2n=2x=16 بود. جمعیت‌های مورد مطالعه رفتار میوزی منظمی نشان دادند و ناهنجاری‌هایی مانند پل آنافازی در آنافاز I، چسبندگی در متافاز I، کروموزوم‌های سرگردان در متافاز I و آنافاز I، وجود بی‌والنت حلقه‌ای و میله‌ای، یونی‌والنت، کوادری‌والنت و تری‌پلار مشاهده شد که چنین تغییرات ساختاری در کروموزوم‌ها باعث افزایش تنوع ژنتیکی شده و سازگاری با شرایط محیطی را می‌توانـد افزایش دهـد (Ebrahimpour Norabadi 2012). مطـالعـه دو گونـه *A. graecorum* و *pseudalhagi* از

[3]. Start codon targeted

نظرکاریوتیپی و پروتئین‌های ذخیره‌ای، وجود اختلاف در شـــکل و اندازه کروموزوم‌ها و نیز رفتار کروموزوم‌ها در مراحل مختلف تقسـیم میوز بویژه تشـکیل کیاسـما را نشـان داد که می‌تواند بیانگر اختلاف ژنتیکی باشـد که در نهایت منجر به درک و فهم بهتر فرآیندهایی است که باعث تکامل و تنوع ژنتیکی در این گیاه شده است (Sheidai & Rashid 2007). به منظور تمایز گونه‌ها و تعیین ساختار جمعیتی گونه‌های خار شتر از هشت آغازگر ISSR برای غربال‌گری ۲۲ جمعیت شامل ۱۱۰ ژنوتیپ استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای به وضوح همه جمعیت‌های خارشتر در ایران را به دو گونه *A. pseudalhagi* و *A. maurorum* متمایز نمودند. تجزیه و تحلیل‌های بیشتر، تفاوت مولکولی قابل‌توجهی را بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد. از کل تنوع مشاهده شده میزان زیادی از تنوع مربوط به بین جمعیت‌ها بود (۷۹ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها و ۲۱ درصد مربوط به درون جمعیت‌ها بود) که نشـــان‌دهنده تبادلات ژنتیکی مکرر بین جمعیت‌های مورد مطالعه بود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نداشت (Amirkhosravi et al. 2021).

در بررسی تنوع ژنتیکی گون سفید با استفاده از نشانگر ISSR دو آغازگر انتخاب شده ۴۰ جایگاه چندشکلی نشان دادند. در تجزیه واریانس مولکولی، ۸۸/۶۹ درصـد از تغییرات به تنوع در جمعیت نسـبت داده شـد. جریان ژنی بالا (۳/۹۳–۳/۹۱) و درصـد انحراف کم از تعادل هاردی واینبرگ به دلیل تقسیم جمعیت مشاهده شد. این نتایج نشان داد که تهدیدهای فعلی تخریب مراتع هنوز بر تنوع ژنتیکی این گونه تأثیری نداشته است (Andrew et al. 2004). ارزیابی سی و سه توده یونجه با استفاده از نشانگر ISSR نشان داد که با وجود شباهت بسیار زیاد بین دو جمعیت مرکز و شرق ایران از نظر ساختار ژنتیکی تنوع بسیار بالایی بین افراد وجود دارد (Rezaie et al. 2011). به منظور بررســی تنوع فنوتیپی و مولکولی رازیانه Farshadfar et al (2017) ۱۶ اکســشــن را مورد ارزیابی قرار دادند. آغازگرهای SCoT در مجموع ۵۵ باند تولید کردند و آغازگرهای SC5 و SC29 بیشــترین تعداد نوار (۱۰و ۹) را تولید کردند. شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی ۰/۳۶، شاخص نشانگری ۱/۸۲، شاخص نسبت چندگانه موثر ۴/۸۰، شاخص قدرت تفکیک ۵/۸۶ و میزان شباهت ژنتیکی برابر با ۰/۶۷ بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای، اکسشن‌ها را در ۳ دسته قرار داد که با نتایج تجزیه به مختصات اصلی همخوانی داشت (Farshadfar et al. 2017). در مطالعه تنوع ژنتیکی دو گونه *L. multiflorum* و *L. perenne* با ۱۵ آغازگر SCoT در مجموع ۸۶ باند تولید شـد که از این تعداد ۷۴ باند چندشــکل بودند. آغازگرهای SC35 و SC36 بیشـترین تعداد باند (۹) و آغازگرهای SC10 کمترین تعداد باند (۲) را تولید نمودند. بیشـترین میزان شاخص قدرت تفکیک، شاخص نشانگری و نسبت چندگانه موثر را آغازگرهای SC26 و SC35 داشتند. میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها ۶۴ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۲ گروه قرار داد، به طوری‌که گونه‌ها صد در صد از یکدیگر تفکیک شدند. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی تنوع درون گونه‌ها ۵۱ و بین گونه‌ها ۴۹ درصد بود. بر اساس شاخص شانون و شاخص هتروژنتیکی مورد انتظار بیشـترین تنوع در گونه *L. multiflorum* مشـاهده شـد (Farshadfar et al. 2018). در بررسـی قابلیت نشـانگر SCoT برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گوجه فرنگی ۱۵ آغازگر ۲۰۷ نوار تولید نمودند که ۲۰۶ نوار آن چندشــکل بود. اندازه نوارها بین

۲۵۰ تا ۳۲۰۰ جفت باز متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی و میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی به ترتیب ۹۹/۵۲ و ۰/۳۰ برآورد شد. تجزیه خوشه‌ای ارقام را به سه خوشه تقسیم کرد. در تجزیه به مختصات اصلی سه مؤلفه اول ۵۸/۸۲ درصد تغییرات مولکولی را توجیه کردند. آغازگرهای SCoT12 و SCoT23 با داشتن محتوای اطلاعات چند شکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندشکلی مؤثر و قدرت تفکیک بالا کارایی مناسبی در تمایز ارقام داشتند (Mirzaei & Salari 2021).

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی با بررسی صفات مورفولوژیکی و در سطح DNA با استفاده از ابزارها و فن‌های مبتنی بر آن انجام می‌گردد (Zahid et al. 2009). در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی مطالعات وسیعی در گیاهان مختلف صورت گرفته است (Noorian & Shirvani 2019; Mirzaei & Salari 2021; Moshrefi-Araghi et al. 2020;)، اما در مورد خارشتر به خصوص اکوتیپ‌هایی که در ایران وجود دارد، مطالعات بسیار اندکی صورت گرفته است. با توجه به وجود جمعیت‌های متفاوت و همچنین اکوتیپ‌های ژنتیکی مختلف که در اقلیم‌های مختلف کشور می رویند به نظر می‌رسد که تفاوت‌هایی از نظر ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های خارشتر وجود داشته باشد. توجه به آنکه خارشتر در اکثر نقاط سه استان خراسان می‌روید و از طرفی با توجه به مطالعات اندکی که در زمینه خارشتر صورت گرفته است، لذا این تحقیق به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف و دسته‌بندی آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی، تعیین شباهت و تفاوت بین اکوتیپ‌ها، بررسی کارایی نشانگرهای مولکولی ISSRو SCoT در متمایز نمودن جمعیت‌ها، تعیین بهترین آغازگر در شناسایی تنوع موجود و مشخص نمودن ساختار ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف خارشتر با استفاده از این نشانگرها صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور ۲۲ اکوتیپ خارشتر از سه استان خراسان رضوی شامل مشهد، تربت جام، نیشابور، سرخس، نیلشهر، فریمان، تربت حیدریه، گناباد، خراسان جنوبی شامل نهبندان، سربیشه، قائن، زیرکوه، فردوس، بیرجند، خوسف، طبس، بشرویه، سرایان، درمیان و خراسان شمالی شامل شیروان، بجنورد و یک نمونه از استان تهران به طور تصادفی جمع آوری گردید و جهت انجام آزمایش به آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی دانشکده کشاورزی بیرجند منتقل شد. (جدول ۱). برای انجام این آزمایش از ۴۸ آغازگر ISSR و ۲۴ آغازگر SCoT استفاده گردید. . این آغازگرها به صورت خشک و فرز شده از شرکت سیناکلون خریداری و تهیه گردید. در ابتدای کار برای آزمون آغازگرها نمونه DNA بالک تهیه شد، به این صورت که پنج نمونه DNA به طور تصادفی انتخاب و باهم مخلوط گردید. هدف از این کار آزمون اولیه آغازگرها بر روی جمعیت‌ها بود تا چنانچه اگر یک نمونه DNA مشکلی داشته باشد آغازگر بتواند بر روی سایر DNAها تکثیر انجام دهد.

