DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2014.4955

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۹۷-۱۸۳ (۱۳۹۲)

بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های اسکنبیل (*Calligonum* L.) در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

حسن دشتی خویدکی[1*]، حسین آذرنیوند[2]، محمدرضا نقوی[3]، محمد جعفری[4] و علی طویلی[5]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشجوی دکترای بیابان‌زدایی، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
پست‌الکترونیک: hassandashti51@yahoo.com
۲- استاد، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج
٤- استاد، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۵- دانشیار، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰٤/۱۱

چکیده

گونه‌های جنس *Calligonum* در مناطق بیابانی آسیای مرکزی پراکنده‌اند و نقش مهمی در تثبیت شن و بادشکن دارند. مارکر RAPD مارکر ژنتیکی مفیدی در بیان پلی‌مورفیسم گیاهان و مطالعه خویشاوندی بین گونه‌هاست. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای جنس اسکنبیل در ایران، تعداد ۲٦ نمونه از ۱۱ گونه اسکنبیل از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و با استفاده از ۱۵ آغازگر مورد تجزیه RAPD قرارگرفتند. نتایج حاصل از شاخص‌های تنوع، ماتریس تشابه Dice، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و اطلاعات باندها، نشان داد که ۱۹۱ مکان توسط آغازگرها تکثیر شده و بطور متوسط ۹٤٪ مکان ها چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌ای، تنوع قابل توجهی را در بین نمونه‌ها نشان داد. میزان تشابه از ۰/۸۱ برای نزدیکترین افراد در داخل گونه *C. bungei* تا ۰/٤۵ بین دورترین نمونه‌ها مربوط به گونه‌های مختلف، مشاهده شد. کل نمونه‌ها به چهار گروه اصلی تبدیل شدند که یکی از گروه‌ها شامل یک نمونه از گونه *C. polygonoides* و یک گروه مربوط به افراد گونه *C. leucocladum* بود و دو گروه دیگر مخلوطی از گونه‌های مختلف بودند که هر کدام به دو زیرگروه تقسیم شدند. گروه‌بندی ژنتیکی بدست آمده از RAPD با توزیع جغرافیایی مطابقت ضعیفی نشان داد که این مسئله ممکن است به‌دلیل مهاجرت بذرهای این گیاه از منطقه‌ای به منطقه دیگر توسط انسان و بادهای شدید و یا به علت تعداد کم آغازگر باشد.

واژه‌های کلیدی: اسکنبیل، ژرم‌پلاسم، تشابه، تجزیه خوشه‌ای، توزیع جغرافیایی، RAPD.

مقدمه

Calligonum spp گونه‌های گیاهی در مناطق بیابانی آسیای مرکزی می‌باشند. از آنجایی که این گیاهان مقاوم به خشکی و شوری هستند، به راحتی در ماسه‌زارها رشد می‌کنند و برای تثبیت ماسه‌ها و احداث بادشکن مفیدند (Wei *et al*., 2009). حفاظت و استفاده پایدار از منابع ژنتیکی جهت تأمین امنیت غذایی در آینده یک ضرورت است (Rao, 2004). در این بین تکنیک‌های مولکولی توانسته‌اند حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی گیاهی (PGR) را به‌ویژه در زمینه‌های اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی در

درون و بین گونه‌ها بهبود بخشند (Rao، 2004 و Powell و همکاران، ۱۹۹٦) و بطور فزاینده ای در شناسایی روابط فیلوژنی مورد استفاده قرار گیرند. اطلاع کافی از همولوژی‌های ژنومیکی به برنامه‌ریزی و راهبردهای اصلاحی در حفاظت از ژرم‌پلاسم و انتقال ژنها از یک گونه به گونه دیگر کمک می‌نماید (Rao & Riley , 1994). پیشرفت‌های اخیر با استفاده از PCR، روش‌های مؤثر و سریعی را برای بررسی پلی‌مورفیسم در سطح DNA فراهم نموده است و از آن می‌توان در شناسایی ژن‌های مقاومت و نشان‌دار کردن و تشخیص QTLها، بهبود مدیریت ژرم‌پلاسم و انتخاب به کمک مارکرها استفاده نمود. مارکرهای مولکولی در جنس کالیگونوم برای بررسی تنوع ژنتیکی، تشخیص ژنوتیپ و تهیه نقشه ژنتیکی استفاده شده است (Fernandes *et al.*, 2002).

مارکرهای RAPD به دلیل مزایایی مانند تولید تعداد زیادی باند، پلی‌مورفیسم زیاد، عدم استفاده از مواد رادیواکتیو و عدم نیاز به وجود اطلاعاتی در مورد توالی ژنومی گیاه، همواره در بررسی تنوع ژنتیکی مخازن ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Strelchenko *et al.*, 2003; Vornom & Gebhardt, 1999). مارکر RAPD نشانگر ژنتیکی مفیدی در بیان پلی‌مورفیسم گیاهان خودگشن که تنوع درون گونه‌ای پایینی دارند، می‌باشد (Joshi & Nguyen, 1993). چنانکه مارکرهای RAPD رابطه خویشاوندی بین دیپلوئیدها و آمفی دیپلوئیدهای براسیکاها (مثلث U) را بخوبی نشان داده‌اند (Demeke *et al.*, 1992). در تحقیقی Milbourne و همکاران (۱۹۹۷) با در نظرگرفتن یک باند به‌عنوان یک لوکوس شاخص تنوع را به صورت $Di= 1-\sum pi^2$ تعریف کردند که در آن pi فراوانی iمین آلل (باند) می‌باشد. و شاخص تنوع برای پرایمر عبارت است از جمعِ Diهای باندهای آن آغازگر ($\sum Di$) و DI متوسط شاخص تنوع برای هر آغازگر می‌باشد [$DI=(\sum Di)/n$] و n تعداد لوکوس‌های هر آغازگر است. شاخص دیگری که در بیان تنوع و تفکیک ژنوتیپ‌ها از یکدیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد شاخص قدرت تفکیک (R_p) است که توسط Prevost و Wilkinson (۱۹۹۹) ارائه گردید. توانایی تفکیک ژنوتیپ‌ها توسط این شاخص براساس توزیع آلل در درون ژنوتیپ‌های نمونه مورد مطالعه است. کارآمدترین وضعیت جداسازی هر گروه از taxa برای اهداف شناسایی، تقسیم تدریجی گروه به زیرگروه‌های با تعداد مساوی است. به‌عنوان مثال در شرایط ایده‌آل یک گروه ٦٤ تایی در مرحله اول به دو گروه ۳۲ نفری و در مرحله بعد هر گروه به دو گروه ۱٦ نفری و همین طور بصورت سلسله مراتبی به گروه‌های ۸، ٤، ۲ و ۱ نفری تقسیم می‌شود. بدین‌ترتیب در این وضعیت حداقل طول مسیر را برای تفکیک و جداسازی خواهیم داشت (مثلا در اینجا ٦ تقسیم لازم است). در اغلب سیستم‌های انگشت‌نگاری DNA، ژنوتیپ‌ها براساس حضور و عدم حضور یک باند در یک موقعیت خاص به دو گروه تقسیم می‌شوند. بدین ترتیب هر باند باید در نیمی از ژنوتیپ‌ها حضور داشته باشد و در نیمی نباشد. ارزش موقعیت یک باند از طریق میزان تطبیق آن با شرایط ایده‌آل (۵۰٪ ژنوتیپ-ها دارای آن باند باشند) قابل محاسبه است. این ارزش را میزان اطلاع‌رسانی (band informativeness) باند گویند (Ibi) که از صفر تا ۱ تغییر می‌کند و بصورت $Ibi = 1 - (2\times|0.5-p|)$ محاسبه می‌شود. P نسبت ژنوتیپ‌هایی است که دارای باند مورد نظر می‌باشند.

