بررسی تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی (*Prosopis juliflora*) در استان خوزستان به روش CDDP

سحر نصیری، مهدی یوسفی* و مریم حائری‌نسب

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۱۳

چکیده

کَهور پاکستانی (Prosopis juliflora)، متعلق به خانواده باقلائیان که در اصل بومی آمریکا است، در دهه‌های گذشته بمنظور توسعه فضای سبز شهری به ایران وارد شده است. در حال حاضر این درخت به عنوان یک گیاه مهاجم بیگانه سطح وسیعی از رویشگاه‌های طبیعی استان خوزستان (جنوب غربی ایران) را اشغال کرده است. هدف پژوهش حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از این گونه در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی Conserved DNA Derived Polymorphism (CDDP) بود. بیست نمونه از چهار جمعیت مجزا با استفاده از ۲۰ آغازگر CDDP مورد بررسی قرار گرفتند و داده‌های حاصله با نرم افزارهای NTSYS،Popgene و GenAlex تجزیه و تحلیل شدند. آغازگرها ۲۱۲ نوار تولید کردند که از آنها ۱۹۴ نوار (۹۱/۹۴درصد) چندشکل (پلی‌مورف) بودند. بیشترین میانگین تنوع ژنتیکی ۰/۲۱۲ و کمترین آن ۰/۱۱۴ بود که بترتیب برای جمعیت های خرمشهر و اهواز به دست آمد. در تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA نمونه‌ها درسطح تشابه ۲۲درصد در دو گروه مجزا طبقه‌بندی شدند که نشاندهنده تنوع ژنتیکی آنها است. تجزیه واریانس مولکولی نیز نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۵۱درصد) بیشتر از بین جمعیت‌ها (۴۹درصد) است. این پژوهش توان بالای نشانگر CDDP را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه Prosopis juliflora نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ایران، تنوع ژنتیکی، خوزستان، کهور پاکستانی (*Prosopis juliflora*)، نشانگر CDDP.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۲۶۰۸۰۲۱، پست الکترونیکی: yousefi1953@gmail.com

مقدمه

در ایران سه گونه از سرده کَهور (Prosopis L.) متعلق به تیره باقلائیان (Fabaceae Lindl.) با نام‌های محلی کهورایرانی (Prosopis cineraria (L.) Druce) کهور درختچه‌ای (Prosopis koelziana Burkart) و کهورک یا جِغجِغه (Prosopis farcta J.F.Macbr.) بصورت خودروی و بومی وجود دارد. دو گونه اول از عناصر شاخص صحارا-سندی هستند و فقط در نواحی جنوب کشور می‌رویند ولی کهورک متعلق به ناحیه ایران-تورانی است (۶، ۸). گونه‌ای دیگر از این سرده با نام علمی Prosopis juliflora (Sw.) DC و نام محلی کهور پاکستانی در نواحی جنوبی کشور به صورت دست کاشت وجود دارد که غیربومی است و بنام‌های محلی دیگری همچون کهور دریایی یا کهور آمریکایی نیز نامیده می‌شود (۱۰). کهور پاکستانی درختی حساس به سرما و خزان کننده بومی قاره آمریکا است ولی در بیشتر نواحی خشک و گرم آفریقا، استرالیا و آسیا، از جمله هند و ایران کاشته می‌شود (۳۲، ۳۸). این گیاه به شوری و خشکی مقاوم است (۴) و بدلیل این ویژگی‌ها در برخی نقاط بمنظور گسترش فضای سبز شهری، تثبیت شن‌های‌روان، جلوگیری از فرسایش خاک و استفاده به عنوان سوخت و علوفه، کاشته می‌شود (۱، ۴۷). کهور پاکستانی باوجود مزایای نسبی، به‌دلیل رشد سریع، در رویشگاه هایی که برای اولین بار کاشته می‌شود با

تشکیل توده‌های متراکم موجب تأثیرات نامطلوب بر محیط اطراف خود و بر فعالیت‌های اقتصادی می‌شود (۳۴، ۳۸، ۴۲).

در اوایل دهه ۱۳۵۰، کهور پاکستانی بمنظور توسعه فضای سبز حاشیه خیابان‌ها و ایجاد پارک‌های جنگلی به استان‌های ساحلی جنوب ایران وارد شد ولی در اغلب این‌مناطق بدلیل سهولت انتقال بذر آن توسط جانوران و سیلاب، پیشروی کرده و بیشه‌های متراکمی را بوجود آورده‌است، بطوری‌که جلوگیری از گسترش آن با مشکل روبرو شده است (۳، ۱۰). طی‌سال‌های ۱۳۶۵ تا ۱۳۸۵ سطح زیر کشت این گونه در مناطق بیابانی و ماسه‌ای خوزستان به حدود ۱۴۱ هکتار رسیده است (۵، ۳۱). براساس بررسی‌هایAssarehzadegan و همکاران (۱۲) دانه‌های گرده این گونه یکی از عوامل عمده بروز حساسیت و مشکلات ناشی از آن در استان خوزستان است. منشأ درختان کاشته شده کهور پاکستانی در استان خوزستان مشخص نیست. طبق بررسی‌های صالحه شوشتری و همکاران (۵) عمده درختان کهور پاکستانی کاشته شده در مناطق شهری استان خوزستان احتمالاً از بذر و نهال های با منبع مشترک تکثیر شده‌اند ولی شواهدی برای این مطلب ارائه نداده‌اند. شناخت تنوع ژنتیکی این درختان کاشته شده داده‌های با ارزشی را بدست می‌دهد که برای تحلیل منشأ (۳۳) و گزینش و بهنژادی آنها (۲۰) کاربرد دارد.

چندین پژوهشگر تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی را با استفاده از نشانگرهای مختلف بررسی نموده‌اند (۲۴، ۲۸، ۳۹). Landeras و همکاران (۲۷) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های *Prosopis* در آفریقا، آمریکای‌جنوبی و آسیا و تشخیص دو گونه *P juliflora* و *P. pallida* از یکدیگر از نشانگر RAPD استفاده نمودند. Hamza (۲۲) نیز تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *P. juliflora* در کشور سودان را با نشانگر RAPD مطالعه نمود. Elmeer و Almalki (۱۸) تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از گونه‌های *P. cineraria* و *P. juliflora* را با استفاده از آغازگرهای RAPD و ISSR و Palacios و همکاران (۳۷) نیز تفاوت‌های ژنتیکی گونه *P. juliflora* و دو گونه *P. pallida* و *P. limensis* را با نشانگرAFLP مطالعه کردند. Muturi و همکاران (۳۳) تنوع ژنتیکی گونه‌های *Prosopis* در کنیا و Chaudhary همکاران (۱۳) الگوهای نواری تکثیر شده از آغازگرهای RAPD را در گونه‌های *P. juliflora* و *P. pallida* بررسی نمودند. این بررسی‌ها نشان داده است که تنوع ژنتیکی قابل توجهی در بین افراد، توده‌های کاشته‌شده و جمعیت‌های کهور پاکستانی (*P. juliflora*) وجود دارد و همین امر باعث سازگاری، گسترش و استقرار موفق این گونه در رویشگاه‌های مختلف شده‌است (۱۵، ۲۰).

یکی از نشانگرهای مولکولی که در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته نشانگر CDDP (Conserved DNA-Derived Polymorphism) است. مبنای این روش استفاده از آغازگرهای کوتاه برای تولید نشانگرهای ژنتیکی در حوزه ژن‌های عملکردی گیاهی و داده‌کاوی توالی آمینواسیدهای کوتاه و محافظت‌شده در پروتئین‌ها و آغازگرها است (۱۱). این روش اولین بار توسط Collard و Mackill (۱۴) به عنوان روشی ساده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام برنج (*Oryza sativa* L.) ابداع شد و پس از آن Poczi و همکاران (۴۱) تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از *Solanum dulcamara* L. و Li و همکاران (۲۹) تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از *Chrysanthemum morifolia* Ramat. را با استفاده از این روش مطالعه کردند. در ایران نیز تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از *Cicer arientinum* L. (۲۱)، *Triticum turgidum* L. (۴۶)، *Trifolium tomehtosum* L. (۲) و *Cordia myxa* L. (۹) به کمک نشانگرهای CDDP مطالعه شده است. پژوهش حاضر بررسی تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی (*Prosopis juliflora*) در استان خوزستان به روش CDDP (چندشکلی ناشی از DNA محافظت‌شده) بود. اهداف این

