

Evaluation of genetic diversity of *suaeda aegyptiaca* genotypes in Khuzestan Province using SCoT molecular markers

Zahra Haghighipoor

Graduate Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran. E-mail address: zahrahaghighipoor@yahoo.com

Massoud Dehdari 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran. E-mail address: adehdari@yu.ac.ir

Fatemeh Nasernakhaei 

Assistant Professor, Department of Genetic and Plant Production, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail address: f.nasernakhaei@scu.ac.ir

Reza Amiri Fahlani 

Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran. E-mail address: Amiri@yu.ac.ir

Abstract

Objective

Suaeda aegyptiaca (Hasselq.) Zohary is a halophyte plant with many nutritional and medicinal uses. There is no information on study and estimation of the genetic diversity of *S. aegyptiaca* plants in Khuzestan province. So, this study was designed and implemented with the aim of investigating the genetic diversity and genetic relationships among *S. aegyptiaca* genotypes in Khuzestan province.

Materials and methods

In order to study of genetic diversity and genetic relationships among *S. aegyptiaca* genotypes, 26 genotypes from two regions of Khuzestan were selected as group one and two based on their DNA quantity and quality from the 71 collected samples. 12 SCoT primers were used to investigate the diversity and genetic relationships among and within populations. Genomic DNA was extracted from leaf tissue of genotypes and DNA amplification was done using 12 SCoT primers, the obtained bands were scored as zero (band absence) and 1 (band presence). Total

number of bands, number of polymorphic bands, and percentage of polymorphic bands, band information index, resolution power, polymorphic information content, marker index and Shannon index were calculated.

Results

A total of 103 fragments were amplified, which showed a high percentage of polymorphism. SCoT14 had the highest polymorphic information (0.43) and marker index (4.36). The highest resolution power (Rp) belongs to SCoT13 (13.38). Cluster analysis using UPGMA method classified the genotypes into five groups. Karoun (KAR2) and Gheyzaniyeh (GH1) genotypes, with the highest genetic distance, were suitable for usage in breeding programs. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that genetic diversity within groups was higher than between groups.

Conclusions

Some of the studied markers showed a high ability to distinguish genotypes, also the results indicated a high genetic diversity among the genotypes in terms of the studied SCoT markers. These results can be used in the breeding programs of *S. aegyptiaca* and related species.

Keywords: Genetic diversity, Germplasm, Marker index, *S. aegyptiaca*

Paper Type: Research Paper.

Citation: Haghighipoor Z, Dehdari M, Nasernakhaei F, Amiri Fahliani R (2024) Evaluation of genetic diversity of *suaeda aegyptiaca* genotypes in Khuzestan Province using SCoT molecular markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 16(4), 99-120.

Agricultural Biotechnology Journal 16(4), 99-120.

DOI: 10.22103/jab.2024.22888.1549

Received: September 08, 2024.

Received in revised form: October 23, 2024.

Accepted: October 24, 2024.

Published online: December 30, 2024.

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



© the authors

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیاه‌شور مصری *Suaeda aegyptiaca* (Hasselq.) Zohary استان

خوزستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT

زهرا حقیقی‌پور

دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران. رایانامه:

zahrahaghighipoor@yahoo.com

مسعود دهداری

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران. رایانامه:

adehdari@yu.ac.ir

فاطمه ناصر نخعی

استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه:

f.nasernakhaei@scu.ac.ir

رضا امیری فهلیانی

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران. رایانامه: Amiri@yu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۸/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۳

چکیده

هدف: سیاه شور مصری با نام علمی *Suaeda aegyptiaca* (Hasselq.) Zohary گیاهی هالوفیت است که کاربردهای تغذیه‌ای و دارویی زیادی دارد. نظر به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی و تخمین تنوع ژنتیکی گیاه سیاه‌شور در استان خوزستان انجام نشده است، این مطالعه با هدف بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های خودرو سیاه‌شور در استان خوزستان طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: برای انجام مطالعات مولکولی از بین ۷۱ نمونه جمع‌آوری شده ۲۶ ژنوتیپ که دارای DNAی مناسب بودند و در دو ناحیه بیشترین پراکنش داشتند تحت عنوان گروه‌های یک و دو انتخاب شدند. جهت بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین و داخل ژنوتیپ‌ها از ۱۲ آغازگر SCoT استفاده شد. بعد از استخراج DNA و انجام PCR، امتیازبندی ژنوتیپ‌ها به صورت صفر

(عدم نوار) و یک (وجود نوار) انجام شد و تعداد کل نوارها، تعداد نوارهای چندشکل، درصد نوارهای چندشکل، تعداد افراد دارای نوار، شاخص اطلاع دهی نوار، قدرت تفکیک، محتوای اطلاعات چندشکل، نسبت سهم مؤثر و شاخص نشانگر محاسبه شدند.

نتایج: در مجموع ۱۰۳ نوار تشکیل شد که درصد چندشکلی بالایی را نشان دادند. بیشترین میزان اطلاعات چندشکل (PIC) متعلق به SCoT₁₄ (۰/۴۳) و SCoT₁ (۰/۳۳)، شاخص نشانگری (MI) متعلق به SCoT₁₄ (۴/۳۶) و بالاترین میزان قدرت تفکیک (Rp) مربوط به SCoT₁₃ (۱۳/۳۸) بود. مقادیر شاخص‌های تنوع ژنی نی (h) ۰/۹۲، شانون (I) ۰/۳۲۰، شاخص تثبیت (F_{st}) ۰/۰۹۲ و جریان ژنی (N_m) ۰/۸۷۲ بدست آمدند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را در پنج گروه قرار داد. در گروه اول ۱۹ ژنوتیپ، در گروه دوم چهار ژنوتیپ و در سه گروه دیگر هر کدام یک ژنوتیپ قرار گرفتند. نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با تجزیه خوشه‌ای همخوانی داشته و گروه‌بندی تقریباً مشابهی را ارائه دادند. ژنوتیپ‌های KAR2 (کارون ۲) و GH1 (غیزانیه) را که بیشترین فاصله ژنتیکی از هم داشتند، جهت ادامه برنامه‌های به‌نژادی مناسب می‌باشند. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها از بین گروه‌ها بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: برخی از نشانگرهای مورد مطالعه توانایی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌ها نشان دادند که از آن‌ها می‌توان برای مطالعات به‌نژادی سیاهشور استفاده کرد. به طور کلی، نتایج حاکی از تنوع وسیع بین ژنوتیپ‌ها از نظر نشانگرهای SCoT مورد مطالعه بود. از این نتایج می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه و گونه‌های خویشاوند استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، ژرم‌پلاسما، سیاه شور مصری، شاخص نشانگر.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حقیقی‌پور زهرا، دهداری مسعود، ناصرنخعی فاطمه، امیری فهلیانی رضا (۱۴۰۳) ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیاهشور مصری *Suaeda aegyptiaca* (Hasselq.) Zohary استان خوزستان با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۴)، ۹۹-۱۲۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

سیاه شور مصری با نام علمی *Suaeda aegyptiaca* (Hasselq.) Zohary گیاهی هالوفیت با نام محلی گاگله (Dinarvand 2021) و کاکل (Akhami 2006) است. از ترکیبات غالب گزارش شده در دانه این گیاه، اسیدهای چرب است که بیشترین مقدار مربوط به اسید لینولئیک و اسید پالمیتیک است. با توجه به ارزش اسیدهای چرب در صنایع غذایی، بهداشتی و

