

Evaluation of Genetic Diversity of Some Cannabis Sativa Ecotypes by SCoT and ISSR Markers

Mohammad Zabet*  | Mozghan Khezri  | Mohammad Ghader Ghaderi  |
Reza Moshtaghi 

Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, University of
Birjand, Birjand, Iran

*Corresponding author ✉: mzabet@birhand.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: February 5, 2026;
Received in revised form: May 31, 2026;
Accepted: June 8, 2026;
Available online: June 30, 2026

Keywords:

Biplot,
Marker index,
Nei's and Shannon's indices,
Resolving power,
Polymorphic information content

ABSTRACT

Cannabis (Cannabis sativa L.) is a sustainable industrial crop that can be cultivated for fiber and seed production across diverse geographical and climatic conditions. In this study, 11 cannabis ecotypes were evaluated using 10 SCoT primers and 10 ISSR primers to estimate the amount of genetic diversity, genetic relatedness and divergence among ecotypes, and some genetic parameters. The ISSR and SCoT markers generated 63 and 77 scorable bands, respectively, with polymorphism rates exceeding 87% for both marker systems. The mean values of the number of polymorphic bands, percentage of polymorphism, polymorphic information content (PIC), effective multiplex ratio (EMR), marker index (MI), and resolving power (RP) were 7.78, 92.02%, 0.35, 7.13, 2.74, and 0.70, respectively, for SCoT markers, and 7.86, 87.50%, 0.32, 7.00, 2.85, and 0.70, respectively, for ISSR markers. Overall, both marker systems demonstrated similar and favorable efficiency in investigating the genetic diversity of cannabis ecotypes. For both marker systems, significant differences in banding patterns and the high percentage of polymorphism indicated the high discriminatory power of the primers used and the considerable genetic diversity among the cannabis ecotypes. For both marker systems, analysis of molecular variance indicated that 100% of the total molecular variance was attributable to variation within populations. This pattern may reflect the selection of ecotypes from specific provinces prior to their assignment to populations. Cluster analysis grouped the ecotypes into three major clusters and revealed no clear correspondence between genetic and geographical distances. Based on the observed genetic divergence, crosses between the Qazvin and Afghanistan ecotypes were predicted to have the greatest potential for heterosis. Principal coordinate analysis largely confirmed the results of the cluster analysis, and the distribution of ecotypes across different regions of the biplot further supported the presence of substantial genetic diversity among the cannabis ecotypes. Overall, the cannabis ecotypes investigated in this study exhibited greater genetic diversity than their foreign counterparts.



Cite this article: Zabet, M., Khezri, M., Ghaderi, M.G. and Moshtaghi, R. (2026). Evaluation of genetic diversity of some cannabis sativa ecotypes by SCoT and ISSR markers. *Plant Genetic Research*, 13(1): 63–82 (In Persian).

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2026.2084647.1032>



© Author(s) retain the copyright.

Homepage: <https://www.pgr.lu.ac.ir> | Publisher: Lorestan University

Introduction

Cannabis (*Cannabis sativa* L.) is a sustainable industrial crop with high yield potential that can be cultivated for fiber or seed production across a wide range of geographic and climatic regions. China, Europe, and Canada are currently the main cannabis-producing regions worldwide. Cannabis cultivation was lost or abandoned for several decades due to competition with other raw materials such as cotton and synthetic fibers, high labor costs, and restrictions related to its potential use as a drug. To maximize the potential of the cannabis gene pool, it is essential to determine its genetic structure in order to select and breed new cultivars adapted to specific regions. Therefore, the objective of this study was to investigate the genetic diversity of cannabis ecotypes, identify similarities and differences among them, and classify these ecotypes using SCoT and ISSR molecular markers.

Materials and Methods

Eleven cannabis ecotypes, including Khusf, Tabas Golshan, Boshroyeh, Se Qale, wild Bojnord, Bojnord, Fariman, Tabriz, Qazvin, and two samples from Afghanistan, collected from different geographic regions, were studied. For molecular evaluation, 10 SCoT primers and 10 ISSR primers were used. DNA extraction was performed using a modified CTAB method. The quantity and quality of the extracted DNA were assessed using a NanoDrop spectrophotometer and horizontal electrophoresis on a 1% agarose gel. Data analysis was conducted using NTSYSpc 2.2, GenALEx 6.1, PopGen32, and Excel 2020 software.

Results and Discussion

Nine out of ten SCoT primers and seven out of ten ISSR primers showed polymorphism with high resolution. Overall, the nine SCoT and seven ISSR primers amplified 77 and 63 bands, respectively. The percentages of polymorphism for SCoT and ISSR markers were 92.02% and 87.50%, respectively. Among SCoT primers, SCoT4 amplified the highest number of bands (14), while SCoT6 amplified the lowest number (5). Similarly, ISSR9 amplified the highest number of bands (12), whereas ISSR4 amplified the lowest (7). The average values of parameters including the number of amplified bands, number of polymorphic bands, percentage of polymorphism, polymorphic information content (PIC), effective multiplex ratio (EMR), marker index (MI), and resolving power (Rp) were 8.56, 7.78, 92.02, 0.35, 7.13, 2.74, and 0.70 for SCoT markers, and 9.00, 7.86, 87.50, 0.32, 7.00, 2.85, and 0.70 for ISSR markers, respectively. Genetic diversity analysis showed that the average numbers of observed alleles, effective alleles, Nei's genetic diversity, and Shannon's information index were 1.91, 1.43, 0.26, and 0.41 for SCoT markers, and 1.87, 1.42, 0.26, and 0.40 for ISSR markers. Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that most of the total genetic variation was attributed to within-population differences for both marker systems. Cluster analysis grouped the studied ecotypes into three distinct clusters using both markers.

Conclusion

Overall, both SCoT and ISSR markers showed similar and satisfactory efficiency in assessing the genetic diversity of cannabis ecotypes. Significant differences in banding patterns, high percentages of polymorphism, and elevated values of genetic indices indicated the strong discriminatory power of the primers used. Comparison of Nei's and Shannon's diversity indices with previous studies revealed that Iranian cannabis ecotypes possess higher genetic diversity than foreign accessions. Cluster analysis showed that genetic distances were not consistent with

geographic distances; therefore, the highest heterosis is expected from crosses between Qazvin and Afghanistan ecotypes. Principal coordinate analysis largely confirmed the results of cluster analysis. The distribution of ecotypes in different regions of the Biplot further confirmed the existence of substantial genetic diversity among cannabis ecotypes.

Author Contributions

Conceptualization: Zabet M, Methodology: Zabet M, Software: Zabet M, Validation: Zabet M, Formal analysis: Zabet M, Investigation: Khezri M, Resources: Zabet M, Data curation: Khezri, M, Writing-original draft preparation: Zabet M, Khezri M Writing-review and editing: Zabet M, Visualization: Zabet M, Supervision: Zabet M, Ghaderi MG, Moshtaghi R, Project administration: Zabet M, Ghaderi MG, Moshtaghi R, Funding acquisition: Khezri M, Zabet M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the dedicated staff at the Molecular Plant Breeding Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Birjand, and their respected peers in the Plant Production and Genetics Department.

Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

The study was funded by the University of Birjand, Iran. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی اکوتیپ‌های شاهدانه با نشانگرهای SCoT و ISSR

محمد ضابط*^{ID} | مژگان خضری^{ID} | محمدقادر قادری^{ID} | رضا مشتاقی^{ID}

گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

بای پلات،

شاخص نشانگر،

شاخص نی و شانون،

قدرت تفکیک،

محتوای اطلاعات چندشکلی

شاهدانه (*Cannabis sativa L.*) یکی از گیاهان است که به‌طور سنتی برای الیاف و یا دانه‌ها در طیف وسیعی از مناطق جغرافیایی و آب و هوایی کشت می‌شود. در این پژوهش ۱۱ اکوتیپ شاهدانه با استفاده از ۱۰ آغازگر SCoT و ۱۰ آغازگر ISSR، به‌منظور برآورد مقدار تنوع ژنتیکی، دوری و نزدیکی اکوتیپ‌ها و برخی پارامترهای ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مجموع، آغازگرهای ISSR، ۶۳ و آغازگرهای SCoT، ۷۷ باند تکثیر کردند. درصد چندشکلی در هر دو نشانگر بیش از ۸۷ درصد بود. میانگین تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی، شاخص محتوی چندشکلی، نسبت چندشکلی، شاخص نشانگر و قدرت تفکیک برای نشانگر SCoT، به ترتیب ۷/۷۸، ۹۲/۰۲، ۰/۳۵، ۷/۱۳، ۲/۷۴، ۰/۷۰ و برای نشانگر ISSR، به ترتیب ۸۷/۵، ۰/۳۲، ۷/۰۰، ۲/۸۵، ۰/۷۰ به‌دست آمد. به‌طور کلی، هر دو نشانگر کارایی مطلوب و مشابهی را در بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های شاهدانه از خود نشان دادند. در هر دو نوع نشانگر، تفاوت‌های قابل توجه در الگوهای باندی و مقادیر بالای درصد چندشکلی نشان‌دهنده توان بالای آغازگرهای به کاررفته و تنوع ژنتیکی بالای اکوتیپ‌های شاهدانه بود. در هر دو نشانگر، ۱۰۰ درصد واریانس، به تفاوت‌های درون‌گروهی اختصاص داشت که علت آن می‌تواند انتخاب اکوتیپ‌های مربوط به یک استان خاص در یک جمعیت قبل از گروه‌بندی باشد. تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌های شاهدانه را در سه گروه دسته‌بندی نمود و ارزیابی خوشه‌ها نشان داد که فواصل ژنتیکی از فواصل جغرافیایی تبعیت ننموده و از تلاقی اکوتیپ‌های قزوین - افغانستان بیشترین هتروزیس مورد انتظار است. تجزیه به مختصات اصلی تا حد زیادی بر نتایج تجزیه خوشه‌ای صحه گذاشت و پراکندگی اکوتیپ‌ها در نواحی مختلف بای پلات بار دیگر وجود تنوع ژنتیکی در شاهدانه را تأیید نمود. در مجموع، اکوتیپ‌های مختلف شاهدانه مورد مطالعه تنوع ژنتیکی غنی تری را نسبت به هم‌تایان خارجی خود نشان دادند.