جدول ۱. مناطق مختلف جمع آوری اکوتیپ‌های خارشتر

Table 1. The different collection regions of Alhaji ecotypes

شماره Number	منطقه Location	استان Province	عرض شمالی Northern latitude	طول شرقی Eastern longitude
1	مشهد Mashhad	Razavi Khorasan Province	36.2972° N,	59.6067° E
2	فریمان Fariman	Razavi Khorasan Province	35.7014° N,	59.8466° E
3	تربت‌جام Torbate-Jam	Razavi Khorasan Province	35.2431° N,	60.6248° E
4	نیلشهر Nilshahr	Razavi Khorasan Province	34.5774° N,	60.1465° E
5	سرخس Sarakhs	Razavi Khorasan Province	36.5372° N,	61.1561° E
6	نیشابور Neyshabour	Razavi Khorasan Province	36.2132° N,	58.7943° E
7	تربت‌حیدریه Torbate-Heydariye	Razavi Khorasan Province	35.2875° N,	59.2215° E
8	گناباد Gonabad	Razavi Khorasan Province	34.3530° N,	58.6838° E
9	نهبندان Nehbandan	Southern Khorasan Province	31.5411° N,	60.0372° E
10	سربیشه Sarbishe	Southern Khorasan Province	32.5785° N,	59.7955° E
11	قائن Qaen	Southern Khorasan Province	33.7351° N,	59.1798° E
12	زیرکوه Zirkouh	Southern Khorasan Province	33.6934° N,	59.9625° E
13	فردوس Ferdows	Southern Khorasan Province	34.0186° N,	58.1712° E
14	بیرجند Birjand	Southern Khorasan Province	32.8733° N,	59.2163° E
15	خوسف Khousf	Southern Khorasan Province	32.7787° N,	58.8882° E
16	طبس Tabas	Southern Khorasan Province	33.5961° N,	56.9279° E
17	بشرویه Boshroye	Southern Khorasan Province	33.8684° N,	57.4285° E
18	سرایان Sarayan	Southern Khorasan Province	33.8606° N,	58.5249° E
19	درمیان Darmian	Southern Khorasan Province	33.0339° N,	60.1185° E
20	شیروان Shirvan	Northern Khorasan Province	37.3968° N,	57.9310° E
21	بجنورد Bojnourd	Northern Khorasan Province	37.4745° N,	57.3233° E
22	تهران Tehran	Tehran Province	35.7219° N,	51.3347° E

به عبارت دیگر هدف بالا بردن دقت در کار بود. میزان DNA در هر واکنش ۳۰ نانوگرم در نظر گرفته شد. مخلوط واکنش با حجم های مشخص آماده و به تیوپ‌های حاوی آغازگرهای مختلف اضافه شد و سپس واکنش های PCR انجام گردید. ۱۲ عدد از آغازگرهای ISSR و ۱۹ عدد از آغازگرهای SCoT بعد از الکتروفورز محصول PCR باندهایی با وضوح بالا تشکیل دادند که از این آغازگرها برای ادامه تحقیق استفاده گردید (جدول ۲)

جدول ۲. آغازگرهای ISSR و SCoT

Table 2. ISSR and SCoT primers

شماره Number	آغازگر Primer	توالی Sequence	شماره Number	آغازگر Primer	توالی Sequence
ISSR			SCoT		
IS5	ISCS34	3'-ACACACACACACACACT-5'	S2	SCoT1	3'-ACCACCATCGGTAACAAC-5'
IS7	ISCS70	3'-GTGTGTGTGTGTGTGTC-5'	S3	SCoT2	3'-CCCACCATCGGTAACAAC-5'
IS2	ISCS57	3'-GTGTGTGTGTGTGTGT-5'	S4	SCoT3	3'-GCCACCATCGGTAACAAC-5'
IS3	ISCS51	3'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-5'	S6	SCoT6	3'-CGCACCATCGGTAACAAC-5'
IS11	ISCS49	3'-TCTCTCTCTCTCTCTCRA-5'	S9	SCoT7	3'-GGCACCATCGGTAACAAC-5'
IS9	ISCS77	3'-TGTGTGTGTGTGTGTGC-5'	S10	SCoT12	3'-GCAACCAGCGGTACAGCA-5'
IS12	ISCS12	3'-TCTCTCTCTCTCTCTCRT-5'	S11	SCoT13	3'-GCTACCAGCGGTACAGCA-5'
IS1	ISCS28	3'-TTGTTGTTGTTGTTGTTGC-5'	S14	SCoT14	3'-CGCACCAGCGGTACAGCA-5'
IS8	ISCS11	3'-CTCTCTCTCTCTCTCTT-5'	S15	SCoT16	3'-AGCCACCATCGGTACCCA-5'
IS4	ISCS7	3'-TCCTCCTCCTCCTCCTCCC-5'	S13	SCoT17	3'-GAGCCACCATCGGTACCA-5'
IS6	ISCS4	3'-GACAGACAGACAGACA-5'	S17	SCoT18	3'-CCGCCACCATCGGTACCA-5'
IS10	ISCS1	3'-TCTCTCTCTCTCTCTCTCC-5'	S16	SCoT20	3'-GCGCCACCATCGGTACCA-5'
			S12	SCoT21	3'-ACACCCAGCGGTACAGCA-5'
			S7	SCoT22	3'-CACCACCATCGGTACCAA-5'
			S8	SCoT24	3'-TACCACCATCGGTACCAC-5'
			S18	SCoT25	3'-GGGCCACCATCGGTACCA-5'
			S1	SCoT28	3'-ACCGCCACCATCGGTACC-5'
			S5	SCoT36	3'-CCACCATCGGTAACAACG-5'

استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته CTAB انجام شد (Doyle & Doyle 1987). از هر نمونه ۲۰۰ میلی‌گرم برگ در ازت مایع پودر و برگ‌های پودر شده به تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۶۸۶ ماکرولیتر بافر استخراج (CTAB 3 درصد، تریس ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA 20 میلی‌مولار، کلرید سدیم ۱/۴ میلی‌مولار) به همراه ۱۴ میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر تیوپ اضافه شد. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین شد. با استفاده از دستگاه نانودراپ جذب DNA رقیق شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و در نهایت نسبت جذب نوری (۲۶۰/۲۸۰) DNA به‌دست آمد. کیفیت باندهای DNA با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو (۳۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول)، ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش و ۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده بود. الکتروفورز افقی محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد در بافر (TBE 0.5X) و پس از رنگ آمیزی ژل تحت تابش اشعه ماورا بنفش با استفاده از محلول سیف استین انجام شد. بدین منظور ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر از رنگ بارگذاری شد که و برای بررسی بهتر باندها از ۵ میکرولیتر

Ladder استفاده شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شدند. قطعات تکثیر یافته DNA توسط ژل‌داک زیر نور فرابنفش مشاهده و عکس‌برداری گردید.

جدول ۳. اجزای واکنش و برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 3. The components and temperature program of PCR

واکنش زنجیرهای پلیمراز PCR					ISSR	
مواد Materials	غلظت نهایی Final concentration	اجزای واکنش Reaction components	مراحل Step	تعداد چرخه Cycle Number	دما (سلسیوس) Temp (C°)	زمان (دقیقه/ثانیه) Time (min/s)
آب دوبار تقطیر Double distilled water	-	8 میکرولیتر µL	واسرشت سازی اولیه Initial denaturation	1	94	4m
مخلوط واکنش Mastermix	یک برابر 1X	10 میکرولیتر µL	واسرشت سازی Denaturation	35	94	1m
آغازگر Primer	0.67 پیکومول pm	1 میکرولیتر µL	اتصال Annealing	35	M.T-5	1m
دی‌ان‌ای DNA	30 نانوگرم/میکرولیتر ng/µL	1 میکرولیتر µL	گسترش Extension	35	72	2m
جمع Total	-	20 میکرولیتر µL	بسط نهایی Final extension	1	72	10m
آب دوبار تقطیر Double distilled water	-	8 میکرولیتر µL	واسرشت سازی اولیه Initial denaturation	1	94	4m
مخلوط واکنش Mastermix	یک برابر 1X	10 میکرولیتر µL	واسرشت سازی Denaturation	35	94	1m
آغازگر Primer	0.67 پیکومول pm	1 میکرولیتر µL	**اتصال** Annealing	35	35	1m
دی‌ان‌ای DNA	30 نانوگرم/میکرولیتر ng/µL	1 میکرولیتر µL	گسترش Extension	35	72	2m
جمع Total		20 میکرولیتر µL	بسط نهایی Final extension	1	72	10m

در ابتدا عکس‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Imagej مورد بررسی قرار گرفت و به حضور باند عدد یک و عدم حضور باند عدد صفر داده شد و اطلاعات حاصل از باندها به صورت ماتریس ذخیره شد. برای ارزیابی آغازگرها از صفات و شاخص‌هایی مانند تعداد آلل تکثیر شده (N_a)، تعداد آلل چند شکل، تعداد آلل مؤثر (Ne)، درصد چند شکلی[4] (PP) (تقسیم تعداد