داروسازی، گیاه سیاه شور مصری می‌تواند منبع طبیعی غنی جهت تولید این ترکیبات باشد (Akhani 2006). پراکندگی این گیاه در عراق، اردن، فلسطین، شبه جزیره عربستان، شمال آفریقا، مصر و در ایران در مرکز، جنوب و جنوب شرق است (Assadi 2019). در استان خوزستان نیز در فصل پاییز به فراوانی در اطراف اهواز، سوسنگرد، بستان، هویزه، کوشک، طلایه آبادان، خرمشهر، دارخوین، اطراف شادگان تا بندر ماهشهر و هندیجان به فراوانی می‌روید (Dinarvand 2021). آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم گیاهی ضمن حفظ ذخائر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آنها را در برنامه‌های به‌نژادی تعیین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آنها، امکان سازماندهی ژرم پلاسم و تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد (Farshadfar et al. 2018). از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی برای بررسی و تخمین تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی استفاده می‌شود. در حال حاضر از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاهی، بدلیل کارایی بالا و عدم تاثیر عوامل محیطی بیشتر استفاده می‌شود. نشانگر چندشکلی مبتنی بر رمز آغاز (SCoT¹) به عنوان یکی از نشانگرهای نوین مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR²) است که بر اساس نواحی کوتاه حفاظت شده اطراف رمز آغاز ATG در ژن‌های گیاهی طراحی شده است (Collard & Mackill 2009). سیستم این نشانگر غالب است. دو آغازگر تک رشته‌ای در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به رشته‌های مخالف DNA الگو، در جهت عکس هم متصل می‌شوند و فاصله بین آنها توسط آنزیم پلیمرز به صورت نمایی در واکنش PCR تکثیر می‌شود. اگر جهش‌های حذف یا اضافه در محل اتصال آغازگر رخ دهد، شاهد عدم اتصال آغازگر و عدم سنتز قطعه DNA خواهیم بود (Davis et al. 1995). با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط صفات مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته با نشانگرهای مولکولی SCoT پژوهشی انجام شد و نتایج نشان داد این آغازگر بهتر از بقیه آغازگرها فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص می‌کند (Khodadadi et al. 2021). در بررسی نقش نشانگر SCoT در جدایی مرز بین گونه‌ها و مشخص شدن روابط بین گونه‌ها در جنس *Adonis* (چشم خروس) کارایی نشانگر SCoT در تفکیک جنس *Adonis* (چشم خروس) مشخص شد (Pakdel et al. 2021). تنوع ژنتیکی در میان چندین گونه نارگیل در ویتنام جهت بکارگیری در برنامه‌های به‌نژادی با ۱۵ نشانگر SCoT بررسی شد که نتایج حاکی از تنوع درون گونه‌ای بالایی بود (Khang et al. 2022). در پژوهشی به‌منظور بررسی ارتباط نشانگرهای SCoT با صفات آگرو-فیزیولوژیک در ژرم پلاسم اصلاح شده گندم دوروم نتایج حاصل تنوع قابل توجهی را بر اساس داده‌های فنوتیپی و نشانگر SCoT در ژرم پلاسم مورد بررسی گندم دوروم نشان داد که می‌تواند در برنامه به‌نژادی گندم دوروم مورد توجه قرار گیرد. این اطلاعات برای گروه‌بندی ژرم پلاسم و تعیین گروه‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی، توسعه ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا و استفاده در برنامه‌های دورگ‌گیری ارزشمند می‌باشند (Mohammadi et al. 2022). در پژوهشی دیگر ۲۲ جمعیت گیاه دارویی *Lepidium* شامل سه گونه مختلف به کمک ۱۴ نشانگر SCoT مورد بررسی قرار گرفتند (Jelvehgar et al. 2021). در این

¹ - Start condon targeted (SCoT) marker

² - Polymerase chain reaction

بررسی ۹۸/۴ درصد چندشکلی بوسیله آغازگرها گزارش گردید. تمامی گزارش‌های بالا کارایی نشانگر SCoT را در بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف نشان می‌دهند. با وجود اهمیت گیاه سیاهشور مطالعه‌ای بر روی تنوع ژنتیکی آن صورت نگرفته است. با توجه به موارد فوق الذکر و نظر به ضرورت بررسی و تخمین تنوع ژنتیکی گیاه سیاهشور در استان خوزستان، این مطالعه با بکارگیری ژنوتیپ‌های مختلف استان خوزستان و با استفاده از نشانگر SCoT طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

در بازه زمانی آبان تا آذر ماه سال ۱۴۰۱ بر اساس فلور استان (Dinarvand 2021) مناطق مختلف استان خوزستان از نظر رویش گیاه سیاه شور مصری مورد بررسی قرار گرفتند. تعدادی از برگ‌های سالم ۷۱ نمونه سیاهشور برداشت و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در نهایت ۲۶ نمونه که دارای کیفیت و کمیت مناسب DNA بودند به عنوان یک جمعیت و بسته به پراکنش آنها در قالب گروه یک و دو در نظر گرفته شدند (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA از بافت برگ ۲۶ ژنوتیپ با استفاده از کیت استخراج شرکت پارس توس طبق

دستورالعمل زیر انجام پذیرفت: ۱۰۰ میلی گرم از بافت برگ تازه وزن و در هاون با نیتروژن مایع پودر شد. بعد از انتقال به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری، ۵۰۰ میلی لیتر محلول بافر ۱ به آن افزوده شد. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز k و ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر نمونه اضافه و یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس چندین بار اینورت انجام شد. پس از ۱ ساعت ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصال بافتی^۲ (بافر ۲) به مخلوط اضافه و ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت. ۵۰۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه و پس از هم زدن، ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. مایع رویی (شفاف) به میکروتیوب جدید انتقال و به میزان نصف حجم انتقالی ایزوپروپانول اضافه شد. پس از هم زدن به ستون منتقل شده و یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو^۳ (بافر ۳) اضافه و یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۷۰۰ میکرو لیتر از بافر شستشو اضافه و یک دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک دقیقه سانتریفیوژ بدون مواد و خالی انجام شد. انتقال به میکروتیوب جدید انجام شد و ۵۰ میکرولیتر از بافر شستشو افزوده و پس از گذشت سه دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. نمونه تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تعیین کیفیت و کمیت DNA: پس از استخراج DNA کمیت و کیفیت آن به ترتیب با استفاده از اسپکتروفتومتر و

الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. جهت تهیه بافر TBE ابتدا یک محلول ذخیره با غلظت 5X تهیه شد.

¹ - Lysis buffer

² - Tissue Binding Buffer

³ - Washing Buffer

جدول ۱. موقعیت جغرافیایی ۲۶ ژنوتیپ مورد مطالعه

Table 1. Geographical location of 26 studied genotypes

عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	نام هر ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	نام گروه
Latitude	Longitude	Name of each genotype	Collected place	The name of the group
31°20'30"N	48°40'14"E	AH1	Ahvaz	
31°20'40"N	48°37'41"E	AH2	Ahvaz	
31°15'12"N	48°39'45"E	AH3	Ahvaz	
30°56'25"N	48°59'49"E	AH4	Ahvaz	
31°13'35"N	48°38'53"E	AH5	Ahvaz	
31°13'26"N	48°38'54"E	AH6	Ahvaz	
31°11'48"N	48°38'9"E	AH7	Ahvaz	
31°11'6"N	48°37'48"E	AH8	Ahvaz	
31°13'20"N	48°36'51"E	AH9	Ahvaz	
31°13'46"N	48°38'52"E	KAR2	Karoun	1
31°22'46"N	48°40'34"E	GH1	Gheyzaniyeh	
31°28'37"N	48°26'50"E	HAM1	Hamidieh	
31°30'60"N	48°14'16"E	SOS1	Sosangerd	
31°32'53"N	48°11'52"E	SOS2	Sosangerd	
31°32'42"N	48°12'3"E	SOS3	Sosangerd	
30°38'60"N	48°41'51"E	AB1	Abadan	
30°23'53"N	48°12'31"E	KH1	Khorramshahr	
30°24'6"N	48°12'18"E	KH2	Khorramshahr	
30°24'39"N	48°11'48"E	KH3	Khorramshahr	
30°52'22"N	48°30'10"E	DAR2	Darkhoveyn	
31°53'2"N	48°20'3"E	SHO1	Shosh	
31°47'10"N	48°27'50"E	SHO2	Shosh	2
31°39'17"N	48°35'33"E	SHO3	Shosh	
31°39'8"N	48°35'42"E	SHO4	Shosh	
31°39'54"N	48°35'2"E	ELH2	Elhaee	
31°55'31"N	48°18'40"E	KAK2	Karkheh	