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.; $2n = 20$) گیاهی دوپایه، دگرگرده‌افشان و یکی از قدیمی‌ترین محصولات زراعی یک‌ساله در جهان است که در مناطق غربی، جنوب‌غربی ایران و همچنین مناطقی از استان‌های گیلان، مازندران، بلوچستان، خراسان، بندرگز و اراک کشت می‌شود (Lemeshev *et al.*, 1994; Salentijn *et al.*, 2015). در حال حاضر چین، اروپا و کانادا مناطق اصلی تولید شاهدانه در جهان هستند. کشت شاهدانه به دلیل رقابت با سایر گیاهان مانند پنبه و الیاف مصنوعی، هزینه بالای نیروی کار و ممنوعیت کشت به دلیل استفاده از آن به عنوان یک ماده مخدر، برای دهه‌ها به فراموشی سپرده شده بود (Salentijn *et al.*, 2015). ایران یکی از رویشگاه‌های مهم این گیاه ارزشمند به شمار می‌رود، به طوری که نمونه‌های خودروی آن در اغلب نقاط و اقلیم‌های ایران به طور گسترده‌ای پراکنده است (Mostafaei Dehnavi *et al.*, 2022; Shams *et al.*, 2020) که نشان از سازگاری بالای شاهدانه با شرایط اقلیمی ایران دارد (Asadi *et al.*, 2019). برآورد تنوع ژنتیکی و ارزیابی ژرم پلاسِم گیاهی، مهم‌ترین مرحله در جمع‌آوری، مدیریت و استفاده از ذخایر ژنتیکی محسوب می‌گردد (Mir Drikvand and Samiei, 2020; Bahari *et al.*, 2015). داشتن تنوع ژنتیکی زیربنای هر برنامه به‌نژادی است. نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی یکی از ابزارهای بررسی تنوع می‌باشند. معمولاً نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی دارای معایبی مانند تعداد اندک، تحت تاثیر محیط‌بودن و تنوع محدود هستند (Del Rio *et al.*, 1997). به طور سنتی، ترکیبی از صفات مورفولوژیکی و زراعی برای سنجش تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Golmohammadi *et al.*, 2025). ارزیابی ۲۵ جمعیت بومی ایران توسط بابایی و همکاران (Babaei *et al.*, 2024) بر اساس صفات فنولوژیکی و مورفولوژیکی در گیاهان نر و ماده نشان داد که تنوع فنوتیپی قابل توجهی در بین جمعیت‌ها وجود دارد. بالاترین میزان وراثت‌پذیری در گیاهان ماده برای شروع گلدهی (۰/۹۱) و در گیاهان نر برای ۵۰ درصد گلدهی

(۰/۹۸) مشاهده شد. بر اساس صفات مورفولوژیکی جمعیت‌ها به هفت گروه طبقه‌بندی شدند (Babaei *et al.*, 2024). توصیف جامعی از صفات مورفوفیزیولوژیکی و فنولوژیکی در ۱۲۱ ژنوتیپ تجاری شاهدانه تحت شرایط کنترل‌شده توسط نایم فیلی و همکاران (Naim-Feil *et al.*, 2021) انجام شد و نتایج آن نشان داد که تنوع فنوتیپی قابل توجهی علی‌رغم کاهش تنوع ژنتیکی در منابع تجاری هم‌چنان وجود دارد (Naim-Feil *et al.*, 2021). به طور مشابه، توصیف فنوتیپی ۱۷۶ ژنوتیپ تجاری شاهدانه در شرایط گلخانه‌ای با تمرکز بر ۱۳ صفت زراعی و مورفولوژیکی در مطالعه لاپیر و همکاران (Lapierre *et al.*, 2023) تغییرات قابل توجهی را در بین جمعیت‌ها نشان داد که مبین چشم‌انداز امیدوارکننده به‌نژادی در شاهدانه است (Lapierre *et al.*, 2023). تنوع مبتنی بر فنوتیپ و شیمیوتیپ، زمینه را برای شناسایی و انتخاب لاین‌ها با صفات کلیدی زراعی را فراهم می‌کند. بررسی تنوع ژنتیکی ۶۶ جمعیت شاهدانه با استفاده از HPLC طی مطالعه مهدی و همکاران (Mehdi *et al.*, 2023) نشان داد که همبستگی قوی بین تنوع ژنتیکی شاهدانه و توزیع منطقه‌ای آن‌ها وجود دارد (Mehdi *et al.*, 2023). در مطالعه آینا و همکاران (Aina *et al.*, 2025) نیز مجموعه‌ای از شاهدانه‌های وحشی نخست از طریق توالی‌یابی و تعیین ژنوتیپ ارزیابی شدند؛ سپس، تغییرات ژن کانابینوئید ستاز مشخص گردید و در نهایت، مشخصات کانابینوئیدها با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) تعیین شدند. تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در مطالعه مذکور، ژرم پلاسِم را در پنج خوشه طبقه‌بندی کرد. سنجش مقدار کانابینوئید، مجموعه‌های وحشی را به سه نوع B2/B2 با ۶ درصد، نوع B2/B1 با ۱۵ درصد و نوع B1/B1 با ۷۵ درصد کانابینوئید تفکیک کرد. محتوای کل کانابینوئید از ۰/۲۱ تا ۴/۷۳ متغیر بود (Aina *et al.*, 2025). بر خلاف نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، نشانگرهای مولکولی تنوع موجود در سطح عوامل ژنتیکی را بیان کرده و تحت‌تأثیر عوامل محیطی قرار ندارند.

برای هر آغازگر تکثیر نمودند. ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌ها $0/67$ - $0/17$ با میانگین $0/42$ برآورد شد که نشان‌دهنده سطح متوسطی از شباهت ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. تمام نمونه‌های شاهدانه در دو خوشه دسته‌بندی شدند (Khatak *et al.*, 2016). با وجود اینکه در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷ اکوتیپ شاهدانه در ترکیه، نشانگرهای ISSR و RAPD نتایج مشابهی را داشتند، لیکن میانگین قدرت تفکیک ISSR کمی بالاتر از RAPD بود (Kayış *et al.*, 2010).

نتایج برخی مطالعات نیز نشان از وجود خزانه‌زنی غنی و تنوع ریختی، ژنتیکی و فیتوشیمیایی قابل‌توجه در جمعیت‌های بومی شاهدانه ایران دارد (Riahi *et al.*, 2016; Soorani *et al.*, 2017; Shams *et al.*, 2020)؛ با این وجود، فقدان برنامه‌های به‌نژادی و حفاظتی، خزانه‌زنی غنی شاهدانه ایران را با خطرات جدی مواجه کرده است (Soorani *et al.*, 2017). بهره‌گیری از تنوع ژنتیکی طبیعی یکی از روش‌های کلاسیک و مؤثر برای بهبود ژنتیکی گیاهان به‌شمار می‌رود. با توجه به اینکه امکان تلاقی تمامی گونه‌های شاهدانه با یکدیگر وجود دارد (Salentijn *et al.*, 2015)، این موضوع می‌تواند الگوی پیوسته‌ای از تنوع را ایجاد کند که خود زیربنای برنامه‌های به‌نژادی آینده باشد. منابع ژنی گیاهی، علاوه بر این که به‌عنوان عامل زیربنایی برای توسعه کشاورزی محسوب می‌شوند، به‌عنوان منبعی از سازگاری ژنتیکی در برابر تغییر عامل‌های محیطی عمل می‌کنند؛ بنابراین قبل از انجام هر نوع کار به‌نژادی در مورد شاهدانه، شناخت تنوع و پتانسیل ژنتیکی آن لازم و ضروری است. با توجه به این که مطالعات اندکی در زمینه شاهدانه و به‌خصوص ارزیابی مولکولی آن صورت گرفته است؛ از این‌رو هدف پژوهش حاضر، بررسی تنوع مولکولی اکوتیپ‌های مختلف شاهدانه و تعیین نسبی میزان خویشاوندی و فاصله ژنتیکی آن‌ها بود تا از نتایج حاصل در تلاقی‌های ژنتیکی و تولید هیبرید در آینده استفاده شود. همچنین، با توجه به رواج کشت شاهدانه در خراسان جنوبی و کاربردهای اقتصادی آن برای خرده‌مالکان، اکوتیپ‌های مختلف این گیاه با استفاده از نشانگرهای SCoT و ISSR از نظر مولکولی مورد بررسی دقیق قرار گرفتند تا اطلاعات بیشتری درباره تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی آن‌ها به‌دست آید.

در نتیجه برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌ها، استفاده از نشانگرهای مولکولی امری اجتناب‌ناپذیر خواهد بود (Punja *et al.*, 2017). مطالعات گذشته نشان داده است که تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای (Sawler *et al.*, 2015) و میان‌گونه‌ای (Lynch *et al.*, 2016) شاهدانه در مقایسه با سایر گونه‌های علفی دگرده‌افشان بسیار بالا است. از زمان ظهور ژنومیکس، روش‌های ژنوتیپی ساده‌ی مبتنی بر نشانگرهای مولکولی، کارایی خود را برای توصیف کافی و یکنواخت جمعیت‌های گیاهی ثابت کرده‌اند. این ابزارهای ژنومی به به‌نژادگران این امکان را می‌دهند که آزمایش‌های میدانی را برای انتخاب فنوتیپ‌های متمایز، یکنواخت و پایدار از جمعیت‌های گیاهی انجام دهند. نشانگرهای مولکولی هم‌چنین به توصیف بهتر و تخمین ارزش اصلاحی افراد و جمعیت‌های گیاهی کمک می‌کنند. از نشانگرهای مولکولی مختلفی مانند RAPD، RFLP، AFLP (Gillan *et al.*, 1995; Faeti *et al.*, 1996; Jagadish *et al.*, 1996; Forapani *et al.*, 2001; Dufresnes *et al.*, 2006) و SSR (Datwyler and Weiblen, 2006) برای تعیین ارتباط ژنتیکی گونه‌ها، ارقام، واریته‌ها و حتی افراد مختلف در شاهدانه استفاده شده است و چندین نشانگر قوی، چندشکل و عملکردی برای تعیین ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی در خزانه‌های ژنی متعدد شاهدانه شناسایی شده‌اند (Prentout *et al.*, 2025).