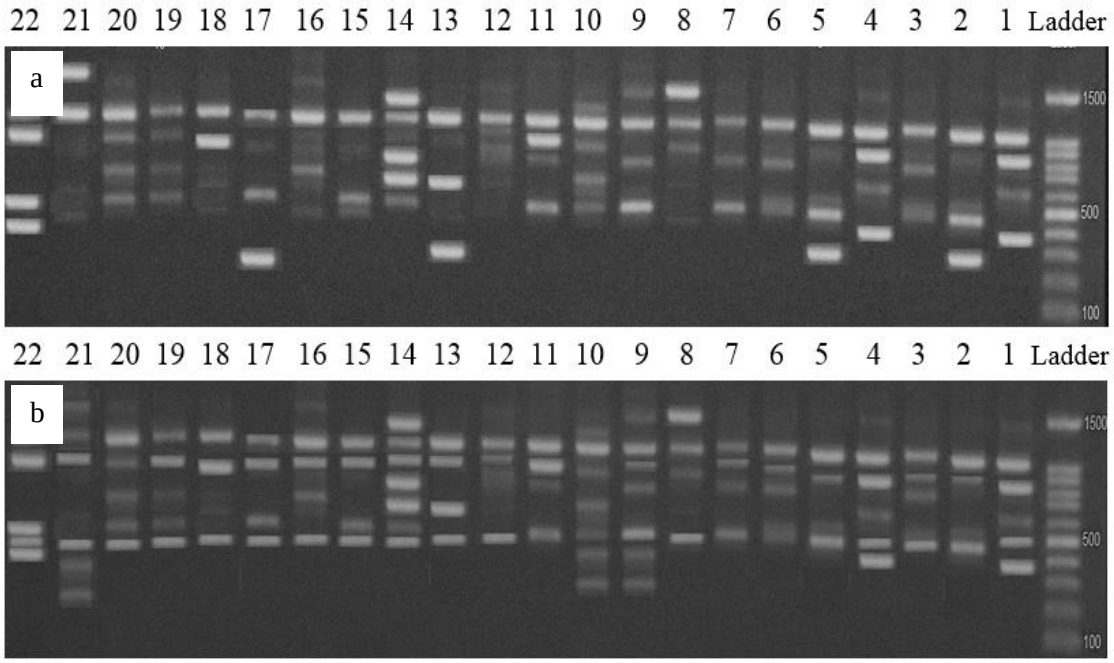
[4]. Polymorphism Percent (PP)

باندهای چندشکل بر کل باندها)، شاخص چندشکلی[5] (DI) یا شاخص محتوای چندشکلی[6] (PIC): از فرمول $PIC=1-\Sigma p_i^2$ محاسبه می‌شود که p_i فراوانی نشانگر i ام می‌باشد، شاخص نسبت چندشکلی موثر[7] (EMR): از درصد چندشکلی × تعداد باندهای چند شکل، شاخص نشانگری[8] (MI): تعداد باندهای چندشکل × شاخص محتوای چندشکلی، قدرت تفکیک[9] RP: $RP=\sum IB$ در رابطه که $IB=1-[2*(0/5-Pi)]$ که pi نسبت افراد دارای باند، شاخص شانون (I)، و شاخص نی (h) محاسبه شد. پارامترهای ژنتیکی مختلفی مانند هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها (H_S)، هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها (Dst)، هتروزیگوسیتی کل ($Ht=Hs+Dst$)، ضریب تنوع بین جمعیت‌ها ($Gst=Dst/Ht$)، شاخص Fst یا همبستگی ژن‌های افراد مختلف در یک جمعیت ($Fst = 1 – Hs/Ht$) نیز محاسبه شد (Lewontin 1972; Botstein et al. 1980; Agrama and Tuinstra, 2003; Anderson et al. 1993; Bryan et al. 1997). برای تعیین تنوع بین جمعیت‌ها تجریه واریانس مولکولی و به منظور تعیین پراکندگی آغازگرها در طول ژنوم تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) و به منظور گروه‌بندی اکوتیپ‌ها و همچنین تعیین تشابه ژنتیکی افراد تجزیه خوشه‌ای انجام شد. در هر دو نشانگر ضریب تشابه UN1 و الگوریتم UPGMA به عنوان بهترین ضریب و الگریتم شناخته شد، لذا در تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. تعیین تعداد خوشه‌ها به صورت تجربی و چشمی انجام شد. این محاسبات با نرم افزارهای NTSYSpc2.2 ، POPGEN ، GENALEX 6.503 و Excel انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی آغازگرها و بررسی چندشکلی: از ۴۸ آغازگر ISSR، ۱۲ آغازگر و از ۲۴ آغازگر ScoT، ۱۸ آغازگر چندشکلی و وضوح بالایی را نشان دادند. در کل، ۱۲ آغازگر ISSR ۱۴۹ باند و ۱۸ آغازگر SCoT ۱۹۴ باند با وضوح بالا تولید نمودند که طول آنها به ترتیب بین ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ و ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز برای نشانگرهای ISSR و SCoT متغیر بود. نمونه‌ای از الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگرهایISSR49 (ISSR) و SCoT22 (SCoT) در شکل ۱ نشان داده شده است. آغازگرهای ISSR، ۹۹/۲۴ درصد و آغازگرهای SCoT، ۹۵/۴۲ درصد چندشکلی نشان دادند. در نشانگر ISSR کمترین تعداد باند تکثیر شده توسط آغازگرهای IS1، IS2، IS3 و IS6 با تعداد ۱۱ باند و بیشترین تعداد باند تکثیر شده توسط آغازگرهای IS5، IS8 و IS10 با تعداد ۱۴ باند و در نشانگر SCoT کمترین تعداد باند تکثیر شده توسط آغازگر S1 با ۵ باند و بیشترین تعداد باند تکثیر شده توسط آغازگرهای S2، S4، S6، S7 و S10 با ۱۳ باند مشاهده شد. در نشانگر ISSR شاخص محتوای چندشکلی بین ۰/۰۹ تا ۰/۴۴ و در نشانگر SCoT بین ۰/۰۳ تا ۰/۴۴ محاسبه شد.

5. Diversity Index (DI)
6. Polymorphism Information Content (PIC)
7. Effective Multiple Ratios (EMR)
8. Marker Index
9. Resolving Power (RP)



شکل ۱. الگوی باندی اکوتیپ‌های خارشتر: الف- آغازگر ISSR49 ب- آغازگر SCoT22

Figure 1. Band pattern of Alhaji ecotypes: a- ISSR49 primer b- SCoT22 primer

در ISSR بیشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به آغازگرهای IS6 (۰/۴۴) و کمترین مربوط به آغازگر IS4 (۰/۰۹) و در نشانگر SCoT یشترین شاخص محتوای چندشکلی مربوط به آغازگر S12 (۰/۴۴) و کمترین مربوط به آغازگر S1 (۰/۰۳) بود. شاخص نسبت چندشکلی در ISSR بین ۹/۰۹ تا ۱۴ و در SCoT بین ۷ تا ۱۳ متغیر بود. در ISSR بیشترین مقدار شاخص نسبت چندشکلی مربوط به آغازگرهای IS5، IS8 و IS10 (۱۴) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر IS2 (۹/۰۹) و در SCoT بیشترین مربوط به آغازگرهای S2، S4، S7،S6 و S10 (۱۳) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر S9 (۷) بود. در ISSR بیشترین شاخص نشانگر متعلق به آغازگر IS8 (۵/۵۴) کمترین شاخص نشانگر متعلق به آغازگر IS4 (۱/۱۲) و در SCoT بیشترین شاخص نشانگر متعلق به آغازگر S7 (۵/۳۶) و کمترین شاخص متعلق به آغازگرS1 (۰/۰۷) بود. در ISSR بیشترین مقدار شاخص قدرت تفکیک مربوط به آغازگرIS9 (۸/۹۷) و کمترین مربوط به آغازگر IS12 (۲/۵۹) و در SCoT بیشترین مقدار مربوط به آغازگر S14 (۱۱/۷) و کمترین مربوط به آغازگر S9 (۲/۳۰) بود.