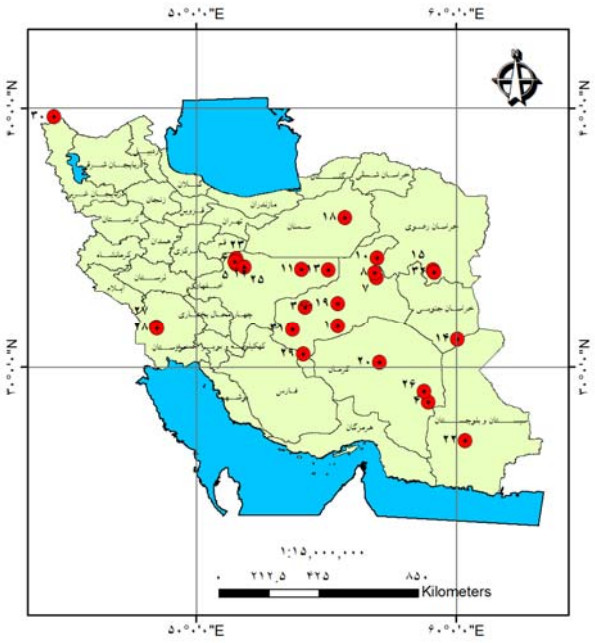
توانایی یک پرایمر برای تشخیص و ممیزی بین تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها عبارت است از مجموع Ibiهای مربوط به باندها و یا لوکوس‌های مورد شناسایی آن

پرایمر. این توانایی به‌عنوان قدرت تفکیک آغازگر به صورت $R_p=\sum Ibi$ محاسبه می‌شود و Ib متوسط میزان اطلاع‌رسانی برای هر آغازگر است، [$Ib =(\sum Ibi)/n$] و n برابر است با تعداد لوکوس‌های هر آغازگر (Sangeeta *et al.*, 2009). تنوع ژنتیکی درون گونه *C. polygonoides* را با استفاده از ۲۲ نمونه در هندوستان، توسط مارکرRAPD مطالعه کرده‌اند و نتایج حاصل تنوع ژنتیکی قابل توجهی را در داخل این گونه نشان داده است. روابط بین گونه‌های جنس کالیگونوم توسط Ren و Tao (۲۰۰٤) از طریق تجزیه آیزوزایم بررسی شده است. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای کالیگونوم‌های کشور تونس با استفاده از ١٦ نمونه از سه گونه *C. arich*، *C. azel* و *C. comosum* توسط مارکر RAPD (٤ آغازگر) مورد بررسی قرار گرفت و ۸۹ درصد از ٤٦ لوکوس تکثیر شده پلی‌مورفیسم بودند و دو گونه *C. azel* و *C. comosum* شباهت زیادی را نشان دادند که ممکن است دارای جد مشترک باشند (Dhief *et al.*, 2011). برای فهم و درک بهتر روش‌های حفاظت مؤثر از گونه-های این جنس در زیستگاه‌های خشک لازم است که ساختار ژنتیکی آن را بشناسیم (Zhang & Zhu, 2009). اطلاعات زیادی در خصوص تنوع ژنتیکی کالیگونوم‌های ایران در دست نیست. در این پژوهش تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای چندین گونه از کالیگونوم‌های ایران، توسط مارکر RAPD مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

تعداد ٢٦ نمونه از ١١ گونه متعلق به جنس *Calligonum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران که توسط بخش گیاه‌شناسی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، براساس خصوصیات میوه تعیین گونه گردیده‌اند (Maassoumi, 2011) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ١ و شکل ١). بذرهای نمونه‌ها در گلدان کشت گردید و ۰/۲ گرم از هر نمونه گیاهی برداشت و DNA آنها به روش CTABبراساس Doyle و Doyle (١٩٩٠) استخراج و کمیت و کیفیت آن به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید.



شکل ١ – مناطق جمع‌آوری گونه‌های اسکنبیل

(١) *C. polygonoides* (٣) *C. leucocladum* (٤) *C. comosum* (٥) *C. polygonoides* (٦) *C. bungei* (٧) *C. stenopterum* (٨) *C. stenopterum* (١٠) *C. stenopterum* (١١) *C. leucocladum* (١٢) *C. caput-medusae* (١٣) *C. arborescense* (١٤) *C. paletzkianum* (١٥) *C. paletzkianum* (١٨) *C. griseum* (١٩) *C. polygonoides* (٢٠) *C. bungei* (٢٢) *C. bungei* (٢٣) *C. comosum* (٢٥) *C. bungei* (٢٦) *C. bungei* (٢٧) *C. polygonoides* (٢٨) *C. intertextum* (٢٩) *C. comosum* (٣٠) *C. polygonoides* (٣١) *C. polygonoides* (٣٢) *C. crinitum*

جدول ۱- گونه‌ها، نمونه‌ها و محل جمع‌آوری آنها

گونه	کد	منشأ	اقلیم	ارتفاع (متر)	مختصات جغرافیایی	
					طول (E)	عرض (N)
C. polygonoides	۱	یزد- بافق	فراخشک معتدل	۱۰۲۵	۵۵ ۲۸ ۵	۳۱ ۳۵ ۰۱
C. leucocladum	۳	یزد- اردکان	فراخشک سرد	۱۱۵۰	۵٤ ۱۲ ۱۱	۳۲ ۱۸ ۳٦
C. comosum	٤	بم- ریگان	فراخشک معتدل	٦۸۰	۵۸ ۵۵ ۵٦	۲۸ ۳۸ ۳۲
C. polygonoides	۵	کاشان	خشک سرد	۹۸۰	۵۱ ۳۳ ٤۰	۳٤ ۰٤ ۱۷
C. bungei	٦	کاشان-آران و بیدگل	خشک سرد	۱۰۸۰	۵۱ ۳۳ ۳۹	۳٤ ۰۹ ۵۰
C. stenopterum	۷	طبس-کریت	فراخشک سرد	٦۷۰	۵٦ ۵۷ ۳٦	۳۳ ۲۷ ۰۰
C. stenopterum	۸	طبس-جمز	فراخشک سرد	٦٦۵	۵٦ ۵۳ ۱۳	۳۳ ۳۸ ۰۵
C. stenopterum	۱۰	طبس-عشق آباد	فراخشک سرد	۸۷۰	۵٦ ۵۸ ۵٦	۳٤ ۱۲ ۰٤
C. leucocladum	۱۱	خوروبیابانک	فراخشک سرد	۸۵۰	۵۵ ۰٤ ۱٤	۳۳ ٤٦ ۱۵
C. caput-medusae	۱۲	کاشان- آران و بیدگل	خشک سرد	۱۰٤۰	۵۱ ۳۳ ۱۱	۳٤ ۱۰ ۲۹
C. arborescense	۱۳	خور و بیابانک	فراخشک سرد	۸٤۰	۵۵ ۰٦ ۲۸	۳۳ ٤۵ ۰٤
C. paletzkianum	۱٤	نهبندان	فراخشک معتدل	۱۱۸۰	٦۰ ۰۳ ٤٦	۳۱ ۰۳ ۳۲
C. paletzkianum	۱۵	قائن	خشک سرد	۱۵۰۰	۵۹ ۰۷ ۵۷	۳۳ ٤٤ ۲٤
C. griseum	۱۸	سمنان- خارتوران	خشک سرد	۱۲۱۵	۵۵ ٤٤ ۱۰	۳٦ ٤۵ ۳۷
C. polygonoides	۱۹	یزد- ساغند	فراخشک سرد	۱۰٦۰	۵۵ ۲۷ ۳٦	۳۲ ۲۷ ۲۲
C. bungei	۲۰	کرمان	خشک سرد	۱۷۹۰	۵۷ ۰٤ ۲۷	۳۰ ۰۹ ۰۸
C. bungei	۲۲	ایرانشهر	فراخشک معتدل	۵۲۰	٦۰ ۲۱ ۳۰	۲۷ ۰۸ ۱۸
C. comosum	۲۳	کاشان-آران و بیدگل	خشک سرد	۹۰۵	۵۱ ۳۱ ٤۱	۳٤ ۰۳ ۵۳
C. bungei	۲۵	کاشان-ابوزیدآباد	خشک سرد	۹۳۰	۵۱ ٤۵ ۰٦	۳۳ ۵۵ ٤۹
C. bungei	۲٦	بم-نرماشیر	فراخشک معتدل	۷۲۵	۵۸ ٤۷ ۱٤	۲۹ ۰۳ ۱۵
C. polygonoides	۲۷	خوزستان	خشک گرم	٤۰	٤۸ ۳۰ ۱۳	۳۱ ۳۱ ۲۲
C. intertextum	۲۸	خوزستان	خشک گرم	۳۰	٤۸ ۳۰ ۵۵	۳۱ ۲۸ ۲۷
C. comosum	۲۹	یزد-مروست	فراخشک سرد	۱۵۸۰	۵٤ ۰۸ ۰٦	۳۰ ۲۸ ۱٦
C. polygonoides	۳۰	آذربایجانغربی- بورالان	نیمه خشک سرد	۱۱۰۰	٤٤ ۳۳ ٤٤	۳۹ ۳۸ ٤۰
C. polygonoides	۳۱	یزد-دهشیر	فراخشک سرد	۱۷۸۰	۵۳ ٤۳ ٦۰	۳۱ ۲٦ ۲۷
C. crinitum	۳۲	قائن	خشک سرد	۱۵۲۰	۵۹ ۱۰ ۳۵	۳۳ ۳۹ ۵۹