ارزیابی ساختار ژنتیکی ۴۳ گونه شاهدانه در مطالعه الصالح و ایلماز (Alsaleh and Yilmaz, 2025) منجر به گروه‌بندی و نامیز جمعیت‌ها بر اساس جنسیت و منشاء جغرافیایی شد. همچنین در تجزیه واریانس مولکولی در مطالعه مذکور نشان داد که ۹۲ درصد از تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده در درون جمعیت‌ها وجود دارد. تعداد آلل‌های مختلف (۱/۵۱)، تعداد آلل‌های مؤثر (۱/۲۳)، شاخص اطلاعات شانون (۰/۲۶) و درصد جایگاه چندشکلی (۷۴/۹۱) تنوع ژنتیکی غنی‌تری را نسبت به هم‌تایان بین‌المللی خود نشان داد. تجزیه به مختصات اصلی، تفاوت‌های ژنتیکی مختص جنسیت را آشکار کرد (Alsaleh and Yilmaz, 2025). در مطالعه ختاک و همکاران (Khatak *et al.*, 2016) ارزیابی ۱۴ نمونه شاهدانه هندی با ۲۸ آغازگر ISSR، منجر به شناسایی ۱۵ آغازگر چندشکلی شد. همچنین نتایج مطالعه مذکور نشان داد که آغازگرها ۱۵۲ باند، ۱۳۲ باند چندشکل با میانگین ۱۰/۱۴ باند

مواد و روش‌ها

بذرهای اکوتیپ‌های مورد استفاده از مناطق مختلفی از ایران (خوسف، طبس گلشن، سه قلعه، بشرویه، بجنورد، بجنورد وحشی، فریمان، تبریز و قزوین) و دو نمونه از افغانستان (افغانستان، افغانستان ۱) جمع‌آوری شدند (جدول ۱). استخراج DNA از برگ‌های جوان (مرحله ۵-۴ برگی گیاه) صوت گرفت (شکل ۱). بذرهای مورد نظر در سال زراعی ۱۴۰۳-۴ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند به‌طور جداگانه در گلدان‌هایی که با مخلوطی از کوکوپیت و خاک معمولی پر شده بودند، در نهالستان دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند کشت شدند. به دلیل متفاوت بودن مناطق جمع‌آوری و شرایط اقلیمی مختلف مبداء بذرهای کشت بذرهای در چند نوبت تکرار شد تا از سبز شدن بذرهای اطمینان به‌دست آید. پنج نمونه برگ‌های از هر گلدان انتخاب و با همدیگر مخلوط گردید و در نهایت مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از آن برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA با بهره‌گیری از روش CTAB تغییر یافته صورت گرفت (Doyle and Doyle, 1987). برای این منظور، از هر اکوتیپ ۲۰۰ میلی‌گرم برگ پودر شد و نمونه‌های پودر شده به تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی ۶۸۶ میکرولیتر بافر استخراج CTAB (سه درصد)، تریس (۱۰۰ میلی‌مولار)، EDTA (۲۰ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۱/۴ میلی‌مولار) به همراه ۱۴ میکرولیتر مرکاپتواتانول اضافه شد. کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل Thermo Scientific 2000 تعیین گردید. در این مرحله، جذب نوری DNA رقیق شده در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر (ویژه اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (ویژه پروتئین‌ها) اندازه‌گیری و نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ برای سنجش کمیت نمونه محاسبه شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز یک درصد انجام گرفت. برای ارزیابی مولکولی، توالی ۱۰ آغازگر SCOT و ۱۰ آغازگر ISSR تهیه و جهت سنتز به شرکت سیناکلون ارسال شد (Pandey et al., 2023; Kayış et al., 2016) (جدول ۲).

جدول ۱- مناطق مختلف جمع‌آوری اکوتیپ‌های شاهدانه

Table1. The different collection regions of *cannabis sativa* ecotypes

شماره Number	منطقه Location	طول شرقی Longitude	عرض شمالی Latitude
1	خوسف، خراسان جنوبی (Khusf, South Khorasan)	59° 13' 16.10" E	32° 51' 58.61" N
2	طبس گلشن، خراسان جنوبی (Tabas Golshan, South Khorasan)	56° 55' 27.73" E	33° 35' 45.10" N
3	سه قلعه، خراسان جنوبی (Se Qaleh, South Khorasan)	58° 26' 0" E	33° 40' 0" N
4	بشرویه، خراسان جنوبی (Boshroyeh, South Khorasan)	57° 26' 59.99" E	33° 51' 59.99" N
5	بجنورد، خراسان شمالی (Bojnord, North Khorasan)	57° 19' 44.51" E	37° 28' 29.03" N
6	بجنورد وحشی، خراسان شمالی (Wild Bojnord, North Khorasan)	57° 19' 44.51" E	37° 28' 29.03" N
7	فریمان، خراسان رضوی (Fariman, Razavi Khorasan)	59° 50' 49" E	35° 42' 06" N
8	افغانستان (Afghanistan)	65° 00' E	33° 00' N
9	افغانستان ۱ (Afghanistan1)	65° 00' E	33° 00' N
10	تبریز، آذربایجان شرقی (Tabriz, East Azerbaijan)	46° 17' 30.84" E	38° 04' 48.00" N
11	قزوین، قزوین (Qazvin, Qazvin)	50° 00' 14.76" E	36° 16' 7.57" N



شکل ۱- نمونه‌ای از گلدان‌های کشت شده شاهدانه

Figure 1. A sample of cultivated *Cannabis sativa* pots

جدول ۲- آغازگرهای ISSR و SCoT به همراه توالی و دمای اتصال

Table 2. ISSR and SCoT primers, their sequences and annealing temperatures

آغازگر Primer	توالی Sequence	دمای اتصال (سانتی گراد) Annealing temperature (C)	آغازگر Primer	توالی Sequence	دمای اتصال (سانتی گراد) Annealing temperature (C)
ISSR1	5'-ACACACACACACACACCG-3'	55.97	SCoT1	5'-CATGGCTACCACCGGCCC-3'	62.8
ISSR2	5'-ACACACACACACACACCC-3'	55.97	SCoT2	5'-CCATGGCTACCACCGCCT-3'	60.52
ISSR3	5'-CACACACACACACACAGC-3'	55.97	SCoT3	5'-AACCATGGCTACCACCAC-3'	55.97
ISSR4	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	56.67	SCoT4	5'-ACCATGGCTACCACCGGC-3'	60.52
ISSR5	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCG-3'	63.14	SCoT5	5'-ACCATGGCTACCACCGAC-3'	58.24
ISSR6	5'-GACACGACACGACACGACAC-3'	61.40	SCoT6	5'-ACGACATGGCGACCGCGA-3'	60.52
ISSR7	5'-CACACACACACAA-3'	66.00	SCoT7	5'-ACGACATGGCGACCATCG-3'	58.24
ISSR8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTT-3'	51.41	SCoT8	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	53.69
ISSR9	5'-GGGGTGGGGTGGGGTC-3'	61.99	SCoT9	5'-CACCATGGCTACCACCAG-3'	58.24
ISSR10	5'-AAGAAGAAGAAGAAGAGC-3'	50.19	SCoT10	5'-CCATGGCTACCACCGCAC-3'	60.52

نشانگری: تعداد باندهای چندشکل $\times$ PIC و شاخص قدرت تفکیک $RP = \sum IB$ که $IB = 1 - [2 \times (0.5 - P_i)]$ (Agrama and Tuinstra, 2003; Botstein *et al.*, 1980). به منظور تعیین پراکندگی آغازگرها در طول ژنوم تجزیه به مختصات اصلی و به منظور گروه بندی اکوتیپ‌ها ابتدا تشابه ژنتیکی افراد محاسبه و سپس تجزیه خوشه‌ای (روش Ward) انجام شد. به منظور تجزیه واریانس مولکولی ابتدا اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف به چهار جمعیت شامل خراسان جنوبی، خراسان شمالی و رضوی، افغانستان و سایر نقاط ایران تقسیم شدند. محاسبه پارامترهای ژنتیکی تعداد آلل تکثیرشده، تعداد آلل مؤثر، درصد چندشکلی (تعداد کل باندها/تعداد باندهای چندشکل)، شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نسبت چندشکلی مؤثر، شاخص نشانگری و شاخص قدرت تفکیک با استفاده از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۲۰) انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار NTSYSpc (نسخه ۲/۲) تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر $(N_e = \frac{1}{(p^2 + q^2)})$ (Kimura and Crow, 1964)، شاخص تنوع ژنتیکی $(-1 \times \ln(\text{Nei identity}))$ (Nei Genetic Distance)، شاخص شانون $(-1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q)))$ (Lewontin, 1972)، بای پلات و تجزیه واریانس مولکولی با GenALEX (۶/۱) محاسبه شد. مقدار q از رابطه $p = 1 - q$ به دست آمد.

جهت انجام واکنش PCR ابتدا تنظیم دمای اتصال برای تمامی ۲۰ آغازگر مورد استفاده انجام شد. برای این منظور واکنش PCR در محدوده دمایی ۱۰- تا ۲+ درجه دمای ذوب پیشنهادی پرایمرها انجام شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۱۰ میکرولیتر Mastermix، ۲ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار هر کدام از آغازگرها، ۱ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر و ۷ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز انجام شد. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر مدل Thermal-Cycler T100 نمایندگی BIORAD صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در بافر $0.5 \times$ TBE با روش الکتروفورز جداسازی شدند. پس از رنگ آمیزی ژل قطعات تکثیر یافته‌ی DNA توسط دستگاه ژل داک عکس برداری گردید. برای بررسی و مقایسه باندها از پنج میکرولیتر نشانگر با قطعات مشخص (DNA Ladder) بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز استفاده شد (جدول ۳).