پارامترهای ژنتیکی: نتایج نشان داد که میانگین میزان هتروزیگوسیتی کل، هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها، جریان ژنی، هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها و Fst در نشانگر ISSR به ترتیب برابر با ۰/۴۳، ۰/۱۲، ۳/۱۰، ۰/۷۳، ۰/۷۲و در SCoT به ترتیب برابر با ۰/۴۰، ۰/۱۴، ۳/۷۶، ۰/۶۲ و ۰/۶۸ بود. در نشانگر ISSR بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر IS6 (۰/۴۶) و کمترین میزان مربوط به آغازگر IS2 (۰/۳۴) و در SCoT بیشترین هتروزیگوسیتی کل مربوط به آغازگر S12 (۰/۴۷) بود و کمترین میزان نیز مربوط به آغازگر S1 (۰/۱۰) بود. در ISSR بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها مربوط به آغازگر IS6 (۰/۱۸)

و کمترین مقدار مربوط به آغازگر IS2 (۰/۰۷) و در SCoT بیشترین مقدار مربوط به آغازگر S5 (۰/۲۰) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر S1 (۰/۰۲) بود. در ISSR بیشترین میزان جریان ژنی مربوط به آغازگر IS8 (۴/۳۱) و کمترین جریان ژنی مربوط به آغازگر IS1 (۱/۶۰) و در SCoT بیشترین میزان جریان ژنی مربوط به آغازگر S14 (۸/۷۱) و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به آغازگر S9 (۰/۶۰) به‌دست آمد. در ISSR بیشترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مربوط به آغازگر IS1 (۰/۸۲) و کمترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مربوط به آغازگر IS6 (۰/۶۲) و در SCoT بیشترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مربوط به آغازگر S9 (۰/۸۶) و کمترین هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها مربوط به آغازگر S1 (۰/۲۵) بود. در ISSR بیشترین Fst را آغازگر IS10 (۰/۸۵) و کمترین میزان Fst را آغازگر IS6 (۰/۶۲) و در SCoT بیشترین Fst را آغازگر S17 (۰/۹۹) و کمترین میزان Fst را آغازگر S14 (۰/۴۴) داشت.

بررسی پارامترهای تنوع زنتیکی نشان داد که در نشانگر ISSR میانگین تعداد آلل‌ها، میانگین تعداد آلل‌های موثر، میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب برابر با ۲، ۱/۴۴، ۰/۲۸ و ۰/۴۴ و در نشانگر SCoT به ترتیب برابر با ۲، ۱/۴۹، ۰/۲۹ و ۰/۴۶ بود. در نشانگر ISSR بیشترین تعداد آلل‌های موثر مربوط به آغازگر IS6 (۱/۶۴) و کمترین آن مربوط به آغازگر IS3 و IS10 (۱/۳۳)، بیشترین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به آغازگر IS6 (به ترتیب ۰/۳۸ و ۰/۵۶) و کمترین آن مربوط به آغازگر IS2 و IS10 (به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۳۶) بود. در نشانگر SCoT بیشترین تعداد آلل‌های موثر مربوط به آغازگر S11 (۱/۶۴) و کمترین آن مربوط به آغازگر S1 (۰/۴۹)، بیشترین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به آغازگر S14 (به ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۵۷) و کمترین آن مربوط به آغازگر S1 (به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۱۲) بود.

تجزیه واریانس مولکولی: تجزیه واریانس مولکولی نشان داد (جدول ۷) که در نشانگر ISSR ۹ درصد از تغییرات مربوط به بین گروه‌ها و ۹۱ درصد مربوط به درون گروه‌ها و بر اساس نشانگر SCoT ۹ درصد از تغییرات مربوط به بین گروه‌ها و ۸۶ درصد مربوط به درون گروه‌ها بود. بررسی ضرایب همبستگی کوفنتیک (جدول ۸) نشان داد که ضریب تشابه UN1 و الگوریتم میانگین تشابه میان زوج نمونه‌ها به دلیل دارا بودن بالاترین ضریب همبستگی (r) در هر دو نشانگر ISSR و SCoT به ترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۴به عنوان بهترین ضریب و بهترین الگوی خوشه‌بندی می‌باشند، لذا بر اساس این الگو ماتریس تشابه بدست آمد و تجزیه خوشه‌ای انجام شد.

ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای: ماتریس تشابه نشان داد که بر اساس نشانگر ISSR بیشترین تشابه بین اکوتیپ‌های بجنورد با شیروان (۰/۹۵) خوسف با بیرجند و زیرکوه با قاین (۰/۹۴) و نیلشهر با تربت‌جام (۰/۹۳) و کمترین درصد تشابه بین اکوتیپ‌های تهران با طبس (۰/۲۸) و تهران با سرخس (۰/۲۹) وجود داشت. بر اساس نشانگر SCoT بیشترین تشابه بین اکوتیپ‌های نیلشهر با تربت‌جام (۰/۹۱)، تربت‌جام با مشهد و نیشابور با سرخس (۰/۹۰) و بجنورد با مشهد، بجنورد با شیروان، زیرکوه با سرایان و زیرکوه با درمیان (۰/۸۹) و کمترین تشابه بین اکوتیپ‌های تهران با سربیشه (۰/۴۳) و تهران با نیلشهر (۰/۴۶) وجود داشت.

جدول ٤. شاخص‌های مولکولی برای نشانگر ISSR و SCoT در اکوتیپ‌های خارشتر

Table 4. Molecular indices for ISSR and SCoT markers in Alhaji ecotypes

آغازگر Primers	تعداد باندها N. of bands	تعداد باندهای چندشکل N. of polymorph bands	درصد چندشکلی Polymorphism percent	شاخص محتوای چندشکلی PIC	نسبت چندشکلی موثر EMR	شاخص نشانگر MI	شاخص قدرت تفکیک RP
ISSR							
IS1	11	11	100	0.26	11	2.89	6.38
IS2	11	10	90.9	0.20	9.09	2.19	6.31
IS3	11	11	100	0.28	11	3.10	3.56
IS4	13	13	100	0.09	13	1.12	7.23
IS5	14	14	100	0.39	14	5.39	8.60
IS6	11	11	100	0.44	11	4.8	8.27
IS7	13	13	100	0.40	13	5.23	8.76
IS8	14	14	100	0.40	14	5.54	8.59
IS9	13	13	100	0.39	13	5.02	8.97
IS10	14	14	100	0.24	14	3.30	6.19
IS11	12	12	100	0.37	12	4.38	5.21
IS12	12	12	100	0.29	12	3.5	2.59
Mean	12.41	12.33	99.24	0.31	12.26	3.87	6.73
SCoT							
S1	5	2	40	0.04	8	0.07	7.99
S2	13	13	100	0.33	13	4.28	8.90
S3	11	11	100	0.39	11	4.31	8.37
S4	13	13	100	0.34	13	4.37	5.96
S5	11	11	100	0.41	11	4.52	8.54
S6	13	13	100	0.37	13	4.84	10.3
S7	13	13	100	0.41	13	5.36	8.88
S8	11	11	100	0.35	11	3.80	6.11
S9	7	7	100	0.26	7	1.81	2.30
S10	13	13	100	0.33	13	4.35	10.44
S11	11	11	100	0.32	11	3.50	10.19
S12	12	12	100	0.44	12	5.22	7.16
S13	10	10	100	0.29	10	2.94	6.17
S14	9	9	100	0.28	9	2.54	11.70
S15	9	8	88.8	0.27	7.10	2.16	4.30
S16	9	8	88.8	0.27	7.10	2.13	7.57
S17	11	11	100	0.38	11	4.21	8.89
S18	8	8	100	0.20	8	1.63	9.29
Mean	10.5	10.22	95.42	0.32	10.50	3.45	7.94

بر اساس نشانگر ISSR اکوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول به دو زیر گروه تقسیم‌بندی شد، زیر گروه اول شامل اکوتیپ‌های مشهد، فریمان، تربت جام، نیلشهر، سرخس، نیشابور، تربت حیدریه، گناباد، نهبندان، سربیشه، قاین، زیرکوه و فردوس بود. در زیر گروه دوم اکوتیپ‌های بیرجند، خوسف، طبس، بشرویه، سرایان و درمیان قرارگرفت. در گروه دوم اکوتیپ‌های شیروان و بجنورد قرار گرفتند. گروه سوم که هیچ زیر گروهی نداشت و از همه گروه‌ها مجزا بود شامل اکوتیپ تهران بود. نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل نشان داد که اکوتیپ‌های خارشتر خراسان شمالی در یک گروه (بجنورد و شیروان) و اکوتیپ‌های خارشتر خراسان رضوی و

بعضی از اکوتیپ‌های خراسان جنوبی در یک گروه قرار گرفتند. بررسی زیرگروه‌ها نشان داد که اکوتیپ‌های خارشتر خراسان جنوبی کاملا در یک زیرگروه قرار گرفتند.