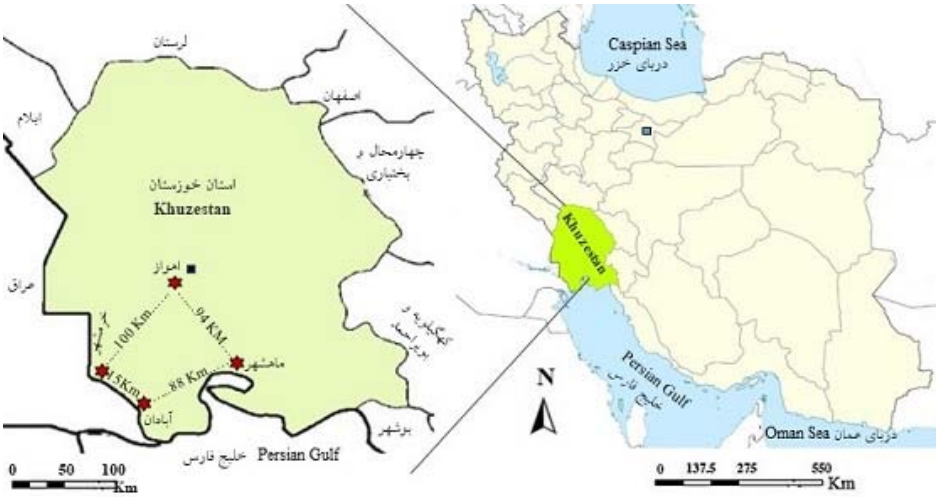
پژوهش، ارزیابی تنوع ژنتیکی و بدست آوردن آغازگرهای مناسب CDDP جهت بررسی تنوع ژنتیکی در کهور پاکستانی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کهور پاکستانی موجود در خوزستان بود.

مواد و روشها

نمونه‌برداری از ۲۰ فرد از گونه *Prosopis juliflora* طی ماه‌های مرداد تا مهر انجام شد (جدول ۱ و شکل ۱). از هر جمعیت پنج فرد به روش تصادفی انتخاب شد. نمونه‌ها با استفاده از فلور ایران (۶، ۴۴) و کلید شناسایی گونه‌های سرده کهور (۸، ۳۸) شناسایی شدند. از هر نمونه تعدادی برگ خشک شدند و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه برگ‌های مورد مطالعه در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان نگهداری می‌شوند.

جدول ۱- جمعیت، کد افراد، ارتفاع از سطح دریا (متر) و مختصات جغرافیائی نمونه‌های مورد مطالعه از کهور پاکستانی

جمعیت	مکان	کد افراد	ارتفاع از سطح دریا (متر)	مختصات جغرافیایی	
				عرض شمالی (N)	طول شرقی (E)
اهواز	حاشیه کارون	AH_1-AH_5	۲۲	۳۱° ۳۰′	۴۸° ۶۶′
آبادان	اطراف فرودگاه	AB_1-AB_5	۴	۳۰° ۳۸′	۴۸° ۲۱′
خرمشهر	بلوار ساحلی	KH_1-KH_5	۵	۳۰° ۴۳′	۴۸° ۱۷′
ماهشهر	شهرک صنعتی	MA_1-MA_5	۱۵	۳۴° ۵۶′	۴۹° ۲۳′



شکل ۱- موقعیت محل جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه کهور پاکستانی (Retrived from www.google.map. Available at May 2018).

استخراج DNA: استخراج DNA نمونه‌ها بروش Lefort و Douglas (۲۸) با استفاده از CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide)، شامل مخلوطی از ۲۰میکرومول Tris-HCl با Ph=۸؛ ۰/۱مول EDTA؛ ۱/۴مول Nacl و۲درصد CTAB انجام شد و کیفیت آنها با استفاده از الکتروفورز (مدل SH503، شرکت اختریان، ایران) بر روی ژل آگارز ۰/۸درصد (کد ۱۱۶۸۰۱، Merck، آلمان) مورد سنجش قرار گرفت. در این پژوهش از ۲۰ آغازگر CDDP (شرکت Metabion International) استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR=Polymerase Chain Reaction) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل MyCycler،کمپانی Biorad، آمریکا) طی چند مرحله،

شامل یک چرخه واسرشت‌سازی به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، مرحله اتصال آغازگر با ۳۵ بار تکرار در دماهای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. اجزای PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل مخلوطی از ۵ میکرولیتر مسترمیکس (مستر میکس رد، کمپانی Ampliqon، دانمارک)، یک میکرولیتر DNA و ۰/۸ میکرولیتر آغازگر (رقیق شده در آب مقطر به نسبت حجمی ۱ به ۵) بود. محصولات تکثیر شده PCR بر روی ژل آگارز ۲درصد و بافر TAE با ولتاژ ۸۰ ولت، به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه الکتروفورز شدند. از الگوی نوارهای قابل مشاهده روی ژل با دستگاه ژل داک (مدل Universal Hood II، کمپانی Bio Rad، آمریکا) عکس برداری شد.

تحلیل‌های آماری: داده‌های مولکولی (نوارهای قابل دید بر روی ژل) کدبندی شدند. به حضور هر نوار برای هر نمونه کد یک، عدم حضور آن کد صفر و عدم حضور نوار در همه نمونه‌ها کد ۹۹۹ اختصاص یافت. جدول ماتریسی حاصل از کدبندی در معرض تحلیل خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA: Principal Coordinate Analysis) قرار گرفت. تحلیل خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه (SM=Simple Matching) و به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS, Version 2.02 (۴۳) انجام‌شد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC=Polymorphism Information Content) از رابطه ۱ و شاخص نشانگر (MI=Marker Index) برای هر آغازگر از رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۱ $PIC=1-\sum p_i^2$

که PIC محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگر و P_i آلل i ام هر جایگاه ژنی برای همه ژنوتیپ‌ها است.

رابطه ۲ $MI=PIC.N.\beta$ (شاخص نشانگر)

که N تعداد کل نوارها و β درصد چند شکلی برای هر آغازگر است. مقدارقدرت تفکیک (Resolving Power) نیز برای هر آغازگر طبق رابطه ۳ محاسبه شد:

رابطه۳ $RP=\sum I_b$

که میزان I_b نیز از رابطه ۴ محاسبه شد:

رابطه ۴ $I_b= 1-(2|0.5-P_i|)$

در این رابطه P_i درصد فراوانی یک آلل از هر نوار می‌باشد (۳۸).

میانگین و انحراف معیار تجمیعی شاخص نشانگر (MI)، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و قدرت تفکیک (RP) به صورت نمودار Box-Whisker با نرم افزار STATISTICA محاسبه و ترسیم شد. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از طریق تحلیل نی (**۳۵**) تعیین شد. شاخص‌های ژنتیکی، شامل تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I: Shanon's Information Index) برای هر جمعیت توسط نرم‌افزار GenAlex, Version 6.3 محاسبه شد. برای انجام تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) و آزمون تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز از نرم‌افزار GenAlex, Version 6.3 استفاده شد.

نتایج

آغازگرهای نشانگر CDDP (جدول ۲) با شناسایی ترادف‌هایی از DNA ژنومی ۲۰ فرد از گونه کهور پاکستانی در استان خوزستان در مجموع ۲۱۲ نوار در محدوده ۱۸۰۰–۲۰۰ جفت باز ایجاد کردند که ۱۹۴ نوار آن (۹۱/۵درصد کل نوارها) چندشکل (پلی مورف) بود (جدول ۳). بطور میانگین به ازاء هر آغازگر ۱۰/۶ نوار ایجاد شده که ۹/۷ نوار آن چندشکلی بود (جدول ۳). آغازگر ABP1-2 با تکثیر ۳ نوار کمترین و آغازگر WRKY-R3 با تکثیر ۱۶ نوار بیشترین تعداد نوار را ایجاد کردند. کمترین میزان چندشکلی ۵۵/۵درصد در آغازگر

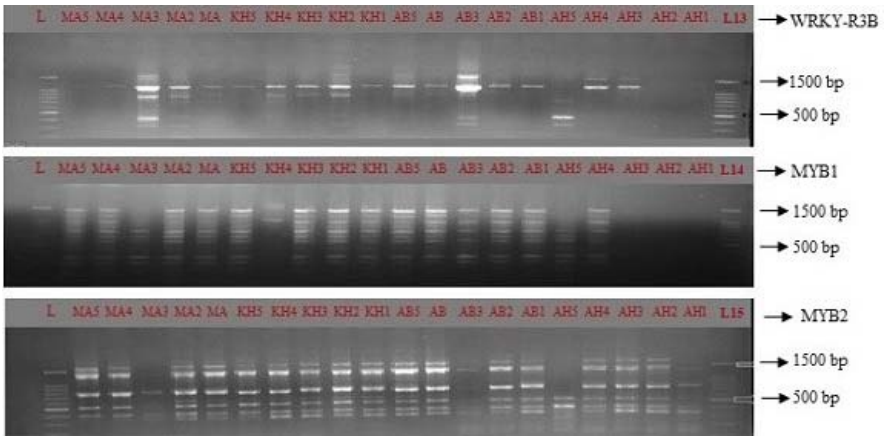
WRKY-R2 مشاهده شد در حالیکه میزان چندشکلی برای ده آغازگر ۱۰۰درصد بود. برخی از آغازگرها نوارهای اختصاصی ایجاد کرده‌اند. به عنوان نمونه آغازگر WRKY-R1 چهار نوار اختصاصی (بین ۵۰۰ تا ۱۸۰۰ جفت باز) و آغازگر MYB2 دو نوار اختصاصی (بین ۳۰۰ تا ۱۶۰۰ جفت باز) تولید نمودند (جدول ۳). شکل ۲ نمونه هایی از الگوی نوارهای تکثیر شده توسط آغازگرهای WRKY-R3B، MYB1 و MYB2 را نشان می‌دهد.