اطلاعات حاصل از باندها به صورت ماتریس صفر (عدم باند) و یک (حضور باند) در نرم‌افزار Excel وارد شدند. برای ارزیابی عملکرد آغازگرها، شاخص‌های تعداد آلل تکثیرشده، تعداد آلل مؤثر، درصد چندشکلی: تعداد کل باندها/تعداد باندهای چندشکل، شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی $PIC = 1 - (p^2 + q^2)$ (p فراوانی حضور باند و q فراوانی عدم حضور باند)، شاخص نسبت چندشکلی مؤثر: درصد چندشکلی $\times$ تعداد باندهای چندشکل، شاخص

نتایج و بحث

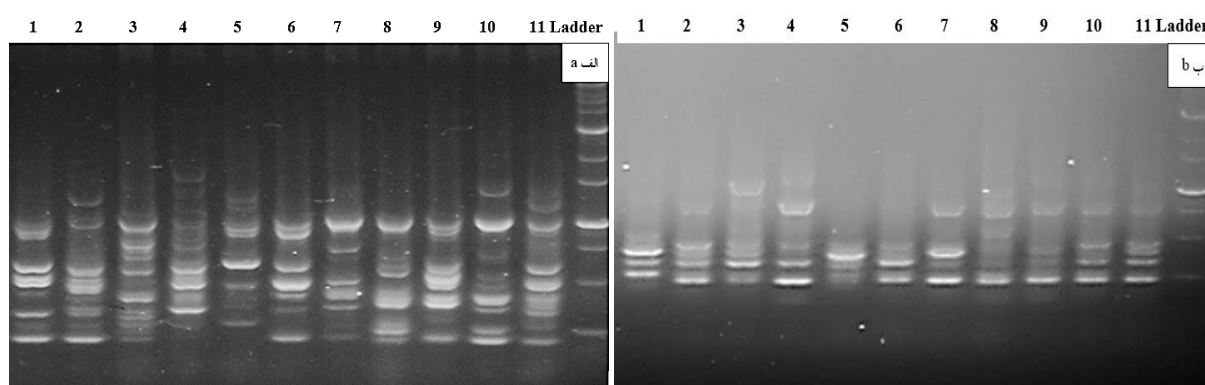
ارزیابی آغازگرها و بررسی چندشکلی: از ۱۰ آغازگر SCoT، نه آغازگر و از ۱۰ آغازگر ISSR، هفت آغازگر توانستند چندشکلی بالا و وضوح مناسبی از خود نشان دهند (شکل ۲). یک آغازگر SCoT و سه آغازگر ISSR به دلیل عدم تکثیر و یا ایجاد باندهای با وضوح نامناسب کنار گذاشته شدند. به طور کلی، ۹ آغازگر SCoT مجموعاً ۷۷ باند و هفت آغازگر ISSR، ۶۳ باند با وضوح

بالا تکثیر کردند. الگوی باندهای تکثیرشده توسط آغازگر ISSR8 و SCoT10 در شکل ۲ قابل مشاهده است. درصد چندشکلی در نشانگر SCoT، ۹۲/۰۲ درصد و در نشانگر ISSR، ۸۷/۵ درصد به دست آمد. در نشانگر SCoT، SCoT4 با ۱۴ باند، بیشترین و SCoT6 با ۵ باند، کمترین تعداد باند را تولید کردند. در میان آغازگرهای ISSR، بیشترین تعداد باند تولید شده مربوط به ISSR9 با ۱۲ باند و کمترین تعداد باند مربوط به ISSR4 با ۷ باند بود (شکل ۲).

جدول ۳- اجزای واکنش و برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3. Polymerase chain reaction (PCR) components and cycle program to amplify ISSR and SCoT markers

مواد Materials	غلظت نهایی Final concentration	اجزای واکنش Reaction components	مراحل Step	تعداد چرخه Cycle Number	دما (سانتی‌گراد) Temp (C°)	زمان (دقیقه/ثانیه) Time (min/s)
Double distilled water	-	8 µl	واسرشت‌سازی اولیه Initial denaturation	1	95	5m
Master mix	1X (SCoT), 2X (ISSR)	10 µl	واسرشت‌سازی Denaturation		95	50S
Primer	0.67 pm	1 µl	اتصال Annealing	35	دمای ذوب Melting temperature	50S
DNA	20ng/µl	1 µl	طویل‌سازی Extension		72	1m: 20s
Total	-	20 µl	طویل‌سازی نهایی Final extension	1	72	5m



شکل ۲- الگوی باندی اکوتیپ‌های شاهدانه: الف- آغازگر SCoT4 ب- آغازگر ISSR1.

۱- خوسف، ۲- طبس گلشن، ۳- سه قلعه، ۴- بشرویه، ۵- بجنورد، ۶- بجنورد وحشی، ۷- فریمان، ۸- افغانستان، ۹- افغانستان ۱، ۱۰- تبریز، ۱۱- قزوین.

Figure 2. Band Pattern of *Cannabis sativa* ecotypes: a- ISSR1 primer b- SCoT4 primer.
1. Khusf, 2. Tabas Golshan, 3. Se Galeh, 4. Boshroyeh, 5. Bojnord, 6. Wild Bojnord, 7. Fariman, 8. Afghanistan, 9. Afghanistan1, 10. Tabriz, 11. Qazvin.

مشابهی داشتند. به عبارت دیگر در مجموع آغازگرها در هر دو روش نشانگری از نظر شاخص‌های آگاهی‌بخش تقریباً مثل هم عمل نمودند. درصد چندشکلی بالا در هر دو نشانگر نشان می‌دهد که هر دو نشانگر سطح بالایی از تنوع را به‌خوبی نشان دادند. نشانگر SCoT درصد چندشکلی نسبتاً بالاتری را نسبت به نشانگر ISSR داشت که این امر با توجه به تعداد باندهای چندشکل کمتر نشانگر ISSR نسبت به SCoT مورد انتظار است. به عبارت دیگر تنوع قابل توجهی در اکوتیپ‌های شاهدانه مورد مطالعه از نظر مولکولی وجود دارد (جدول ۴).

مقادیر PIC بین صفر (آغازگرهای تک‌شکل) تا ۰/۵ برای آغازگرهایی که در ۵۰ درصد از افراد وجود دارند و در ۵۰ درصد دیگر وجود ندارند، متغیر است (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). مقادیر بالاتر PIC نشان می‌دهد که همه آغازگرهای مورد استفاده، سطوح بالاتری از کارایی و قابلیت را برای تجزیه و تحلیل ژنتیکی در مطالعه حاضر داشته‌اند. مقدار شاخص محتوی چندشکلی (PIC) بالا برای آغازگر نشان‌دهنده کارایی خوب و بالای آن‌ها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده است. آغازگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند. PIC یک معیار برای انتخاب بهترین جایگاه ژنی است و مقادیر PIC بالا در یک مکان ژنی بیانگر وجود آلل نادر آن مکان ژنی است که می‌تواند در تمایز مؤثر ژنوتیپ‌ها استفاده شود (Roder *et al.* 1995). شاخص PIC بزرگتر از ۰/۵ نشان‌دهنده آغازگر بسیار کارآمد، بین ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ نشان‌دهنده آغازگر کارآمد و کمتر از ۰/۲۵ نشان‌دهنده آغازگر با کارایی کم است (Wei *et al.* 2005). با توجه به آن‌که مقدار این پارامتر (۰/۳۲ و ۰/۳۵) در هر دو نشانگر بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ بود. آغازگر SCoT3 در نشانگر SCoT و آغازگر ISSR2 در نشانگر ISSR با بالاترین شاخص محتوی چندشکلی (۰/۴۱ و ۰/۴۲) بهترین آغازگرها در تمایز اکوتیپ‌های شاهدانه بودند. آغازگرهایی که بیشترین مقدار PIC را ایجاد می‌کنند، توانایی بیشتری در مشخص کردن فواصل ژنتیکی دارند و با توجه به اینکه متوسط شاخص PIC در آغازگرهای SCoT با ISSR برابر بود، از این‌رو هر دو نشانگر کارایی مشابهی در تمایز اکوتیپ‌ها داشتند (Thimmappaiah *et al.*, 2009).

میانگین تعداد باند تکثیرشده، تعداد باندهای چندشکل، شاخص محتوی چندشکلی، نسبت چندشکلی، شاخص نشانگر و شاخص قدرت تفکیک در نشانگر SCoT، ۸/۵۶، ۷/۷۸، ۹۲/۰۲، ۰/۳۵، ۷/۱۳، ۲/۷۴، ۰/۷۰ و در نشانگر ISSR، ۸۷/۵، ۷/۸۶، ۰/۳۲، ۰/۷۰، ۲/۸۵، ۰/۷۰ به‌دست آمد. در نشانگر SCoT، بیشترین تعداد باند تکثیرشده (۱۴)، تعداد باندهای چندشکل (۱۱)، شاخص نشانگری (۳/۸۵) و کمترین درصد چندشکلی (۷۸/۵۷) را آغازگر SCoT4؛ بیشترین شاخص محتوی چندشکلی (۰/۴۱)، شاخص قدرت تفکیک (۰/۹۴) را آغازگر SCoT3؛ بیشترین نسبت چندشکلی (۹/۰۰) را آغازگر SCoT1؛ بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰) را آغازگرهای SCoT1، SCoT5، SCoT6؛ کمترین تعداد باند تکثیرشده (۵)، تعداد باندهای چندشکل (۵)، شاخص محتوی چندشکلی (۰/۲۶)، نسبت چندشکلی (۵/۰۰)، شاخص نشانگری (۱/۳۰) را آغازگر SCoT6 و کمترین شاخص قدرت تفکیک (۰/۴۲) را آغازگر SCoT7 نشان داد (جدول ۴).

