



ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سس زراعی (*Cuscuta campestris* Yunker) با استفاده از نشانگرهای مولکولی و پروتئینی

سارا تاجدوست^{۱*}، رمضانعلی خاوری نژاد^۲، فریبا میقانی^۳، اسکندر زند^۴ و زهرا نورمحمدی^۵

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- استاد فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۳- استادیار فیزیولوژی گیاهی، بخش تحقیقات علف‌های هرز، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

۴- دانشیار فیزیولوژی گیاهان زراعی، بخش تحقیقات علف‌های هرز، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

۵- استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۴

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۲۲

Assessment of Genetic Diversity in *Cuscuta campestris* Yunker Ecotypes Based on their Molecular and Protein Markers

Sara Tajdoust,^{1*} Ramezan Ali Khavari-Nejad,²
Fariba Meighani,³ Eskandar Zand⁴ and Zahra
Noormohammadi⁵

1- Ph.D. student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University.

2- Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University.

3- Assistant Professor, Department of Weed Research, Plant Protection Research Institute.

4- Associate Professor, Department of Weed Research, Plant Protection Research Institute.

5- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University.

Abstract

The genetic diversity of 17 *Cuscuta campestris* ecotypes collected from different regions of Iran was assessed using ISSR and protein markers. Ten ISSR primers generated a total of 361 bands, of which 347 bands were polymorphic. PIC (polymorphism information content), based on ISSR and protein data, averaged 0.66 and 0.4 per primer, respectively. Cluster analysis and PCA plots derived from Dice's similarity coefficient of the two-marker systems were highly concordant. The analysis of molecular variance allowed us to partition variation into: 81% (variance among populations) and 19% (variance within populations) based on ISSR data; and 85% (variance among populations) and 15% (within populations) for protein data. This high variation among ecotypes could be due to the high self fertilization, limited gene flow or the low rate of pollen and seed migration among ecotypes. Knowledge of the genetic variability of the weed acquired through using different molecular tools can be helpful in developing management programs in order to effective control of the weed in crop fields.

Keywords: Genetic diversity, *Cuscuta campestris*, ISSR markers, Gene flow.

چکیده

۱۷ اکوتیپ سس زراعی از نواحی مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR و پروتئینی مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ده آغازگر ISSR در مجموع ۳۶۱ باند نمره‌دهی شد که در بین آنها ۳۴۷ باند چند شکل بودند. میانگین PIC (محتوای اطلاعات چند شکلی) بر پایه داده‌های ISSR و پروتئینی، به ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۴ محاسبه گردید. تجزیه خوشه‌ای و پلات‌های PCA حاصل از ضریب تشابه دایس، همخوانی بالایی داشتند. آنالیز واریانس مولکولی بر پایه داده‌های ISSR، تنوع کلی را به ۸۱٪ (تنوع بین جمعیت‌ها) و ۱۹٪ (تنوع داخل جمعیت‌ها) و بر پایه داده‌های پروتئینی به ۸۵٪ (تنوع بین جمعیت‌ها) و ۱۵٪ (تنوع داخل جمعیت‌ها) تقسیم نمود. تنوع زیاد بین اکوتیپ‌ها ممکن است نتیجه خودگشنی بالای این گیاه، جریان ژنی محدود و سرعت پایین انتقال دانه گرده و دانه باشد. آگاهی از تنوع ژنتیکی این علف‌هرز با استفاده از ابزارهای مولکولی متفاوت، می‌تواند منجر به پیشرفت برنامه‌های مدیریتی به منظور کنترل مؤثر این علف هرز در زمین‌های زراعی شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، سس زراعی، نشانگرهای ISSR، جریان ژنی.

مقدمه

سس که عموماً با نام انگلیسی dodder شناخته شده، از علف‌های هرز مهم اروپا، خاورمیانه، آفریقا، آمریکای شمالی و جنوبی است. همه گونه‌های سس انگل اجباری هستند و با ۱۷۰ گونه در سراسر جهان پراکنده شده‌اند (Aly, 2007). مهم‌ترین گونه آن *Cuscuta campestris* Yuncker (سس زراعی) است. تلفات محصولات زراعی با این انگل از ۲۰ تا ۵۷ درصد تخمین زده شده و تولید چغندر قند را ۳/۵-۴ تن در هکتار کاهش داده و علف‌هرز حداقل ۲۵ محصول زراعی در ۵۵ کشور جهان است. یونجه (*Medicago sativa* L.)، شبدر (*Trifolium spp.*)، هویج (*Daucus carota* L.) و با گستره کمتر مارچوبه (*Asparagus officinalis* L.)، نخود (*Cicer arietinum* L.)، انگور (*Vitis vinifera* L.)، خربزه (*Cucumis melo* L.)، بادمجان (*Solanum melongena* L.) و برخی گیاهان زینتی مانند گل مینا از میزبان‌های ترجیحی این گونه هستند (Costea and Tardif, 2006; Lian et al., 2006). ساقه پیچنده سس فاقد برگ و ریشه و به رنگ زرد- نارنجی است. گل‌های کوچک آن‌ها، به صورت سنبله و گاهی منفرد هستند. جوانه‌زنی دانه آن‌ها، مستقل از تأثیر میزبان روی می‌دهد. دانه‌رست آن‌ها می‌تواند تا چند روز بدون میزبان بقا یابد و زمانی که به میزبان مناسب خود اتصال یافتند، ساقه آن‌ها در اطراف میزبان می‌پیچد و اندام مکنده‌ای را می‌سازد که مکینه نامیده می‌شود، که به بافت آوندی میزبان نفوذ می‌کند (Weinberg et al., 2003).

علف‌های هرز در مزارع کشاورزی دارای شکل‌پذیری بالایی فنوتیپی و تنوع بالایی ژنتیکی

هستند، در برابر آشفته‌گی‌های محیطی به خوبی سازش یافته و اغلب دارای قابلیت تکثیر بذری می‌باشند (Adahl et al., 2006). افزایش آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیت‌های علف‌هرز می‌تواند ابزاری مهم در افزایش کارایی مدیریت علف‌های هرز و نوآوری در روش‌های کنترل آن‌ها باشد (Goolsby et al., 2006). نشانگرهای ژنتیکی منجر به افزایش دانش ما در رابطه با جنبه‌های مهم علف‌های هرز شده و اطلاعاتی را در رابطه با الگوی تهاجم، توارث و ویژگی‌ها (مانند مقاومت به علف‌کش‌ها)، روابط تاکسونومیک، منشأ و جریان ژنی آن‌ها فراهم می‌سازند. نشانگرهای مبتنی بر DNA تحت اثر شرایط محیطی قرار نگرفته و نقش مهمی را در شناسایی و سنجش تنوع ژنتیکی گیاهان ایفا می‌کنند (Zhao et al., 2006). نشانگرهای ISSR^۱ (تکثیر بین ردیف تکراری ساده)، نشانگرهایی بالقوه در شناسایی تنوع ژنتیکی، در مقایسه با سایر نشانگرها هستند و امکان بررسی تنوع نواحی ویژه‌ای از ژنوم را در چندین جایگاه به صورت همزمان فراهم می‌سازند (Mengistu et al., 2004). مطالعات اولیه مولکولی با اهداف طبقه‌بندی با استفاده از نشانگرهای پروتئینی انجام می‌شد. نشانگرهای پروتئینی، فرآورده نهایی ژن‌های ساختاری بوده که در واقع بیانگر تنوع موجود در سطح توالی نوکلئوتیدی ژنوم هستند، اما از آنجا که محصولات ژن از روی قسمتی از توالی‌های DNA ساخته می‌شوند، لذا در برگ‌گیرنده همه تغییرات موجود در سطح DNA نیستند و نمی‌توانند نماینده کل ژنوم باشند و در برگ‌گیرنده تنوع مربوط به قسمت‌های بیان شونده ژنوم می‌باشند. این نشانگرها به دلیل همباز