تجزیه RAPD

۱۵ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی ساخت شرکت سیناژن و UBC که پلی‌مورفیسم قابل توجهی را نشان دادند از بین ۳۰ آغازگر انتخاب شد (جدول ۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱/۹ میکرولیتر MgCl2 با غلظت $25mMμl^{-1}$، ۱ میکرولیتر از dNTP با غلظت $10mMμl^{-1}$، ۱ میکرولیتر آغازگر با غلظت 10μM، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x، ۵ میکرولیتر DNA الگو (25ng)، ۰/۲ میکرولیتر از *Taq* دی.ان.آ. پلی‌مراز با غلظت $5uμl^{-1}$ و ۱۲/٤ میکرولیتر آب دو بار تقطیر با اضافه نمودن ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی تهیه شد. عمل PCR با برنامه حرارتی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد و برای ٤۵ دوره: ۱ دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه در ۳۵ درجه سانتیگراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد، در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصول واکنش در ژل آگاروز ۱/۵٪ و بافر TAE به مدت ۲/۵ ساعت با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد و بعد ژل در محلول اتیدیوم بروماید به مدت۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و با استفاده از Gel document عکس‌برداری شد.

تصاویر حاصل از ژل‌ها با استفاده از نرم‌افزار UVITEC تجزیه و تحلیل و باندها براساس حضور و عدم حضور، به کد صفر و یک تبدیل شد. داده‌ها پس از انتقال به نرم‌افزار Excel، توسط نرم‌افزار NTSYS ماتریس تشابه براساس ضریب تشابه Dice محاسبه و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از زیرمنوی SAHAN به روش UPGMA انجام شد و دندروگرام رسم گردید. در نهایت نمونه‌های مورد مطالعه براساس PcoA (Principle Ccoordinate Analysis) در صفحه مختصات گروه‌بندی شدند و شاخص‌های تنوع (Di) و قدرت تفکیک (R_p) براساس فرمول‌های مربوطه برای هر پرایمر محاسبه گردید و روابط بین (R_p) با (Di) و (Di) با (Ibi) از طریق رگرسیون در نرم‌افزارهای Minitab و Excel مورد مطالعه قرارگرفت.

نتایج

اطلاعات باندی

آغازگرهای مورد استفاده در کل نمونه‌ها، ۲۱٤۷ باند تولید کردند (جدول ۲). تعداد ۱۸۲ مکان از ۱۹۱ مکان (۹٤٪) دارای چندشکلی بودند و محدوده اندازه باندهای بدست آمده بین ۲۰۰ تا ۹۰۰ جفت باز بود. آغازگر J بیشترین تعداد باند (۱۹۳) و آغازگر UBC76 کمترین تعداد باند (٦٦) را تولید کردند و آغازگرهای D و J بیشترین مکان (۱۷ مکان) را تکثیر کردند. آغازگر J یک باند به اندازه ٤۸٤ جفت باز تولید نموده که در تمام گونه‌ها و نمونه‌ها وجود دارد و یک باند به اندازه ۳۲٦ جفت باز که فقط در نمونه شماره ۱۹ وجود دارد و در بقیه دیده نمی‌شود (شکل ۲). به طور متوسط هر آغازگر ۱۲/۷ مکان را شناسایی و تکثیر نموده است. آغازگرهای G، C، H، F، UBC76، UBC77 و 400 بیشترین نسبت چندشکلی (۱۰۰٪) را نشان دادند. آغازگر E و UBC76 به‌ترتیب دارای بیشترین مقدار متوسط Ib (۰/۵۸) و کمترین Ib (۰/۲۷) بودند. همچنین آغازگرهای Dو UBC76 به‌ترتیب دارای بیشترین R_p (۸/٦) و کمترین R_p (۲/۲) بودند.

تجزیه خوشه‌ای

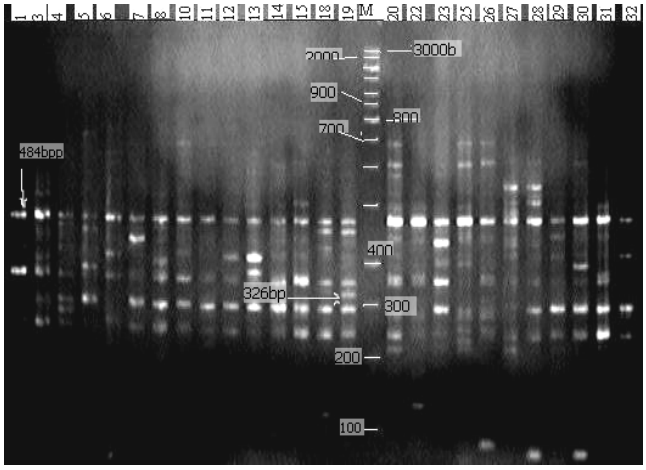
دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲٦ نمونه از ۱۱ گونه براساس ماتریس تشابه (جدول ۳) در ضریب تشابه ۰/۵۸ به ٤ گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۳). گروه A شامل یک نمونه شماره ۳۰ از گونه *C. polygonoides* و گروه B شامل ۱۲ نمونه که در ضریب تشابه ۰/٦۸ به دو

زیرگروه B1 و B2 تقسیم شدند. زیرگروه B1 شامل۷ نمونه: شماره‌های ۱۳، ۱۸، ۲۸، ۱۵، ۱٤، ۱۲ و ۱۰ که به‌ترتیب شامل گونه‌های *caput-medusae*، *arborescense*، *stenopterum* و *griseum*، *intertextum*، *paletzkianum* می‌باشند. در این زیر گروه گونه‌های *caput-medusae* و *arborescense* بیشترین تشابه (۰/۷۹) را داشتند (جدول ۳). زیرگروه B2 شامل ۵ نمونه: شماره‌های ۲۳، ۲۹ و ٤ از گونه‌های *comosum* و شماره‌های ۷ و ۸ از گونه*stenopterum* می‌باشند که این ۵ نمونه دارای متوسط تشابه ۰/٦۱ می‌باشند.

گروه C شامل نمونه‌های ۳ و ۱۱ که هر دو از گونه *C.leucocladum* می‌باشند و دارای تشابه ۰/٦۹ و تفاوت ۰/۳۱ هستند (جدول ۳). گروه D دارای ۱۱ نمونه شامل نمونه‌های: ۱۹، ٦، ۲۰، ۲۵، ۲٦، ۲۲، ۵، ۳۱، ۲۷، ۳۲ و ۱ که در درجه تشابه ۰/۵۹ به دو زیر گروه D1 و D2 تقسیم می‌شوند. زیر گروه D1 شامل چهار نمونه: شماره ۳۲ از گونه *C.crinitum* و شماره‌های ۳۱، ۵ و ۲۷ از گونه *C.polygonoides* می‌باشد. زیرگروه D2 شامل شماره‌های ۱ و ۱۹ از گونه *C.polygonoides* و شماره‌های ٦، ۲۰، ۲۵، ۲٦ و ۲۲ از گونه *C.bungei* بوده و از بین نمونه‌های مربوط به گونه *C.bungei* نمونه‌های ۲۰ و ۲۵ دارای ۰/۸۱ تشابه بودند. PcoA نمونه‌های مورد مطالعه را براساس دو مؤلفه اول و دوم که بیش از ۲۵٪ از کل واریانس را توجیه می کردند در ۵ گروه قرار داد (شکل ٤).