در نشانگر ISSR، بیشترین تعداد باند تکثیرشده (۱۲)، تعداد باندهای چندشکل (۱۱)، نسبت چندشکلی (۱۱) و کمترین شاخص محتوی چندشکلی (۰/۳۱)، شاخص قدرت تفکیک (۰/۵۳) را آغازگر ISSR3؛ کمترین درصد چندشکلی (۶۲/۵۰)، نسبت چندشکلی (۳/۱۳)، شاخص نشانگری (۲/۱۰) و بیشترین شاخص محتوی چندشکلی (۰/۴۲) را آغازگر ISSR2؛ بیشترین شاخص نشانگری (۳/۶۰) را آغازگر ISSR9؛ بیشترین شاخص قدرت تفکیک (۰/۹۱) را آغازگر ISSR1؛ بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰) را آغازگرهای ISSR3، ISSR4، ISSR8 و کمترین تعداد باند تکثیرشده (۷/۰۰)، تعداد باندهای چندشکل (۷/۰۰) را آغازگر ISSR8 نشان داد. بررسی شاخص‌ها و مقایسه این شاخص‌ها در نشانگر SCoT و ISSR نشان می‌دهد که تعداد باندهای تکثیرشده در دو نشانگر (۸/۵۶ در مقابل ۹)، تعداد باندهای چندشکل (۷/۷۸ در مقابل ۷/۸۶)، درصد چندشکلی (۹۲/۰۲ در مقابل ۸۷/۵۰ درصد)، شاخص محتوی چندشکلی (۰/۳۵ در مقابل ۰/۳۲)، شاخص نسبت چندشکلی (۷/۱۳ در مقابل ۷/۰۰)، شاخص نشانگری (۲/۷۴ در مقابل ۲/۸۵) و شاخص قدرت تفکیک (۰/۷۰ در مقابل ۰/۷۰)، تقریباً مقادیر

یکی دیگر از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، قدرت تمایز آن‌ها است. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه آلی دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. بعضی از محققین بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب را شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌دانند، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آل تأثیر می‌پذیرد. بررسی این شاخص در دو نشانگر نشان داد که مقادیر آن در هر دو نشانگر تقریباً بالا و برابر (۰/۷۰) بود، لذا هر دو نشانگر از این حیث نشانگرهای مشابه و خوبی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی شاهدها بودند. RP توانایی یک نشانگر در تفکیک اکوتیپ‌ها از هم را نشان می‌دهد و هر چه مقدار این شاخص بالاتر باشد، یعنی توانایی بیشتری در تمایز اکوتیپ‌ها از هم را دارد (Kayış et al., 2010). از نظر پارامتر RP آغازگر ScoT3 و ISSR1 با بیشترین قدرت تفکیک (۰/۹۴ و ۰/۹۱) به‌عنوان مناسب‌ترین آغازگرها شناخته شدند.

شاخص نشانگری (MI) علاوه بر مزایای PIC، تعدادکل باند و نسبت چندشکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید باند بیشتر نشان می‌دهد. شاخص نشانگر برآوردی مناسب از کارایی آغازگرها است که به تعداد باندهای چندشکل به‌دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم با نشانگر نسبت داده می‌شود. زیاد بودن شاخص نشانگر، بیان‌کننده فراهم‌کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد بیشتر باند چندشکل است (Milbourne et al. 1997). بررسی شاخص نشانگری (۲/۷۴ در مقابل ۲/۸۵) در دو نشانگر SCoT و ISSR نشان می‌دهد که هر دو نشانگر از این حیث کارایی تقریباً مشابهی داشته و هیچ‌کدام بر دیگری برتری نداشتند. آغازگرهای SCoT4 و ISSR9 با بالاترین شاخص نشانگری (۳/۸۵ و ۳/۶۰) به‌عنوان بهترین آغازگر شناخته شدند. این آغازگرها توانایی بالایی در تولید تعداد باند چندشکل (۱۱ و ۱۰) داشتند و از این‌رو انتخاب آغازگرها به‌درستی صورت گرفته است.

جدول ۴- شاخص‌های مولکولی برای نشانگر ISSR و SCoT در اکوتیپ‌های شاهدها

Table 4. Molecular indices for ISSR and SCoT markers in *Cannabis sativa* ecotypes

آغازگر	تعداد باند	تعداد باند	درصد	شاخص محتوی	نسبت	شاخص قدرت	تفکیک
Primer	N. of bands	N. of Polymorphism bands	Polymorphism Percent	Polymorphic information content (PIC)	Effective multiplex ratio (EMR)	Marker Index (MI)	Resolving Power (RP)
SCoT							
SCoT1	9	9	100	0.33	9.00	2.97	0.79
SCoT2	9	8	88.89	0.38	7.11	3.04	0.68
SCoT3	8	7	87.50	0.41	6.13	2.87	0.94
SCoT4	14	11	78.57	0.35	8.64	3.85	0.66
SCoT5	8	8	100	0.36	8.00	2.88	0.55
SCoT6	5	5	100	0.26	5.00	1.30	0.58
SCoT7	7	6	85.71	0.31	5.14	1.86	0.42
SCoT9	8	7	87.50	0.37	6.13	2.59	0.94
SCoT10	9	9	100	0.37	9.00	3.33	0.75
mean	8.56	7.78	92.02	0.35	7.13	2.74	0.70
ISSR							
ISSR1	9	7	77.78	0.36	5.44	2.52	0.91
ISSR2	8	5	62.50	0.42	3.13	2.10	0.76
ISSR3	11	11	100	0.31	11.00	3.41	0.53
ISSR4	7	7	100	0.37	7.00	2.59	0.65
ISSR6	9	8	88.89	0.36	7.11	2.88	0.61
ISSR8	7	7	100	0.41	7.00	2.87	0.88
ISSR9	12	10	83.33	0.36	8.33	3.60	0.55
mean	9	7.86	87.50	0.32	7.00	2.85	0.70

ScoT7؛ کمترین تعداد آل‌های مشاهده‌شده (۱/۷۹) در آغازگر ScoT4 و بیشترین تعداد آل‌های مشاهده‌شده (۲) در آغازگرهای متعددی (SCoT1، SCoT5، SCoT6 و SCoT10) دیده شد. در نشانگر ISSR، بیشترین تعداد آل‌های مؤثر (۱/۵۷)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (۰/۳۲)، شاخص شانون (۰/۴۸) در آغازگر ISSR8؛ کمترین تعداد آل‌های مشاهده‌شده (۱/۶۳)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (۰/۲۲) و شاخص شانون (۰/۳۴) در آغازگر ISSR2؛ کمترین تعداد آل‌های مؤثر (۱/۳۴) در آغازگر ISSR9 و بیشترین تعداد آل‌های مشاهده‌شده (۲) در آغازگرهای ISSR3 و ISSR4 دیده شد (جدول ۵).

بررسی و مقایسه تعداد آل مشاهده‌شده (Na: ۱/۹۱ و ۱/۸۷)، تعداد مؤثر آل‌ها (Ne) (۱/۴۳ و ۱/۴۲) و شاخص‌های تنوع ژنی نی (H) و شانون (I) (۰/۲۶، ۰/۴۱ و ۰/۲۶ و ۰/۴۰) با مطالعات الصالح و ایلماز (Alsaleh and Yilmaz, 2025) بر روی جمعیت‌های ترکی شاهدانه (H: ۰/۲۶، Ne: ۱/۱۴، Na: ۱/۱۵) و I: ۰/۲۶، نشان داد که بر اساس مقادیر محاسبه‌شده سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف شاهدانه ایران نسبت به جمعیت ترک وجود دارد. به عبارت دیگر جمعیت‌های مختلف شاهدانه مورد مطالعه کنونی تنوع ژنتیکی غنی‌تری را نسبت به هم‌تایان بین‌المللی خود دارد.

تجزیه واریانس مولکولی: تجزیه واریانس مولکولی بر اساس داده‌های نشانگر ISSR و SCoT نشان داد که تمام تنوع مربوط به تفاوت‌های درون‌گروهی بود. این یافته نشان داد که تنوع ژنتیکی صد در صد در درون هر گروه وجود داشت و تفاوت‌های بین گروه‌ها صفر بود. به عبارت دیگر بین جمعیت‌های خراسان جنوبی با خراسان رضوی و یا غرب ایران با جمعیت‌های زاهدان و افغانستان تفاوتی مشاهده نشد، اما در درون این جمعیت‌ها تفاوت وجود دارد و عمده تفاوت به خاطر این موضوع (تفاوت درون‌گروهی) ثبت شد. این امر به معنای آن است که در مطالعه کنونی و بر اساس تجزیه واریانس مولکولی به احتمال زیاد این جمعیت‌ها از یک مبدا یا منشاء مشترک سرچشمه گرفته‌اند و بعداً بین آن‌ها به دلایل مختلف مانند شرایط آب و هوایی و جغرافیایی، تفاوت به وجود آمده است. با این حال، بررسی اکوتیپ‌های بیشتر، با نشانگرها و آغازگرهای متفاوت و زیاده‌تر برای قطعیت این موضوع ضروری به نظر می‌رسد.