جدول ۲- ویژگی‌های ۲۰ آغازگر CDDP مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی گونه مورد مطالعه کهور پاکستانی

*نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm °C**	CG%***
WRKY	WRKY-R1	5`- GTG GTT GTG CTT GCC -3`	۴۹	۶۰/۰
	WRKY-R2	5`- GCC GTC GTA SGT SGT -3`	۵۲	۶۶/۷
	WRKY-R3	5`- GCA SGT GTG CTC GCC -3`	۵۴	۷۳/۳
	WRKY-R2B	5`- TGS TGS ATG CTC CCG -3`	۵۲	۶۶/۷
	WRKY-R3B	5`- CCG CTC GTG TGS ACG -3`	۵۴	۷۳/۳
	WRKY-F1	5`- TGG CGS AAG TAC GGC CAG -3`	۶۱	۶۶/۷
ABP1	ABP1-1	5`- ACS CCS ATC CAC CGC -3`	۵۴	۷۳/۳
	ABP1-2	5`- ACS CCS ATC CAC CGG -3`	۵۴	۷۳/۳
	ABP1-3	5`- CAC GAG GAC CTS CAGG -3`	۵۶	۶۸/۸
ERF	ERF1	5`- CAC TAC CGC GGS CTS CG -3`	۶۲	۷۶/۵
	ERF2	5`- GCS GAG ATC CGS GAC CC -3`	۶۲	۷۶/۵
	ERF3	5`- TGG CTS GGC ACS TTC GA -3`	۵۷	۶۴/۷
KNOX	KNOX-1	5`- AAG GGS AAG CTS CCS AAG -3`	۵۸	۶۱/۱
	KNOX-2	5`- CAC TGG TGG GAG CTS CAC -3`	۶۱	۶۶/۷
	KNOX-3	5`- AAG CGS CAC TGG AAG CC -3`	۵۷	۶۴/۷
MYB2	MYB1	5`- GGC AAG GGC TGC CGC -3`	۵۷	۸۰/۰
	MYB2	5`- GGC AAG GGC TGC CGG -3`	۵۷	۸۰/۰
MADS	MADS-1	5`- ATG GGC CGS GGC AAG GTG C -3`	۶۶	۷۳/۷
	MADS-2	5`- ATG GGC CGS GGC AAG GTG G -3`	۶۶	۷۳/۷
	MADS-4	5`- CTS TGC GAC CGS GAG GTG -3`	۶۳	۷۲/۲

* عملکرد ژن‌ها: WRKY (عامل رونویسی در عملکردهای تکاملی و فیزیولوژیکی)، ABP1 (کدکننده پروتئین متصل شونده به اکسین)، ERF (عامل رونویسی دخیل در مسیر مقاومت به بیماری‌ها)، KNOX (کدکننده هومئوباکس)، MYB (ناشناخته، احتمالا دخیل در متابولیسم ثانویه، تنش‌های زنده و غیرزنده، ریخت‌زایی یاخته‌ای)، MADS (کنترل کننده شروع و توسعه اندام گل). اقتباس از حائری نسب (۲).

**Tm°C: دمای اتصال برحسب درجه سانتی‌گراد؛ ***CG%: محتوای گوانین- سیتوزین برحسب درصد



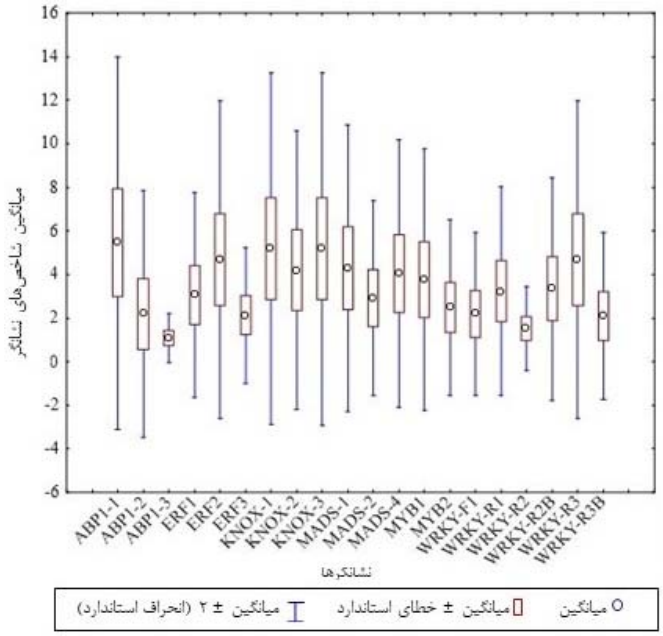
شکل ۲- الگوی نوارهای تکثیر شده توسط آغازگرهای ۱۳ (WRKY-R3B)، ۱۴ (MYB1) و ۱۵ (MYB2) در روش CDDP. بر روی ۲۰ فرد از گونه کهور پاکستانی در استان خوزستان. افراد AH1-AH5 (اهواز)، AB1-AB5 (آبادان)، KH1-KH5 (خرمشهر) و MA1-MA5 (ماهشهر).

میانگین شاخص نشانگر (MI) برای تمام آغازگرها برابر با ۴/۷۱ بود. بیشترین مقدار این شاخص ۷/۸۴ به آغازگر KNOX-3 و کمترین مقدار آن ۱/۳۱ به آغازگر ABP1-3 تعلق دارد (جدول ۳). میانگین مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بین ۰/۲۲ تا ۰/۵۳ و میانگین آن ۰/۴۶ است. آغازگرهای ABP1-1، ERF3 و KNOX-1 با مقدار ۵/۳ بیشترین و آغازگر WRKY-R3B با مقدار ۰/۲۲ کمترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) را دارند (جدول ۳). میانگین قدرت تفکیک (RP) برای تمام نشانگرها ۴/۹۰ است (جدول ۳). نشانگر ABP1-1 بیشترین قدرت تفکیک و نشانگر ABP1-2 کمترین قدرت تفکیک را دارد. مقایسه میانگین و انحراف معیار آغازگرها که براساس تجمیع شاخص نشانگر (MI)، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و قدرت تفکیک (RP) محاسبه شده است (شکل ۳) نشان می دهد که آغازگرهای ABP1-1، ERF2، KNOX-1، KNOX-3 و WRKY-R3 نسبت به سایر آغازگرها بیشترین مقدار و آغازگرهای WRKY-R2 و ABP1-3 کمترین مقدار میانگین و انحراف معیار را دارند و ۱۲ آغازگر دیگر آغازگرهای متوسط هستند.

جدول ۳-شاخص‌های مولکولی اندازه‌گیری شده در آغازگرهای نشانگر CDDP در بررسی کهور پاکستانی