بودن اهمیت خاصی دارند. تعداد مکان‌های ژنی که در طول دوره زندگی جاندار بیان می‌شوند زیاد است، بنابراین برای پاسخ به برخی از پرسش‌ها بهتر است به جای نشانگرهای اسیدنوکلئیک، از نشانگرهای پروتئینی استفاده شود (Dziechciarkova et al., 2004).

اگر چه گیاه سس از دیر باز مورد توجه بوده و تحقیقاتی در زمینه بیولوژی و مبارزه با آن‌ها انجام شده، اما متأسفانه مطالعه چندانی روی تنوع ژنتیکی آن‌ها صورت نگرفته است. در مطالعه Kim و همکاران (2004)، تنوع ژنتیکی دانه‌رست‌های سس مرداب (Swamp dodder) با استفاده از نشانگرهای ملکولی RFLP بررسی شد که منجر به جداسازی دو اکوتیپ A و B شد. تنوع مشاهده شده در جمعیت سس مرداب، توضیحی برای تفاوت زمان‌های حضور حداکثر این گونه از سس در طی چهار فصل رویشی بود، همچنین بردباری متفاوت آن‌ها به علف‌کش پیش رویشی دیکلوبنیل را نیز توضیح می‌داد. Kim و همکاران (2004) گزارش دادند که تعیین توزیع اکوتیپ‌های این گیاه و کاربردهای مناسب علف‌کش، می‌تواند در کنترل سس مرداب که انگل زغال‌اخته‌های ماساچوست هستند، مؤثر باشد. Li و Dong (2009) روی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های *C. campestris* و میزبان *Mikania micrantha* با نشانگر ISSR مطالعه نمودند و نتایج حاکی از رشد کلونالی بالای *C. campestris* بود.

هدف از این تحقیق، بررسی میزان تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های سس زراعی با استفاده از نشانگرهای ISSR و پروتئینی است. نتایج این

بررسی، می‌تواند در پیشبرد استراتژی‌های مدیریتی و کنترلی، به منظور کاهش تأثیر منفی این علف‌هرز در نواحی کشاورزی مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق، ۱۷ اکوتیپ سس زراعی که بذرها از آن‌ها از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، بخش تحقیقات علف‌های هرز تهیه شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذرها از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری گردیده، که مشخصات طول و عرض جغرافیایی محل جمع‌آوری آن‌ها، در جدول ۱ نشان داده شده است. تاریخ کاشت بذرها در گلدان‌ها پنجم فروردین ۱۳۹۰ بود. قبل از کشت بذرها در گلدان‌ها، به منظور حذف پوسته سخت فوقانی و برطرف ساختن خواب بذرها، سس، تیمار خراش‌دهی آن‌ها انجام گرفت. بذرها سس ۲۰ دقیقه در محلول اسید سولفوریک ۹۸ درصد قرار گرفتند. پس از حذف پوسته‌های سخت بذرها، در ابتدای مرحله شش برگی حقیقی چغندر قند (گیاه میزبان)، بذرها در سطح گلدان‌ها پخش و روی آن‌ها به وسیله ماسه نرم پوشیده شد. بذرها در عمق تقریبی ۱/۵-۱ سانتی‌متری کاشته شدند. آزمایشات در طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار در شرایط گلخانه‌ای در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعته و رطوبت نسبی حدود 50 ± 70 درصد انجام شد.

دو هفته پس از رشد دانه رست‌های سس، از هر تکرار سه گیاه به صورت تصادفی انتخاب و نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از انجماد در نیتروژن مایع، به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند.

استخراج DNA و آنالیز ISSR

استخراج DNA از ساقه دانه رست ۱۴ روزه سس، بر اساس روش Saghai-Marooif و همکاران (1984)، با اندکی تغییر صورت گرفت. برای تعیین کمیت DNA، از دستگاه بیوفتومتر و برای تعیین کیفیت DNA، از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. واکنش PCR با کمک دستگاه Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. غلظت مواد و بافرهای مورد نیاز جهت واکنش PCR عبارتند از: ۲/۵ میکرولیتر از بافر Taq پلیمرز ۱۰X، ۱/۲۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم DNA پلیمرز Taq ۵ واحد، ۲ میکرولیتر از DNA الگو ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، ۰/۲۵ میکرولیتر از dNTP mix ۲۰ میلی مولار و بقیه تا حجم ۲۵ میکرولیتر نیز آب مقطر دیونیزه بود. در این تحقیق، از ۱۰ آغازگر (ساخت شرکت سیناژن) استفاده شد، که مشخصات و توالی آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. چرخه‌های دمایی واکنش PCR شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ سیکل که هر سیکل خود از سه مرحله مجزا شامل واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در گستره دمایی ۴۷-۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ دقیقه تشکیل شده بود. آخرین مرحله شامل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه بود. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پنج میکرولیتر رنگ فرمامید ۹۸ درصد، مخلوط و قبل از بارگذاری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه واسرشته شدند. ده

میکرولیتر از مخلوط فرآورده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رنگ فرمامید، بر روی ژل پلی آکرلامید واسرشته سازشش درصد (Benbouza *et al.*, 2006) بارگذاری و الکتروفورز (در دستگاه Bio Rad, squi-Gen GT) با توان ۸۰ وات به مدت ۶۰ دقیقه انجام و سپس رنگ آمیزی ژل با استفاده از روش نترات نقره انجام شد (Bassam *et al.*, 1991).

استخراج پروتئین و الکتروفورز: برای تهیه عصاره پروتئینی، ۱ گرم بافت تر ساقه سس در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با اسیدیته ۷ (به نسبت ۱:۱) هموژنیزه گردید. برای سهولت عصاره گیری از ازت مایع استفاده گردید، پس از آن پودر حاصله به لوله سانتریفوژ ۱۰ میلی لیتری منتقل شده و بافر مذکور به لوله اضافه گردید. سپس این سوسپانسیون به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در برودت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. بخش مایع آن (عصاره صاف شده) به لوله‌های تمیز منتقل شده و در برودت ۲۰- درجه سانتیگراد تا اجرای مراحل بعدی نگهداری گردید. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها مطابق روش Bradford (1976)، با استفاده از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. در این تحقیق برای الکتروفورز پروتئین، از روش SDS-PAGE استفاده شد. مخلوط ۳۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی با بافر نمونه SDS-PAGE، روی ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد بارگذاری شد. الکتروفورز (در دستگاه PROTEAN IIx Bio-Rad) در ولتاژ ۲۰۰ ولت و شدت جریان ۶۰ میلی آمپر انجام و سپس رنگ آمیزی ژل با کوماسی بریلیانت بلو صورت گرفت (Laemmli, 1970).