جدول ۵. پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده برای نشانگرهای ISSR و SCoT در اکوتیپ‌های خارشتر

Table 5 .Genetic parameters for ISSR and SCoT markers in Alhaji ecotypes

آغازگر Primer	هتروزیگوسیتی کل Ht	هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها Hs	جریان ژنی Nm	هتروزیگوسیتی بین جمعیت‌ها Gst	شاخص اف‌اس‌تی Fst
ISSR					
IS1	0.44	0.09	1.60	0.82	0.80
IS2	0.34	0.07	2.52	0.79	0.78
IS3	0.43	0.10	2.01	0.79	0.77
IS4	0.44	0.14	3.58	0.70	0.68
IS5	0.44	0.13	2.84	0.71	0.70
IS6	0.46	0.18	3.82	0.62	0.62
IS7	0.46	0.14	3.48	0.70	0.69
IS8	0.46	0.16	4.31	0.66	0.64
IS9	0.45	0.16	4.02	0.67	0.66
IS10	0.41	0.08	3.07	0.81	0.85
IS11	0.45	0.14	3.21	0.69	0.68
IS12	0.43	0.11	2.72	0.77	0.74
Mean	0.43	0.12	3.10	0.73	0.72
SCoT					
S1	0.10	0.02	1.54	0.25	0.80
S2	0.45	0.16	4.46	0.64	0.64
S3	0.46	0.19	4.47	0.60	0.56
S4	0.43	0.11	2.13	0.75	0.74
S5	0.46	0.20	5.29	0.58	0.56
S6	0.43	0.17	5.37	0.61	0.61
S7	0.47	0.19	5.38	0.50	0.58
S8	0.43	0.13	3.62	0.69	0.69
S9	0.42	0.06	0.60	0.86	0.86
S10	0.43	0.16	5.24	0.62	0.62
S11	0.41	0.09	2.98	0.75	0.78
S12	0.47	0.16	3.31	0.66	0.66
S13	0.42	0.12	2.74	0.72	0.71
S14	0.36	0.20	8.71	0.42	0.44
S15	0.39	0.12	1.99	0.63	0.70
S16	0.37	0.13	3.13	0.58	0.64
S17	0.41	0.10	1.56	0.79	0.99
S18	0.34	0.14	5.20	0.57	0.60
Mean	0.40	0.14	3.76	0.62	0.68

Ht: Total heterozygosity, Hs: Heterozygosity within populations, Nm: Gene flow, Gst: Gene differentiation coefficient

Ht: هتروزیگوسیتی کل، Hs: هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها، Nm: جریان ژنی، Gst: ضریب تمایز ژنی

بر اساس نشانگر SCoT اکوتیپ‌ها به شش گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول به دو زیر گروه تقسیم‌بندی شد، زیر گروه اول شامل اکوتیپ‌های شیروان، بجنورد، سرایان، نهبندان و سربیشه و زیر گروه دوم شامل اکوتیپ‌های درمیان، طبس، بشرویه، گناباد و فردوس بود. گروه دوم هم به دو زیر گروه تقسیم شد، در زیر گروه اول فقط اکوتیپ مشهد و در زیر گروه دوم اکوتیپ‌های نیشابور، فریمان و تربت‌حیدریه قرار گرفتند. گروه سوم شامل اکوتیپ‌های قاین و زیرکوه بود. گروه چهارم شامل اکوتیپ‌های خوسف و بیرجند بود در گروه پنجم اکوتیپ‌های سرخس، تربت‌جام و نیلشهر قرار گرفتند. در گروه ششم فقط اکوتیپ تهران قرار گرفت.

جدول ٦. پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده برای نشانگرهای ISSR و SCoT در اکوتیپ‌های خارشتر

Table 6. Genetic parameters for ISSR and SCoT markers in Alhaji ecotypes

آغازگر Primer	تعدادآلل‌ها Na	آللهای موثر Ne	شاخص نی H	شاخص شانون I	آغازگر Primer	تعدادآلل‌ها Na	آللهای موثر Ne	شاخص نی H	شاخص شانون I
		ISSR					SCoT		
IS1	2	1.42	0.26	0.41	S1	2	0.49	0.07	0.12
IS2	2	1.35	0.22	0.36	S2	2	1.48	0.30	0.46
IS3	2	1.33	0.23	0.37	S3	2	1.56	0.34	0.51
IS4	2	1.43	0.28	0.43	S4	2	1.37	0.26	0.42
IS5	2	1.48	0.31	0.47	S5	2	1.61	0.33	0.54
IS6	2	1.64	0.38	0.56	S6	2	1.52	0.33	0.50
IS7	2	1.54	0.33	0.50	S7	2	1.58	0.36	0.54
IS8	2	1.44	0.33	0.50	S8	2	1.47	0.30	0.46
IS9	2	1.54	0.33	0.50	S9	2	1.37	0.25	0.41
IS10	2	1.33	0.22	0.36	S10	2	1.51	0.31	0.47
IS11	2	1.46	0.29	0.46	S11	2	1.64	0.36	0.53
IS12	2	1.37	0.24	0.39	S12	2	1.56	0.35	0.53
Mean	2	1.44	0.28	0.44	S13	2	1.40	0.26	0.42
					S14	2	1.46	0.39	0.57
					S15	2	1.29	0.21	0.35
					S16	2	1.41	0.25	0.40
					S17	2	1.56	0.34	0.51
					S18	2	1.48	0.29	0.45
					Mean	2	1.49	0.29	0.46

Na: Observed number of alleles, Ne:Efficient number of alleles, H: Neis gene diversity index, I: Shannons information index

Na: تعداد آلل‌ها، Ne: تعداد آلل‌های موثر،H: شاخص نی، I: شاخص شانون

جدول ۷. تجزیه واریانس مولکولی اکوتیپ‌های خارشتر برای نشانگرهای ISSR و SCoT

Table 7. Molecular analysis of variance of Alhaji ecotypes for ISSR and ScoT markers

منبع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	مربعات مجموع SS	میانگین مربعات MS	واریانس (٪) Variance (%)	Phi PT	P-Value
			ISSR			
بین گروه‌ها Between group	3	108.23	36.08	9	0.02	0.09
درون گروه‌ها Within group	18	442.72	24.60	91		
کل Total	21	550.96		100		
			SCoT			
بین گروه‌ها Between group	3	935.16	978.51	14	0.14	0.01
درون گروه‌ها Within group	18	565.53	698.29	86		
کل Total	21	500.69		100		

جدول ۸. ضرایب همبستگی کوفنتیک برای نشانگرهای ISSR و SCoT

Table 8. Coufentic correlation coefficients for ISSR and SCoT markers

الگوریتم Algorithm	کامل Complete		منفرد Single		میانگین تشابه میان زوج نمونه‌ها UPGMA	
ضریب تشابه Similarity coefficient	ISSR	SCoT	ISSR	SCoT	ISSR	SCoT
دایس Dice	0.61**	0.67**	0.72**	0.70**	0.74**	0.74**
تطابق ساده SM	0.94**	0.90**	0.94**	0.90**	0.96**	0.93**
جاکارد Jacard	0.62**	0.71**	0.74**	0.73**	0.76**	0.73**
UN1	0.96**	0.92**	0.96**	0.92**	0.97**	0.94**

جدول ۹. ماتریس تشابه برای نشانگر ISSR در اکوتیپ‌های خارشتر

Table 9. Similarity matrix for ISSR marker in Alhaji ecotypes

اکوتیپ Ecotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1										
2	0.92	1									
3	0.87	0.85	1								
4	0.82	0.84	0.93	1							
5	0.77	0.76	0.80	0.83	1						
6	0.80	0.82	0.81	0.87	0.84	1					
7	0.82	0.91	0.78	0.86	0.81	0.87	1				
8	0.81	0.78	0.83	0.78	0.78	0.84	0.87	1			
9	0.80	0.82	0.83	0.87	0.82	0.82	0.86	0.94	1		
10	0.75	0.78	0.84	0.83	0.83	0.80	0.81	0.85	0.84	1	
11	0.79	0.77	0.77	0.71	0.85	0.80	0.83	0.79	0.82	0.86	1
12	0.80	0.77	0.81	0.74	0.76	0.81	0.90	0.83	0.80	0.81	0.82
13	0.81	0.77	0.83	0.72	0.76	0.81	0.79	0.83	0.78	0.84	0.79
14	0.79	0.77	0.84	0.84	0.77	0.83	0.81	0.83	0.85	0.82	0.78
15	0.81	0.76	0.79	0.81	0.77	0.85	0.81	0.83	0.76	0.81	0.80
16	0.78	0.80	0.77	0.84	0.76	0.78	0.83	0.79	0.81	0.80	0.87
17	0.81	0.78	0.78	0.79	0.77	0.79	0.85	0.82	0.81	0.78	0.94
18	0.80	0.75	0.75	0.77	0.77	0.75	0.82	0.78	0.76	0.74	0.87
19	0.83	0.78	0.81	0.83	0.76	0.82	0.82	0.86	0.83	0.78	0.79
20	0.82	0.81	0.83	0.78	0.77	0.81	0.83	0.84	0.83	0.79	0.76
21	0.77	0.78	0.80	0.82	0.76	0.76	0.83	0.82	0.80	0.79	0.74
22	0.50	0.39	0.41	0.33	0.29	0.40	0.43	0.40	0.38	0.28	0.46