سپس به مقدار نیاز جهت تهیه TBE1X رقیق سازی انجام شد. برای تهیه آگارز ۰/۸ درصد، ابتدا ۰/۸ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر TBE1X مخلوط و به کمک حرارت حل شد. ۰/۵ میکرولیتر Safe Stain dye (۱ µg/mg) به ژل اضافه گردید و در نهایت ژل در قالب ریخته شد تا در دمای محیط آزمایشگاه به آرامی سفت شود. برای هر نمونه مقدار دو میکرولیتر از DNA و ۲ میکرولیتر رنگ بارگذاری درون چاهک ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شد. عمل الکتروفورز به مدت ۳۵ دقیقه با ولتاژ ۱۱۰ صورت گرفت و سپس با دستگاه ژل داکيومنت رؤیت و عکس برداری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از نشانگر SCoT: جهت انتخاب نشانگر SCoT از بین ۸۰ آغازگر معرفی شده توسط (Collard & Mackill (2009) و Luo *et al.* (2010) تعداد ۱۲ نشانگر که بیشترین چندشکلی نشان داده اند، انتخاب شدند (جدول ۲). آغازگرها ساخت شرکت تگ کپنهاگ دانمارک به سفارش شرکت ژن فرآوران بودند. جهت رقیق سازی آغازگرها مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده آب استریل اضافه شد و حجم نهایی آن به ۱۰۰ میکرومولار رسانده شد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای SCoT مورد مطالعه

Table 2. Characteristics of the studied SCoT primers

شماره	آغازگر	دمای اتصال °C	GC (%)	توالی آغازگر (۳' → ۵')
No.	Primer	Annealing temperature °C		Primer sequence (5' → 3')
1	SCoT 1	48.0	50.0	AAGCAATGGCTACCACCA
2	SCoT 3	50.3	55.6	ACCATGGCTACCACCGCA
3	SCoT 5	48.0	50.0	CAACAATGGCTACCACCA
4	SCoT 11	48.0	50.0	ACGACATGGCGACCACGC
5	SCoT 13	52.6	61.1	ACGACATGGCGACCACGC
6	SCoT 14	54.9	66.7	ACCATGGCTACCACCGGC
7	SCoT 19	54.9	66.7	ACCATGGCTACCACCGCG
8	SCoT 20	54.9	66.7	ACGACATGGCGACCCACA
9	SCoT 21	52.6	61.1	ACCATGGCTACCACCGTC
10	SCoT 26	52.6	61.1	CAACAATGGCTACCACCG
11	SCoT 34	52.6	61.1	CATGGCTACCACCGGCC
12	SCoT 35	57.1	72.2	CAACAATGGCTACCACGA

واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. ۵ میکرولیتر از DNA (با غلظت نهایی ۵۰ نانوگرم) و ۰/۶ میکرولیتر از آغازگر (با غلظت نهایی ۱۰ نانوگرم)، ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس 2X و ۱/۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استفاده شد.

تکثیر در دستگاه مستر سایکلر (SimpliAmp Thermal Cycler, Applied biosystems, USA) انجام و چرخه PCR به این شرح بود: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دماهای اتصال آنها (طبق جدول ۲) به مدت ۵۰ ثانیه، گسترش اولیه به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس. جهت مشاهده محصول PCR مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه درون چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری گردید. سپس به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۱۱۰ الکتروفورز انجام پذیرفت. در نهایت برای رؤیت نوارهای چندشکل، ژل آگارز به دستگاه ژل داکيومنت (UV Transilluminator, MUV21-312, Taiwan) منتقل گردید و عکس برداری انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با توجه به اینکه نشانگر SCoT دارای الگوی غالب می باشد، ژنوتیپ‌ها به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) برای هر کدام از آلل‌ها امتیازدهی شدند. فقط به نوارهای واضح و تکرارپذیر امتیاز داده شد. تجزیه و تحلیل پارامترهایی از جمله درصد مکان‌های ژنی چندشکل^۱ (PPL)، درصد نوارهای چندشکل (PPB)، شاخص اطلاع دهی نوار (I_b)، قدرت تفکیک نشانگر (R_p)، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، شاخص نشانگر (MI)، تعداد آلل‌های مشاهده شده^۲ در نشانگر (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر^۳ در نشانگر (N_e) در هر مکان ژنی، شاخص شانون (I) (Shannon 1948)، شاخص نی (h) (Nei 1972)، تنوع بین گروه‌ها (G_{st}) و جریان ژنی (N_m) طبق روابط زیر و با استفاده از نرم افزارهای اکسل، POPGEN (Yeh et al. 1999) ver.1.32 و GENALEX ver. 6.5 (Peakall & Smouse 2006) محاسبه گردیدند.

$$PPB = \frac{np}{n} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

$$I_b = 1 - [2 \times |0.5 - p|] \quad \text{رابطه ۲}$$

$$R_p = \sum I_b \quad \text{رابطه ۳}$$

$$PIC = 2fi(1 - fi) \quad \text{رابطه ۴}$$

$$MI = PIC \times N \times B \quad \text{رابطه ۵}$$

$$H = - \sum_{i=1}^s P_i \times \ln P_i \quad \text{رابطه ۶}$$

$$Gst = d_{st}/h_t \quad \text{رابطه ۷}$$

در این روابط np=تعداد نوارهای چندشکل، n و N=تعداد کل نوارها، p=فراوانی نسبی آلل (وجود نوار) و \bar{f}_i فراوانی نسبی وجود نوار (امتیاز یک) برای هر آلل، d_{st} =تنوع داخل گروه‌ها و h_t =تنوع کل می‌باشند.

¹ - Percentage of polymorphic loci

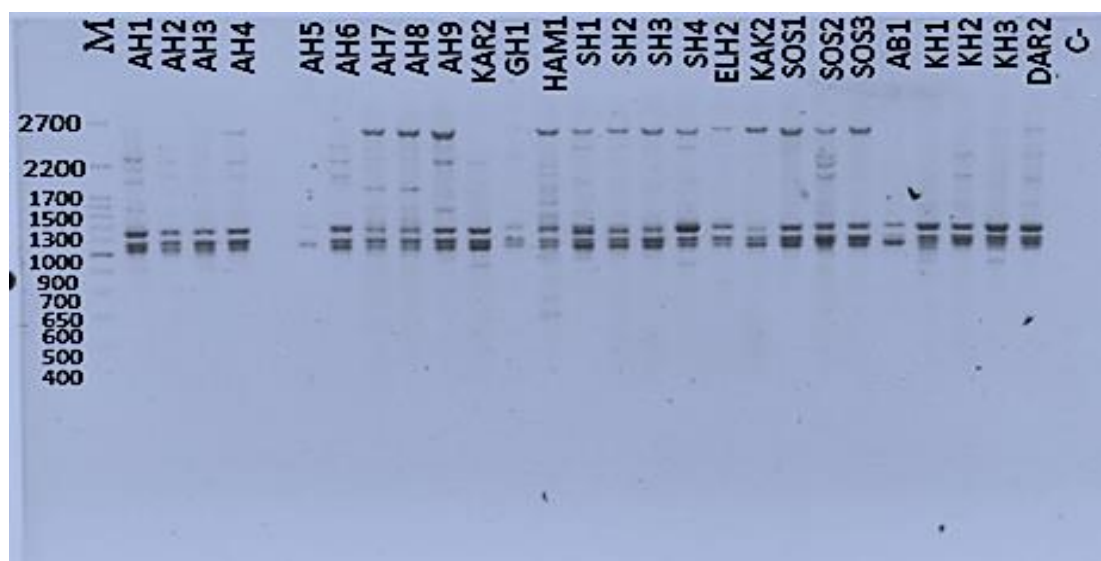
² - Number of observed alleles

³ -Number of effective alleles

به کمک نرم افزار NTSYS (Rohlf 1987) تجزیه خوشه‌ای با توجه به ضریب همبستگی کوفتیک به روش UPGMA و ماتریس تشابه جاکارد انجام شد. تعداد منطقی گروه‌ها با استفاده از آزمون T^2 کاذب هتلینگ مشخص گردید. با استفاده از نمودار دو بعدی حاصل از مولفه‌های اصلی پراکنش ژنوتیپ‌ها برای تأیید یا عدم تأیید گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بررسی گردید.

نتایج و بحث

از ۱۲ آغازگر SCoT استفاده شده در این مطالعه دو آغازگر SCoT 3 و SCoT 5 تکثیر و نوادهی نداشتند. دامنه اندازه نواریها ۲۰۰-۳۰۰۰ جفت باز (bp^1) بود. الگوی تکثیر یک نمونه از آغازگرهای SCoT در شکل زیر آورده شده است (شکل ۱).