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران

Ecotype No.	Region originated	Latitude, N	Longitude, E
EC1	Tabriz (East azarbaijan state)	38°04'	46 13'
EC2	Tabriz (East azarbaijan state)	36°07'	46°20'
EC3	Tabriz (East azarbaijan state)	38°01'	46 34'
EC4	Arasbaran (East azarbaijan state)	38°54'	46°51'
EC5	Hamedan (Hamedan state)	34 47'	48°30'
EC6	Hamedan (Hamedan state)	36°39'	48 29'
EC7	Kermanshah (Kermanshah state)	34 18'	47 03'
EC8	Kermanshah (Kermanshah state)	32 11'	47 30'
EC9	Isfahan (Isfahan state)	32 13'	51 04'
EC10	Varamin (Tehran state)	35°19'	51 38'
EC11	Rey (Tehran state)	35 21'	51 15'
EC12	Yazd (Yazd state)	31 53'	54 22'
EC13	Jiroft (Kerman state)	28 40'	57 44'
EC14	Jiroft (Kerman state)	29 41'	58 21'
EC15	Chopar (Kerman state)	30°03'	57 06'
EC16	Zehak (Sistan-Baluchestan state)	30 53'	60 42'
EC17	Zarghan (Fars state)	29 46'	52°43'

تجزیه‌های آماری

افزار آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) با ۹۹۹ نمونه‌برداری مجدد تصادفی (permutation) صورت گرفت. برای بررسی تمایزهای ژنتیکی بین جمعیت‌ها، شاخص PhiPT با استفاده از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) تخمین زده شد. شاخص PhiPT به صورت نسبت واریانس بین جمعیت‌ها به واریانس کل محاسبه شده و ارتباط بین افراد درون یک جمعیت را نسبت به کل جمعیت نشان می‌دهد و مشابه شاخص تثبیت (*Fst*) است (Maguire *et al.*, 2002). با استفاده از نرم افزار NTSYS 2.02 ماتریس دو طرفه ارقام بر اساس ضریب تشابه دایس تشکیل شد (Rohlf, 1998). تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه دایس و با استفاده از روش UPGMA ترسیم شد. همبستگی بین ماتریس‌های تشابه هر نشانگر با ماتریس کوفتیک آن، از طریق آزمون مانتل و با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام گرفت (Mantel, 1967).

امتیازدهی باندهای ISSR و پروتئینی به صورت ۱ برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند صورت گرفت. $PIC_i = 2f_i$ بر اساس فرمول محاسبه گردید، که PIC_i محتوای اطلاعات چند شکلی مکان ژنی a_i فراوانی قطعات تکثیر یافته (باند حاضر) و $(1 - f_i)$ فراوانی قطعات تکثیر نیافته (باند غایب) است. PIC هر آغازگر به صورت میانگینی از همه مکان‌های ژنی آن آغازگر، محاسبه شده است (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). قدرت تفکیک هر آغازگر با استفاده از رابطه $R_p = \sum I_b$ محاسبه گردید که مقدار I_b از ۰-۱ متغیر است و با رابطه $I_b = 1 - (|0.5 - p|)$ محاسبه گردید که در اینجا p فراوانی افراد دارای باند است I است (Prevost and Wilkinson, 1999). محاسبه PIC و R_p با نرم افزار GenAlex 6 انجام شد (Peakall and Smouse, 2006)، همچنین با این نرم

همچنین از این آزمون، جهت بررسی همسویی و مقایسه ماتریس تشابه داده‌های ISSR و پروتئینی استفاده گردید. جهت تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای، آزمون تجزیه به مختصات اصلی (PCA) با استفاده از نرم افزار NTSYS انجام شد و با دو مؤلفه اول که بیشترین درصد تنوع را توجیه می‌کردند، نمودار مربوطه جهت گروه‌بندی و ارتباط بین نمونه‌ها ترسیم شد.

نتایج

اطلاعات نشانگرهای ISSR

تمامی ده آغازگر ISSR به کار رفته در این تحقیق، چند شکلی نشان دادند. محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگرها و تعداد باندها در جدول ۲ نشان داده شده است. در مجموع ۳۶۱ باند نمره‌دهی شد که در بین آن‌ها ۳۴۷ باند چند شکلی بودند. تعداد باندهای چند شکلی از ۱۴ تا ۸۱ باند برای هر آغازگر متغیر بود. میانگین ۳۶/۱ باند و ۳۴/۷ باند چند شکلی برای همه آغازگرها حاصل شد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر، محاسبه گردید و میانگین این شاخص برای کل اکوتیپ‌ها ۰/۶۶ محاسبه گردید. آغازگر UBC811، دارای بیشترین

مقدار PIC در بین آغازگرها (۰/۹۵) و نشانگر UBC873 دارای کمترین مقدار PIC در بین آغازگرها (۰/۲۴) بود. بنابراین آغازگر UBC811 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. قدرت تفکیک (Rp) پارامتری است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می‌دهد. قدرت تفکیک آغازگرها ۲/۶۸ و بیشترین و کمترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به آغازگر UBC811 و UBC873 به ترتیب با میزان ۵/۷ و ۱ بود. بیشترین باند چند شکلی مربوط به آغازگر UBC811 با ۸۱ باند چند شکلی و کمترین باند چند شکلی مربوط به آغازگر UBC873 با ۱۲ باند چند شکلی بود.

شبهت یا فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها با نشانگر

ISSR: تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه Dice مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۳ آمده است. میزان تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها از ۰/۰۹۵ تا ۰/۹۳۱ متغیر بود. کمترین ضریب تشابه (۰/۰۹۵) بین اکوتیپ EC5 و EC12 (به ترتیب از استان همدان و یزد) و بیشترین ضریب تشابه بین اکوتیپ EC7 و EC8 بود، که هر دو از یک منطقه جغرافیایی (استان کرمانشاه) بودند (جدول ۳).