نام ژن	آغازگر	TNB	NPB	PPB%	NSB	PSB%	MI	PIC	RP
WRKY	WRKY-R1	۱۰	۱۰	۱۰۰	۴	۴۰	۴/۹۳	۰/۴۹	۴/۲۸
	WRKY-R2	۹	۵	۵۵/۵	۰	۰	۱/۹۸	۰/۳۹	۲/۱۴
	WRKY-R3	۱۶	۱۳	۸۱/۲۵	۲	۱۲/۵	۶/۴۳	۰/۴۹	۷/۱۱
	WRKY-R2B	۹	۹	۱۰۰	۰	۰	۴/۲۱	۰/۴۶	۵/۳۵
	WRKY-R3B	۱۱	۹	۸۱/۸۲	۰	۰	۲/۰۰	۰/۲۲	۴/۰۶
	WRKY-F1	۹	۷	۷۷/۷۸	۱	۱۱/۱۱	۳/۲۰	۰/۴۵	۳/۳۳
ABP1	ABP1-1	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰	۰	۷/۴۲	۰/۵۳	۸/۳۸
	ABP1-2	۳	۲	۶۶/۶۷	۱	۳۳/۳	۵/۴۴	۰/۲۷	۰/۸۶
	ABP1-3	۴	۳	۷۵/۰۰	۱	۲۵	۱/۳۱	۰/۴۳	۱/۵۰
ERF	ERF1	۱۱	۱۱	۱۰۰	۱	۹/۰۹	۴/۱۱	۰/۳۷	۴/۷۱
	ERF2	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰	۰	۶/۵۳	۰/۵۰	۷/۰۶
	ERF3	۵	۴	۸۰/۰۰	۰	۰	۲/۲۱	۰/۵۳	۳/۶۵
KNOX	KNOX-1	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰	۰	۷/۳۹	۰/۵۳	۷/۶۲
	KNOX-2	۱۲	۱۱	۹۱/۶۷	۱	۸/۳۳	۵/۷۱	۰/۵۲	۶/۳۵
	KNOX-3	۱۵	۱۵	۱۰۰	۲	۱۳/۳۳	۷/۸۴	۰/۵۲	۷/۱۷
MYB	MYB1	۱۱	۱۰	۹۰/۹۲	۰	۰	۴/۵۷	۰/۴۵	۶/۲۸
	MYB2	۱۱	۱۱	۱۰۰	۲	۱۸/۱۸	۴/۳۷	۰/۳۶	۲/۷۳
MADS	MADS-1	۱۲	۱۲	۱۰۰	۲	۱۶/۶۶	۶/۰۳	۰/۵۰	۶/۳۳
	MADS-2	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰	۰	۴/۹۱	۰/۴۹	۳/۳۵
	MADS-4	۱۳	۱۲	۹۲/۴۰	۰	۰	۵/۸۰	۰/۴۸	۵/۸۲
	جمع	۲۱۲	۱۹۴	۹۱/۵۱	۱۷	میانگین	۴/۷۱	۰/۴۶۶	۴/۹۰

TNB: تعداد کل نوارها; NPB: تعداد نوارهای چندشکلی; PPB: درصد نوارهای چند شکل; NSB: تعداد نوارهای اختصاصی; PSB: درصد نوارهای اختصاصی; MI: شاخص نشانگر؛ PIC : محتوای اطلاعات چندشکلی؛ RP.: قدرت تفکیک.



شکل ۳- نمودار Box-Whisker آغازگرهای مورد استفاده در روش CDDP بر روی ۲۰ فرد از گونه کهور پاکستانی در استان خوزستان. میانگین و انحراف معیار هر آغازگر براساس شاخص‌های درصد نوارهای چندشکلی (PPB)، درصد نوارهای اختصاصی (PSB)، شاخص نشانگر (MI) و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC). محاسبه شده است.

نمونه‌های خرمشهر با ۱۱۰ نوار چندشکل (۵۲/۱۳درصد کل نوارها) بیشترین میزان چندشکلی را دارند و پس از آن نمونه‌های آبادان با ۹۹ نوار چندشکل (۴۶/۹۲درصد)، نمونه‌های ماهشهر با ۸۲ نوار چندشکل (۳۸/۸۶درصد کل نوارها) و نمونه‌های اهواز با ۱۶ نوار چندشکل (۷/۵۸درصد کل نوارها) به ترتیب در رده‌های بعدی قرار دارند.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که از کل تنوعات مشاهده شده درسطح احتمال P<۰/۰۰۱ درمجموع ۵۱درصد مربوط به تنوع درون افراد هر جمعیت و ۴۹درصد مربوط به تنوع بین جمعیت ها است (جدول ۴).

جدول ۴-آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های حاصل از نشانگر CDDP مربوط به کهور پاکستانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	انحراف معیار	فراوانی تنوعات (درصد)
درون افراد	۱۶	۶۱۳/۲۰۰	۳۴/۳۹۸	۵۱
بین افراد	۳	۵۱۸/۶۰۰	۳۲/۴۱۳	۴۹
کل	۱۹	۱۱۳۱/۸۰۰	۶۶/۸۱۱	۱۰۰

میانگین آلل‌های مشاهده شده (Na) در نمونه‌های هر شهر ۱/۳۹۹ بود. نمونه‌های خرمشهر با ۱/۵۲۱ آلل بیشترین و نمونه‌های اهواز با ۱/۱۹۷ آلل کمترین تعداد آلل های مشاهده شده را دارند (جدول ۵). میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) در نمونه‌های هر شهر ۰/۱۶۶ است که بیشترین مقدار آن در نمونه‌های خرمشهر (H=۰/۲۱۲) و کمترین آن در نمونه‌های اهواز (H=۰/۱۱۴) مشاهده شد. میانگین شاخص تنوع شانون (I) در نمونه‌های هر شهر ۰/۲۲۹ است که بیشترین مقدار آن در نمونه‌های خرمشهر (I=۰/۳۰۹) و کمترین آن در نمونه‌های اهواز (I=۰/۱۱۸) بود (جدول ۵).

جدول ۵- شاخص‌های تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی در چهار شهر استان خوزستان با نشانگر مولکولی CDDP

شهر	Na	H	I
اهواز	۱/۱۹۷	۰/۱۱۴	۰/۱۱۸
آبادان	۱/۴۹۰	۰/۱۹۶	۰/۲۸۱
خرمشهر	۱/۵۲۱	۰/۲۱۲	۰/۳۰۹
ماهشهر	۱/۳۸۸	۰/۱۴۲	۰/۲۱۱
میانگین	۱/۳۹۹	۰/۱۶۶	۰/۲۲۹

Na: تعداد آلل های مشاهده شده؛ H: شاخص تنوع ژنتیکی نی؛ I: شاخص شانون.

ماتریس فاصله ژنتیکی۲۰ فرد از *P. Juliflora* (جدول ۶) نشان می‌دهد که فرد AH1 از اهواز و MA2 از ماهشهر بیشترین فاصله (۰/۲۰۲) و افراد AH2 و AH3 از اهواز کمترین فاصله (۰/۱۲) را دارند. براساس ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های هر جمعیت (جدول ۷) نمونه‌های اهواز و خرمشهر دارای بیشترین فاصله (۲/۶۴۴) و نمونه‌های آبادان و خرمشهر دارای کمترین فاصله (۰/۳۹۳) هستند.

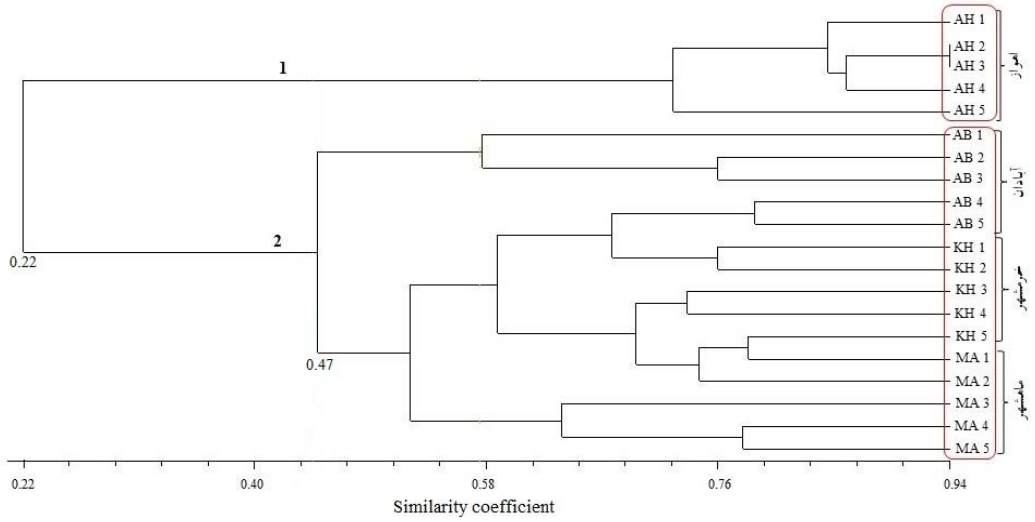
جدول ۶-ماتریس فاصله ژنتیکی بین ۲۰ فرد از گونه کهور پاکستانی در استان خوزستان (علائم اختصاری نمونه‌ها برطبق جدول ۱ است).