شکل ۱. الگوی نواریهای حاصل از محصول PCR ژنوتیپ‌های سیاه‌شور مصری توسط آغازگر SCoT 35. M نشانگر وزنی و سایر ستون‌ها مربوط به ژنوتیپ‌ها طبق جدول ۱ می‌باشند

Figure 1. The bands pattern of PCR products with primer SCoT 35 of 26 *Suaeda aegyptiaca* genotypes. The M column is related to molecular weight marker and the other columns are related to genotypes as Table 1

از میان ۱۰ آغازگر SCoT، ۵ آغازگر (SCoT 11، SCoT 13، SCoT 14، SCoT 26، SCoT 20) صددرصد چندشکلی نشان دادند. در کل ۱۰۳ نوار در این مطالعه حاصل گردید که ۹۰/۹ نوار آن چندشکل بودند (جدول ۳). بیشترین قطعات تکثیر شده متعلق به آغازگرهای SCoT 1، SCoT 14، SCoT 13، SCoT 11 و SCoT 35 به ترتیب ۱۴، ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۱۲ نوار می‌باشد.

¹ - Base pair

کمترین قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگر SCoT 20 دارای ۴ قطعه تکثیر شده می‌باشد. دامنه درصد نوارهای چندشکل در مطالعه ما ۶۰ تا ۱۰۰ درصد بود. در گیاهان مختلف نشانگر SCoT نتایج متفاوتی در مقایسه با پژوهش حاضر دربر داشته است. بعنوان مثال آغازگرهای SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۹ اکوتیپ زیره سبز ایرانی در مجموع ۶۲/۰۳ درصد چندشکلی نشان دادند (Ebrahimiyan et al. 2017). در مطالعه‌ای دیگر بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ مختلف بادام زمینی به وسیله ۱۸ آغازگر مربوط به نشانگر SCoT صورت گرفته است از ۱۵۷ نوار تولید شده به کمک این ۱۸ آغازگر، ۶۰ نوار (۳۸/۲۲٪) چندشکل بودند (Xiong et al. 2011) که در مقایسه با نتایج ما در این دو پژوهش چندشکلی کمتری آشکار شده است. در برخی مطالعات دیگر همانند مطالعه حاضر چندشکلی وسیعی بوسیله نشانگرهای SCoT مشاهده شده است بعنوان مثال در یک مطالعه از ۲۶ آغازگر SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ اکوتیپ بارهنگ ایرانی و ارتباط احتمالی آن با صفات زراعی استفاده شده است، در مجموع، ۶۹۷ نشانگر با متوسط چندشکلی ۸۸/۶۸ درصد بدست آمد که نشاندهنده کارایی بالای این نشانگرها در تعیین سطح تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه بود (Rahimi et al. 2018). (Khang et al. (2022) تنوع و روابط ژنتیکی ۷۹ ژنوتیپ از چهار گونه نعنای با استفاده از ۷۰ آغازگر SCoT را برای شناسایی نشانگرهای اختصاصی گونه بررسی کردند. در مجموع، ۱۷۱ نشانگر تکثیر گردید و درصد چندشکلی از ۷۵ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. (Jalilian et al. (2018) برای ارزیابی روابط فیلوژنی و ساختار جمعیت ۳۰ نمونه متعلق به چهار گونه گلابی، از ۱۲ آغازگر SCoT استفاده کردند. در این مطالعه نیز نشانگرهای SCoT چندشکلی بالایی را (۹۵/۹٪) بروز دادند. با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در نه جمعیت بابونه آلمانی، مطالعه‌ای صورت گرفت که در آن از نشانگر مولکولی SCoT استفاده شد. ۱۰ آغازگر SCoT استفاده شده در این تحقیق، نوارهای چندشکل با الگوی نواری واضح ایجاد کردند که میانگین درصد نوارهای چندشکل ۹۶/۵ به دست آمد (Tahani et al. 2019).

در این مطالعه مقدار شاخص اطلاع‌دهی نوار (I_b) بسته به نشانگر از ۰/۱۹ تا ۰/۷۸ متفاوت بود. همانگونه که از رابطه ۲ استنباط می‌گردد این شاخص براساس میزان هتروزیگوسیتی محاسبه می‌شود و کاربرد اصلی آن در محاسبه قدرت تفکیک‌پذیری نشانگر می‌باشد. براساس نتایج، متوسط شاخص قدرت تفکیک‌پذیری کل آغازگرهای مورد ارزیابی، برابر با ۹/۵۰۸ بود که بیشترین مقدار آن مربوط به SCoT 13 با ۱۳/۳۸ و کمترین مقدار آن مربوط به SCoT 20 با ۴/۵ بود (جدول ۳). مقدار این شاخص از ۲/۴ تا ۷/۸ در گیاه *Lepidium* (Jelvehgar et al. 2021)، از ۲/۶ تا ۶/۵ در گیاه خشخاش (Shaghghi et al. 2019) با بکارگیری نشانگر SCoT متفاوت بوده است.

محتوای اطلاعات چندشکل که با استفاده از فراوانی آلی برای هر آغازگر به طور جداگانه محاسبه گردید (جدول ۳). میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای نشانگر SCoT برابر با ۰/۲۷۱ بود. بالاترین میزان اطلاعات چندشکل مربوط به آغازگر SCoT 14 به میزان ۰/۴۳ و کمترین آن متعلق به SCoT 34 به میزان ۰/۱۵ بود. بر همین اساس به نظر می‌رسد آغازگر SCoT 14 بهتر از سایر آغازگرها توانسته فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کند. این شاخص یکی از مهمترین شاخص‌ها در بررسی کارایی نشانگرهای مولکولی است که در اغلب مطالعات برآورد می‌گردد. در مطالعه ما و نشانگرهای غالب بسته به فرمول بکار رفته

حداکثر مقدار آن ۰/۵ خواهد بود. (Agravel et al. 2018) از آغازگر SCoT برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۹ نمونه رز استفاده کردند که در مجموع ۲۹ نشانگر چندشکل بودند. میزان اطلاعات چندشکلی بین ۰/۴۲ تا ۰/۹۲ با میانگین ۰/۷۸ متغیر بود. همانگونه که ذکر شد دلیل برآورد بیشتر از ۰/۵ در این پژوهش رابطه بکارگرفته شده می‌باشد که صحیح نمی‌باشد. مقدار این شاخص در گونه‌های مختلف *Lepidium* از ۰/۲۶ تا ۰/۴۱ (Jelvehgar et al. 2021) و در گیاه خشخاش از ۰/۲۳۳ تا ۰/۳۳۵ (Shaghghi et al. 2019) گزارش گردیده است.