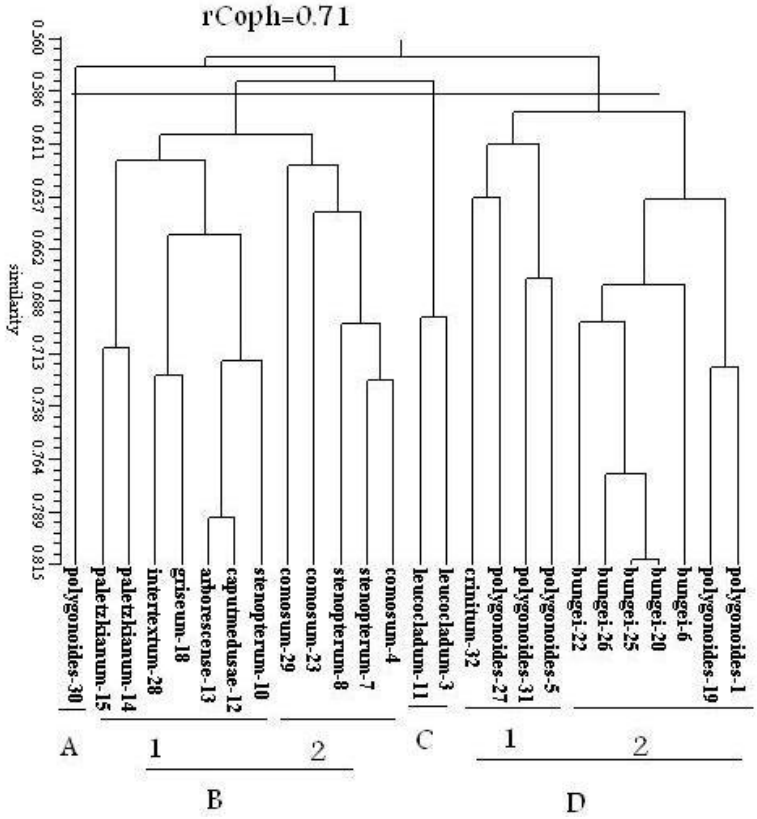
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده و نتایج تجزیه RAPD

نام	توالی	تعداد کل باند تولید شده	تعداد مکان تکثیر شده	مکان چندشکلی	نسبت چندشکلی	متوسط باند در مکان	Ib	∑Di	DI متوسط شاخص تنوع	R_p (∑Ib)
D	5′-TGGGCTCGCT-3′	۱۸۱	۱۷	۱٦	۰/۹٤	۱۰/۱۱	۰/۵۰	۵/۲۷	۰/۳۱	۸/٦
E	5′-ACTTGTGCGG-3′	۱٦٦	۱۳	۱۲	۰/۹۳	۱۱/۹۳	۰/۵۸	٤/٤۲	۰/۳٤	۷/٦
G	5′-CTGAGGAGTG-3′	۱٦۱	۱۲	۱۲	۱/۰۰	۱۲/٤٦	۰/٤٤	۳/۱۲	۰/۲٦	۵/۳
C	5′-CAGAGCACCG-3′	۱۳۹	۱٤	۱٤	۱/۰۰	۹/۳۳	۰/۵۲	٤/۷٦	۰/۳٤	۷/۳
400	5'-GCCCTGATAT-3'	۱۳۸	۱٤	۱٤	۱/۰۰	۹/۲۷	۰/۳۰	٤/۹	۰/۳۵	٤/۳
H	5′-GGTCAACCCT-3′	۱۳۸	۱۲	۱۲	۱/۰۰	۱۰/٦۹	۰/٤٦	۳/۳٦	۰/۲۸	۵/۵
I	5′-GCGGGAGACC-3′	۱٤۸	۷	٦	۰/۸۸	۱۸/٦۳	۰/۳۷	۱/٦۸	۰/۲٤	۲/٦
J	5′-CCTCACCTGT-3′	۱۹۳	۱۷	۱٦	۰/۹٤	۱۰/۷۸	۰/٤۹	۵/۱۰	۰/۳۰	۸/٤
F	5′-CCCACTGACG-3′	۱۰۹	۱۵	۱۵	۱/۰۰	٦/۸۸	۰/٤۸	٤/۹۵	۰/۳۳	۷/۲
UBC16	5′-GGTGGCGGGA-3′	۱۵۱	۱۰	۹	۰/۹۰	۱۵/۱۰	۰/٤۰	۲/۸	۰/۲۸	٤/۰۰
UBC84	5′-GGGCGCGAGT-3′	۱۸۷	۱٦	۱٤	۰/۸۸	۱۱/۰٦	۰/۳٦	٤	۰/۲۵	۵/۸
UBC82	5′-GGGCCCGAGG-3′	۱۳٤	۱٤	۱۳	۰/۹۳	۹/۵۷	۰/٤۷	٤/٦۲	۰/۳۳	٦/٦
UBC66	5′ -GAGGGCGTGA-3′	۱٦۲	۸	۷	۰/۸۸	۲۰/۲۵	۰/۲۸	۱/۷٦	۰/۲۲	۲/۳
UBC76	5′ -GAGCACCAGT-3′	٦٦	۸	۸	۱/۰۰	۸/۲۵	۰/۲۷	۲/۹٦	۰/۳۷	۲/۲
UBC77	5′-GAGCACCAGG-3′	۷٤	۱٤	۱٤	۱/۰۰	۵/۲۹	۰/۳٦	۵/۱۸	۰/۳۷	۵/۱
کل		۲۱٤۷	۱۹۱	۱۸۲						
میانگین			۱۲/۷	۱۲/۱	۰/۹٤	۱۰/٦۹			۰/۳۰	۵/۹

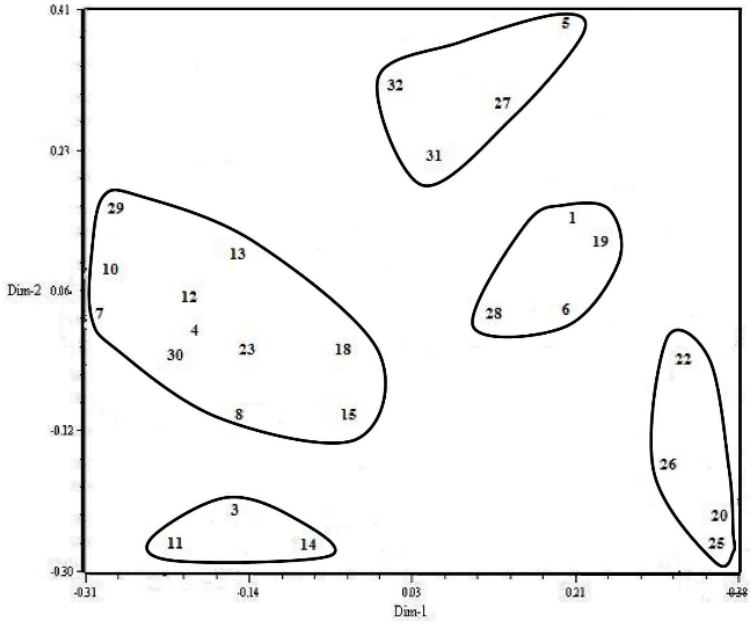


شکل ۲- الکتروفورز مربوط به الگوی باندی آغازگر. J فلش‌ها نشان‌دهنده باند bp ٤٨٤ که در تمام نمونه‌ها و گونه‌ها دیده می‌شود و باند bp ٣٢٦ فقط در نمونه ١٩ (*polygonoides*) موجود است. M مارکر

(1) *C. polygonoides* (3) *C. leucocladum* (4) *C. comosum* (5) *C. polygonoides* (6) *C. bungei* (7) *C. stenopterum* (8) *C. stenopterum* (10) *C. stenopterum* (11) *C. leucocladum* (12) *C. caput-medusae* (13) *C. arborescense* (14) *C. paletzkianum* (15) *C. paletzkianum* (18) *C. griseum* (19) *C. polygonoides* (20) *C. bungei* (22) *C. bungei* (23) *C. comosum* (25) *C. bungei* (26) *C. bungei* (27) *C. polygonoides* (28) *C.intertextum* (29) C. *comosum* (30) *C. polygonoides* (31) *C. polygonoides* (32) *C. crinitum*