اکوتیپ Ecotype	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
12	1										
13	0.80	1									
14	0.90	0.80	1								
15	0.85	0.80	0.81	1							
16	0.80	0.80	0.84	0.81	1						
17	0.76	0.80	0.70	0.80	0.81	1					
18	0.79	0.81	0.80	0.87	0.81	0.78	1				
19	0.81	0.74	0.80	0.78	0.84	0.83	0.79	1			
20	0.78	0.80	0.72	0.76	0.85	0.82	0.72	0.76	1		
21	0.81	0.80	0.81	0.79	0.82	0.70	0.76	0.71	0.95	1	
22	0.37	0.40	0.40	0.40	0.43	0.41	0.48	0.40	0.54	0.55	1

جدول ۱۰. ماتریس تشابه برای نشانگر SCoT در اکوتیپ‌های خارشتر

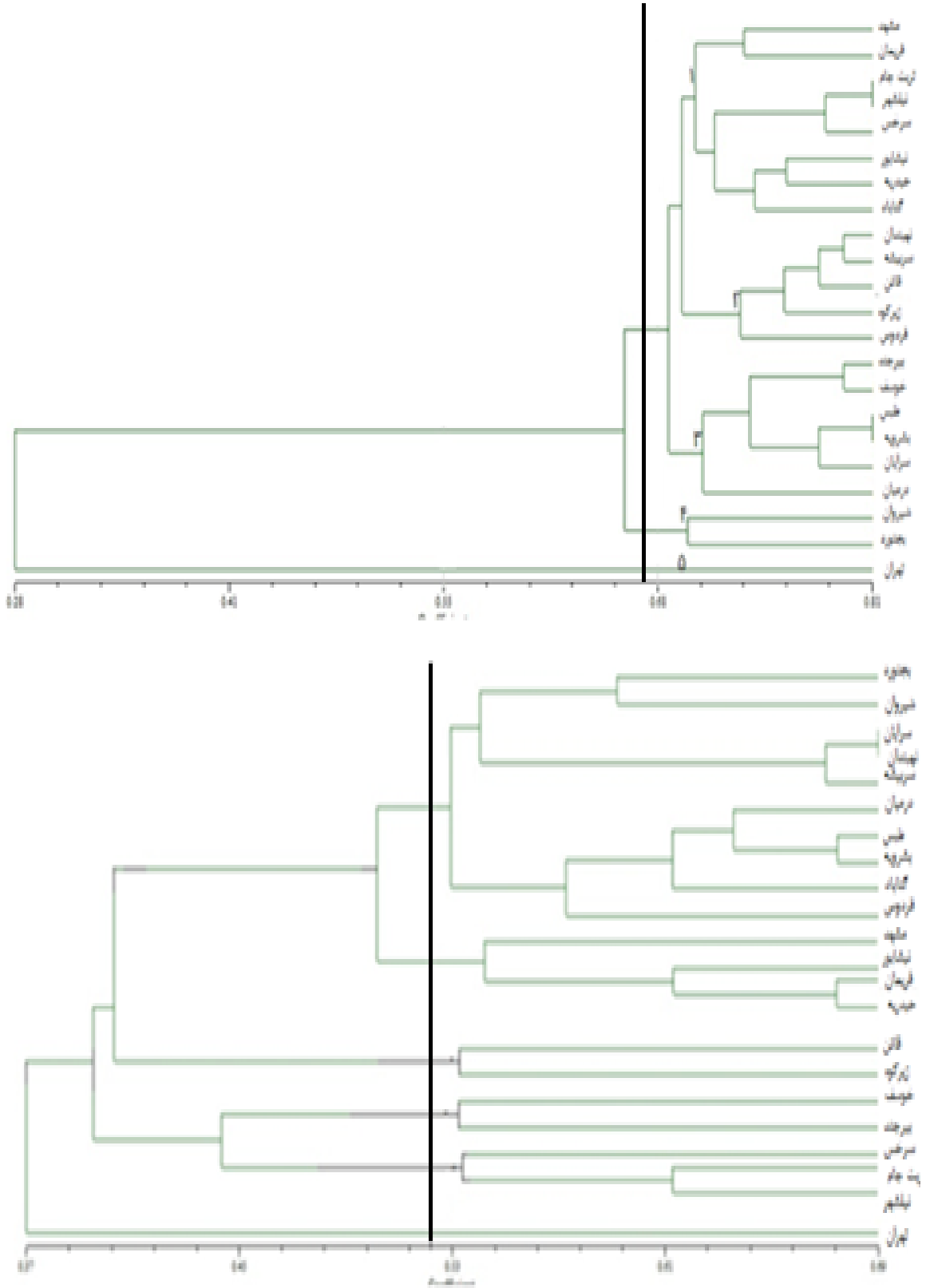
Table 10. Similarity matrix for SCoT marker in Alhaji ecotypes

اکوتیپ Ecotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1										
2	0.81	1									
3	0.90	0.83	1								
4	0.87	0.81	0.91	1							
5	0.85	0.79	0.84	0.84	1						
6	0.83	0.82	0.70	0.86	0.90	1					
7	0.84	0.85	0.76	0.82	0.81	0.74	1				
8	0.86	0.80	0.75	0.84	0.84	0.83	0.83	1			
9	0.84	0.83	0.82	0.83	0.82	0.81	0.83	0.80	1		
10	0.76	0.77	0.78	0.88	0.78	0.73	0.78	0.76	0.81	1	
11	0.77	0.80	0.79	0.82	0.79	0.76	0.82	0.74	0.81	0.86	1
12	0.83	0.81	0.85	0.87	0.80	0.71	0.84	0.72	0.82	0.80	0.86
13	0.83	0.79	0.86	0.87	0.83	0.83	0.82	0.78	0.80	0.77	0.83
14	0.82	0.76	0.83	0.81	0.71	0.82	0.80	0.81	0.79	0.73	0.81
15	0.79	0.78	0.80	0.80	0.76	0.80	0.78	0.86	0.77	0.72	0.81
16	0.79	0.80	0.80	0.77	0.80	0.78	0.83	0.80	0.81	0.77	0.83
17	0.81	0.79	0.79	0.77	0.80	0.77	0.80	0.77	0.78	0.74	0.77
18	0.82	0.78	0.82	0.76	0.81	0.80	0.83	0.79	0.77	0.73	0.78
19	0.84	0.80	0.83	0.82	0.82	0.80	0.78	0.79	0.79	0.80	0.73
20	0.79	0.73	0.78	0.76	0.75	0.77	0.73	0.78	0.76	0.75	0.79
21	0.89	0.79	0.79	0.77	0.78	0.79	0.81	0.78	0.81	0.72	0.80
22	0.53	0.64	0.56	0.46	0.55	0.57	0.58	0.61	0.56	0.60	0.52

اکوتیپ Ecotype	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
12	1										
13	0.87	1									
14	0.85	0.87	1								
15	0.82	0.85	0.86	1							
16	0.81	0.82	0.82	0.89	1						
17	0.81	0.81	0.78	0.82	0.89	1					
18	0.80	0.80	0.80	0.78	0.85	0.88	1				
19	0.81	0.82	0.85	0.83	0.82	0.78	0.84	1			
20	0.77	0.84	0.82	0.79	0.76	0.79	0.79	0.87	1		
21	0.78	0.80	0.82	0.78	0.82	0.84	0.85	0.86	0.89	1	
22	0.55	0.52	0.52	0.59	0.62	0.61	0.59	0.43	0.57	0.55	1

۱-مشهد ۲-فریمان ۳-تربت‌جام ۴-نیلشهر ۵-سرخس ۶-نیشابور ۷-تربت‌حیدریه ۸-بیرجند ۹-خوسف ۱۰-طبس ۱۱-قاین ۱۲-گناباد ۱۳-فردوس ۱۴-بشرویه ۱۵-سرایان ۱۶-درمیان ۱۷-زیرکوه ۱۸-نهبندان ۱۹-سربیشه ۲۰-شیروان ۲۱-بجنورد ۲۲-تهران

1-Mashhad 2-Fariman 3-Torbate-Jam 4-Nilshahr 5-Sarakhs 6-Neyshabour 7-Torbate-Heydariye 8-Birjand 9-Khousf 10-Tabas 11-Qaen 12-Gonabad 13-Ferdows 14-Boshroye 15-Sarayan 16-Darmian 17-Zirkouh 18-Nehbandan 19-Sarbishe 20-Shirvan 21-Bojnord 22-Tehran