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، میانگین شاخص نشانگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۲/۴۱۳ محاسبه گردید که بیشترین مقدار شاخص نشانگری متعلق به آغازگرهای SCoT 1، SCoT 11، SCoT 13 و SCoT 14 به ترتیب برابر با ۳/۳۶، ۳/۲۱، ۳/۹۷، ۴/۳۶ و کمترین آن مربوط به آغازگرهای SCoT 20 و SCoT 34 به ترتیب با مقادیر ۰/۸۴ و ۰/۵۴ بود. شاخص نشانگری (MI) همانند شاخص PIC برآورد مناسبی از کارایی آغازگرها است که به تعداد نوارهای چندشکل به دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می‌شود (Milboun et al. 1997). در مطالعات مختلف بسته به نوع گیاه مقادیر متفاوتی بدست آمده است مثلاً در گونه‌های *Lepidium* متوسط شاخص نشانگری ۱/۵۹ (Jelvehgar et al. 2021) که کمتر از مقدار بدست آمده در آزمایش ما می‌باشد و در گیاه خشخاش متوسط آن ۴/۲۸۴ (Shaghghi et al. 2019) که بیشتر از مقدار آزمایش حاضر است بدست آمده است. با توجه به اینکه در محاسبه شاخص نشانگر از PIC، تعداد نوارها، تعداد نوارهای چندشکل و به طور غیرمستقیم قدرت تفکیک پذیری استفاده می‌شود به نظر می‌رسد این شاخص کارایی نشانگرها را در مقایسه با سایر شاخص‌ها بهتر بیان می‌کند. درصد مکانهای چند شکل در گروه یک ۸۷/۳۸ و در گروه دوم ۴۲/۳۸ بود که در مقایسه با پژوهش دیگر Jelvehgar et al. (2021) روی گیاه *Lepidium* مقادیر کمتری است. در بین جمعیت‌های مورد مطالعه سیاه شور مصری تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) در هر مکان ژنی بین ۱/۸۶۴ تا ۱/۱۵۵ با میانگین ۱/۵۱۰ و همینطور میزان آلل‌های مؤثر (Ne) با میانگین ۱/۳۴۶ مشاهده گردید (جدول ۴). جهت بررسی میزان یکنواختی هریک از گروه‌ها نسبت تعداد آلل‌های مؤثر به تعداد آلل‌های مشاهده شده (Ne/Na) محاسبه گردید. برای نشانگر SCoT این نسبت در دامنه بین ۰/۷۵ تا ۱/۱۱ با میانگین ۰/۹۳ متغیر بود. نزدیک بودن اعداد و دامنه کوچک تغییرات Ne/Na نشاندهنده توزیع نسبتاً برابر آلل‌ها می‌باشد. شاخص تنوع ژنی Nei از شاخص‌های مهم برای ارزیابی تنوع ژنی بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها می‌باشد (Nei 1972). شاخص تنوع ژنی نی (h) در نشانگر SCoT در گروه یک ۰/۱۵ و در گروه دو ۰/۳۷۱ و میانگین ۰/۲۴ بود و شاخص اطلاعات شانون (I) در گروه دو ۰/۲۳۹ و در گروه یک ۰/۴۰۱ و میانگین ۰/۳۲۰ مشاهده گردید (جدول ۵). مقدار شاخص نی در مطالعه ما تقریباً مشابه با مقادیر بدست آمده در مطالعه‌ای (Jelvehgar et al. 2021) روی گیاه *Lepidium* به میزان ۰/۲۱۵ بود در حالی که کمتر از مقادیر بدست آمده در گیاه زیره سبز (Ebrahimiyan et al. 2017) به میزان ۰/۳۵ و در گیاه خشخاش (Shaghghi et al. 2019) به میزان ۰/۴۳ بود.

جدول ۳. تعداد کل نوارها (N)، تعداد نوار تکثیر شده چندشکل (np)، درصد چندشکلی (%PPB)، میانگین تعداد نوار حاوی اطلاعات (I_b)، قدرت تفکیک (R_p)، محتوی اطلاعات چندشکل (PIC)، شاخص نشانگری (MI) و اندازه نوارها (SZ) برای آغازگرهای SCoT مورد مطالعه

Table 3. The total number of bands (N), the number of polymorphic bands (np), the percentage of polymorphism Band (PPB), the band containing information (I_b), the resolution power (R_p), the polymorphic information content (PIC), the marker index (MI) and the size of the bands for the studied SCoT primers

آغازگر primer	N	np	%PPB	I_b	R_p	PIC	MI	SZ(bp)
SCoT1	14	11.9	85.0	0.50	7.71	0.34	3.36	3000-500
SCoT11	12	12.0	100.0	0.56	9.50	0.27	3.21	3000-300
SCoT13	13	13.0	100.0	0.68	13.38	0.30	3.97	1700-300
SCoT14	10	10.0	100.0	0.45	5.20	0.43	4.36	1500-200
SCoT19	9	8.0	88.9	0.69	10.66	0.26	1.89	3000-600
SCoT20	4	4.0	100.0	0.34	4.50	0.21	0.84	2000-600
SCoT21	9	7.0	77.8	0.78	11.33	0.21	1.14	3000-500
SCoT26	10	10.0	100.0	0.19	12.00	0.28	2.87	2400-400
SCoT34	10	6.0	60.0	0.66	9.80	0.15	0.54	2200-400
SCoT35	12	9.0	75.0	0.72	11.00	0.28	1.95	2700-400

این در حالی هست که مقدار شاخص شانون در مطالعه حاضر از هر سه مطالعه ذکر شده بیشتر بود. به هر حال دلیل این تفاوتها و شباهتها را باید در نوع گیاه مورد مطالعه و نشانگر بکار رفته جستجو نمود. در مطالعه حاضر میزان G_{st} برابر با ۰/۱۲۸ و میزان جریان ژنی (Nm) برابر با ۰/۸۷۲ می باشد. این مقدار G_{st} بیانگر تنوع زیاد داخل جمعیت در مقایسه با تنوع بین آنها می باشد یعنی تنوع داخل حدود هفت برابر تنوع بین دو جمعیت است. دلیل این امر در بخش بعدی توضیح داده می شود. جریان ژنی در بین جمعیتها در مطالعه حاضر متوسط به بالا بود. این شاخص به طور قابل توجهی با افزایش فاصله جغرافیایی بین جمعیتها کاهش می یابد. ساختار ژنتیکی جمعیتهای یک گونه انعکاسی از برهم کنشهای پیشینه تکاملی آن در دراز مدت، جهش، نوترکیبی، رانش ژنتیکی، سیستم تلاقی، جریان ژنی و گزینش مصنوعی است (Schaal et al. 1998). نتایج بررسی شاخص چندشکلی در درون هر گروه نشان داد که بالاترین درصد چندشکلی مربوط به گروه یک خوزستان با ۸۷/۳۸ درصد بود (جدول ۵) که این نشاندهنده عدم یکنواختی این جمعیت نسبت به دیگر جمعیت مورد مطالعه است.

جدول ۴. درصد مکان‌های ژنی چندشکل در نشانگر (PPL)، میانگین تعداد آللهای مشاهده شده (Na)، میانگین آللهای مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنی نی (h) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) در دو گروه یک و دو خوزستان بر اساس نشانگر SCoT

Table 4. The percentage of polymorphic gene locations in the marker (PPL), the average number of observed alleles (Na), the average effective alleles (Ne), the Nei gene diversity index (h) and Shannon's information index (I) in the two groups of North and South Khuzestan based on the SCoT markers

جمعیت	تعداد نمونه‌ها	%PPL	Na	Ne	Na/ Ne	I	h
Population	Number of samples						
1	20	87.38	1.864	1.409	0.75	0.401	0.15
2	6	42.38	1.155	1.284	1.11	0.239	0.37
میانگین	-	65.05	1.510	1.346	0.93	0.320	0.24
Average							

بررسی تنوع ژنتیکی در ۱۹ ژنوتیپ پنیرک از مناطق مختلف ایران با استفاده از ۱۵ نشانگر مولکولی SCoT نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپ‌های پنیرک وجود دارد و نشانگر SCoT چندشکلی خوبی نشان دادند (Noorian 2020). همچنین با بررسی‌هایی که روی ۳۶ ژنوتیپ از سه جمعیت خشخاش با استفاده از ۲۶ آغازگر نشانگر مولکولی SCoT انجام شده است، مشخص کرد که نشانگر مولکولی SCoT قابلیت تفکیک جمعیت‌های خشخاش را دارد و ابزاری کارآمد در مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های این گیاه می‌باشد (Shaghghi et al. 2019). برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۴۲ نمونه کاکوتی از نقاط مختلف ایران، از ۲۵ نشانگر SCoT استفاده شد. مقدار بالای چندشکلی مشاهده شده در قطعات حاصل از آغازگرهای SCoT، حکایت از توانایی مناسب این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه کاکوتی است (Zamani et al. 2016). نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد در درون گروه‌ها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها بود (جدول ۵). بر این اساس درصد تنوع در بین گروه‌ها ۹ درصد و در درون گروه‌ها ۹۱ درصد مشاهده گردید. عواملی مانند دما، میزان رطوبت، میزان بارندگی، موقعیت جغرافیایی و غیره بر میزان تنوع ژنتیکی و توزیع آن تأثیرگذار است (Nevo et al. 1998). در مطالعه ای که روی ژنوتیپ‌های پنیرک ایرانی با نشانگر SCoT انجام شد درصد تنوع درون گونه ای ۸۲ درصد و درصد تنوع بین گونه ای ۱۸ درصد گزارش شده است (Noorian 2020). همچنین نتایج تجزیه واریانس مولکولی روی ژنوتیپ‌های کاکوتی با استفاده از نشانگر SCoT حکایت از تنوع زیاد در داخل نمونه‌ها به میزان ۸۹ درصد تنوع کل بود (Zamani et al. 2016).

جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی در جمعیت های سیاهشور مصری

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) in *S. aegyptiaca* populations

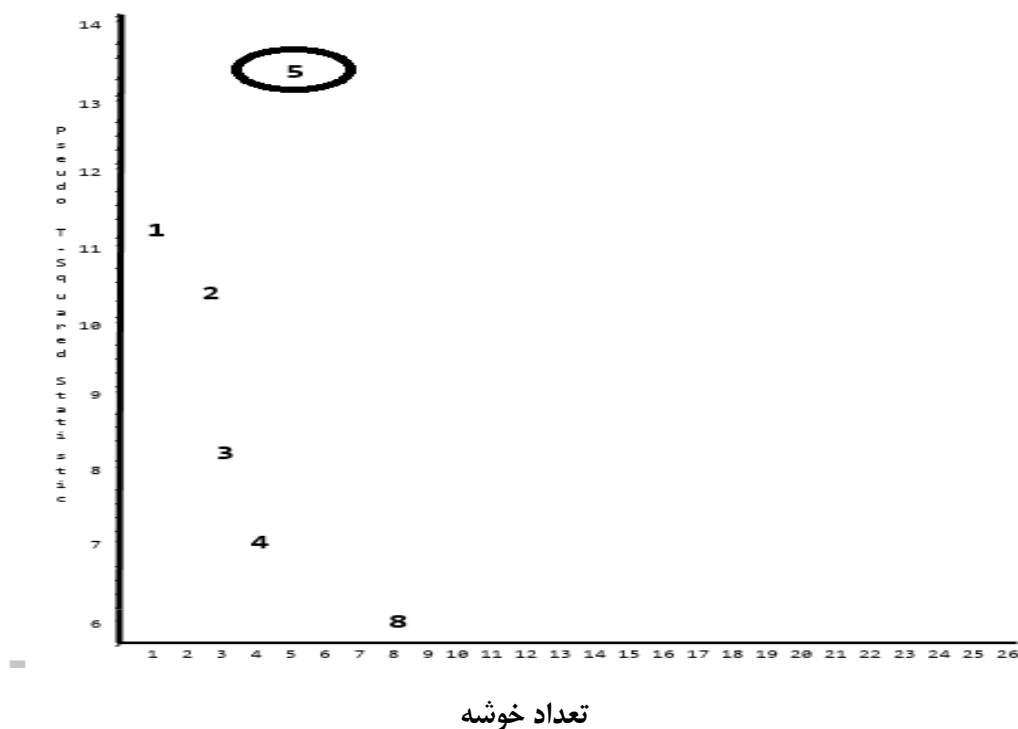
Source of Variation	df	Sum of Square	Mean of Square	Variance	Variance explanation (%)
Between	1	28.419	28.419	1.493	9
Within	24	351.35	14.640	14.640	91
Total	25	379.769		16.132	100

با بررسی جمعیت های بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) به کمک نشانگر SCoT میزان تنوع درون جمعیت ها ۷۶ درصد و بین جمعیت ها ۲۴ درصد گزارش شده است (Shabaniyan et al. 2015). تنوع ژنتیکی مشاهده شده در چچم با استفاده از نشانگر SCoT در درون گونه ها برابر ۵۱ درصد و در بین گونه ها برابر ۴۹ درصد بود (Farshadfar et al. 2018). برای ارزیابی ژنتیکی و تاریخچه تکاملی گونه های مختلف مرکبات متعلق به کشور تونس نیز از ۷۲ آغازگر SCoT استفاده شد که در مجموع ۱۳۲ نشانگر با درصد چندشکلی ۹۳/۹ تکثیر گردید و میانگین تنوع ژنی برابر ۰/۳۷۶ بود. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، واریانس درون و بین گروهی به ترتیب ۸۴ و ۱۶ درصد از واریانس مولکولی کل را تبیین کردند (Mahjabi et al. 2015). همانگونه که ملاحظه می گردد تقریباً در تمامی مطالعات گزارش شده همانند مطالعه ما تنوع داخل جوامع بیشتر از بین جوامع بوده است. عواملی چون جابه جایی ژرم پلاسم ناشی از بارندگی و سیل، جابه جایی بذور از طریق دستگاه گوارش دام، پرندگان، فعالیت انسانی (مانند خاک برداری)، دگرگشتی و طوفان نیز می تواند منجر به ایجاد تغییرات ژنتیکی و در نتیجه مشاهده تنوع بالا درون گروه ها شوند. از طرفی اندک بودن تعداد گروه های مورد مطالعه و تعداد کم نمونه در گروه دو نیز عوامل مهم دیگری هستند که می توانند تنوع را کاهش دهند.

گروه بندی ژنوتیپ ها بر اساس نشانگرهای SCoT: دندروگرام نهایی با استفاده از نرم افزار NTSYS ver.2.2 بر

اساس بهترین ضریب همبستگی کوفنتیک (جدول ۶) با $r=0/835$ برای ضریب جاکارد و روش UPGMA ترسیم شد. Rincon et al. (1996) در تجزیه خوشه ای با استفاده از داده های مولکولی نشان دادند که ضریب کوفنتیک پایین دلیل بر عدم کارایی دندروگرام حاصل نمی تواند باشد، بلکه ضریب همبستگی کوفنتیک پایین ممکن است به دلیل شرایط غیرعادی در داده ها به خصوص داده های مولکولی گمشده باشد. بنابراین، ضریب تشابه جاکارد با بیشترین مقدار همبستگی برای تجزیه خوشه ای مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس آزمون T2 هتلینگ (شکل ۲)، ژنوتیپ ها به پنج گروه تقسیم شدند (شکل ۳). گروه اول (A) شامل ۱۹ نمونه SHO1، HAM1، HAM2، HAM3، HAM4، HAM5، HAM6، HAM7، HAM8، HAM9، SOS1، KAK2، ELH2، SHO4، SHO3، SHO2، KAR2، SOS3، AB1، گروه دوم (B) شامل چهار نمونه، AH1، KH1، KH2، KH3، گروه سوم (C) شامل یک نمونه، HAM1، گروه چهارم (D) شامل یک نمونه، DAR2 و گروه پنجم (E) شامل یک نمونه، GH1 بود. بیشترین میزان تشابه ژنتیکی در میان ژنوتیپ های مورد مطالعه در تجزیه خوشه ای بر اساس داده های مولکولی بین ژنوتیپ های AH7 و AH8 (۰/۹۱) و

کمترین تشابه مربوط به KAR2 و GH1 (۰/۴۱) مشاهده گردید. گروه‌های اول و پنجم بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم داشتند. بنابر این می‌توان ژنوتیپ‌های از گروه اول انتخاب و با ژنوتیپ GH1 از گروه پنجم جهت بهره‌برداری از هتروزیس و تفکیک متجاوز تلاقی داد. در این میان تلاقی بین GH1 و KAR که بیشترین فاصله ژنتیکی دارند نتیجه بخش خواهد بود.



شکل ۲. نمودار تعداد خوشه در برابر مقادیر T^2 هتلینگ

Figure 2. Bi-plot of the pseudo Hotelling T^2 statistic and number of clusters

جدول ۶. ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شده بین ضرایب تشابه و روش UPGMA