جدول ۲- آغازگرهای ISSR انتخاب شده جهت بررسی تنوع ژنتیکی و درصد چند شکلی آن‌ها در اکوتیپ‌های *C. campestris*

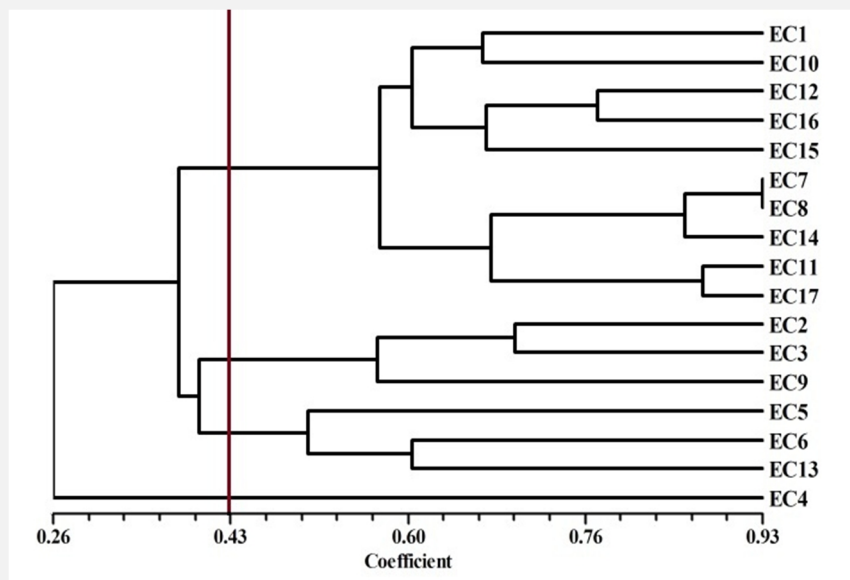
Primer	Sequence	Number of amplified bands	Number of polymorphic bands	PIC	Rp
UBC807	(AG) ₈ T	50	50	0.79	3.7
UBC808	(AG) ₈ C	42	42	0.90	1.4
UBC811	(GA) ₈ C	81	81	0.95	5.7
UBC812	(GA) ₈ A	41	41	0.89	2.5
UBC825	(AC) ₈ T	24	24	0.27	3.5
UBC842	(GA) ₈ YG	23	19	0.74	2.7
UBC856	(AC) ₈ YA	20	20	0.46	1.3
UBC864	(ATG) ₆	39	36	0.75	2.5
UBC873	(GACA) ₄	14	12	0.24	1.0
UBC884	HBH (AG) ₇	27	22	0.58	2.5
Average		36.1	34.7	0.66	2.68

تجزیه خوشه‌ای نشانگر ISSR: از ضریب تشابه دایس و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA برای رسم دندروگرام استفاده شد (شکل ۱). در فاصله ضریب ۴۳ درصد، کلیه جمعیت‌ها به ۴ دسته گروه‌بندی شدند. گروه اول شامل ۱۰ اکوتیپ (EC1، EC10، EC12، EC14، EC15، EC16، EC7، EC8، EC11 و EC17) بود و حداکثر تشابه بین EC7 و EC8 مشاهده شد، که هر دو از یک منطقه جغرافیایی (استان کرمانشاه) بودند. EC14 و EC15 نیز هر دو از استان کرمان بودند. گروه دوم شامل سه اکوتیپ EC2، EC3 و EC9 بود که EC3 و EC2 هر دو متعلق به یک ناحیه تبریز از استان آذربایجان شرقی) و EC9 متعلق

به استان اصفهان بود. گروه سوم شامل سه اکوتیپ EC5، EC6، EC13 و EC6 بود که EC5 و EC6 هر دو از یک منطقه جغرافیایی (استان همدان) و EC13 متعلق به استان کرمان بود و در نهایت گروه آخر تنها شامل اکوتیپ EC4 (ارسباران از استان آذربایجان شرقی) بود. مقایسه ماتریس تشابه دایس با ماتریس کوفنتیک دندروگرام ISSR با استفاده از آزمون انطباق مانتل، همبستگی بالایی این دو ماتریس را نشان داد ($r = 0.78$; $P = 0.01$)، که این نشان دهنده همخوانی بالایی داده‌ها در ماتریس تشابه با دندروگرام UPGMA است.

جدول ۳- ماتریس تشابه ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ *C. Campestris* بر پایه آنالیز داده‌های ISSR

Ecotype*	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6	EC7	EC8	EC9	EC10	EC11	EC12	EC13	EC14	EC15	EC16	EC17
EC1	1.000																
EC2	0.333	1.000															
EC3	0.558	0.698	1.000														
EC4	0.286	0.143	0.345	1.000													
EC5	0.171	0.171	0.222	0.381	1.000												
EC6	0.387	0.452	0.500	0.470	0.417	1.000											
EC7	0.480	0.240	0.274	0.222	0.605	0.410	1.000										
EC8	0.480	0.240	0.274	0.222	0.558	0.461	0.931	1.000									
EC9	0.150	0.550	0.585	0.308	0.485	0.483	0.417	0.458	1.000								
EC10	0.667	0.333	0.367	0.235	0.146	0.216	0.607	0.607	0.217	1.000							
EC11	0.615	0.256	0.300	0.320	0.375	0.571	0.723	0.766	0.324	0.533	1.000						
EC12	0.653	0.735	0.600	0.171	0.095	0.316	0.456	0.456	0.425	0.654	0.565	1.000					
EC13	0.293	0.488	0.333	0.296	0.588	0.600	0.612	0.653	0.461	0.383	0.474	0.375	1.000				
EC14	0.500	0.292	0.204	0.118	0.439	0.324	0.857	0.857	0.304	0.704	0.622	0.545	0.638	1.000			
EC15	0.581	0.473	0.607	0.244	0.292	0.409	0.667	0.667	0.604	0.590	0.577	0.613	0.407	0.590	1.000		
EC16	0.667	0.571	0.558	0.143	0.171	0.387	0.520	0.480	0.450	0.458	0.615	0.775	0.243	0.458	0.727	1.000	
EC17	0.686	0.286	0.333	0.286	0.214	0.500	0.651	0.651	0.182	0.585	0.875	0.619	0.353	0.634	0.542	0.686	1.000



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ۱۷ اکوتیپ *C. Campestris* بر اساس ماتریس تشابه حاصل از داده‌های ISSR

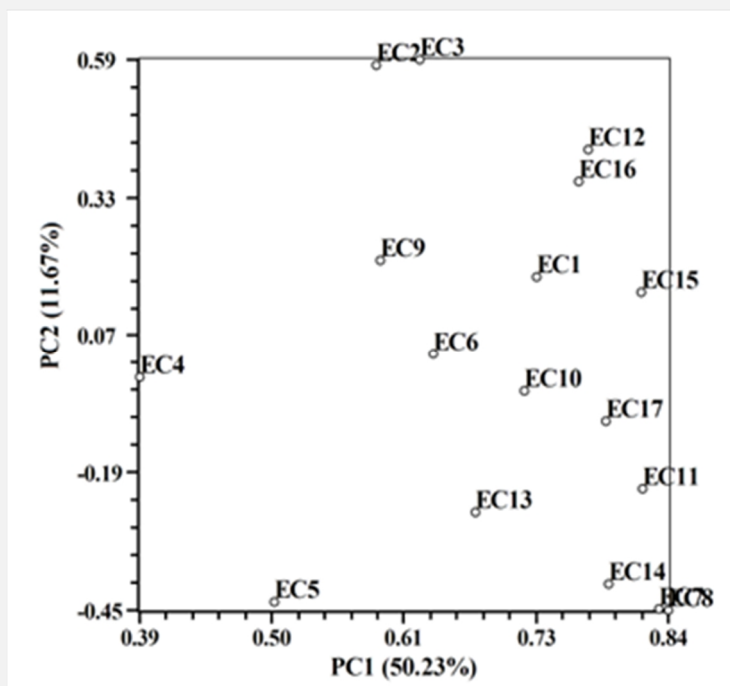
با نرم افزار GenAlExe 6.1 انجام گرفت، این امکان وجود دارد تا واریانس اجزاء محاسبه و سهم هر یک از آن‌ها در تنوع کل تعیین شود. نتایج حاصل از واریانس مولکولی نشان داد که مقدار شاخص تثبیت PhiPT بالا (۰/۸۱۴) و بسیار معنی‌دار است ($P=۰/۰۱$). از میزان کل واریانس مشاهده شده، در مجموع در حدود ۱۹٪ آن به مربوط به تنوع داخل جمعیت‌ها و ۸۱٪ آن مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها بود. به این ترتیب در مجموع سهم تنوع بین جمعیت‌ها از تنوع داخل آن‌ها بیشتر بود و تنوع ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌ها با توجه به میزان بالای شاخص PhiPT مشاهده شد.