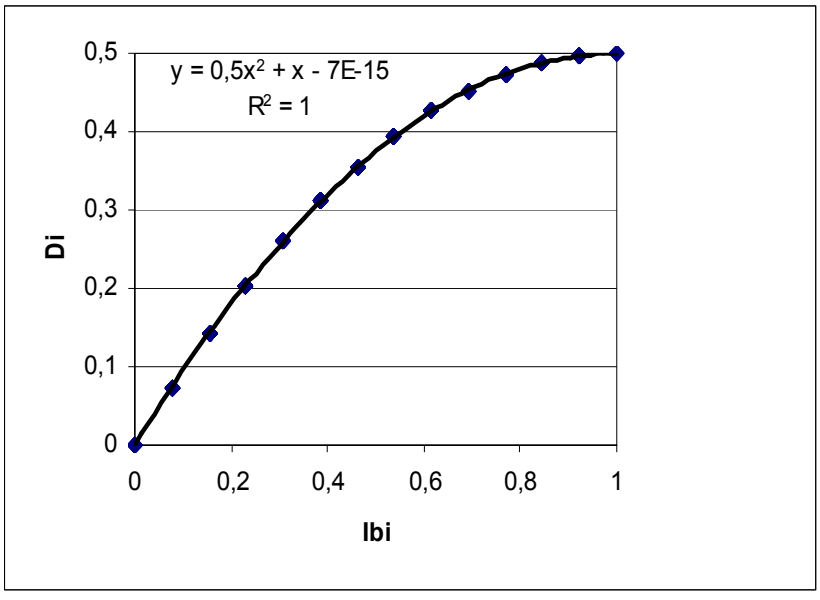


شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای۱۱ گونه و ٢٦ نمونه حاصل از به‌کارگیری روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه Dice



شکل ٤ – گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه براساس تجزیه به مختصات اصلی

(1) *C. polygonoides* (3) *C. leucocladum* (4) *C. comosum* (5) *C. polygonoides* (6) *C. bungei* (7) *C. stenopterum* (8) *C. stenopterum* (10) *C. stenopterum* (11) *C. leucocladum* (12) *C. caput-medusae* (13) *C. arborescense* (14) *C. paletzkianum* (15) *C. paletzkianum* (18) *C. griseum* (19) *C. polygonoides* (20) *C. bungei* (22) *C. bungei* (23) *C. comosum* (25) *C. bungei* (26) *C. bungei* (27) *C. polygonoides* (28) *C.intertextum* (29) C. *comosum* (30) *C. polygonoides* (31) *C. polygonoides* (32) *C. crinitu**m***

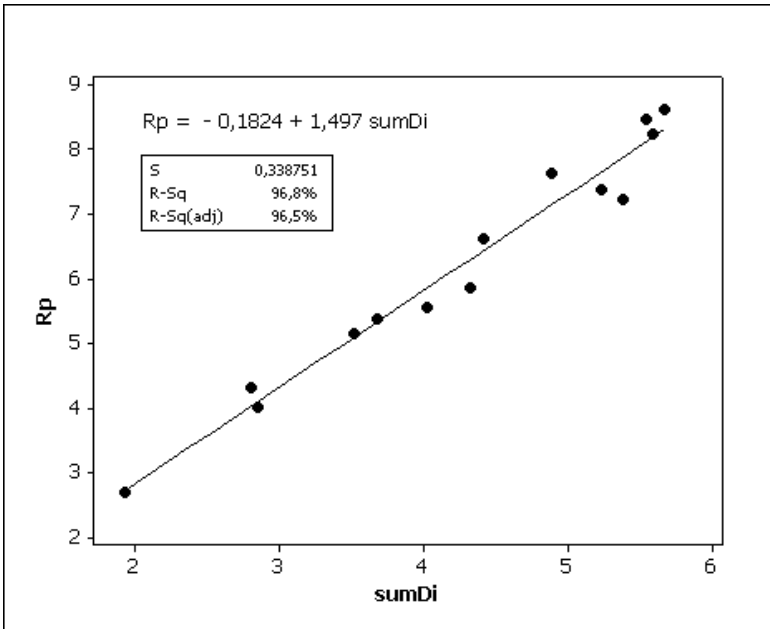


شکل ٥- رگرسیون ضریب اطلاع‌رسانی هر باند روی ضریب تنوع ژنتیکی هر باند

جدول ۳- ضرایب تشابه (پایین قطر) و تفاوت (بالای قطر) بین نمونه‌های مورد مطالعه

	۱	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥	۱۸	۱۹	۲۰	۲۲	۲۳	۲
۱	۱	۰/۵۳	۰/۳۳	۰/۸۳	۰/۳۵	۰/٤۲	۰/۳۵	۰/٤۰	۰/٤۸	۰/۳۷	۰/٤۰	۰/٤۱	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۲۸	۰/۳٤	۰/۳٦	۰/٤٦	۰/۳
۳	۰/٤۷	۱	۰/۳۹	۰/۵۳	۰/٤۹	۰/٤۵	۰/٤۵	۰/٤٦	۰/۳۱	۰/٤۵	۰/٤۳	۰/٤۸	۰/٤۹	۰/٤۵	۰/٤۹	۰/٤۷	۰/٤۵	۰/٤٤	۰/٤
٤	۰/٦۷	۰/٦۱	۱	۰/٤۸	۰/٤۲	۰/۲۷	۰/۳۲	۰/۳٤	۰/٤۳	۰/۳۵	۰/٤۰	۰/٤۲	۰/٤۳	۰/٤۳	۰/٤۰	۰/٤۵	۰/٤٦	۰/۳۸	۰/٤
۵	۰/٦۲	۰/٤۷	۰/۵۲	۱	۰/٤۱	۰/۵۰	۰/٤۷	۰/٤۹	۰/۵۵	۰/٤۷	۰/٤٤	۰/۵۳	۰/٤۹	۰/٤٤	۰/۳۸	۰/٤۵	۰/٤۱	۰/۵۰	۰/٤
٦	۰/٦۵	۰/۵۱	۰/۵۸	۰/۵۹	۱	۰/۳۷	۰/٤۲	۰/٤۰	۰/٤۵	۰/۳۷	۰/۳۳	۰/٤۲	۰/۳٦	۰/۳٦	۰/٤۲	۰/۲۹	۰/۳۳	۰/۳۹	۰/۳
۷	۰/۵۸	۰/۵۵	۰/۷۳	۰/۵۰	۰/٦۳	۱	۰/۲۸	۰/۳۰	۰/۳۹	۰/۳۹	۰/۳۷	۰/۳۸	۰/۳٦	۰/۳۸	۰/٤۲	۰/٤٤	۰/٤۸	۰/۳۳	۰/۵
۸	۰/٦۵	۰/۵۵	۰/٦۸	۰/۵۳	۰/۵۸	۰/۷۲	۱	۰/٤۱	۰/۳۸	۰/۳۵	۰/۳۷	۰/۳۳	۰/٤۰	۰/٤۱	۰/٤۰	۰/٤۱	۰/٤۵	۰/۳٦	۰/٤
۱۰	۰/٦۰	۰/۵٤	۰/٦٦	۰/۵۱	۰/٦۰	۰/۷۰	۰/۵۹	۱	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/٤۷	۰/۳٦	۰/۳٤	۰/٤۸	۰/٤۹	۰/٤٦	۰/٤٤	۰/٤
۱۱	۰/۵۲	۰/٦۹	۰/۵۷	۰/٤۵	۰/۵۵	۰/٦۱	۰/٦۳	۰/٦۸	۱	۰/۳۳	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/٤۰	۰/٤۱	۰/٤۸	۰/٤٤	۰/۵۱	۰/٤۵	۰/٤
۱۲	۰/٦۳	۰/۵۵	۰/٦۵	۰/۵۳	۰/٦۳	۰/٦۱	۰/٦۵	۰/۷۲	۰/٦۷	۱	۰/۲۱	۰/٤۱	۰/٤۰	۰/۳۳	۰/٤۵	۰/٤٦	۰/٤۵	۰/٤۳	۰/٤
۱۳	۰/٦۰	۰/۵۷	۰/٦۰	۰/۵٦	۰/٦۷	۰/٦۳	۰/٦۳	۰/۷۱	۰/٦۲	۰/۷۹	۱	۰/۳۸	۰/۳٤	۰/۳۲	۰/۳۹	۰/٤۷	۰/٤۰	۰/٤۰	۰/٤
۱٤	۰/۵۹	۰/۵۲	۰/۵۸	۰/٤۷	۰/۵۸	۰/٦۲	۰/٦۷	۰/۵۳	۰/٦۲	۰/۵۹	۰/٦۲	۱	۰/۲۹	۰/۳۳	۰/٤۳	۰/٤۱	۰/٤۹	۰/٤۵	۰/٤
۱۵	۰/٦۲	۰/۵۱	۰/۵۷	۰/۵۱	۰/٦٤	۰/٦٤	۰/٦۰	۰/٦٤	۰/٦۰	۰/٦۰	۰/٦٦	۰/۷۱	۱	۰/۳۲	۰/۳٤	۰/۳۷	۰/٤۲	۰/٤۱	۰/٤
۱۸	۰/٦۱	۰/۵۵	۰/۵۸	۰/۵٦	۰/٦٤	۰/٦۲	۰/۵۹	۰/٦٦	۰/۵۹	۰/٦۷	۰/٦۸	۰/٦۷	۰/٦۸	۱	۰/۳۸	۰/٤۱	۰/۳۷	۰/٤۰	۰/۳
۱۹	۰/۷۲	۰/۵۱	۰/٦۰	۰/٦۲	۰/۵۸	۰/۵۸	۰/٦۰	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۵	۰/٦۱	۰/۵۷	۰/٦٦	۰/٦۲	۱	۰/۳۵	۰/٤۰	۰/٤۱	۰/۳
۲۰	۰/٦٦	۰/۵۳	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۷۱	۰/۵٦	۰/۵۹	۰/۵۱	۰/۵٦	۰/۵٤	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/٦۳	۰/۵۹	۰/٦۵	۱	۰/۳۰	۰/٤۳	۰/۱
۲۲	۰/٦٤	۰/۵۵	۰/۵٤	۰/۵۹	۰/٦۷	۰/۵۲	۰/۵۵	۰/۵٤	۰/٤۹	۰/۵۵	۰/٦۰	۰/۵۱	۰/۵۸	۰/٦۳	۰/٦۰	۰/۷۰	۱	۰/٤۲	۰/۳
۲۳	۰/۵٤	۰/۵٦	۰/٦۲	۰/۵۰	۰/٦۱	۰/٦۷	۰/٦٤	۰/۵٦	۰/۵۵	۰/۵۷	۰/٦۰	۰/۵۵	۰/۵۹	۰/٦۰	۰/۵۹	۰/۵۷	۰/۵۸	۱	۰/٤
۲۵	۰/٦٤	۰/۵۵	۰/۵٤	۰/۵۱	۰/٦٦	۰/٤۹	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۵۹	۰/۵٦	۰/۵٦	۰/۵٦	۰/٦۰	۰/٦۱	۰/٦۱	۰/۸۱	۰/۷۰	۰/۵٤	۱
۲٦	۰/٦۹	۰/۵٦	۰/۵۷	۰/۵۹	۰/٦۷	۰/۵۹	۰/٦٤	۰/۵۸	۰/٦۵	۰/۵۸	۰/٦۰	۰/۵۸	۰/٦۱	۰/٦٤	۰/٦٤	۰/۷۷	۰/٦۹	۰/۵۵	۰/۷
۲۷	۰/۵۹	۰/۵۳	۰/۵۲	۰/٦۱	۰/٦۰	۰/۵٦	۰/۵۲	۰/٦۱	۰/٤۹	۰/٦۰	۰/٦۳	۰/٤۷	۰/۵۸	۰/٦۳	۰/٦٦	۰/۵٦	۰/٦۵	۰/۵۷	۰/۵
۲۸	۰/٦۲	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/۵۹	۰/٦۹	۰/٦۱	۰/٦۱	۰/٦۱	۰/٦۰	۰/٦٤	۰/٦۷	۰/٦۰	۰/٦۱	۰/۷۲	۰/٦٦	۰/٦۸	۰/٦۲	۰/۵٤	۰/٦۵
۲۹	۰/۵٤	۰/۵٤	۰/٦۲	۰/۵٤	۰/۵٦	۰/۷۲	۰/۵۷	۰/٦٤	۰/٦۰	۰/٦۱	۰/٦۲	۰/٤۹	۰/۵۹	۰/۵۹	۰/۵۲	۰/۵۳	۰/۵۲	۰/۵۷	۰/٤
۳۰	۰/۵۰	۰/۵٦	۰/۵۵	۰/٤۸	۰/۵۱	۰/٦۳	۰/۵۵	۰/٦٤	۰/۵۷	۰/۵۳	۰/۵۵	۰/۵۲	۰/٦۱	۰/۵۷	۰/۵٤	۰/۵۲	۰/۵۳	۰/٦۲	۰/۵
۳۱	۰/٦۸	۰/۵۱	۰/۵۷	۰/٦۸	۰/٦۵	۰/٦۱	۰/۵۹	۰/٦۳	۰/٦۰	۰/۵۷	۰/٦۱	۰/۵٤	۰/٦۰	۰/٦۰	۰/٦۱	۰/۵۹	۰/۵۷	۰/۵٦	۰/۵
۳۲	۰/٦۵	۰/۵۰	۰/۵۷	۰/٦۲	۰/٦۱	۰/٦۱	۰/۵۵	۰/٦۰	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/٦۱	۰/۵۳	۰/۵٤	۰/۵٦	۰/٦۰	۰/۵۷	۰/۵۱	۰/۵٦	۰/۵