به طور کلی در نیمی از پارامترهای ژنتیکی مقادیر SCoT اندکی بیشتر از ISSR و در نیمی دیگر مقادیر ISSR اندکی بیشتر از SCoT بود. این موضوع نشان می‌دهد که در مطالعه تنوع ژنتیکی شاهدانه هر دو نشانگر تا کنون مشابه هم عمل نموده‌اند و هر دو نشانگر توانایی مشابهی در تفکیک و تمایز اکوتیپ‌های شاهدانه را داشتند. مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی موجود در اکوتیپ‌های مورد مطالعه کنونی بیشتر از موارد قبلی بود. به عنوان مثال، درصد چندشکلی در هر دو نشانگر بیش از ۸۷/۵۰ درصد بود که نسبت به مطالعات شمس و همکاران (Shams et al., 2020) بر روی جمعیت‌های ایرانی شاهدانه و یا مطالعات اصلح و ایلماز (Alsaleh and Yilmaz, 2025) بر روی توده‌های ترکیه بیشتر بود. تعداد باندهای تکثیرشده به ازای هر آغازگر در این مطالعه نسبت به سایر مطالعات کمتر و یا بیشتر بود. در این مطالعه در کل ۱۶ آغازگر در دو نشانگر ۱۴۰ باند تکثیر نمودند که نسبت به مطالعه شمس و همکاران (Shams et al., 2020) که در آن ۱۴ آغازگر ISSR، ۲۳۱ باند (۱۹۸ باند چندشکل) را تکثیر نمودند، کمتر بود، اما نسبت به مطالعه پاندی و همکاران (Pandey et al., 2023) با ۲۶ آغازگرهای SCoT و ۲۱ آغازگر CBPD که ۱۳۴ و ۱۸۰ باند تکثیر نمودند، بیشتر بود. به طور کل تفاوت‌های قابل توجه در الگوهای باندی، درصد چندشکلی و مقادیر بالای PIC در اکوتیپ‌های مختلف شاهدانه، نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در اکوتیپ‌های مختلف شاهدانه ایران است که این موضوع در ارزیابی‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی و بیوشیمیایی مختلف قبلی نیز گزارش شده است (Riahi et al., 2016; Soorani et al., 2017; Shams et al., 2020).

بررسی پارامترهای تنوع ژنتیکی نشان داد که میانگین تعداد آل‌های مشاهده‌شده، تعداد آل‌های مؤثر (نشان‌دهنده سهم نسبی هر آل در تنوع ژنتیکی)، شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون در نشانگر SCoT برابر با ۱/۹۱، ۱/۴۳، ۱/۲۶ و ۰/۴۱ و در نشانگر ISSR برابر با ۱/۸۷، ۱/۴۲، ۰/۲۶ و ۰/۴۰ بود. در نشانگر SCoT، بیشترین تعداد آل‌های مؤثر (۱/۵۶)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (۰/۳۲)، شاخص شانون (۰/۴۹) در آغازگر ScoT7؛ کمترین تعداد آل‌های مؤثر (۱/۲۴)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (۰/۱۷)، شاخص شانون (۰/۳۰) در آغازگر

جدول ۵- پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده برای نشانگرهای ISSR و SCoT در جمعیت‌های شاهدانه

Table 5. Genetic parameters for ISSR and SCoT markers in <i>Cannabis sativa</i> populations									
شاخص	شاخص	تعداد	تعداد آل‌های	آغازگر	شاخص	شاخص	تعداد	تعداد آل‌های	آغازگر
شانون	نی	آل‌های مؤثر	مشاهده‌شده	Primer	شانون	نی	آل‌های مؤثر	مشاهده‌شده	Primer
I	H	Ne	Na		I	H	Ne	Na	
SCoT1	0.41	0.28	1.50	1.78	ISSR1	0.41	0.28	1.50	1.78
SCoT2	0.34	0.22	1.37	1.63	ISSR2	0.34	0.22	1.37	1.63
SCoT3	0.38	0.23	1.37	2.00	ISSR3	0.38	0.23	1.37	2.00
SCoT4	0.42	0.26	1.41	2.00	ISSR4	0.42	0.26	1.41	2.00
SCoT5	0.42	0.27	1.45	1.88	ISSR6	0.42	0.27	1.45	1.88
SCoT6	0.48	0.32	1.57	1.88	ISSR8	0.48	0.32	1.57	1.88
SCoT7	0.38	0.23	1.34	1.91	ISSR9	0.38	0.23	1.34	1.91
SCoT9	0.44	0.29	1.46	1.88	Mean	0.44	0.29	1.46	1.88
SCoT10	0.49	0.32	1.56	2.00		0.49	0.32	1.56	2.00
Mean	0.41	0.26	1.43	1.91		0.41	0.26	1.43	1.91

P: آغازگر، Na: تعداد آل اهدشده، Ne: تعداد آل مؤثر، H: شاخص تنوع ژنتیکی نی، I: شاخص اطلاعاتی شانون

P: Primer, Na: Observed number of alleles, Ne: Effective number of alleles, H: Nei's gene diversity, I = Shannon's Information index

جدول ۶- مقادیر یکسانی ژنتیکی (بالای قطر) و فاصله ژنتیکی (پایین قطر) نی بین جمعیت‌های شاهدانه

Table 6. Values of Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between populations of *Cannabis sativa*

POP	SCoT				ISSR			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	****	0.91	0.89	0.90	****	0.91	0.86	0.90
2	0.09	****	0.86	0.92	0.09	****	0.85	0.92
3	0.11	0.15	****	0.83	0.15	0.16	****	0.84
4	0.11	0.08	0.18	****	0.10	0.08	0.18	****

جمعیت ۱: (خوسف، طیس گلشن، سه‌قلعه، بشرویه)؛ جمعیت ۲: (بجنورد، بجنورد وحشی، فریمان)؛ جمعیت ۳: (افغانستان، افغانستان ۱)؛ جمعیت ۴: (تبریز و قزوین)
Population 1: (Khusf, Tabas Golshan, Se Qaleh, Boshroyeh); Population 2: (Bojnord, Wild Bojnord, Fariman); Population 3: (Afghanistan, Afghanistan1); Population 4: (Tabriz, Qazvin)

و SCoT ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA، بهترین ضریب و بهترین الگوی خوشه‌بندی بودند (جدول ۸).

بر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از داده‌های SCoT، مقدار تشابه ژنتیکی اکوتیپ‌ها بین ۰/۰۷ تا ۰/۶۶ با متوسط ۰/۴۲ متغیر بود. کمترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های قزوین-افغانستان (۰/۰۷) و بیشترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ تبریز-خوسف (۰/۶۶) به‌دست آمد (جدول ۹). تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های SCoT اکوتیپ‌های مختلف را در چهار خوشه دسته‌بندی نمود. در خوشه‌ی اول اکوتیپ‌های خوسف، تبریز، افغانستان، بشرویه، بجنورد وحشی، سه‌قلعه، فریمان، طیس گلشن، و افغانستان ۱؛ در خوشه‌ی دوم اکوتیپ بجنورد و در خوشه‌ی سوم اکوتیپ قزوین قرار گرفتند (شکل ۳ الف).

بر اساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از داده‌های ISSR، مقدار تشابه ژنتیکی اکوتیپ‌ها بین ۰/۰۷ تا ۰/۷۵ با متوسط ۰/۴۰ متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های فریمان-سه‌قلعه (۰/۷۵) و کمترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ قزوین-سه‌قلعه و قزوین-افغانستان (۰/۰۷) به‌دست آمد (جدول ۱۰). تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های نشانگر ISSR اکوتیپ‌های مختلف

مقادیر بالاتر واریانس درون گروهی نسبت به بین گروهی نشان می‌دهد که میزان تنوع در درون گروه‌ها بیشتر از بین گروه‌ها است. اختلاف کم موجود در بین گروه‌ها نیز نشان می‌دهد که از نظر داده‌های مولکولی میانگین جمعیت‌های هر گروه با گروه دیگر اختلاف زیادی نداشتند (جدول ۶). عدم تفاوت بین میانگین گروه‌ها با یکدیگر بیانگر این است که دو گروه و یا چند گروه به‌طور کل مشابه است. این اختلاف کم موجود بین گروه‌ها می‌تواند به‌دلیل جابجایی جمعیت‌ها از یک منطقه به منطقه دیگر و در نتیجه شباهت جمعیت‌هایی از دو گروه با یکدیگر باشند. این امر باعث نزدیک شدن میانگین گروه‌ها به یکدیگر و در نتیجه شباهت گروه‌ها با یکدیگر می‌گردد. این نتایج با نتایج مطالعه هاک و همکاران (Hakki et al., 2007)، تفاوت دارد. آن‌ها با بررسی تنوع ژنتیکی ۷۵ نمونه شاهدانه از مناطق مختلف ترکیه متوجه شدند که ۲۰/۲۳ درصد از تغییرات ژنتیکی به‌دلیل تفاوت بین گروه‌ها و ۷۹/۷۷ درصد از تغییرات ژنتیکی به‌دلیل تفاوت درون گروه‌ها بود (جدول ۷).
ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای: بررسی ضرایب کوفتیک (به‌ترتیب ۰/۹۱ و ۰/۹۵) نشان داد که در هر دو نشانگر ISSR

را در سه خوشه دسته‌بندی نمود. در خوشه‌ی اول اکوتیپ‌های خوسف، بشرویه، بجنورد وحشی، افغانستان^۱، سه‌قلعه، فریمان، تبریز و طبس گلشن؛ در خوشه‌ی دوم اکوتیپ بجنورد و در خوشه‌ی سوم اکوتیپ قزوین قرار گرفتند (شکل ۳ ب). بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از داده‌های SCoT بیشترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های خوسف-تبریز و کمترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ قزوین - افغانستان و بر اساس داده‌های ISSR، بیشترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های فریمان - سه‌قلعه و کمترین شباهت ژنتیکی بین قزوین - افغانستان و قزوین - سه‌قلعه به دست آمد. با نگاهی به ماتریس‌های شباهت معلوم می‌شود که اکوتیپ خوسف بالاترین شباهت را با سایر اکوتیپ‌ها دارد و برعکس اکوتیپ قزوین کمترین شباهت را با سایر اکوتیپ‌ها دارد. این موضوع نشان می‌دهد که بهترین راه برای ایجاد هتروزیس استفاده از اکوتیپ قزوین در تلاقی با سایر اکوتیپ‌ها است. از طرف دیگر بررسی خوشه‌ها نشان داد که در درون یک خوشه

اکوتیپ‌های با فاصله جغرافیایی دور کنار یکدیگر قرار گرفتند که این موضوع نشان‌دهنده عدم تبعیت فاصله‌ی ژنتیکی از فاصله‌ی جغرافیایی است. در کل، میانگین ضرایب تشابه بر اساس دو نشانگر (۰/۴۲ و ۰/۴۰) تا حدود زیادی برابر است. این امر نشان می‌دهد که هر دو نشانگر مقدار شباهت را به به‌صورت تقریباً برابر برآورد نمودند. در هر دو نشانگر در تجزیه‌ی خوشه‌ای، اکوتیپ‌های شاهدانه مورد مطالعه را در سه خوشه گروه‌بندی نمودند و به‌نظر می‌رسد که دو نشانگر از لحاظ خوشه‌بندی مزیتی نسبت به یکدیگر نداشتند. به‌طور کلی اکوتیپ‌های متعلق به یک استان در یک خوشه و در بعضی موارد در خوشه‌های متفاوت قرار گرفتند. قرارگرفتن اکوتیپ‌های با فواصل جغرافیایی دور در یک خوشه می‌تواند نشانه‌ای از تبادلات ژنتیکی بین مناطق مختلف (جابجایی بذور، اختلاط بذور و یا خاستگاه مشترک اکوتیپ‌ها) باشد. در کل قرابت ژنتیکی از نزدیکی جغرافیایی تبعیت نمود.