تجزیه به مختصات اصلی (PCA) نشانگر

ISSR: آرایش تجمعی ۱۷ اکوتیپ مورد مطالعه با استفاده از آزمون تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ماتریس تشابه دایس، در شکل ۲ نشان داده شده است. مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب ۵۰/۲۳ و ۱۱/۶۷ درصد از واریانس کل را بیان کردند. در این تجزیه همپوشانی بالایی بین EC7 و EC8 که منشأ آن‌ها از یک منطقه جغرافیایی (استان کرمانشاه) بود، مشاهده شد. پراکنش اکوتیپ‌ها در این آنالیز با دندروگرام خوشه‌ای همخوانی زیادی داشته است.

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشانگر

ISSR: در آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) که



شکل ۲- پلات مختصات اصلی ۱۷ اکوتیپ *C. campestris* بر اساس داده‌های ISSR

برآورد شباهت یا فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها بر اساس نشانگر پروتئینی SDS-PAGE

در مجموع برای اکوتیپ‌های مورد مطالعه ۲۵ بانده شناسایی گردید، اگرچه باندهای پروتئینی مشترک زیادی در بین اکوتیپ‌های مذکور وجود داشت، اما باندهای اختصاصی نیز مشاهده گردید که خاص هر اکوتیپ بودند. باندهای پروتئینی علاوه بر اینکه از نظر محل قرارگرفتن روی ژل و وزن ملکولی متفاوت بودند، از نظر تراکم و شدت نیز با یکدیگر تفاوت نشان دادند. محتوای اطلاعات چندشکلی

برای هر باند محاسبه گردید و میانگین این شاخص برای کل اکوتیپ‌ها ۰/۴۱ محاسبه گردید. بر اساس ماتریس تشابه دایس، میزان تشابه ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها از ۰ تا ۱ با میانگین ۰/۵ متغیر بود. بیشترین تشابه بین EC2 و EC3 مشاهده شد که هر دو از یک منطقه جغرافیایی (استان آذربایجان شرقی) بودند و هر دو اکوتیپ کمترین تشابه را با EC5 با منشأ جغرافیایی متفاوت (استان همدان) داشتند (جدول ۴).

جدول ۴- ماتریس تشابه ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ *C. Campestris* بر پایه آنالیز داده‌های پروتئین

Ecotype*	EC1	EC2	EC3	EC4	EC5	EC6	EC7	EC8	EC9	EC10	EC11	EC12	EC13	EC14	EC15	EC16	EC17
EC1	1.000																
EC2	0.454	1.000															
EC3	0.454	1.000	1.000														
EC4	0.640	0.381	0.381	1.000													
EC5	0.200	0.000	0.000	0.210	1.000												
EC6	0.690	0.480	0.480	0.714	0.261	1.000											
EC7	0.500	0.200	0.200	0.174	0.667	0.370	1.000										
EC8	0.467	0.385	0.385	0.414	0.500	0.485	0.714	1.000									
EC9	0.562	0.428	0.428	0.516	0.461	0.571	0.600	0.900	1.000								
EC10	0.583	0.500	0.500	0.783	0.222	0.667	0.364	0.428	0.467	1.000							
EC11	0.560	0.571	0.571	0.833	0.210	0.786	0.174	0.414	0.516	0.696	1.000						
EC12	0.118	0.461	0.461	0.125	0.182	0.200	0.267	0.190	0.261	0.267	0.125	1.000					
EC13	0.452	0.444	0.444	0.467	0.560	0.588	0.552	0.800	0.865	0.414	0.600	0.273	1.000				
EC14	0.516	0.518	0.518	0.467	0.480	0.529	0.621	0.857	0.811	0.483	0.533	0.273	0.900	1.000			
EC15	0.581	0.444	0.444	0.533	0.400	0.588	0.552	0.857	0.973	0.483	0.533	0.182	0.833	0.778	1.000		
EC16	0.857	0.500	0.500	0.667	0.273	0.839	0.461	0.437	0.588	0.692	0.667	0.210	0.485	0.485	0.606	1.000	
EC17	0.786	0.583	0.583	0.741	0.182	0.903	0.308	0.437	0.588	0.692	0.815	0.210	0.545	0.485	0.606	0.867	1.000

تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر پروتئینی:

دندروگرام حاصل از نشانگر پروتئینی بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA در شکل ۳ نشان داده شده است. در فاصله ضریب ۴۷ درصد، کلیه جمعیت‌ها به ۳ دسته گرویندی شدند. گروه اول شامل ۹ اکوتیپ (EC1، EC16، EC6، EC17، EC4، EC11، EC10، EC2 و EC3) بود و حداکثر تشابه بین EC2 و EC3 مشاهده شد، که هر دو از یک منطقه جغرافیایی (استان آذربایجان شرقی) بودند. EC4 و EC1 نیز هر دو متعلق به استان آذربایجان شرقی بودند و همچنین EC10 و EC11 نیز از یک منطقه جغرافیایی (استان تهران) بودند.

گروه دوم شامل ۱۷ اکوتیپ (EC5، EC7، EC8، EC9، EC15، EC13، EC14 و EC13) بود، که EC13، EC14 و EC15 هر سه متعلق به یک استان (کرمان) بودند و همچنین EC7 و EC8 نیز هر دو متعلق به استان کرمانشاه بودند. گروه سوم تنها شامل اکوتیپ EC12 (استان یزد) بود. مقایسه ماتریس تشابه دایس با ماتریس کوفنتیک دندروگرام پروتئین با استفاده از آزمون انطباق مانتل، همبستگی یالای این دو ماتریس را نشان داد ($r = 0.85$; $P = 0.01$)، که این نشان دهنده همخوانی بالایی داده‌ها در ماتریس تشابه با دندروگرام UPGMA است. ماتریس ضریب تشابه