شکل ۲.تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های خارشتر برای الف- نشانگر ISSR ب- نشانگر SCoT

Figure 2.Cluster analysis of Alhaji ecotypes for a- ISSR marker b- SCoT marker

به طور کل بررسی شاخص‌ها و مقایسه این شاخص‌ها در نشانگر ISSR در مقابل SCoT نشان می‌دهد که تعداد باندهای تکثیر شده ۱۲/۴ و ۱۰/۵، تعداد باندهای چندشکل ۱۲/۳۳ و ۱۰/۲۲، درصد چندشکلی ۹۹/۲۴ و ۹۵/۴۲، شاخص PIC۰/۳۱ و ۰/۳۲، شاخص EMR ۱۲/۲۶ و ۱۰/۵، شاخص MI ۳/۸۷ و ۳/۴۵، شاخص RP ۶/۳۷ و ۷/۹۴، تقریبا مقادیر مشابهی داشتند. به عبارت دیگر در مجموع آغازگرها در هر دو سیستم نشانگری از نظر شاخص‌های آگاهی بخش تقریباً مثل هم عمل نمودند. هر دو سیستم نشانگری به خوبی قادر به نشان دادن سطح بالایی از تنوع درون گونه‌ای بودند. در برخی از پارامترهای ژنتیکی مقادیر ISSR اندکی بیشتر از SCoT بود. مقدار PIC بالا برای آغازگر نشان‌دهنده کارایی بالای آنها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده می‌باشد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند. PIC یکی از معیارها برای انتخاب بهترین جایگاه ژنی است. مقدار PIC بالا در یک مکان ژنی بیانگر وجود آلل نادر در آن مکان ژنی می‌باشد که می‌تواند در تمایز مؤثر ژنوتیپ‌ها استفاده شود (Roder et al. 1995). شاخص PIC بزرگ‌تر از ۰/۵ نشان‌دهنده نشانگری بسیار کارآمد، بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ نشان‌دهنده نشانگری کارا و کمتر از ۰/۲۵ نشان‌دهنده نشانگری با کارایی کم است (Wei et al. 2005). با توجه به آنکه مقدار این پارامتر (۰/۳۱ و ۰/۳۲) در هر دو نشانگر بین ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ بود، لذا می‌توان نتیجه‌گیری نمود که آغازگرهای مورد مطالعه اگرچه خوب بودند ولی عالی نبودند. از طرفی آغازگرهای IS6 و S12 (PIC =۰/۴۴) بهترین آغازگرها در تمایز اکوتیپ‌های خارشتر بودند. یکی دیگر از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، قدرت تمایز (RP) آنها میباشد. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد، بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد. قدرت تفکیک، شاخصی است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می‌دهد (Kayis et al. 2010). بررسی این شاخص در دو نشانگر نشان می‌دهد که مقادیر آن (۶/۷۳ در ISSR و ۷/۹۴ در SCoT) تقریبا بالا بود، لذا هر دو نشانگر از این حیث نشانگرهای خوبی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های خارشتر بودند. شاخص نشانگر (MI) علاوه بر مزایای PIC تعداد کل باند و نسبت چندشکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید باند بیشتر نشان می‌دهد. شاخص نشانگر برآوردی مناسب از کارایی آغازگرها است که به تعداد باندهای چندشکلی بدست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می‌شود، زیاد بودن شاخص نشانگر، بیان‌کننده فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد بیشتر باند چندشکل است (Milbourne et al. 1997). بررسی شاخص نشانگر (۳/۸۷ و ۳/۴۵) در هر دو نشانگر نشان می‌دهد که آغازگرهای انتخاب شده در ISSR و SCoT توانایی بالایی در تولید تعداد باند چندشکل داشتند و از این رو انتخاب آغازگرهای مناسب بوده است. بهترین آغازگر از این حیث IS9 (۸/۹۷) و S14 (۱۱/۷) بود. شاخص Fst ساختار، دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در جمعیت‌ها نشان می‌دهد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملا مشابه باشند مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی کاملا متفاوت باشند این مقدار برابر با یک می شود. شاخص Fst برای مطالعه تفاوت بین جمعیت ها نیز بکار می رود. در مطالعه

جمعیت‌ها اگر میزان Fst بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ بدست آید نشان می‌دهدجمعیت های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز هستند (Wright 1951). مقدار Fst بدست آمده در دو نشانگر ISSR و SCoT (۰/۷۲ و ۰/۶۸) نشان می‌دهد که جمعیت‌های مورد مطالعه یعنی خراسان شمالی، رضوی و جنوبی کاملا از هم متمایز می‌باشند. بالا بودن میزان شاخص نی و شاخص اطلاعاتی شانون، در هر دو نشانگر نشان‌دهنده کارایی بالای آغازگرهای انتخاب شده در تمایز اکوتیپ‌ها داشت. مقادیر بالاتر واریانس درون گروه‌ها نسبت به بین گروه‌ها نشان می‌دهد که میزان تنوع در درون گروه‌ها بیشتر از بین گروه‌ها است. بالاتر بودن میزان تنوع در درون گروه‌ها نشان‌دهنده تفاوت بیشتر اکوتیپ‌ها با یکدیگر در درون آن گروه است. تفاوت بین اکوتیپ‌ها در درون هر گروه نشان می‌دهد که اکوتیپ‌های درون هر گروه از لحاظ داده‌های مولکولی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. اختلاف کم موجود در بین گروه‌ها نیز نشان می‌دهد که از نظر داده‌های مولکولی میانگین اکوتیپ‌های هر گروه با گروه دیگر اختلاف زیادی نداشتند. عدم تفاوت بین میانگین گروه‌ها با یکدیگر بیانگر این است که دو گروه و یا چند گروه به طور کل مشابه می باشند. این اختلاف کم موجود بین گروه‌ها می‌تواند به دلیل جابه‌جایی اکوتیپ‌ها از یک منطقه به منطقه دیگر و در نتیجه شباهت اکوتیپ‌هایی از دو گروه با یکدیگر باشد. این امر باعث نزدیک شدن میانگین گروه‌ها به یکدیگر و در نتیجه شباهت گروه‌ها با یکدیگر می‌گردد. اگرچه اختلاف بیشتر بین گروهی نسبت به درون گروهی در مطالعات مربوط به گیاهان مختلف دیده شده است (Andrew et al. 2004; Farshadfar et al. 2018)، لیکن این نتایج با نتایج Amirkhosravi et al (2021) مطابقت داشت. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که دورترین اکوتیپ‌ها از لحاظ مولکولی با توجه به نشانگر ISSR تهران با طبس (۰/۲۸) و تهران با سرخس (۰/۲۹) و از لحاظ نشانگر SCoT تهران با سربیشه (۰/۴۳) و تهران با نیلشهر (۰/۴۶) می‌باشد. بنابراین چنانچه در مطالعات آینده دورگ‌گیری بین اکوتیپ‌ها مد نظر باشد، احتمال بیشترین هتروزیس از تلاقی این اکوتیپ‌ها با یکدیگر مورد انتظار است. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اکوتیپ‌های نزدیک از لحاظ جغرافیایی لزوماً از لحاظ ژنتیکی نزدیک به هم نیستند، به عبارت دیگر تنوع جغرافیایی از تنوع ژنتیکی تبعیت نداشت. نتایج این تحقیق با نتایج Amirkhosravi et al (2021) مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری: از نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌توان گفت که نشانگرها به خوبی در سطح ژنوم پراکنده بودند و توانستند اکوتیپ‌ها را به گروه‌های مشخصی تفکیک کنند و استفاده از نشانگرهای ISSR و SCoT در مطالعه تنوع ژنتیکی خارشتر مناسب بوده و از این نتایج می‌توان در سایر مطالعات ژنتیکی و به‌نژادی خارشتر به منظور انتخاب والدین در برنامه‌های دورگ‌گیری با توجه به حداکثر فاصله ژنتیکی برای تولید ارقام برتر استفاده نمود.

سپاسگزاری: از دانشگاه بیرجند به خاطر حمایت مالی و معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

ابراهیم‌پور نورآبادی مریم، یزدان بخش زهرا، کشاورزی مریم (۱۳۹۱) مطالعه سیتوژنتیکی دو گونه خارشتر *Alhagi pseudoalhagi* و *Alhagi graecorum*. داروهای گیاهی ۳(۳)، ۱۶۷-۱۷۳.

ادنایی سید مهدی، مرادی محمد رضا، بیات حسین، زارع زاده مهریزی، حسن (۱۳۹۲) معرفی گیاه خارشتر و بررسی مراحل پدیده‌شناختی آن در مراتع حاشیه حوض سلطان قم. همایش ملی پدافند غیر عامل در بخش کشاورزی.