جدول ۷- تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های شاهدانه بر اساس داده‌های نشانگرهای ISSR و SCoT

Table 7. Analysis of molecular variance of <i>Cannabis sativa</i> populations based on ISSR and SCoT marker data						
منبع تغییرات SOV	درجه آزادی D.F	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	درصد واریانس مشاهده شده Est. Var	Phi PT	P-Value
SCoT						
بین گروه Among Pops	3	35.16	11.72	0	-0.08	0.96
درون گروه Within Pops	7	101.75	14.54	100		
کل Total	10	136.91		100		
ISSR						
بین گروه Among Pops	3	29.72	9.91	0	-0.05	0.86
درون گروه Within Pops	7	79.92	11.42	100		
کل Total	10	109.64		100		

جدول ۸- ضرایب کوفتیک برای نشانگرهای ISSR و SCoT

Table 8. Cophenetic coefficients for ISSR and SCoT markers						
الگوریتم Algorithm	کامل Complete		منفرد Single	میانگین تشابه میان زوج نمونه‌ها UPGMA		
	ISSR	SCoT		ISSR	SCoT	
دایس Dice	0.87	0.90	0.94	0.89	0.95	0.91
تطابق ساده SM	0.75	0.65	0.68	0.70	0.77	0.78
جاکارد Jacard	0.87	0.89	0.93	0.88	0.94	0.90
UN1	0.73	0.62	0.66	0.66	0.75	0.75

جدول ۹- ماتریس تشابه برای نشانگر SCoT در اکوتیپ‌های شاهدانه

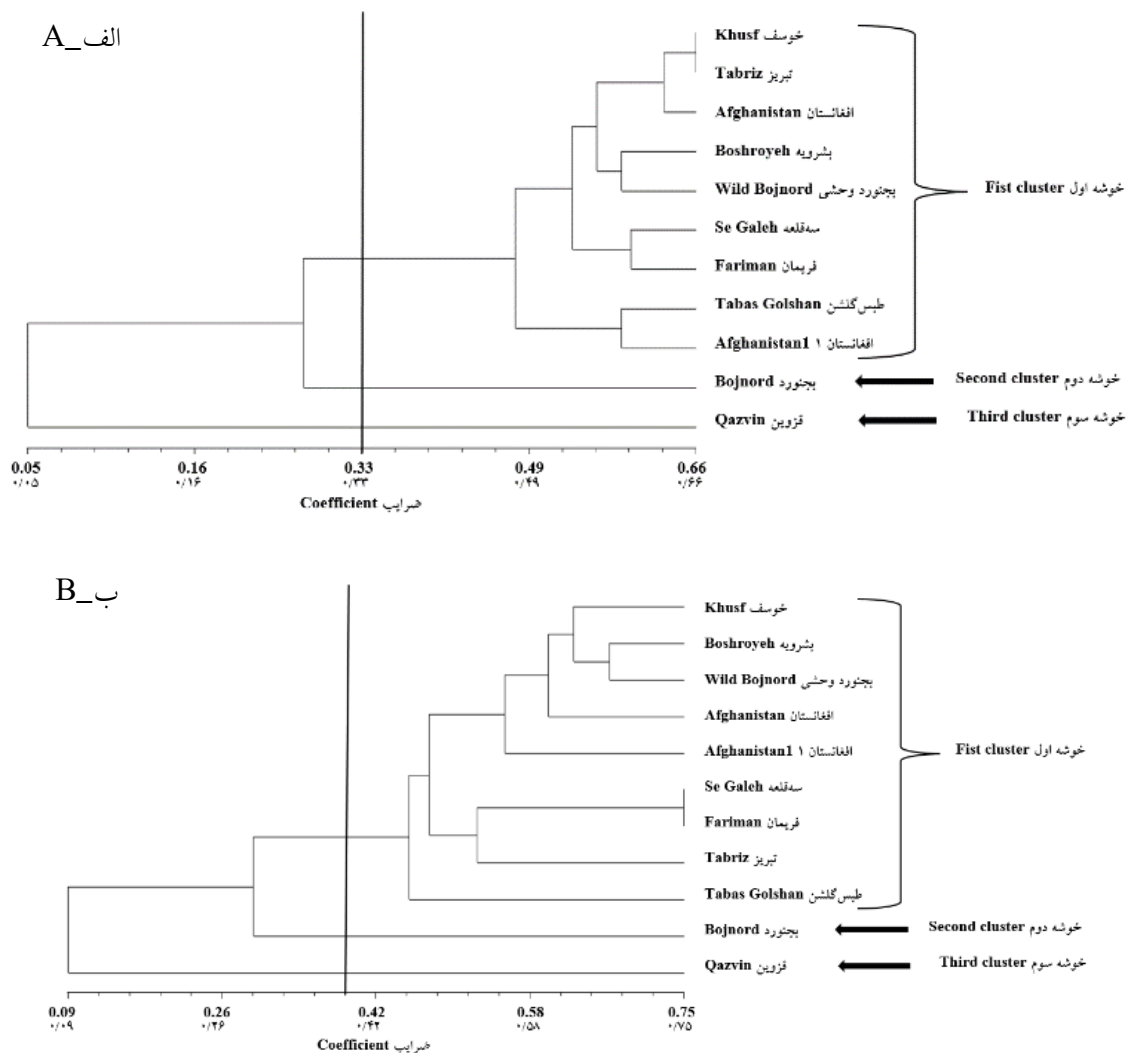
Table 9. Similarity matrix for SCoT marker in *Cannabis sativa* ecotypes

اکوتیپ‌ها Ecotypes	خوسف Khusf	طبس گلشن Tabas Golshan	سه‌قلعه Se Galeh	بشرویہ Boshroyeh	بجنورد Bojnord	بجنورد وحشی Wild Bojnord	فریمان Fariman	افغانستان Afghanistan	افغانستان ۱ Afghanistan1	تبریز Tabriz	قزوین Qazvin
خوسف (Khusf)	1.00										
طبس گلشن (Tabas Golshan)	0.46	1.00									
سه‌قلعه (Se Galeh)	0.52	0.50	1.00								
بشرویہ (Boshroyeh)	0.62	0.46	0.50	1.00							
بجنورد (Bojnord)	0.27	0.31	0.19	0.31	1.00						
بجنورد وحشی (Wild Bojnord)	0.62	0.54	0.46	0.58	0.38	1.00					
فریمان (Fariman)	0.63	0.44	0.59	0.52	0.21	0.59	1.00				
افغانستان (Afghanistan)	0.64	0.46	0.50	0.50	0.25	0.50	0.58	1.00			
افغانستان ۱ (Afghanistan1)	0.59	0.58	0.42	0.54	0.31	0.46	0.48	0.39	1.00		
تبریز (Tabriz)	0.66	0.52	0.48	0.56	0.21	0.56	0.57	0.61	0.44	1.00	
قزوین (Qazvin)	0.09	0.10	0.08	0.13	0.17	0.10	0.10	0.07	0.13	0.11	1.00

جدول ۱۰- ماتریس تشابه برای نشانگر ISSR در اکوتیپ‌های شاهدانه

Table 10. Similarity matrix for ISSR marker in *Cannabis sativa* ecotypes

اکوتیپ‌ها Ecotypes	خوسف Khusf	طبس گلشن Tabas Golshan	سه‌قلعه Se Galeh	بشرویہ Boshroyeh	بجنورد Bojnord	بجنورد وحشی Wild Bojnord	فریمان Fariman	افغانستان Afghanistan	افغانستان ۱ Afghanistan1	تبریز Tabriz	قزوین Qazvin
خوسف (Khusf)	1.00										
طبس گلشن (Tabas Golshan)	0.48	1.00									
سه‌قلعه (Se Galeh)	0.55	0.47	1.00								
بشرویہ (Boshroyeh)	0.62	0.47	0.37	1.00							
بجنورد (Bojnord)	0.27	0.36	0.37	0.34	1.00						
بجنورد وحشی (Wild Bojnord)	0.64	0.51	0.54	0.67	0.24	1.00					
فریمان (Fariman)	0.44	0.30	0.75	0.33	0.27	0.55	1.00				
افغانستان (Afghanistan)	0.63	0.43	0.50	0.51	0.37	0.67	0.51	1.00			
افغانستان ۱ (Afghanistan1)	0.56	0.46	0.45	0.51	0.27	0.65	0.47	0.50	1.00		
تبریز (Tabriz)	0.47	0.51	0.50	0.41	0.12	0.50	0.55	0.54	0.50	1.00	
قزوین (Qazvin)	0.08	0.09	0.07	0.11	0.15	0.09	0.08	0.07	0.11	0.09	1.00



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های شاهدانه الف- نشانگر ScoT ب- نشانگر ISSR

Figure 3. Cluster analysis of *Cannabis sativa* ecotypes a- SCoT marker b- ISSR marker

می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر ایجاد کنند. بر اساس نتایج پژوهش حاضر می‌توان تلاقی اولیه‌ی جمعیت ۳ (افغانستان و افغانستان ۱) با ۴ (قزوین و تبریز) را توصیه نمود. بر اساس ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای به‌دست‌آمده از داده‌های نشانگر ISSR، تلاقی اکوتیپ قزوین با سایر اکوتیپ‌ها به‌خصوص سه قلعه و افغانستان را می‌توان به‌منظور ایجاد تنوع و بهره‌جستن از هتروزیس توصیه کرد. با دقت در نتایج فوق آشکار است که اکوتیپ قزوین و بجنورد کمترین شباهت ژنتیکی را در اکثر مواقع نسبت به سایر اکوتیپ‌ها دارند و لذا استفاده از این اکوتیپ در کارهای به‌نژادی آتی توصیه می‌گردد. در کل بهترین تلاقی جهت حصول حداکثر هتروزیس قزوین × افغانستان شناخته شد.