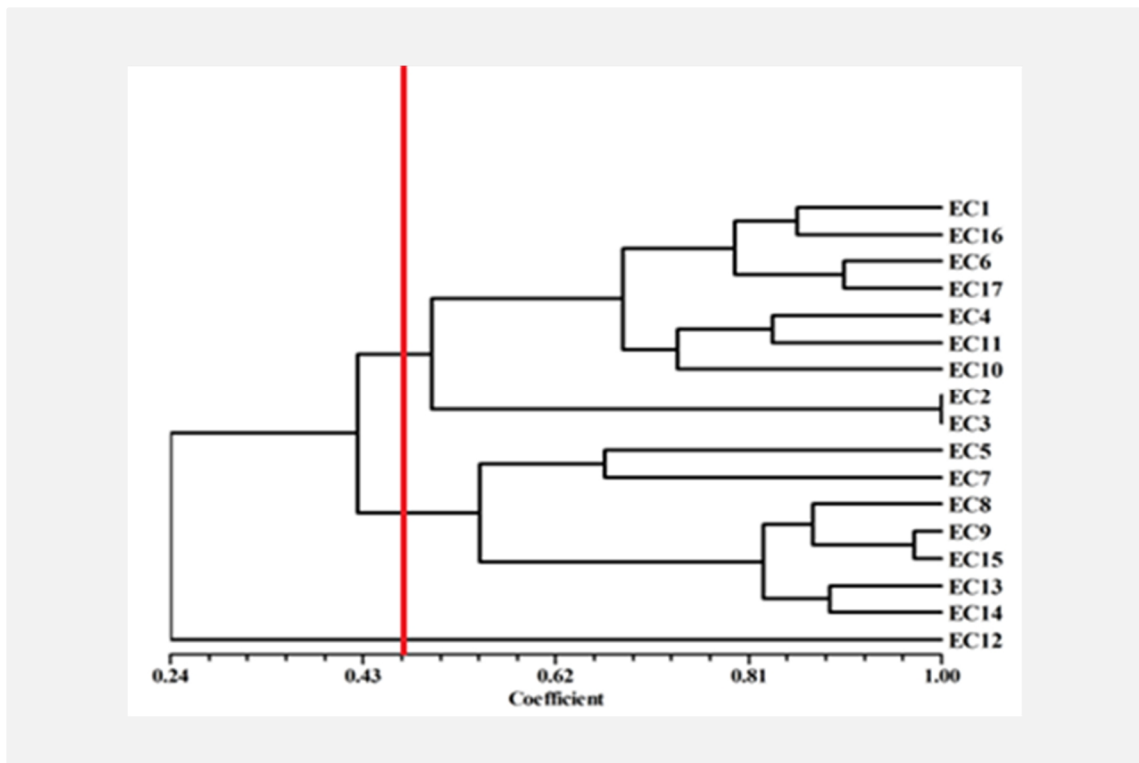
دایس حاصل از نشانگر پروتئینی و نشانگر ISSR نیز با استفاده از آزمون مانتل با هم مقایسه شدند و نتایج نشان داد که بین این دو نشانگر همبستگی معنی داری وجود ندارد ($r = 0.29$; $P = 0.99$).

بر پایه تجزیه خوشه‌ای نشان داد که EC12 (متعلق به استان یزد) در فاصله‌ای دور از دیگر نمونه‌ها و در گروهی کاملاً مجزا قرار گرفته است.

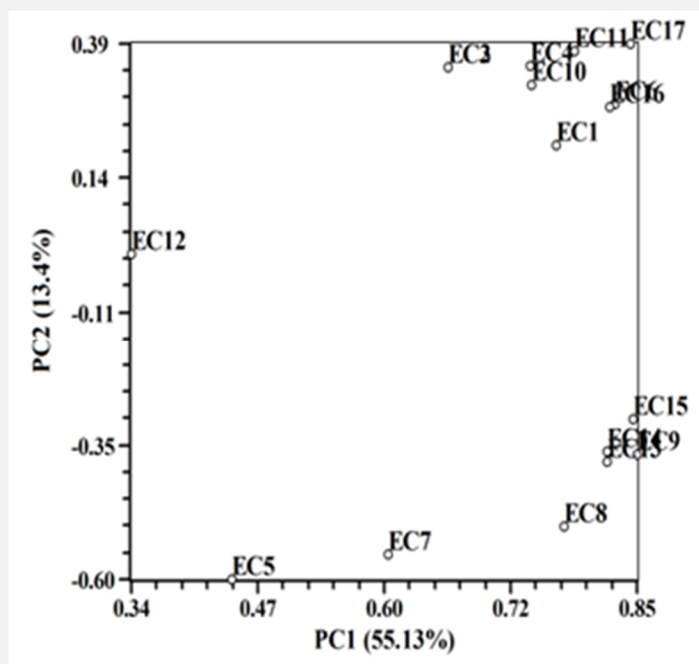
تجزیه به مختصات اصلی (PCA) بر اساس نشانگر پروتئینی SDS-PAGE:

برای بررسی بیشتر روابط ژنتیکی جمعیت‌ها آزمون تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ماتریس تشابه نشانگر پروتئینی، در شکل ۴ نشان داده شده است. مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب ۵۵/۱۳ و ۱۳/۴ درصد از واریانس کل را بیان کردند. پراکنش اکوتیپ‌ها در این آنالیز با دندروگرام خوشه‌ای همخوانی زیادی داشته است. داده‌های این تجزیه به همراه گروه‌بندی

آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس نشانگر پروتئینی SDS-PAGE: بر پایه نتایج حاصل از واریانس مولکولی، تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها بالا بود ($\Phi_{IPT} = 0.846$; $P = 0.01$). از میزان کل واریانس مشاهده شده، در مجموع در حدود ۱۵٪ آن مربوط به تنوع داخل جمعیتها و ۸۵٪ آن مربوط به تنوع بین جمعیتها بود. به این ترتیب در مجموع سهم تنوع بین جمعیتها از تنوع داخل آنها بیشتر بود و تنوع ژنتیکی بالایی بین جمعیتها با توجه به میزان بالای شاخص Φ_{IPT} مشاهده شد.



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای ۱۷ اکوتیپ *C. campestris* بر اساس ماتریس تشابه حاصل از داده‌های پروتئین



شکل ۴- پلات مختصات اصلی ۱۷ اکوتیپ *C. campestris* بر اساس داده‌های پروتئین

بحث

است. در این تحقیق، به دلیل وضوح کم باندها با ژل آگارز، از ژل پلی آکریلامید با رنگ آمیزی نیترا نقره استفاده شد، اما در گزارش Li و Dong (2009) از ژل آگارز با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شده بود. بنابراین، علت تفاوت تعداد آلل بین پژوهش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تعداد متفاوت ژنوتیپ‌ها و روش‌های مطالعه باشد.