افراد	AH1	AH2	AH3	AH4	AH5	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	KH1	KH2	KH3	KH4	KH5	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5
AH2	۰/۲۵	۰																		
AH3	۰/۲۶	۰/۱۲	۰																	
AH4	۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۲۴	۰																
AH5	۰/۷۳	۰/۵۵	۰/۴۸	۰/۵۳	۰															
AB1	۰/۹۱	۰/۱۰۶	۰/۹۶	۰/۷۵	۰/۷۵	۰														
AB2	۰/۱۴۶	۰/۱۴۰	۰/۱۲۹	۰/۱۲۸	۰/۱۱۳	۰/۷۲	۰													
AB3	۰/۱۶۵	۰/۱۴۹	۰/۱۴۴	۰/۱۴۱	۰/۱۱۴	۰/۱۰۵	۰/۵۰	۰												
AB4	۰/۱۷۷	۰/۱۶۹	۰/۱۶۱	۰/۱۶۲	۰/۱۴۷	۰/۱۱۹	۰/۷۵	۰/۸۰	۰											
AB5	۰/۱۹۰	۰/۱۹۰	۰/۱۸۴	۰/۱۷۵	۰/۱۷۳	۰/۱۳۷	۰/۱۰۴	۰/۱۰۶	۰/۴۴	۰										
KH1	۰/۱۸۵	۰/۱۸۴	۰/۱۷۵	۰/۱۶۹	۰/۱۵۸	۰/۱۲۴	۰/۹۹	۰/۱۰۴	۰/۵۷	۰/۶۱	۰									
KH2	۰/۱۹۹	۰/۱۹۷	۰/۱۹۳	۰/۱۸۸	۰/۱۷۷	۰/۱۴۳	۰/۱۱۹	۰/۱۱۵	۰/۸۴	۰/۶۷	۰/۵۰	۰								
KH3	۰/۱۹۱	۰/۱۸۷	۰/۱۸۰	۰/۱۷۹	۰/۱۶۶	۰/۱۳۷	۰/۱۱۲	۰/۱۱۱	۰/۸۰	۰/۷۷	۰/۵۷	۰/۵۵	۰							
KH4	۰/۱۹۷	۰/۱۹۲	۰/۱۸۴	۰/۱۸۸	۰/۱۷۲	۰/۱۴۵	۰/۱۱۱	۰/۱۱۶	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۷۶	۰/۶۶	۰/۵۵	۰						
KH5	۰/۱۹۶	۰/۱۹۱	۰/۱۸۲	۰/۱۸۳	۰/۱۶۵	۰/۱۴۲	۰/۱۱۰	۰/۱۱۹	۰/۸۸	۰/۹۷	۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۵۳	۰/۴۶	۰					
MA1	۰/۱۸۶	۰/۲۰۰	۰/۱۹۱	۰/۱۷۰	۰/۱۷۶	۰/۱۳۰	۰/۱۱۶	۰/۱۲۲	۰/۹۹	/۱۰۳	۰/۸۶	۰/۸۸	۰/۶۹	۰/۶۶	۰/۴۵	۰				
MA2	۰/۲۰۳	۰/۱۸۲	۰/۱۷۳	۰/۱۷۳	۰/۱۵۹	۰/۱۴۸	۰/۱۱۳	۰/۱۱۱	۰/۱۰۱	۰/۱۱۳	۰/۹۰	۰/۹۷	۰/۷۲	۰/۷۴	۰/۵۱	۰/۵۵	۰			
MA3	۰/۱۷۵	۰/۱۵۶	۰/۱۵۰	۰/۱۵۱	۰/۱۲۳	۰/۱۲۸	۰/۱۰۱	۰/۸۳	۰/۱۲۳	۰/۱۲۸	۰/۱۳۳	۰/۱۲۶	۰/۱۱۳	۰/۱۱۸	۰/۱۰۷	۰/۱۰۷	۰/۷۱	۰		
MA4	۰/۱۶۵	۰/۱۶۸	۰/۱۵۸	۰/۱۳۸	۰/۱۴۱	۰/۱۱۴	۰/۱۲۱	۰/۱۱۲	۰/۱۱۵	۰/۱۲۰	۰/۱۱۴	۰/۱۲۸	۰/۱۰۲	۰/۱۰۷	۰/۹۳	۰/۷۵	۰/۹۷	۰/۶۹	۰	
MA5	۰/۱۷۷	۰/۱۷۳	۰/۱۶۴	۰/۱۶۲	۰/۱۴۷	۰/۱۲۱	۰/۱۰۲	۰/۱۰۸	۰/۹۳	۰/۱۰۳	۰/۹۷	۰/۱۱۱	۰/۸۶	۰/۸۳	۰/۶۵	۰/۶۷	۰/۵۷	۰/۸۲	۰/۴۶	

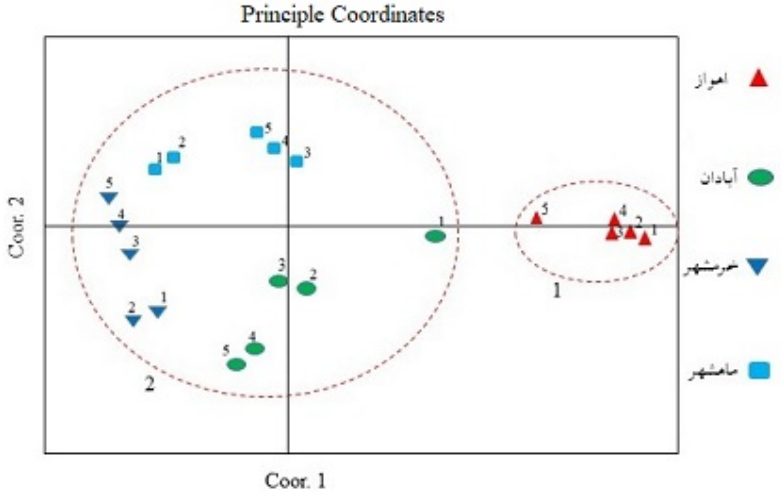
جدول ۷-ماتریس فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های گونه کهور پاکستانی در استان خوزستان

جمعیت	اهواز	آبادان	خرمشهر	ماهشهر
اهواز	۰/۰۰۰			
آبادان	۱/۲۰۰	۰/۰۰۰		
خرمشهر	۲/۶۴۴	۰/۳۹۳	۰/۰۰۰	
ماهشهر	۲/۰۵۱	۰/۴۲۵	۰/۴۲۲	۰/۰۰۰

دارنگاره (دندروگرام) حاصل از تحلیل خوشه‌ای داده‌های مولکولی ۲۰ فرد از گونه کهور پاکستانی با نشانگرهای CDDP نشان می‌دهد این افراد در سطح تشابه ۲۲درصد (۰/۲۲) در دو خوشه مجزا قرار می‌گیرند (شکل ۴). خوشه اول متشکل از افراد نمونه‌های اهواز (AH-AH5) و خوشه دوم شامل افراد نمونه‌های آبادان، خرمشهر و ماهشهر است (شکل ۴). در تحلیل به مختصات اصلی (PCoA) دو محور اول و دوم به ترتیب ۵۱/۶۳ و ۱۵/۷۸درصد (در مجموع ۶۷/۴۱درصد) واریانس کل را توجیه می‌کنند. توزیع افراد در این نمودار مطابق با توزیع آنها در تحلیل خوشه‌ای است (شکل ۵). بنابراین نتایج تجزیه به مختصات اصلی اعتبار گروه‌بندی افراد در تحلیل خوشه‌ای را تأیید می‌کند.



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تحلیل خوشه‌ای داده‌های مولکولی ۲۰ فرد از کهور پاکستانی در استان خوزستان به روش UPGMA و ضریب تشابه SM توسط نرم‌افزار NTSYS.



شکل ۵-نمودار پراکندگی ۲۰ فرد از گونه کهور پاکستانی در استان خوزستان در تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار GenALEX.

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش که بمنظور بررسی تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی (*Prosopis Juliflora*) در استان خوزستان با استفاده از ۲۰ آغازگر CDDP انجام شد، تعداد ۲۱۲ قطعه DNA (معرف ۲۱۲ آلل) در اندازه‌های بین ۲۰۰ تا ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر شدند که ۹۱/۵درصد آنها چندشکل بود. این نتایج تأییدی بود بر اینکه آغازگرهای CDDP قادرند طیف وسیعی از ترادف های ژنومی را شناسایی کنند و تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی را به خوبی آشکار سازند. در چند پژوهش دیگر نیز نشان داده شده است که آغازگرهای CDDP نسبت به روش‌های مولکولی دیگر حاوی اطلاعات مولکولی مفیدتری هستند. برای نمونه حائری‌نسب (۲) تعداد نوارهای تکثیر شده در جمعیت‌های *Trifolium tomehtosum* L. توسط ۱۲ آغازگر CDDP را ۲۱۷ نوار و میزان چندشکلی آنها را ۹۸/۲۹درصد گزارش نمود. لطیفی و همکاران (۹) نیز تعداد نوارهای تکثیر شده و میزان چندشکلی در جمعیت‌های *Cordia myxa* L. توسط ۲۰ آغازگر CDDP را بترتیب ۲۲۲ نوار و

۹۷/۶۳درصد گزارش کردند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. در بررسی تنوع ژنتیکی سه جمعیت از گونه کهور پاکستانی در کشور سودان هفت آغازگر RAPD توانسته‌اند ۵۶ نوار تکثیر کنند که میزان چندشکلی بین آنها ۵۵/۳۶ درصد بوده‌است (۲۲). بدلیل تفاوت دو روش RAPD و CDDP و نیز تفاوت در تعداد آغازگرهای مورد استفاده، نمی‌توان مقایسه دقیقی بین نتایج پژوهش حاضر و نتایج Hamza (۲۲) انجام داد ولی با توجه به یافته‌های دیگری که به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی کهور پاکستانی یا گونه‌های دیگر سرده کهور انجام شده‌است، صرف نظر از تفاوت در روش‌ها و داده‌های حاصله، نتیجه مشترک‌شان وجود جایگاه‌های ژنی چندشکلی (پلی‌مورف) و تنوع ژنتیکی نسبتا بالای درون و بین جمعیتی این گونه است (۱۳، ۱۷، ۱۸، ۲۴، ۳۹).

آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر به لحاظ توان شناسایی ترادف‌های ژنومی و تولید نوارهای اختصاصی عملکرد یکسانی نداشتند. آغازگر WRKY-R3 با تکثیر ۱۶ نوار (آلل) و آغازگر ABP1-2 با تکثیر ۳ نوار بترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوار را تولید کردند. بیشترین تعداد نوار اختصاصی (۴ نوار) نیز توسط آغازگر WRKY-R3 تولید شده است. بعقیده Roy (۴۵) آلل‌های اختصاصی در شناسایی تاکسون‌ها و طراحی آغازگرهای جدید کاربرد مفیدتری دارند. بنابراین، آغازگر WRKY-R3 (مربوط به ژن عامل رونویسی در عملکردهای تکاملی و فیزیولوژیکی) نسبت به سایر آغازگرها نقش مؤثرتری در آشکارنمودن تنوع ژنتیکی نمونه‌های کهور پاکستانی ایفا نموده است و قابلیت آن را دارد که از آن برای طراحی آغازگرهای نشانگر CDDP استفاده شود.

شاخص نشانگر (MI) برآوردی از کارآیی آغازگرها در تولید و تکثیر نوارهای چندشکلی است (۳۰، ۴۸). بیشترین مقدار این شاخص متعلق به آغازگر KNOX-3 (مربوط به ژن کدکننده هومئوباکس) و برابر ۴/۷۱ بود. آغازگرهای ABP1-1، KNOX-1 و ERF3 بیشترین مقدار را داشتند. شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی دیگر از شاخص‌های مهم برای مقایسه و ارزیابی کارآیی و توان آغازگرها است (۱۴). براساس معیار شرح داده شده توسط Wei و همکاران (۵۰) مقادیر بالاتر از ۰/۵ نشانه کارآیی بالا، مقادیر بین ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ نشانه کارآیی متوسط و کمتر از ۰/۲۵ نشانه کارآیی پایین آغازگر است. آغازگرهای ABP1-1، KNOX-1 و ERF3 بیشترین مقدار شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC=۰/۵۳) را داشتند. مقدار این شاخص برای هفت آغازگر بیشتر از ۰/۵۰، برای یازده آغازگر بین ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ و برای دو آغازگر کمتر از ۰/۲۵ بود. قدرت تفکیک (RP) از کارآمدترین شاخص‌های یک آغازگر و نشان دهنده توان آن در آشکارسازی میزان چندشکلی در ژنوم است (۲۶). قدرت تفکیک نشانگرها به طور میانگین ۴/۹۰ بود. نشانگرهایABP1-1 و ABP1-2 به ترتیب با مقادیر ۸/۳۶ و ۰/۸۶ بیشترین و کمترین قدرت تفکیک را داشتند.

آغازگرهای CDDP مورد استفاده در این پژوهش براساس میانگین شاخص نشانگر (MI)، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و قدرت تفکیک (RP) به سه گروه آغازگرهای با کارآیی بالا، شامل پنج آغازگر ABP1-1، ERF2، KNOX-1، KNOX-3 و WRKY-R3، آغازگرهای با کارآیی متوسط شامل ABP1-2، WRKY-R1، WRKY-R2B، WRKY-R3B، WRKY-F1، ERF1، ERF3، KNOX-2، MYB1، MYB2، MADS1-1، MADS-2 و MADS-3، و آغازگرهای با کارآیی ضعیف شامل آغازگرهای WRKY-R2 و ABP1-3 تقسیم می‌شوند. آغازگرهای گروه اول و دوم نسبت به سایر آغازگرها توان بیشتری در نشان دادن چندشکلی DNA ژنومی گونه کهور پاکستانی دارند و می‌توان از آنها در طراحی نشانگرهای مولکولی استفاده نمود (۱۹، ۴۹).

نمونه‌های خرمشهر دارای بیشترین میانگین آلل‌های مشاهده شده (Na=۱/۵۲۱)، بیشترین میزان تنوع نی (H=۰/۲۱۲) و بالاترین مقدار شاخص شانون (I=۰/۳۰۹)، بودند. نمونه‌های آبادان از این لحاظ بیشترین شباهت را به نمونه‌های خرمشهر دارند. از طرف دیگر نمونه‌های اهواز با کمترین میانگین آلل های مشاهده شده (Na=۱/۱۹۷)، کمترین میزان تنوع نی (H=۰/۱۱۴) و پایین‌ترین مقدار شاخص شانون (I=۰/۱۱۸) کمترین تنوع ژنتیکی را دارند. نمونه‌های ماهشهر بلحاظ این شاخص‌ها حدواسط نمونه‌های خرمشهر و اهواز هستند. فراوانی این شاخص‌ها بیانگر تنوع ژنتیکی بیشتر است (۱۵).

در تحلیل خوشه‌ای نمونه‌های اهواز در یک گروه مجزا قرار گرفتند که حاکی از تمایز ژنتیکی آنها از بقیه نمونه‌ها است. ولی نمونه‌های آبادان، خرمشهر و ماهشهر گروه‌های مستقلی را تشکیل ندادند. نمونه‌های اهواز از نظر شکل ظاهری تفاوتی با نمونه‌های دیگر این گونه نداشتند. نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز مؤید اعتبار گروه‌بندی افراد در تحلیل خوشه‌ای بود. محورهای اول و دوم حامل ۶۷/۴۱درصد واریانس کل و در واقع توجیه کننده ۶۷درصد تنوعات بودند. این مطلب بیانگر توزیع یکنواخت و مناسب داده‌های مولکولی حاصل از عمل آغازگرها در سطح ژنوم است. اگر آغازگرها تنها بخش‌هایی از ژنوم را پوشش دهند و از توزیع همگن برخوردار نباشند قادر به آشکارسازی کامل تنوع ژنتیکی نیستند و از اعتبار نتایج کاسته می‌شود (۲۳).

نتایج ماتریس فاصله نیز با نتایج تحلیل خوشه‌ای مطابقت دارد. نمونه‌های اهواز بیشترین فاصله ژنتیکی و درنتیجه کمترین شباهت را با نمونه‌های خرمشهر (۲/۶۴۴) و آبادان (۱/۲۰۰) دارند. فاصله جغرافیایی اهواز–ماهشهر درحدود ۹۴ کیلومتر و فاصله اهواز–خرمشهر درحدود ۱۰۰ کیلومتر و فاصله ماهشهر–آبادان درحدود ۸۸ کیلومتر است. کمترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های خرمشهر و آبادان (۰/۳۹۳) وجود دارد. این دو گروه کمترین شباهت ژنتیکی را با همدیگر دارند. فاصله جغرافیایی خرمشهر–آبادان حدود ۱۵ کیلومتر است. فاصله جغرافیایی گروه‌ها الزاماً نشان دهنده تشابه یا دوری ژنتیکی آنها نیست (۲۲) و نمی‌تواند به‌تنهایی معیاری برای درک ساختار ژنتیکی یک گونه باشد. تنوع ژنتیکی یک گونه با اندازه جمعیت‌های آن مرتبط است. کاهش شدید در اندازه جمعیت می‌تواند باعث از دست‌رفتن تنوع ژنتیکی درون جمعیت شود (۲۰).