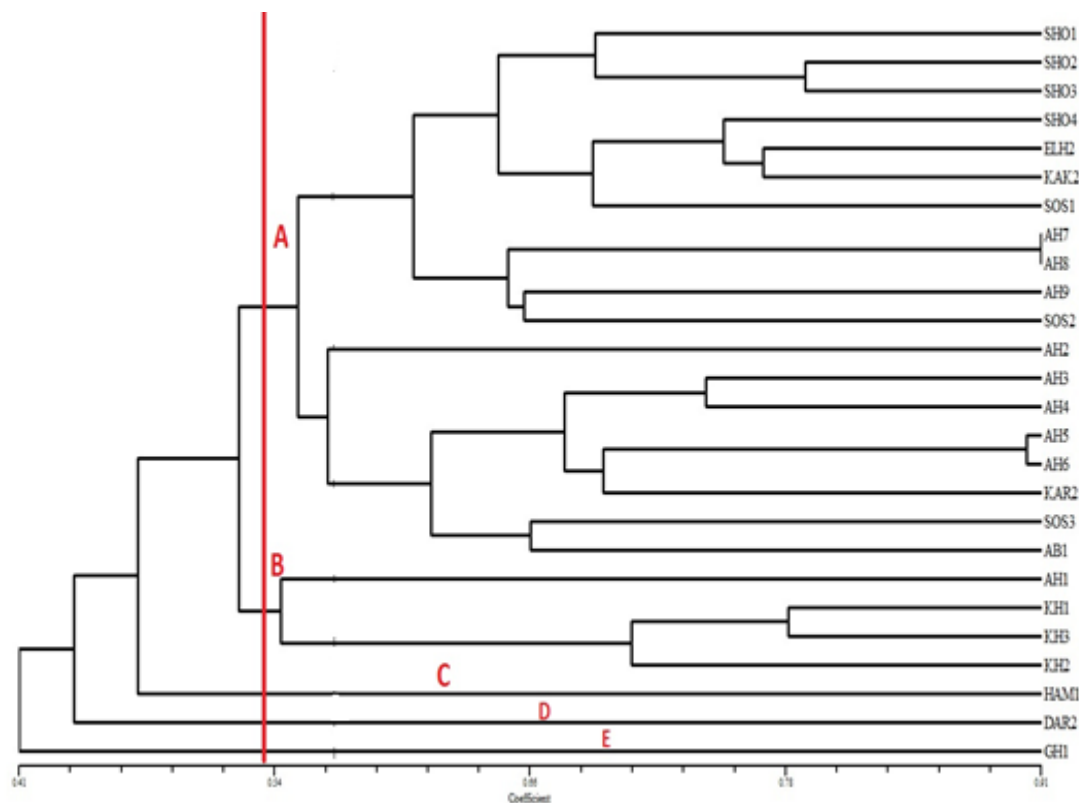
Table 6. Cophentic correlation coefficient calculated between similarity coefficients and UPGMA method

Similarity coefficients	ضرایب تشابه	Simple match	تطابق ساده	Jacquard	جاکارد	Dice	دایس
UPGMA		0.808		0.834		0.821	

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA): با توجه به پلات تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۴) و نمودار تجزیه‌ی خوشه‌ای

(شکل ۳) نتایج تجزیه به مختصات اصلی گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تا حد مطلوبی تأیید کرد. به طوری که گروه‌های حاصل از دسته بندی نمونه‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای در نمودار تجزیه به مختصات اصلی تا حد بالایی مشاهده گردید. اگر بخواهیم

شبهات‌های هر دو را بیان کنیم، می‌بینیم که ژنوتیپ‌های SHO1، SHO2، SHO3، SHO4، ELH2، KAK2، SOS1، AH7، AH8، AH9، SOS2 در هر دو روش با هم در یک گروه، ژنوتیپ‌های KH1، KH2، KH3 در هر دو روش در یک گروه، AH2، AH3، AH4، AH5، AH6، KAR2، SOS3، AB1 هم با یکدیگر در یک گروه مشترک قرار گرفته‌اند. همچنین ژنوتیپ DAR2 در هر دو روش به تنهایی در یک گروه قرار دارد. اما ژنوتیپ‌های AH1، GH1، HAM1 در گروه‌های مشترک قرار نگرفتند.



شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر SCoT با به کارگیری ضریب جاکارد و روش UPGMA. نام ژنوتیپ‌ها همانند جدول ۱ می‌باشد

Figure 3. Cluster analysis of *Suaeda aegyptiaca* genotypes based on the data from the SCoT marker using the Jaccard coefficient and the UPGMA method. The name of genotypes can be found as Table 1

در کنار تجزیه خوشه‌ای، PCA از متداول‌ترین روش‌های آماری چند متغیره در مطالعات روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها می‌باشد. در مورد صفات کمی در بیشتر مواقع دو یا سه مولفه اصلی اول بیشترین مقدار تغییرات مربوط به داده‌های اولیه را توجیه می‌کنند (حدود ۷۵-۸۰ درصد) و این مولفه‌ها برای نمایش گرافیکی جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شوند. ولی در مورد داده‌های مولکولی دو یا سه مولفه اول حداکثر حدود ۲۰-۱۰ درصد تغییرات مربوط به تغییرات اولیه نشانگرها را توجیه می‌کنند. در مطالعه

حاضر شش مولفه اول ۷۳/۶۴ درصد تغییرات را توجیه نمود (جدول ۷). هر چند که این نتایج ممکن است از نقطه نظر آماری برای PCA و نمایش گرافیکی مناسب نباشد ولی از نظر ژنتیکی نشان‌دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد. به این ترتیب که هر یک از نشانگرهای مورد استفاده از بخش‌های متفاوت ژنوم بوده، بنابراین دارای همبستگی کمتر هستند. در تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از داده‌های مولکولی باید توجه کرد که نمایش گرافیکی و گروه‌بندی براساس دو یا سه مولفه نمی‌تواند نشان‌دهنده تغییرات کل متغیرهای اولیه باشد. به همین دلیل تفاوت‌هایی در گروه‌بندی‌های تجزیه خوشه‌ای و مختصات اصلی وجود دارد.

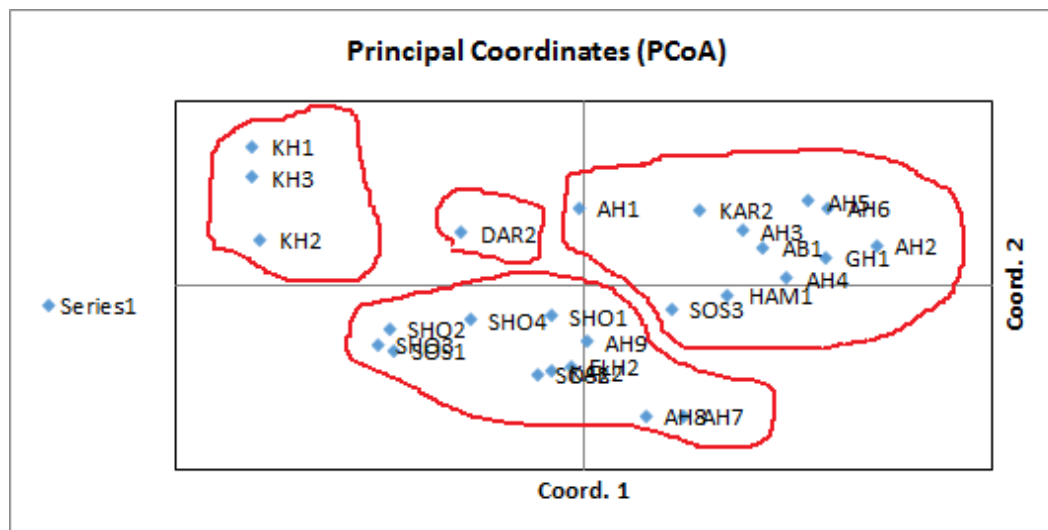
جدول ۷. مؤلفه‌های حاصل از تجزیه به مختصات اصلی در ژنوتیپ‌های سیاه شور مصری مورد مطالعه

Table 7. The components obtained from the principal coordinates analysis in the studied *Suaeda aegyptiaca* genotypes

مؤلفه اصلی	1	2	3	4	5	6
The main component						
Egein Value مقادیر ویژه	14.615	1.293	1.084	0.779	0.771	0.593
Variance واریانس	56.21	4.97	4.17	3.03	2.96	2.28
Cumulative Variance واریانس تجمعی	57.21	61.18	65.35	68.39	71.36	73.64

از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی با بکارگیری داده‌های نشانگرهای SCoT در بسیاری از مطالعات جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و شناسایی گروه‌های هتروتیک استفاده شده است (Agarwal et al. 2018; Ebrahimiyan et al. 2017; Jelvehgar et al. 2021; Khang et al. 2022).

نتیجه گیری: در مطالعه حاضر نشانگر مولکولی SCoT به طور موفقیت آمیزی برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سیاه شور مصری مورد استفاده قرار گرفت و سطح بالایی از چندشکلی را نشان داد. نتایج حاصل از تفرق ژنی و جریان ژنی در نشانگر SCoT تنوع متوسط و جریان ژنی متوسط را در هر دو گروه نشان داد. با درک مقدار تنوع در میان ژنوتیپ‌های سیاه شور مصری می‌توان در زمینه مدیریت ژرم پلاسماهای سیاه شور و استفاده از آن برای انجام کارهای به‌نژادی با هدف‌های متنوع بهره برد. بعنوان مثال ژنوتیپ‌هایی که بیشترین فاصله ژنتیکی از هم دارند را به‌عنوان والدین تلاقی انتخاب نماییم.