آغاز گر UBC811، دارای بیشترین مقدار باند چند شکل در بین آغاز گرها و آغاز گر UBC873 دارای کمترین مقدار باند بود. قدرت تفکیک (Rp) پارامتری است که توانایی تفکیک آغاز گرهای انتخابی را نشان می‌دهد. Prevost و Wilkinson (1999)، پارامتر Rp را به عنوان شاخص سنجش توانایی تمایز نشانگرهای ملکولی ISSR، معرفی نمودند. همسویی بالای

در این تحقیق، با ۱۰ آغاز گر ISSR ۳۶۱ باند شناسایی شد که ۳۴۷ باند آن چند شکل بودند. در مطالعه Li و Dong (2009) از این آغاز گرها، در بررسی تنوع کلونالی *C. campestris* (۴ ژنوتیپ) با نشانگر ISSR استفاده شده بود، اما در تحقیق آن‌ها، از مجموع ۱۳۶ باند شناسایی شده تنها سه باند چند شکل بودند. Semagn و همکاران (2006) گزارش دادند که نشانگرهای ISSR اغلب چند شکلی بالایی نشان می‌دهند، اما سطح چند شکلی می‌تواند با به کارگیری روش‌های شناسایی باندها، تفاوت پیدا کند. حساسترین روش شناسایی، ژل پلی آکریلامید (PAGE) همراه با مواد پرتوزا، پس از آن ژل پلی آکریلامید با رنگ آمیزی نیترا نقره و سپس ژل آگارز با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید

مقادیر Rp و تعداد باندهای چند شکل نشان داد که آغازگر UBC811 از سایر آغازگرها کارآمدتر است. یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف است و در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد (Barth et al., 2002). Botstein و همکاران (1980)، گزارش دادند که $PIC > 0.5$ نشان‌دهنده یک نشانگر بسیار کارا و $0.5 > PIC > 0.25$ نشان‌دهنده یک نشانگر کارا و $PIC \leq 0.25$ نشان‌دهنده یک نشانگر با کارایی پایین است. در این تحقیق، میانگین مقدار PIC نشانگر ISSR و پروتئین به ترتیب ۰/۶۶ و ۰/۴۱ و فراوانی آلل دو نشانگر نیز به ترتیب ۳۶۱ و ۲۵ بود. فراوانی باندها نشانگرهای پروتئینی در مقایسه با نشانگرهای ISSR بسیار کمتر بود. بنابراین، با توجه به مقدار PIC و فراوانی آلل، نشانگرهای ISSR نسبت به نشانگرهای پروتئینی دارای کارایی بیشتری در بررسی تنوع اکوتیپ‌های *C. Campestris* هستند. Zhao و همکاران (2006) گزارش دادند که بر خلاف نشانگرهای پروتئینی، نشانگرهای دی ان ای تحت تأثیر شرایط محیطی و مرحله رشدی قرار نگرفته و در کل ژنوم پراکنده‌اند، از مزایای دیگر آن‌ها فراوانی، چند شکلی بالا و سنجش ساده آن‌ها است. نتایج تجزیه خوشه‌ای دو نشانگر ISSR و پروتئین با نتایج پلات تجزیه به مختصات اصلی بر اساس دو مؤلفه اصلی، همخوانی زیادی داشت. در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، بهتر است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در سطح ژنوم داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را تا حدودی پوشش دهند. بنابراین اگر نشانگر از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه

تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها نیاز است (Ahkami et al., 2007). در این مطالعه نیز، توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط دو مؤلفه اولیه، دلالت بر توزیع مناسب نشانگرهای استفاده شده در ژنوم دارد. با نشانگر ISSR در فاصله ضریب ۴۳ درصد، کلیه جمعیت‌ها به ۴ گروه و با نشانگر پروتئینی در فاصله ضریب ۴۷ درصد، به سه گروه خوشه‌بندی شدند. بنابراین، نشانگر ISSR منجر به تمایز بیشتر اکوتیپ‌ها و نشانگر پروتئینی منجر به تمایز کمتر شده است. Mengistu و همکاران (2004) گزارش دادند که نشانگرهای ISSR، قادر به بررسی تنوع میان و درون ژنومی هستند و با این نشانگرها، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه‌ها وجود دارد. دندروگرام بر پایه نشانگرهای ISSR، ارتباط نزدیکی بین اکوتیپ‌های استان کرمانشاه، آذربایجان شرقی، کرمان و همدان نشان داد و بر پایه نشانگرهای پروتئینی، اکوتیپ‌های استان کرمانشاه، کرمان و تهران در یک گروه قرار گرفتند و حداکثر تشابه بین اکوتیپ‌های استان آذربایجان شرقی مشاهده شد، اما اکوتیپ‌های استان همدان در دو گروه مجزا قرار گرفتند.

نشانگرهای ISSR، ارتباط نزدیکی بین اکوتیپ‌های استان کرمانشاه، آذربایجان شرقی و همدان نشان دادند و بر پایه نشانگرهای پروتئینی نیز اکوتیپ‌های استان کرمانشاه در یک گروه قرار گرفتند و حداکثر تشابه بین اکوتیپ‌های استان آذربایجان شرقی مشاهده شد، اما اکوتیپ‌های استان همدان در دو گروه مجزا قرار گرفتند. در بقیه اکوتیپ‌ها، هیچ رابطه‌ای بین واگرایی ژنتیکی و منشأ جغرافیایی وجود نداشت، به نحوی که اکوتیپ‌هایی

که از یک مکان یا نواحی جغرافیایی نزدیک به هم جمع آوری شده بودند، در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. قرارگیری اکوتیپ‌هایی با منشأ جغرافیایی متفاوت در دندروگرام کنار یکدیگر نشان می‌دهد، که آلل‌های مشترکی بین آن‌ها وجود دارد. به این ترتیب، نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای تا حد زیادی عدم ارتباط بین تنوع ملکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد. عدم انطباق داده‌های مولکولی و مناطق جغرافیایی ممکن است ناشی از پدیده جریان ژن بین جمعیت‌ها، تشابه شرایط اقلیمی و یا تبادل فیزیکی مواد بین این مناطق باشد. Dreisigacker و همکاران (2004) گزارش دادند که ارقام کشت شده در مناطق مختلف جغرافیایی، لزوماً در دسته‌های جداگانه قرار نمی‌گیرند و این حالت چند دلیل می‌تواند داشته باشد: طولانی نبودن انتخاب بر اساس شرایط مختلف محیطی آنقدر که بتواند منجر به ایجاد تفاوت در ذخیره ژنتیکی شود، توانایی ژن‌هایی که باعث ایجاد سازش به چند محیط می‌شوند و در نهایت احتمال ناکافی بودن تعداد مکان‌های ژنی مورد مطالعه را نشان می‌دهد. ماتریس ضریب تشابه دایس حاصل از نشانگر پروتئینی و نشانگر ISSR با استفاده از آزمون مانتل با هم مقایسه شدند و نتایج نشان داد که بین این دو نشانگر همبستگی معنی داری وجود ندارد ($r = 0.29; P = 0.99$). این عدم همبستگی، می‌تواند به علت تفاوت در نواحی تحت پوشش این دو نشانگر باشد، زیرا نشانگرهای پروتئینی دربرگیرنده تنوع مربوط به قسمت‌های بیان شونده ژنوم می‌باشند. Jonaviciene و همکاران (2009) نیز گزارش نمودند نشانگرهای ISSR، ردیف‌های غیررمز شونده

ژنوم را در برمی‌گیرند. قسمت عمده ردیف‌های غیررمز شونده را ردیف‌های پشت سر هم تکرار شونده تشکیل می‌دهد. این توالی‌ها به وفور در ژنوم یوکاریوت‌ها یافت شده و در طول ژنوم پراکنده‌اند و چند شکلی بالا در این ردیف‌ها به واسطه سر خوردن DNA (خطاهای همانند سازی) است. نتایج آنالیز واریانس مولکولی بر پایه نشانگر ISSR، با نتایج آنالیز بر پایه نشانگر پروتئینی همخوانی داشت و با هر دو نشانگر، سهم تنوع بین جمعیت‌ها از تنوع داخل آن‌ها بیشتر بود.