در جمعیت‌های طبیعی کهور پاکستانی معمولا تنوع درون‌جمعیتی بیشتر از تنوع بین‌جمعیتی است. Hamza (۲۲) در بررسی تنوع ژنتیکی *Prosopis Juliflora* در سودان با روش RFLP تنوع درون‌جمعیتی را ۶۷درصد و تنوع بین‌جمعیتی را ۳۳درصد (تقریبا یک سوم تنوع درون‌جمعیتی) گزارش نموده است. Juarez-Munoz و همکاران (۲۴) نیز تنوع درون و بین‌جمعیتی این گونه در کنیا را بترتیب ۹۲/۸۵درصد و ۷/۱۵درصد برآورد نمودند. *Prosopis Juliflora* گونه‌ای دگرگشن است (۵). بنابراین انتظار می‌رود تنوع ژنتیکی درون‌جمعیتی بالایی داشته باشد. تبادل جریان ژنی بین گونه‌های گیاهی از دو طریق مهاجرت دانه گرده و انتقال بذر به جمعیت‌های مجاور میسر است. در واقع میزان تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌ها متأثر از این دو مکانیسم است (۴۰). در بررسی‌های انجام شده در رویشگاه‌های بومی کهور پاکستانی که شرایط بهتری برای جریان ژنی بین جمعیت‌ها فراهم بوده است تنوع ژنتیکی درون‌جمعیتی به وضوح از تنوع ژنتیکی بین‌جمعتی بیشتر بوده است. اما در پژوهش حاضر نتایج آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که تنوع ژنتیکی درون نمونه‌های کهور پاکستانی در هر جمعیت در سطح احتمال ۰/۰۰۱ (α<۰/۰۰۱) ۵۱درصد و تنوع بین جمعیت ها ۴۹درصد است. صالحه شوشتری و همکاران (۵) اظهار داشته‌اند که درختان کهور پاکستانی در استان خوزستان احتمالاً از بذرهای با منبع مشترک تکثیر شده‌اند. اما براساس نتایج این پژوهش منشأ بذر این گونه در

جمعیت های اهواز و ماهشهر نمی‌تواند با منشأ آنها در جمعیت های آبادان و خرمشهر یکسان باشد. زیرا اگر این توده‌ها دارای منشأ مشترک و یکسان بودند می‌بایستی تنوع ژنتیکی یکسانی داشته‌باشند. اما براساس تحلیل خوشه‌ای، تحلیل مولفه‌های اصلی، شاخص شانون، تنوع نی و میانگین آلل‌های مشاهده شده نمونه‌های اهواز کمترین تنوع ژنتیکی و نمونه‌های خرمشهر و آبادان بیشترین تنوع ژنتیکی را دارند.

پژوهش‌ها نشان‌داده که گونه‌های بیگانه و مهاجم توان زیادی در ایجاد جمعیت‌های با تنوع ژنتیکی بالا دارند و همین امر عامل موفقیت آن‌ها است (۱، ۲۵). نتایج این پژوهش در مورد گونه بیگانه و مهاجم کهور پاکستانی و استقرار موفق آن در رویشگاه‌های جدید در استان خوزستان مؤید این نظر است. همانگونه که خسروشاهی (۳) و نجفی و همکاران (۱۰) بیان داشته‌اند توده‌های کهور پاکستانی که در حاشیه شهرهای استان خوزستان به صورت مهاجم درآمده‌اند، اغلب از پراکنش بذر پایه‌های کاشته‌شده در حاشیه خیابان‌ها و پارک‌های جنگلی بوجود آمده‌اند. اطلاع از تنوع ژنتیکی برای ارزیابی توان محیطی گونه‌های مهاجم مفید و ضروری است. تنوع ژنتیکی پایین احتمالاً توان تکاملی جمعیت‌های بیگانه وارد شده به یک اکوسیستم را محدود می‌کند و در نتیجه توان آن را برای سازش با محیط جدید کاهش می‌دهد (۱۷). ولی گونه‌های مهاجم با تنوع ژنتیکی بالا از طریق اشغال زیستگاه‌های طبیعی متعلق به گونه‌های بومی باعث کاهش تنوع زیستی می‌شوند (۱، ۳۶). با این‌حال، ساز و کار منجر به موفقیت گونه‌های مهاجم هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۵۱).

گونه کهور پاکستانی به لحاظ مقاومت زیاد به شوری (۱۶) و داشتن ریشه‌های وسیع و قابلیت زنده‌مانی بالا، در سالهای گذشته برای توسعه فضای سبز و جنگل کاری‌های درون و برون شهری مورد استفاده قرار گرفته است (۱، ۸). توجیه اقتصادی کاشت این گونه در مناطق جنوب کشور اینست که در مقایسه با سایر گونه‌های برگ‌پهن ویژگی‌های بهتری برای تهیه خمیر کاغذ دارد (۷). با این وجود، می‌بایستی در مناطقی که گونه‌های بومی جایگزین وجود دارد از کاشت کهور پاکستانی، که ماهیت تهاجمی دارد، خودداری شود (۵).

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور اصفهان به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می‌نمایند. همچنین از همکاری و مساعدت خانم الهه لطیفی در انجام برخی از مراحل آزمایشگاهی و تحلیل‌های آماری تشکر می نمایند.

منابع

۱- ایمانی، ف.، مرادی، م. و بصیری، ر. ۱۳۹۷. ارزیابی تنوع گونه‌های گیاهی در تپه‌های شنی بعد از دو دهه گذشت از فعالیت‌های تثبیت و جنگل‌کاری (مطالعه موردی: منطقه مگران، شوش). مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران). ۳۱ (۱): ۲۱۶-۲۰۶.

۲- حائری نسب، م. ۱۳۹۶. ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی *Trifolium tomentosum* با استفاده از روش CDDP در ایران. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. ۹ (۳۲): ۷۰-۵۷.

۳- خسروشاهی، م. ۱۳۹۲. محاسبه نیاز آبی گونه سمر (*Prosopis juliflora*) در چند ناحیه رویشی خلیج عمانی ایران. فصلنامه تحقیقات جنگل ها و صنوبر. ۲۱ (۲): ۳۱۵-۳۰۰.

۴- سلیمانی، ز.، مصلح آرانی، ا. و سودائی زاده، ح. ۱۳۹۰. بررسی تنش شوری بر سه گونه کهور در مراحل جوانه زنی و دانه‌رست. فصلنامه خشکبوم. ۱ (۳): ۶۲-۵۱.

۵- صالحه شوشتری، م.ح.، بهنام‌فر، ک. و غدیری‌پور، پ. ۱۳۹۰. تأثیر فاصله و ترکیب کشت بر عملکرد زیست توده هوایی سه

گونه نیام دار کشت شده در تپه های ماسه ای خوزستان. فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. ۱۹ (۳): ۳۲۶-۳۱۲.

۶- ضعیفی، م. ۱۳۷۵. فلور ایران. جلد ۱۸. تیره گل ابریشم (Mimosaceae). مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، تهران، ایران.

۷- فخریان روغنی، ع.، یزدانی، ر.، قاسمیان، ع و رسالتی، ح. ۱۳۹۵. ارزیابی پتانسیل گونه کهور پاکستانی (سمر) در خمیر کاغذسازی کرافت. مجله صنایع چوب و کاغذ ایران. ۷ (۱): ۵۴-۴۳.

۸- کشاورزی، م.، رئیسی للری، ف. و فراست، ن. ۱۳۹۵. ریخت شناسی سرده *Prosopis* (Fabaceae) در ایران. مجله پژوهشهای گیاهی (زیست شناسی ایران). ۲۹ (۲): ۴۴۰-۴۲۶.

۹- لطیفی، ا.، یوسفی، م. و حائری نسب، م. ۱۳۹۶. تنوع ژنتیکی جمعیت هایی از گونهٔ سپستان (*Cordia myxa* L.) در ایران با نشانگر مولکولی CDDP. زیست شناسی گیاهی ایران. ۹ (۴): ۵۴-۳۹.

۱۰- نجفی، ک.، جلیلی، ع. و اسدپور، ر. ۱۳۹۳. بررسی برخی از اثرهای تهاجمی گونه کهور آمریکایی (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.). فصلنامه خشکبوم. ۴ (۱): ۶۴-۵۳.

11- Amom, T. and Nongdam, P. 2017. The use of molecular marker methods in plants: A review. International Journal of Current Research Review, 9 (17): 1-7.

12- Assarehzadegan, M.A., Khodadadi, A., Amini, A., Abdol-Hosein Shakurnia, A.H., Marashi, S.S., Ali-Sadeghi, H., Zarinhadideh, F., and Sepahi, N. 2015. Immunochemical characterization of *Prosopis juliflora* pollen allergens and evaluation of cross-reactivity pattern with the most allergenic pollens in tropical areas. Iranian Journal of Allergy and Asthma Immunology, 14(1):74-82.

13- Chaudhary, A., Shah, S., Katudia, B., Vyas, K., and Chikara, S.K. 2013. RAPD analysis of *Prosopis Juliflora* and *Prosopis pallida* accessions in India. Indian Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research, 1 (2): 50-55.

14- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. 2009. Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 27 (4): 558-562.