(1) *C. polygonoides* (3) *C. leucocladum* (4) *C. comosum* (5) *C. polygonoides* (6) *C. bungei* (7) *C. stenop*
stenopterum (11) *C. leucocladum* (12) *C. caput-medusae* (13) *C. arborescense* (14) *C. paletzkianum* (15) *C. pal*
polygonoides (20) *C. bungei* (22) *C. bungei* (23) *C. comosum* (25) *C. bungei* (26) *C. bungei* (27) *C. polygo*
comosum (30) *C. polygonoides* (31) *C. polygonoides* (32) *C. crinitum*



شکل ٦- رگرسیون قدرت تفکیک پرایمر روی مجموع تنوع ژنتیکی حاصل از هر پرایمر در افراد تحت مطالعه

بحث

اطلاعات باندی

هرچه Ib و Rb مربوط به آغازگر بیشتر باشد، کارایی آغازگر در تفکیک و جداسازی ژنوتیپ‌های تحت مطالعه بیشتر است (Dhief *et al*., 2011; Prevost *et al*.,1999). مقدار Ib و Rb برای یک آغازگر رابطه مستقیمی با تعداد لوکوس تکثیر شده و تعداد افرادی از جمعیت که دارای باند مورد نظر می‌باشند، دارد. نتیجه‌ای که از اطلاعات باندی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه بدست می-آید، اینکه این آغازگرها توان بالایی را در تفکیک و گروه-بندی و جداسازی بین گونه‌ها ودرون گونه‌ها دارند. زیرا، تعداد لوکوس‌های شناسایی شده در ژنوم کالیگونوم در دامنه ۱۷-۷ لوکوس با میانگین۱۲/۷ لوکوس و نسبت چندشکلی ۰/۹٤ و میانگین شاخص تفکیک و جداسازی ۵/۹ می‌باشند. شاخص متوسط تنوع ژنتیکی (DI) هر آغازگر نیز می‌تواند نشان‌دهنده قدرت تفکیک ژنوتیپ‌ها باشد و حداکثر آن برابر با ۰/۵ است و این مقدار زمانی بدست می‌آید که pi برابر ۰/۵ باشد، یعنی نیمی از افراد تحت مطالعه دارای باند مورد نظر باشند، حداکثر Ibi برابر ۱ است و زمانی بدست می‌آید که pi برابر۰/۵ باشد. بنابراین هر چه Di به ۰/۵ نزدیکتر می‌شود Ibi به ۱ نزدیکتر خواهد شد (شکل ۵). بنابراین Ib و DI هردو یک مفهوم و کاربرد را دارند و رابطه خطی معنی‌دار و قوی بین Rb و ΣDi وجود دارد و به خوبی می‌توان از Σ Di بجای R_P استفاده کرد (شکل ٦).

تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای انجام شده براساس ماتریس تشابه، تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای زیادی را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. نزدیکترین افراد مربوط به دو

نمونه از گونه *C.bungei* با ضریب تشابه ۰/۸۱ و دورترین آنها با ضریب تشابه ۰/٤٥ (جدول ۳) مبین تفاوت‌های ژنتیکی بالاست. ضریب کوفنتیک (r =۰/۷۱) نشان داد که دندروگرام بدست آمده در روش UPGMA مطابقت خوبی با ماتریس تشابه دارد (Mohammadi & Prasanna, 2003) از بین ۱۱ گونه تحت مطالعه فقط افراد گونه *C.leucocladum* با ضریب تشابه ۰/٦۹ در یک گروه مجزای C قرارگرفته‌اند که تفاوت بین آنها (۰/۳۱) می‌تواند به‌علت مناطق جغرافیایی و اقلیمی متفاوت آنها (جدول ۱ و شکل ۱) باشد که در معرض موتاسیون‌ها و فشار سلکسیونی متفاوتی بوده‌اند (Singh & Wadhwani, 1996). تمام نمونه‌های گونه *C.bungei* در یک زیر گروه با تشابه ۰/٦۷ قرار گرفته‌اند، در صورتی که محل جمع-آوری آنها چندصد کیلومتر با هم فاصله دارند (جدول ۱ و شکل ۱) و عدم مطابقت توزیع جغرافیایی و تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد. شماره‌های ١٤ و ١٥ دو نمونه از گونه *C.paletzkianum* در کنار یکدیگر با تشابه ۰/۷۱ در زیر گروه B1 قرار گرفته‌اند که مربوط به مناطق قاین و نهبندان (خراسان جنوبی) می‌باشند. هشت گونه دیگر در کلاس‌های مجزا گروه‌بندی نشده‌اند. دوگونه *C.caput-medusae* و *C.arborescense* تشابه زیادی را نشان دادند (۰/۷۹)، گرچه مربوط به دو منطقه جغرافیایی از استان اصفهان هستند (جدول ۱). این تشابه را شاید بتوان مربوط به داشتن جد مشترک این دوگونه دانست، شبیه آنچه که Dhief و همکاران (2011)، تشابه زیاد بین *C.azel* و *C.comosum* را در داشتن جد مشترک دانسته‌اند. در تجزیه کلادیستیک (Cladistic Analysis) نیز که بر روی جنس *Calligonum* و جنس *Petropyrum* انجام شده است این دو گونه تشابه زیادی را نشان داده و در یک کلاد قرار گرفته‌اند (Tavakkoli *et al*., 2008). همچنین در مطالعه فیلوژنی جنس *Calligonum* و جنس *Pteropyrum* که به روش تجزیه بیزی (Bayesian analysis) و براساس توالی DNAی کلروپلاست (cpDNA *trn* L-F) انجام شده، این دو گونه تشابه زیادی را نشان داده‌اند (Tavakkoli *et al*., 2010). در گونه *C. polygonoides*، دو نمونه از این گونه (شماره‌های ۱و ۱۹) همراه با گونه *C.bungei* در زیرگروه D2 قرارگرفته-اند و یکی از نمونه‌های *C. polygonoides* (شماره ۳۰) در یک گروه مجزا قرار گرفته که از نظر جغرافیایی مربوط به آذربایجان‌غربی است که مکان کاملا متفاوتی از سایر مناطق جغرافیایی است. احتمالاً شرایط خاص اکولوژیکی زیستگاه این نمونه علت جدا شدن آن از سایر نمونه‌ها باشد. از نظر تنوع درون گونه‌ای، گونه *C.polygonoides* دارای بیشترین تنوع درون گونه‌ایست (از ۰/۵۷ تا ۰/۷۲). تنوع مشاهده شده در درون گونه *C.polygonoides* با تنوعی که Sangeeta و همکاران (۲۰۰۹) در هندوستان درون ۲۲ نمونه از این گونه گزارش کرده‌اند همخوانی دارد. سه نمونه مربوط به گونه *C.comosum* در یک زیر گروه همراه با گونه *C.stenopterum* قرار گرفته‌اند. گروه-بندی نمونه‌ها براساس PcoA با گروه‌بندی افراد براساس تجزیه خوشه‌ای در تشابه ۰/٦۰ تقریبا مطابقت دارد. بنابراین تجزیه به مختصات اصلی وقتی که دو مؤلفه اول و دوم بیش از ۲۵٪ واریانس موجود در بین افراد جمعیت را توجیه می‌کنند توان تفکیک و گروه‌بندی بالایی را دارد (Mohammadi &Prasanna, 2003). به طورکلی تنوع مشاهده شده بین و درون گونه‌ای جنس *Calligonum* در این مطالعه را می‌توان بدین شرح تفسیر و توجیه نمود که هر چند همبستگی کاملی بین فاصله‌های ژنتیکی و

جغرافیایی وجود ندارد اما تنوع جغرافیایی و اکولوژیکی زیستگاه‌های واریته‌ها و گونه‌های مختلف این جنس در ایجاد تنوع مؤثر است (Dheif *et* ; Sangeeta *et al*., 2009 Dheif *et al*., 2011). توزیع جغرافیایی و اکولوژیکی گیاهان در تنوع ژنتیکی بیشتر، سهیم می‌باشند. برای مثال نمونه‌های ۷ و۸ در این مطالعه از یک گونه و یک منطقه هستند و در یک خوشه قرار گرفتند. همچنین، نمونه‌های ۱ و ۱۹ از یک گونه و در یک منطقه هستند اما در گونه *C. comosum* نمونه‌های ۲، ۲۹ و ٤ در یک گروه ژنتیکی قرار دارند ولی متعلق به مناطق کاشان و یزد (مروست) و بم می‌باشند. چنانچه تقسیم‌بندی‌های اقلیمی در نظر گرفته شوند (خشک و سرد، فراخشک و خشک و گرم) تقریبا گروه‌بندی ژنتیکی با گروه‌بندی بدست آمده در تجزیه خوشه‌ای مطابقت می‌کند ولی فاصله‌های جغرافیایی با فاصله‌های ژنتیکی کمتر مطابقت دارد. شاید بتوان گفت یکی از علت‌های اصلی آن انتقال بذر گونه‌های جنس کالیگونوم به مناطق مختلف از طریق مهاجرت‌ها و بادهای شدید و یا تعداد کم آغازگر مورد استفاده باشد. تشابه ژنتیکی زیاد بدست آمده از RAPD برای افرادی که از گونه‌های متفاوتند، احتمالاً بخشی از آن به این علت باشد که گیاه‌شناسان، تاکسونومی و شناسایی گونه‌های جنس *Calligonum* را تنها براساس خصوصیات میوه انجام می‌دهند (Wei *et al*., 2009; Pan & Mao, 1986). در صورتی که باندهای RAPD فقط اختصاص به مکان‌های DNA مربوط به خصوصیات میوه ندارد و یا فاصله ژنتیکی زیاد مشاهده شده داخل یک گونه ازجمله *polygonoides* می‌تواند انعکاس تفاوت‌های دیگری غیر از مرفولوژی دانه همانند ارتفاع، رنگ شاخه‌ها، طول میانگره‌ها، تعداد شاخه‌های فرعی، رنگ گل و رنگ میوه، زمان گلدهی و فنولوژی گیاه، خصوصیات جوانه‌زنی و واکنش آنها به استرس‌های محیطی که تماما ژنتیکی است، باشد (Xiaoshan *et al*.,2011; Dhief *et al*.,2011; Dashti *et al*., 2011). و همچنین از طرفی باندهای مشابه بدست آمده از RAPD در افراد مختلف ضرورتاً مشابه و همولوگ نیستند ولی در عین حال از نظر اندازه و تعداد جفت باز یکسان هستند (Runo & Muluvi, 2004; Liu & Pie, 1999). این مسئله ممکن است باعث نشان دادن روابط ژنتیکی غیر واقعی شود. در مطالعه‌ای Mabberely (1997) اظهار نموده که جنس کالیگونوم، به‌عنوان یکی از جنس‌های مهم خانواده *Polygonaceae* با داشتن حدود ۸۰ گونه، تنوع زیادی را در مدت زمان کوتاهی در بیابان‌های خشک و داغ در آسیای مرکزی نشان داده است. خصوصیات سیتوژنتیکی و دگرگشنی از عوامل دیگری است که موجب تنوع درون گونه‌ای و تشابهات بین گونه‌ای می‌شود. در تحقیقی Ferchichi (1997) نشان داد که گونه *C.comosum* در تونس با 2n=۳٦ کروموزوم از گونه *C. azel* با 2n = ۱۸ بوجود آمده است. همچنین Dhief و همکاران (2011) نیز اعلام کرده‌اند سه گونه *C.azel*، *C.comosum* و *C.arich* از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند. همچنین اینتروگرسیون و هیبریداسیون و متعاقباً تتراپلوییدی که توسط دیگران گزارش شده است نیز مزید بر علت است (Tavakkoli *et al*., 2010). اما در بررسی دیگری که بر روی سیستم گرده‌افشانی در چهار گونه از جنس کالیگونوم انجام شده، نشان داده است که گونه‌ها خودسازگار بوده و دگرگشنی هم در آنها دیده می‌شود ولی تلاقی بین گونه‌ای در آنها مشاهده نشده است (Xiaoshan *et al*., 2011). تجزیه RAPD تنوع قابل توجهی را در جنس کالیگونوم در ایران نشان داد، اما تنوع