ساختار ژنتیکی یک گونه، توسط تعدادی از عوامل تکاملی مانند سیستم جفت‌گیری، جریان ژنی، پراکنده‌گی دانه، نوع تولید مثل و به علاوه انتخاب طبیعی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Lin et al., 2002). رشد کلونالی *C. Campestris* بالا است و غالب افراد این گونه قادر به تکثیر کلونالی از طریق قطعات بریده شده ساقه در مزرعه هستند. این گیاه هم از طریق جنسی و هم غیر جنسی تولید مثل می‌کند و قادر به خودلقاحی است (Li and Dong, 2009). پراکنده‌گی بذر این گونه از طریق انسان، ماشین آلات کشاورزی، پرندگان و جانوران است و بذر آن‌ها ویژگی‌های عمومی برای پراکنش با باد را دارا نیستند (Costea et al., 2006). بذر آن‌ها با افتادن از گیاه پراکنده شده و سرعت انتشار بذر و دانه گرده آن‌ها پایین است (Li and Dong, 2009).

در این تحقیق، سطح پایینی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و تمایز بالای ژنتیکی بین جمعیت‌ها، می‌تواند ناشی از عوامل مختلفی مانند کاهش جریان ژنی در میان جمعیت‌ها، مدیریت این علف‌هرز در نواحی مختلف، انتشار پایین دانه گرده و بذر آن

Cellular & Developmental Biology – Plant, 43: 304-317.

Barth, S., A. E. Melchinger and T. Luebberstedt (2002). Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 11: 495- 505.

Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Gresshoff (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.

Benbouza, H., J. M. Jacquemin, J. P. Baudoin and G. Mergeai (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 10: 77-81.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.

Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Costea, M. and F. J. Tardif (2006). The biology of Canadian weeds. 133. *Cuscuta campestris* Yuncker, *C. gronovii* Willd. ex Schult., *C. umbrosa* Beyr. ex Hook., *C. epithymum* (L.) L. and *C. epilinum* Weihe. *Canadian Journal of Plant Science*, 86: 293-316.

Dreisigacker, S., P. Zhang, M. L. Warburton, M. Van Ginkel, D. Hoisington, M. Bohn and A. E. Melchinger (2004). SSR and pedigree analysis of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different mega-environments. *Crop Science*, 4: 381-388.

Dziechciarkova, M., A. Lebeda, I. Dolezalova and D. Astley (2004). Characterization of *Lactuca* spp. germplasm by protein and molecular markers. *Plant Soil Environment*, 50: 47-58.

باشد و ماهیت کلونالی *C. Campestris* در این رابطه نقشی اساسی دارد، زیرا گسترش به نواحی جدید بوسیله تولید مثل رویشی غیر ممکن است. از طرف دیگر تنوع بالای ژنتیکی بین اکوتیپ‌های سس زراعی، در مرحله اول کارایی بالای نشانگرهای ISSR را در آنالیز ژنوم این گیاه آشکار می‌سازد و از طرف دیگر حضور چنین تنوعی در این تحقیق، سطوح متفاوت آلودگی اکوتیپ‌های سس در مناطق مختلف کشور و واکنش متفاوت آن‌ها به علفکش‌ها را توجیه می‌کند و اطلاعات پایه‌ای را فراهم می‌سازد که می‌تواند منجر به کنترل مؤثر این علف‌هرز در مناطق مختلف کشور شود.

پی‌نوشت‌ها

- 1- Inter-simple sequence repeat
- 2- Polymorphism information content
- 3- Resolving power
- 4- Unweighted Pair- Group Method using Arithmetic average
- 5- Analysis of molecular variance
- 6- Principal component Analysis

منابع

Adahl, E., P. Lundberg and N. Jonzan (2006). From climate change to population change: the need to consider annual life cycles. *Global Change Biology*, 12: 1627-1633.

Ahkami, A. M., M.R. Naghavi, M. Mardi, A. Hosseinzadeh, M. Pirsayedi, P. Petki, M. Kazemi Alamoti, I. Hashempour and M. A. Omidbakhsh (2007). Study of genetic diversity in durum wheat (*Triticum durum*) using AFLP markers. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 1: 25-35.

Aly, R. (2007). Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro*

- Mengistu, L. W., C. G. Messersmith and M. J. Christoffers (2004). Genetic diversity of herbicide-resistant and - susceptible *Avena fatua* populations in North Dakota and Minnesota. *Weed Research*, 45: 413-423.
- Peakall, R. and P. E. Smouse (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Prevost, A. and M. J. Wilkinson (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and applied Genetics*, 98: 107-112.
- Rohlf, F. J. (1998). NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate analysis System, Version 2.02. Exeter software, Setauket, New York.
- Roldan-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van-Bockstaele, A. Depicker and M. De-Loose (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6: 125-134.
- Saghai-Marouf, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard (1984). Ribosomal DNA spacer - length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81: 8014-8018.
- Semagn, K., A. Bjornstad and M. N. Ndjiondjop (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5: 2540-2568.
- Weinberg, T., A. Lalazar and B. Rubin (2003). Effects of bleaching herbicides on field dodder (*Cuscuta campestris*). *Weed Science*, 51: 663-670.
- Zhao, W. G., X. X. Miao, B. Zang, L. Zhan, Y. L. Pan and Y. P. Huang (2006). Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers. *Acta Genetica Sinica*, 33: 851-860.
- Goolsby, J. A., P. J. De Barro, J. R. Makinson, R. W. Pemberton, D. M. Hartley and D. R. Frohlich (2006). Matching the origin of an invasive weed for selection of a herbivore haplotype for a biological control program. *Molecular Ecology*, 15: 287-297.
- Jonaviciene, K., V. Paplauskiene and G. Brazauskas (2009). Isozymes and ISSR markers as a tool for the assesment of genetic diversity in *Phleum* spp. *Zemdirbyste Agriculture*, 96: 47-57.
- Kim, A. K., D. J. Ellis, H. A. Sandler, P. Hart, J. E. Darga, D. Keeney and T. A. Bewick (2004). Genetic diversity of dodder (*Cuscuta* spp.) collected from commercial cranberry production as revealed in the trnL (UAA) intron. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 217-233.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Li, J. and M. Dong (2009). Fine-scale clonal structure and diversity of invasive plant *Mikania micrantha* H.B.K. and its plant parasite *Cuscuta campestris* Yunker. *Biological Invasions*, 11: 687-695.
- Lian, J. K., W. H. Ye, H. L. Cao, Z. M. Lai, Z. M. Wang, and C. X. Cai (2006). Influence of obligate parasite *Cuscuta campestris* on the community of its *Mikania micrantha*. *Weed Research*, 46: 441-443.
- Lin, J. Z., P. L. Morrell and M. T. Clegg (2002). The influence of linkage and inbreeding on patterns of nucleotide sequence diversity at duplicate alcohol dehydrogenase loci in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). *Genetics Society of America*, 162: 2007-2015.
- Maguire, T. L., R. Peakall and P. Saenger (2002). Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and applied Genetics*, 104: 338-398.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