15- Crawford, K.M. and Rudgers, J.A. 2012. Plant species diversity and genetic diversity within a dominant species interactively affect plant community biomass. Journal of Ecology, 100: 1512–1521.

16- Dutton, R.W. 1992. *Prosopis* species: A justification for their future research and development in *Prosopis* species, Aspects of their value. Research and Development Proceeding of the *Prosopis* Symposium, University of Durham, Durham, UK.

17- Ellstrand, N.C. and Elam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Reviews of Ecological Systems, 24: 217-242.

18- Elmeer, K. and Almalki, A. 2011. DNA finger printing of *Prosopis cineraria* and *Prosopis juliflora* using ISSR and RAPD techniques. American Journal of Plant Sciences, 2: 527-534.

19- Enayat Avval, S. 2017. Assessing Polymorphism Information Content (PIC) using SSR molecular markers on local species of *Citrullus colocynthis*. Case study: Iran, Sistan-Balouchestan Province. Journal of Molecular Biology Research, 7 (1): 42-49.

20- Govindaraj, M, Vetriventhan, M. and Srinivasan, M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. Genetics Research International, 10: 1-14.

21- Hajibarat, Z., Saeidi, A., Hajibarat, Z. and Talebi, R. 2015. Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) and Conserved DNA Derived Polymorphism (CDDP). Physiology and Molecular Biology of Plants, 21(3): 365-373.

22- Hamza, N.B. 2010. Genetic variation within and among three invasive *Prosopis juliflora* (Leguminosae) populations in the River Nile State, Sudan. International Journal of Genetics and Molecular Biology, 2(5): 92-100.

23- Hedrick, P. W. 2011. Genetics of populations. Jones and Bartlett Publishers, United States of America.

24- Juarez-Munoz, J., Carrillo-Castan, Eda, G., Arreguin, R. and Rubluo, A. 2002. Inter-and intra-genetic variation of four wild populations of *Prosopis* using RAPD-PCR fingerprints. Biodiversity and Conservation, 11: 921–930.

25- Kahilainen, A., Puurtinen, M. and Kotiaho, J.A. 2014. Conservation implications of species–

genetic diversity correlations. Global Ecology and Conservation, 2: 315–323.

26- Kayis, S. A., Hakki, E. E. and Pinarkara, E. 2010. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African Journal of Agricultural Research, 5(21): 2925-2933.

27- Landeras, G., Alfonso, M., Pasiecznik, N.M., Harris, P.J.C. and Ramirez, L. 2005. Identification of *Prosopis juliflora* and *Prosopis pallida* accessions using molecular markers. Biodiversity and Conservation, 15 (5): 1829-1844.

28- Lefort, F. and Douglas, G. C. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species Acer, Fraxinus, Prunus and Quercus. Annals of Forest Science, 56: 259-263.

29- Li, T., Li, Y., Ning, H., Sun, X. and Zheng, C. 2013. Genetic diversity assessment of *Chrysanthemum* germplasm using conserved DNA-derived polymorphism markers. Scientia Horticulturae, 162: 271277.

30- 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 relationships in cultivated potato. Molecular Breeding, 3: 127-136.

31- Moradi, M., Imani, F., Naji, H.R., Moradi Behbahani, S. and Ahmadi, M.T. 2017. Variation in soil carbon stock and nutrient content in sand dunes, after afforestation by *Prosopis juliflora* in the Khuzestan province (Iran). Forest Biogeosciences and Forestry, 10: 585-589.

32- Morgan, M.A., Abdalla M. Hamdoun, A.M. and Bashir, N.H.H. 2017. Studies on seed germination and seedling emergence of mesquite, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. In Sudan Gezira. Universal Journal of Agricultural Research, 5(2): 159-163.

33- Muturi, G.M., Machua, J.M., Mohren, G.M.J., Poorter, L., Gicheru, J.M. & Maina, L.W. 2012. Genetic diversity of Kenyan *Prosopis* populations based on random amplified polymorphic DNA markers. African Journal of Biotechnology, 11 (87): 15291-15302.

34- Mwuangi, E. and Swallow, B. 2005. Invasive *Prosopis juliflora* and local livelihoods; case study from the lake Baringo of Kenya. World Agroforestry Center, Nairobi, kenya. Retrieved from www.worldagroforestry.org. On: 8 February 2019.

35- Nie, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 70: 3321-3323.

36- Ogwu, M.C., Osawaru, M.E. and Ahana, C.M. 2014. Challenges in conserving and utilizing plant genetic resources (PGR). International Journal of Genetics and Molecular Biology, 6 (2): 16-22.

37- Palacios, R.A., Burghardt, A.D., Frías-Hernández, J.T., Olalde-Portugal, V., Grados, N., Alban, L. and Martínez-de la Vega, O. 2012. Comparative study (AFLP and morphology) of three species of *Prosopis* of the section *Algarobia*: *P. juliflora*, *P. pallida*, and *P. limensis*. Evidence for resolution of the "*P. pallida-P. juliflora* complex". Plant Systematics and Evolution, 298 (1): 165-171.

38- Pasiecznik, N.M., Harris, P.J.C. and Smith, S. 2004 Identifying tropical *Prosopis* species: A Field Guide. HDRA, Coventry, UK

39- Pawell, W., Morganet, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A. 1996. The comparision of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.

40- Pfeifer, M., and Jetschke, G. 2006. Influence of geographical isolation on genetic diversity of *Himantoglossum hircinum* (Orchidaceae). Folia Geobotanica, 41: 3-20.

41- Poczai, P., Varga, I., Bell, N.E. and Hyvönen, J. 2011. Genetic dversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, Solanaceae) germplasm using conserved DNA derived polymorphism and intron-targeting markers. Annals of Applied Biology, 159: 141–153.

42- Qureshi, H., Arshad, M. and Bibi, Y. 2014. Invasive flora of Pakistan: a critical analysis. International Journal of Biosciences, 4(1): 407-427.

43- Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Exeter software, Setauket, New York.

44- Rechinger, K.H. 1986. Mimosaceae In: Rechinger, K.H. (Ed.) 1963-2010. Flora Iranica, Vols. 1-178. Academische Drucku.Verlagsanstalt, Graz, Austria.

45- Roy, D. 2000. Plant breeding: Analysis and exploitation of variation. Alpha Science International Ltd, India.

46- Seyedimoradi, H., Talebi, R. and Fayaz, F. 2016. Geographical diversity pattern in Iranian landrace durum wheat (*Triticum turgidum*) accessions using start codon targeted polymorphism and conserved DNA-derived polymorphism markers. Environmental and Experimental Biology, 14: 63–68

47- Shackleton, R.T., Le Maitre, D.C., Pasiecznik, N.M. and Richardson, D.M. 2014. *Prosopis*: a global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. The Open Access Journal of Plant Sciences, 6 (27): 1-18.

48- Spooner, D., van Treuren, R. and de Vicente, M. C. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. Plant Genetic Resources Institute (now Bioversity International, Inc.), Rome.

49- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G. S. 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae, 118: 1-7.

50- Wei, Y. M., Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wu, W., Zhang, Z. Q., Liu, D. C. and Zhang, Y. L. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. Theoretical and Applied Genetics, 46: 3-9.

51- Xu, C.Y., Tang, S., Fatemi, M., Caroline L. Gross, C.L., Julien, M.H., Curtis, C. and van Klinken, R.D. 2015. Population structure and genetic diversity of invasive *Phyla canescens*: implications for the evolutionary potential. Ecospher, 36 (9): 1-21.

Genetic variation of *Prosopis juliflora* in Khuzestan province by CDDP method

Nasiri S., Yousofi M. and Haerinasab M.

Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payam Noor University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Mesquite (*Prosopis juliflora*) belonging to Fabaceae that is originally a Native American plant, was brought to Iran to develop urban green spaces in the past decades. At present, it is an alien invasive plant and occupies a wide range of natural habitats in Khuzestan province (southwestern Iran). The aim of the present study was the assessment of genetic diversity in some populations of this species in Khuzestan province using Conserved DNA Derived Polymorphism (CDDP) molecular markers. Twenty samples from four distinct populations were evaluated using 20 CDDP primers. The resulted data were analyzed by NTSYS, Popgene and GenAlex softwares. The primers generated 212 bands, from which 194 bands (91.94%) were polymorphic. The highest and lowest means of genetic diversity were 0.221 and 0.114 for the populations of Khorramshahr and Ahvaz, respectively. Clustering analysis using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method classified the samples in two separate groups at 22% similarity level, reflecting their genetic variations. Molecular Variance Analysis also showed that the genetic diversity in intra-population was higher (51%) than inter-population (49%). This study indicated the high potentiality of the CDDP marker for assessing genetic diversity of *Prosopis juliflora* populations.

Key words: CDDP primers, genetic diversity, Iran, Khuzestan, *Prosopis juliflora*.