شکل ۴. نمودار PCoA ژنوتیپ‌های سیاه شور مصری حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (نام ژنوتیپ‌ها همانند جدول ۱ می‌باشد)

Figure 4. PCoA diagram of *S. aegyptiaca* genotypes resulting from decomposition into main components (The name of genotypes can be found as Table 1)

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه یاسوج به خاطر حمایت مالی و معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. همچنین از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

ابراهیمیان مهسا، ابراهیمی محسن، مرتضویان سیدمحمد مهدی، رامشینی حسین (۱۳۹۶) بررسی ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) با استفاده از نشانگرهای SCOT. ژنتیک نوین ۲، ۲۹۲-۲۸۵.

اسدی مصطفی (۱۳۹۸) فلور ایران. طبیعت ایران ۴ (۲)، ۲۹-۴۱.

پاکدل گیگلو فهیمه (۱۴۰۰) بررسی بیوسیتما تکی جنس *Adonis* L. با تکیه بر شواهد آناتومیکی و مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.

دیناروند مهری (۱۳۹۹) فلور استان خوزستان. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، چاپ اول. ۸۱۴ص.

زمانی نوید، زمانی وحید، میرزایی خالد (۱۳۹۵) بررسی تنوع ژنتیکی کاکوتی (*Ziziphora tenuior* L.) با استفاده از نشانگر SCOT. دوفصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۴ (۲)، ۱۸۹-۱۷۷.

شعبانیان نقی، علیخانی لیلا، رحمانی محمدشفیع (۱۳۹۴). تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت‌های بلوط ایرانی در جنگلهای در حال کاهش زاگرس شمالی با استفاده از مشخصه‌های بیوشیمیایی و نشانگر مولکولی SCoT. دو فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۲۳ (۱)، ۱۳-۲۹.

شقایق جواد، کردنائیج علاءالدین، قادری اردشیر (۱۳۹۸) ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه *Papaver bractaetum* Lindl. رشته کوه البرز با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCoT. فصلنامه گیاهان دارویی ۴ (۱۲)، ۹۰-۱۰۲.

طحانی لیلا، کوهی‌دهکردی مهرا، دهقان زاده حمید (۱۳۹۸). بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بابونه آلمانی کشت شده در ایران با استفاده از نشانگر SCoT. پژوهش‌های ژنتیکی گیاهی ۶ (۱)، ۹۸-۸۷.

فرشادفر محسن، شیروانی هومن، امجدیان مصطفی، باقوتی‌پور آینا (۱۳۹۷) کارایی نشانگر مولکولی SCoT در بررسی تمایز دو گونه *Lolium muktifloram* و *Lolium perenna*. دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۴۵ (۴)، ۴۲۵-۴۴۲.

نوریان عبدالمهدی (۱۳۹۹). بررسی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های گیاه پنبرک (*Malva neglecta*) با استفاده از کدونهای آغاز هدف واقع شده (SCoT). (مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی) مجله زیست‌شناسی ایران ۳۳ (۱)، ۲۷-۱۶.

References

- Agarwal A, Gupta V, Haq SU, Jatav PK, et al. (2018) Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasms using SCoT marker. J King Saud Univ Sci 31, 780-788.
- Akhani H (2006) Biodiversity of halophytic and sabkha ecosystems in Iran. In: Sabkha Ecosystems. Khan MA, Böer B, Kust GS, Barth HJ (eds). Tasks for Vegetation Science, Springer Cham, pp. 71-88.
- Assadi M (2019) Flora of Iran. Irannature 4(2), 29-41.
- Collard BC, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Mol Biol Rep 27 (1), 86-93.
- Davis TM, Yu H, Haigis KM, McGowan PJ (1995) Template mixing: a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. Theor Appl Genet 91(4), 582-588.
- Dinarvand M (2021) Flora of Khuzestan Provinces, Ground cover plants, Iran, Khuzestan. pp. 814 (In Persian).
- Ebrahimiyan M, Ebrahimi M, Mortazavian SM, Ramshini H (2017) The structure and genetic diversity of Iranian cumin populations (*Cuminum cyminum* L.) using SCoT molecular markers. J Genet 12 (2), 285-292 (In Persian).

- Farshadfar M, Shirvani H, Amjadian A, Yaghotipoor A (2018) Application of SCoT marker to discriminate *Lolium perenne* and *Lolium multiflorum* species. Iranian J Rang Plant Breed Genet Res 45, 425-442 (In Persian).
- Jalilian H, Zarei A, Erfani-Moghadam J (2018) Phylogeny relationship among commercial and wild pear species based on morphological characteristics and SCoT molecular markers. Sci Hort 235, 323-333.
- Jelvehgar N, Miri SM, Mostafavi K, et al. (2021) Assessing the suitability of SCoT markers for studying genetic variation and genetic structure of *Lepidium* species. Iranian J Genet Plant Breed 10(1), 91-100.
- Khang, NHM, Quang, NT, Mai, HNX et al. (2022) Genetic characterization of coconut (*Cocos nucifera* L.) varieties conserved in Vietnam through SCoT marker-based polymorphisms. Genet Resour Crop Evol 69, 385–398.
- Khodadadi S, Dashti H, Saberi R, et al. (2021) Genetic diversity of pistachio cultivars and genotypes in terms of resistance to crown and root rot (*Phytophthora drechsleri*) and its relationship with SCoT molecular markers. Mod Genet J 16 (3), 235-248.
- Luo C, He XH, Chen H, et al. (2012). Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis. Genet Resour Crop Evol 59, 1505-1515.
- Mahjbi A, Baraket G, Oueslati A, Salhi-Hannachi A (2015) Start codon targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species. Biochem Syst Ecol 61, 390-398.
- 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.
- Mohammadi R, Cheghamirza K, Akbari D, Amiri H et al (2022) Association analysis of agrophysiological traits with SCoT markers in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). Cereal Biotech Biochem 1(1), 1-17.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. Am Nat 106(949), 283-292.
- Nevo E (1998) Genetic diversity in wild cereals: regional and local studies and their bearing on conservation ex situ and in situ. Genet Resour Crop Evol 45(4), 335-370.
- Noorian AM (2020) Genetic variation among Iranian genotypes of Malva (*Malva neglecta*) using Start codon targeted (SCoT). J Mol Cell Res (Iranian J Biol) 33(1), 16-27 (In Persian).
- Pakdel F (2021) Biosystematic study of *Adonis* L. genuse basid on anatomical and molecular evidence, Master thesis, Shahid Beheshti University. pp. 88 (In Persian).
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol 6 (1), 288-295.

- Rincon F, Johnson B, Crossa J, Taba S. (1996) Cluster analysis, an approach to sampling variability in maize accessions. *J Nep Agric Res* 2(1), 33-36.
- Rahimi M, Nazari L, Kordrostami M, Safari, P (2018) SCoT marker diversity among Iranian *Plantago* ecotypes and their possible association with agronomic traits, *Sci Hortic* 233, 302-309.
- Rohlf, FJ (1987) NTSYS-pc: Micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. *Am Stat* 41, e330.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM et al. (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7, 465-474.
- Shabaniyan N, Alikhani L, Rahmani MS (2015) Phenotypic and genotypic diversity in brant oak (*Quercus brantii*) populations of declining North-Zagros forests using biochemical characteristics and molecular SCoT marker. *Iranian J Rang Plant Breed Genet Res* 23(1), 13-29 (In Persian).
- Shaghghi J, Qaderi A, Kordenaeej A (2019) Evaluation of genetic diversity of *Papaver bracteatum* Lindl. populations in Alborz mountain using SCoT molecular markers. *J Med Plant Res* 18(12), 90-102 (In Persian).
- Shannon CE (1948) The mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech* 27, 379-423.
- Tahani L, Koochi Dehkordi M, Dehghanzade H (2019) Evaluation of genetic diversity among Iranian chamomilla *Matricaria* using SCoT markers. *Plant Genet Res* 6(1), 87-98 (In Persian).
- Xiong F, Zhong R, Han Z, et al. (2011) Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Mol Biol Rep* 38, 3487-3494.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetics Analysis. University of Alberta, Edmonton.
- Zamani N, Zamani V, Mirzaei K (2016) Genetic diversity analysis of *Ziziphora tenuior* L. using SCoT markers. *Iranian J Rang Plant Breed Genet Res* 24(2), 177-189 (In Persian).