و گروه‌بندی ژنتیکی مشاهده شده نه با تنوع و مناطق جغرافیایی مطابقت خوبی نشان می‌دهد و نه با گروه‌بندی براساس گونه‌های تعیین شده توسط گیاه‌شناسان. که دلایل احتمالی آن ذکر گردید. بنابراین به نظر می‌رسد اگرچه مارکر RAPD به خوبی توانسته است تنوع در جنس کالیگونوم را نشان دهد ولی قادر به تفکیک گونه‌ها نیست. به نظر می‌رسد برای تفکیک و شناسایی گونه‌های جنس کالیگونوم مارکر SSR توان بیشتری داشته باشد، بنابراین طراحی و ساخت پرایمرهای SSR برای مطالعه تنوع در جنس کالیگونوم می‌تواند کمک زیادی در شناسایی ساختار ژنتیکی و تفکیک گونه‌های آن بنماید، همچنانکه Zhuو Zhang (2009) با شناسایی ١٤ لوکوس میکروساتلیت توانستند چهار گونه از جنس کالیگونوم (*C.mongolicum*، *C.junceum*، *C.rubicundum* و *C.aphyllum*) را تفکیک و شناسایی کنند.

منابع مورد استفاده

–Dashti, H., Azarnivand, H., Shirani ,H., Hajabbasi, M. A, and Maddahosseini, S. H., 2011. Response of three *Calligonum* species to salinity at germination and seedling stages. African Journal of Agricultural Research, 6(19): 4487-4493.

–Demeke, T., Adams, R.P. and chibbar ,R., 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica.* Theoritical and Appllied Genetics., 84: 990-994.

–Dhief, A., Gorai, M., Aschi-Smiti, S.,and Neffati, M., 2009. Comparative phenological and water potential patterns of three *Calligonum* species in the eastern Great Erg of Tunisia, Flora, 204: 581-592.

–Dhief, A., Ferdaws, G.,Tibra, T., Neffati, M., and Samir, A., 2011. Natural genetic variation in *Calligonum* Tunisian genus analyzed by RAPD markers. African Journal of Biotechnology, 10(48): 9766-9778.

–Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

–Ferchichi, A., 1997. Contrubition à l'étude caryologique, caryosystématique, morphologique et écologique de la flore de la Tunisie présaharienne. Thèse de doctorat (Ph.D). Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie, p. 187

–Fernandes, M.E., Figueiras, A.M. and Beenito, C., 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification, and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoritical and Appllied Genetics, 104: 845-858

–Joshi,C.P., and Nguyen, H.T., 1993. RAPD (Random amplified polymorphic DNA) analysis based on intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science, 93: 95-103.

–Liu, Z.Q. and Pei, Y., 1999. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum* L. Plant Breeding, 118(2): 119-123.

–Maassoumi ,A.A., 2011. a revision of the genus *Calligonum* L. *(Polygonaceae)* in Iran. Iranian Journal of Botany, 17 (1): 43-54

–Mabberely, D.J., 1997. The Plant Book. Cambridge University Press, Cambridge, 858pp.

–Mao, Z. M. and Pan, B. R. 1986. The classification and distribution of the genus *Calligonum* L. in China. Acta Phytotaxonomica Sinica, 24: 98-107.

–Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J.E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell W. and Waugh, R., 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. Molecular Breeding, 3:127-136.

–Mohammadi, S.A and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants, salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43:1235–1248.

–Prevost, A. and Wilkinson, M.J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoritical and Appllied Genetics, 98: 107-112.

–Powell, W., Morgante, M. and Andre, C., 1996. The comparision of RFLP,RAPD,AFLP and

–Tavakkoli, S., Kazempour Osaloo, S.h. and Maassoumi, A.A., 2008. Morphological cladistic analysis of *Calligonum* and *Pteropyrum* (*polygonaceae*) in Iran. Iranian Journal of Botany, 14 (2): 117-125.

–Tavakkoli ,S., Kazempour Osaloo, S.H. and Maassoumi , A.A., 2010. The phylogeny of *Calligonum* and *Pteropyrum* (*Polygonaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast trnL-F sequences. Iranian Journal of Biotechnology., 8(1): 7-15.

–Vornom, B. and Gebhardt, K., 1999. Application of cp DNA-and RAPD-markers in characterization of Clone Collections of wild Cherries and performance of micro propagated plus trees. In:Espinel S and Ritter E (eds). Congress Application of biotechnology to forest genetics.Vitoria-Gasteiz, 51-71.

–Xiaoshan, K., Pan, B., Shimin, D., Wei, S. and Yongzhi, Z., 2011. The reproductive biology of *Calligonum* L. in relation to *ex situ* conservation in a botanical garden. Archives of Biological Science Belgrade, 63(3): 799-809.

–Wei, S., Borong, P., Gaskin, John F. and Xiaoshan, K., 2009. Morphological variation and chromosome studies in *Calligonum mongolicum* and *C. pumilum* (Polygonaceae) suggests the presence of only one species. Nordic Journal of Botany, 27: 81-85.

–Zhang, Q. and Zhu, X. T., 2009. Microsatellite DNA loci from the drought desert plant *Calligonum mongolicum* Turcz.(*Polygonaceae*). Conservation of Genetics, 10: 1891-1893.

SSR(microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.

–Rao, R. and Riley, R., 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Genetics Resources News, 97: 3-20.

–Rao, K. N., 2004. Plant genetics resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, 3(2): 136-145.

–Ren, J. and Tao, L., 2004. RAPD study on inter-species relationships in *Calligonum*. Acta Botany Boreal-Occidental Sinica, 22: 338-343.

–Runo, M.S. and Muluvi, G.M., 2004. Analysis of genetic structure in *Melia volkensii* (Gurke.) population using random amplified polymorphic DNA. African Journal Biotechnolology, 3(8): 421-425.

–Sangeeta, B., Santosh, K.S., Ajuy, P., Sadha, S., Satyawada, R.R. and Arun, K., 2009. Utilization of RAPD marker to analyze natural genetic variation in *Calligonum polygonoides* L.-A key stone species of Thar desert. International Journal of Integrative Biology, 5(3): 143-151.

–Singh, UR. and Wadhwani, AM., 1996. Dictionary of Economic Plants in India. ICAR New Delhi, 37-60.

–Strelchenko, P., Street, K., Mitrofanova, O., Mackay, M., Chabane, K. and Valkoun, J. 2003. The genetic relationships between hexaploid wheat landraces from different geographical origin. In ‘Proc 10th Int Wheat Gen Symp.September 1-6, 2003, Paestum, Italy, 2: 637-640.

Evaluation of genetic diversity in Iranian *Calligonum* L. species using RAPD markers

H. Dashti -Khavidaki[1*], H. Arzarnivand[2], M.R. Naghavi[3], M. Jafari[4] and A. Tavili[5]

1*- Corresponding Author, Ph.D. student in De-desertification, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R.Iran, E-mail: hassandashti51@yahoo.com
2- Assoc. Prof., Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, I.R. Iran
3- Prof., Faculty of Agriculture,University of Tehran, Karaj, I.R. Iran
4- Prof., Faculty of Natural Resources,University of Tehran, Karaj, I.R. Iran
5- Assoc. Prof., Faculty of Natural Resources,University of Tehran Karaj, I.R., Iran

Received: 07.01.2012 Accepted: 01.23.2013

Abstract

Calligonum species are distributed in centeral Asia desert and are effective to stabilize sand dunes. RAPD is a useful genetical marker to determine polymorphism and relationship among plant species. In order to evaluate Genetic diversity within and between species of *Calligonum* was evaluated using 15 RAPD primers in 26 samples of 11 species collected from different parts of Iran. According to diversity indices, Dice similarity, cluster analysis and band information a total of 191 bands was amplified and 94% of the bands were polymorphic. Cluster analysis revealed a high amount of diversity among the samples. The most similar samples with 0.81 similarity was found within *C. bungei* species, while the least similarity (0.45) obtained in samples from other different species. All samples clustered in four groups, samples of *C. polygonoides* and *C. leucocladum* located in two groups separately. However, other species distributed in two other groups. There was low relationship between genetic divergence and geographical origins that could be because of seed migration between the locations by wind and human.

Key words: *Calligonum, C*luster analysis, Similarity, RAPD, Germplasm, Geographical distribution.