باقری عبدالرضا، ایزدی دربندی علی، ملبوبی محمد علی (۱۳۹۱) کاربردهای عملی بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی (ترجمه). انتشارات دانشگاه مشهد. ۲۳۴ص.

براتی میترا، بازوبندی محمد.، قربانعلی مه‌لقا (۱۳۸۵). بررسی برخی ویژگی‌های اکوفیزیولوژیکی رشد خارشتر. رستنیها، ۷(۲): ۱۲۳-۱۱۱.

بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، و همکاران (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های تولیدات دامی ۱۳، ۱۹۲-۱۸۶.

رحمتی هوشنگ، فرشادفر محسن، شیروانی هومن (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های *Festuca arundinacea* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۹(۲۴)، ۹۴-۸۷.

زرگری علی ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. جلد دوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۹۸۰ ص.

رضایی مهدی، نقوی محمد رضا، معالی امیری رضا (۱۳۸۹) ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa*) نواحی مرکزی و شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. ۱۲ (۴)، ۵۲۰-۵۳۲.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

فرشادفر محسن، مرادزاده نازنین، فرشادفر عزت اله، شیروانی هومن (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌هایی از رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) بر اساس صفات ریخت شناختی و نشانگر مولکولی SCoT. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۵ (۲)، ۲۳۱-۲۱۲.

فرشادفر محسن، شیروانی هومن، امجدیان مصطفی، یاقوتی‌پور آنیتا (۱۳۹۷). کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تمایز دو گونه *Lolium multiflorum* و *Lolium perenne*. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۶ (۲)، ۲۲۰-۲۰۷.

محمدی سید ابولقاسم (۱۳۸۵) تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی. نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۱۱۹ – ۹۶.

مشرفی عراقی علیرضا، نعمتی حسین، عزیزی مجید، مشکانی نسرین، شور محمود (۱۳۹۹) بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های پونه وحشی (*Mentha longifolia* L.) ایران با استفاده از نشانگر ISSR و ارتباط آن با عملکرد ماده خشک و درصد اسانس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲ (۳)، ۱۴۰-۱۱۷.

میرزائی سپیده، سالاری هومن (۱۴۰۰) بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگرSCoT . مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۲۰-۱۰۱.

نوریان عبدالمهدی، شیروانی هومن (۱۳۹۸) بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های پنیرک (*Malva neglecta*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست شناسی ایران) ، ۳۲ (۴)، ۹۹۴-۹۸۴.

یغمایی فرنوش، کریم پور محمدحسن (۱۳۸۷) بررسی ویژگی‌های رفتاری زنجرک مولد ترنجبین *Poophilus nebulosus* Leth روی گیاه خارشتر *Alhagi persarum Boiss & Buhse* در منطقه تربت‌جام، استان خراسان رضوی. حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۲ (۲)، ۱۷۰-۱۶۱.

References

Adnaei SM, Moradi MR, Bayat H et al. (2013) Introduction of Alhaji and study of its phenomenological stages in the rangelands of Hoze- Sultan Qom. National Conference on Passive Defense in Agriculture (In Persian).

Agrama H, Tuinstra M (2003) Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. Afr J Biotechnol 2, 334-340.

Amirkhosravi A, Asri Y, Assadi M et al. (2021) Genetic structure of Alhagi (Hedysareae, Fabaceae) populations using ISSR data in Iran. Mol Biol Rep 48, 5143–5150.

Andrew AJ, Liston A, Popovich SJ (2004) Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). Am J Bot 91(12), 2004-2012.

Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5 (2), 49-56 (In Persian).

Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iran J Biotechnol 9, 222–229 (In Persian).

Bagheri A, Izadi Darbandi A, Malboobi M (2012) Practical applications of plant molecular biotechnology (translation). Mashhad University Press, 234 p (In Persian).

Bahador Y, MR Mohammadabadi, A Khezri, et al. (2016) Study of Genetic Diversity in Honey Bee Populations in Kerman Province using ISSR Markers. Res Anim Prod 7 (13), 186-192 (In Persian).

Barati M, Bazoubandi M, Ghorbanali M (2006) Study of some ecophysiological characteristics of *Alhagi pseudalhagi* growth. Rostaniha 7 (27), 111-123 (In Persian)

Botstein D, White RL, Skolnick M et al. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32, 314-322.

Bryan G, Collins A, Stephenson P et al. (1997) Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theor Appl Genet 94, 557-563.

Collard BY, Mackill D (2012) Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene Targeted Markers in Plants. Plant Mol Biol Rep 27, 86-93.

Davis TM, Haigis YUH, McGowan PJ (1995) Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. Theor Appl Genet 91, 582- 588.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19, 11-15.

Ebrahimpour Norabadi M, Yazdanbakhsh Z, Keshavarzi M (2012) Cytogenetic Study of Two Alhagi Species. J Herb Med 3(3), 167-173 (In Persian).

Farshadfar M, Moradzade N, Farshadfar E et al. (2017) Genetic diversity among fennel (*Fueniculum vulgare* Mill.) accessions using morphological and SCoT markers. Iran J Rageland Forest Planf Breed Genet Res 25(2), 212-231 (In Persian).

Farshadfar M, Shirvani H, Amjadian M et al. (2018) Application of SCoT marker to discriminate Lolium perenne and Lolium multiflorum species. Iran J Rageland Forest Planf Breed Genet Res 6(2), 207 - 220 (In Persian).

Gept P (1993) The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. In: Evolutionary Biology. (Eds.): M.K. Hecht, Plenum Press, New York, 534.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination ofgenetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4, 5758–5760.

Hassanein AM, Mazen AMA (2001) Adventitious bud formation in *Alhagi graecorum*. Plant Cell Tiss Org 65, 31-35.

Kalendar R (2007) FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm; 2007.

Kayis SA, Hakki EE, Pinarkara E (2010) Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (Cannabis sativa L.) in Turkey. Afr J Agric Re 5(21), 2925-2933.

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. In: Evolutionary biology. (ed)^(eds). Springer, pp, 381-398.

Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE et al. (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Mol Breed 3, 127–136.

Mirzaei S, Salari H (2021) Study on the genetic diversity of tomato's cultivars via SCoT marker. Agric Biotechnol J 13 (4), 101-120 (In Persian).

Mohammadabadi M, Askari N (2012) Characterization of Genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany, 120pp.

Mohammadabadi M, Oleshko V, Oleshko O, et al. (2021) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Guppy Fish. Turk J Fish Aquatic Sci 21 (12), 603-613.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. J Res Develop 5 (2), e154.

Mohammadi SA (2006) The analysis of molecular data from the point of view of studying genetic diversity. 9th Iranian Congress of Crop Science and Plant Breeding 96- 119 (In Persian).

Moshrefi-Araghi AR, Nemati H, Azizi M et al. (2020) Study of genetic diversity of some genotypes of iranian wild mint (Mentha longifolia L.) using ISSR marker and its correlation with dry yield and essential oil content. Agric Biotechnol J 12 (3), 117-138 (In Persian).

Noorian AM, Shirvani H (2019) Genetic variability of Malva neglecta ecotype using ISSR molecular markers. J Plant Res 32(4), 984-994 (In Persian).

Rahmati H, Farshadfar M, Shirvani H (2018) Study of Genetic Diversity of Festuca Arundinacea Based on ISSR Molecular. J Crop Breed, 9(24), 87-94 (In Persian).

Rezaie M, Naghavi MR, Maali Amiri R (2011) Assessment of genetic diversity in Alfalfa (Medicago Sativa L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran using SSR markers. Iran J Crop Sci 4(48), 520-532 (In Persian).

Roder MS, Plaschke J, Konig SU et al. (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol Genet Genom 246, 327-333.

Sheidai M, Rashid S (2007) Cytogenetic study of some Hordeum L. species in Iran. Acta Biol Szeged 51(2), 107–112.

Wei YM, Hou YC, Yan ZH, et al. (2005) Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. J Appl Genet 46, 3-9.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. Ann Eur Genet 15, 323-35.

Yaghmaei F, Karimpour H (2008) Assessment of behaviourial characteristics of poophilus nebulosus leth spittlebug on *Alhagi persarum* boiss & buhse camel thorn plant in Torbate Jam region, Khorasan Razavi province. Agric Sci Technol 22(2), 161 -170 (In Persian).

Zahid NY, Abbasi NA, Hafiz IA et al. (2009). Genetic Diversity of Indigenus Fennel (Foeniculum Vulgare Mill.) Germplasm in Pakistan Assessed by RAPD Markers. Pak J Bot 41, 1759-1767.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Rumin Res 132, 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, et al. (2011) Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol 10, 1812–1817.

Zargari A (1996) Mediciml Plants. Vol 2. Tehran University Press, 980 p (In Persian).