مطالعه‌ی کنونی نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای در اکوتیپ‌های شاهدانه وجود دارد و این تنوع نسبت به موارد گزارش‌شده خارجی بیشتر است (Hakki *et al.*, 2007, 2003) و با مطالعات انجام شده بر روی جمعیت‌های ایرانی شباهت دارد (Shams *et al.*, 2020).

کمتر بودن تنوع بین جمعیت‌ها نسبت به درون جمعیت‌های شاهدانه را می‌توان با دگرگشتن بودن این گیاه نیز مرتبط دانست. به‌نظر می‌رسد که علی‌رغم وجود موانع فیزیکی/زیستگاهی احتمالی، جمعیت‌های جغرافیایی مختلف شاهدانه کاملاً از یکدیگر جدا نیستند. یکی از روش‌های دستیابی به قدرت هتروزیس بالا استفاده از والدینی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند، زیرا والدین با فاصله ژنتیکی بیشتر

است؛ بنابراین تنوع زیادی بین آنها وجود ندارد، اما چنانچه اکوتیپ‌ها در نواحی مختلف نمودار پراکنده شوند، نشان‌دهنده دور بودن اکوتیپ‌ها از لحاظ داده‌های مولکولی مورد بررسی است و لذا تنوع ژنتیکی بالایی بین آنها وجود دارد. آنچه مسلم است این است که گروه‌بندی انجام شده درست بوده و اکوتیپ‌های نزدیک به هم که با رنگ مشخص متمایز شده و متعلق به یک جمعیت بوده‌اند، تقریباً در یک ناحیه و نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال اکوتیپ‌های مربوط به خراسان جنوبی که جمعیت ۱ (خوسف، طبس گلشن، بشرویه و سه‌قلعه؛ با رنگ قرمز) و یا خراسان رضوی و شمالی (بجنورد، بجنورد وحشی و فریمان؛ با رنگ سبز) که جمعیت ۲ را تشکیل داده‌اند هر کدام در یک ناحیه خاص از بای‌پلات قرار گرفته‌اند (شکل ۴).

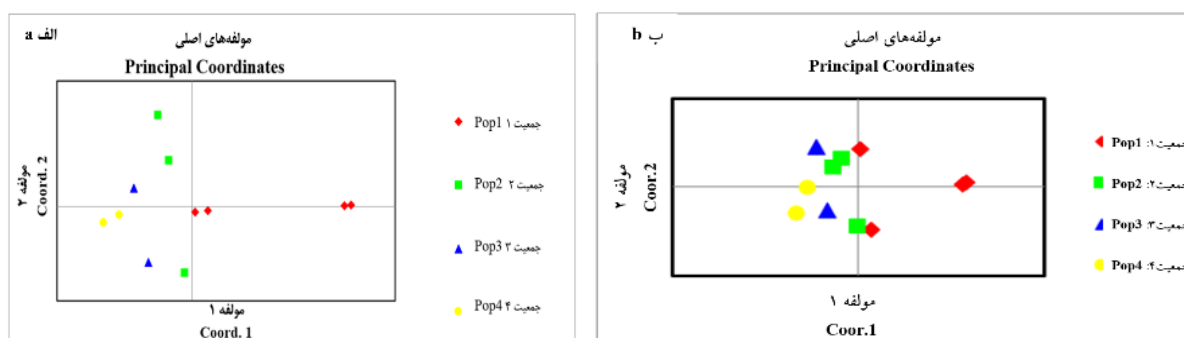
تجزیه به مختصات اصلی: بر اساس داده‌های SCoT، سه مؤلفه اول ۹۴/۸۲ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مؤلفه اول ۸۴/۲۶ درصد، مؤلفه دوم ۶/۲۵ درصد و مؤلفه سوم ۴/۳۱ درصد از واریانس کل را به خود اختصاص دادند. بر اساس داده‌های ISSR، سه مؤلفه اول ۹۸/۴۳ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. مؤلفه اول ۹۱/۸۶ درصد، مؤلفه دوم ۴/۶۴ درصد و مؤلفه سوم ۱/۹۲ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند. (جدول ۱۱).

نمودار پراکنش اکوتیپ‌ها نشان می‌دهد که اکوتیپ‌های شاهدانه پراکندگی مناسبی داشته؛ از این‌رو تنوع ژنتیکی کافی در بین آنها وجود داشت. در این نمودار چنانچه اکوتیپ‌ها در یک ناحیه‌ی خاص از نمودار پراکنش داشته باشند، نشان‌دهنده‌ی نزدیکی و در نتیجه تشابه ژنتیکی آنها

جدول ۱۱- تجزیه به مختصات اصلی بر اساس داده‌های نشانگرهای ISSR و SCoT در اکوتیپ‌های شاهدانه

Table 11. Principal Coordinate Analysis based on ISSR and SCoT marker data in *Cannabis sativa* ecotypes

مؤلفه Component	ISSR			SCoT		
	مقدار ویژه Eigen Value	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی	مقدار ویژه Eigen value	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
		Variance (%)	Cumulative variance (%)		Variance (%)	Cumulative variance (%)
PC ₁	3.77	91.86	91.86	3.78	84.26	84.26
PC ₂	0.19	4.64	96.51	0.28	6.25	90.51
PC ₃	0.08	1.92	98.43	0.19	4.31	94.82



شکل ۴- بای‌پلات داده‌های الف- ISSR ب- SCoT در اکوتیپ‌های شاهدانه

Figure 4. Biplot of a- ISSR b- SCoT data in *Cannabis sativa* ecotypes

جمعیت ۱: خراسان جنوبی (خوسف، طبس گلشن، سه‌قلعه، بشرویه)، جمعیت ۲: خراسان رضوی و شمالی (بجنورد، بجنورد وحشی، فریمان)، جمعیت ۳: (افغانستان، افغانستان ۱)، جمعیت ۴: (تبریز و قزوین)

Pop1: South Khorasan (Khusf, Tabas Golshan, SeQaleh, Boshroyeh); Pop2: Razavi and North Khorasan (Bojnord, Wild Bojnord, Fariman); Pop3: (Afghanistan, Afghanistan1); Pop4: (Tabriz, Qazvin)

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) روشی فضایی برای مرتب‌سازی داده‌ها برای تجسم الگوهای روابط ژنتیکی موجود در ماتریس‌های بزرگ است که خواندن و تفسیر آن‌ها غیرممکن است. در بررسی داده‌های مولکولی بهترین حالت این است که آغازگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در سطح کل ژنوم داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را پوشش دهند. در صورتی که آغازگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشند، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه به مؤلفه‌های بیشتری جهت توجیه تغییرات کل نیاز است (Mohammadi, 2006). نمودار پراکنش اکوتیپ‌ها نشان داد که توزیع اکوتیپ‌ها مشابه با توزیع آن‌ها در تجزیه خوشه‌ای و منطبق بر ماتریس تشابه بود. به عبارت دیگر نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی تا حد زیادی تأییدکننده‌ی هم بودند. پراکندگی اکوتیپ‌ها در نواحی مختلف نمودار بار دیگر وجود تنوع ژنتیکی در شاهدانه را تأیید نمود، لیکن با توجه به اینکه این نمودار بر اساس تمامی مؤلفه‌ها ترسیم نمی‌گردد، بنابراین از تمامی اطلاعات داده‌ها استفاده نمی‌نماید، اما تجزیه خوشه‌ای که از تمامی اطلاعات استفاده می‌کند، گروه‌بندی کامل‌تر و جامع‌تری را نسبت به پراکنش داده‌ها (بر اساس دو مؤلفه) ارائه می‌دهد. بنابراین چنانچه در مطالعات آینده دورگ‌گیری بین اکوتیپ‌ها مد نظر باشد، احتمال بیشترین هتروزیس از تلاقی این اکوتیپ‌ها با یکدیگر مورد انتظار است. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اکوتیپ‌های نزدیک از لحاظ جغرافیایی لزوماً از لحاظ ژنتیکی نزدیک به هم نیستند؛ به عبارت دیگر تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نداشت.

به‌طور کلی، آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه توانستند جمعیت‌ها را به‌خوبی از یکدیگر متمایز کنند و از نظر ویژگی‌های نشانگری کارایی مطلوبی نشان دادند. نتایج نشان داد که هر دو نشانگر ISSR و SCoT ظرفیت آشکارسازی تغییرات ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های مختلف شاهدانه را دارد. هر دو نشانگر کارایی مطلوب و مشابهی در آشکارسازی تفاوت‌ها و شباهت‌های مولکولی داشتند و از این حیث هیچ کدام بر دیگری برتری معنی‌داری نداشتند. نشانگرهای حاضر تا حد نسبتاً زیادی از نظر تمایز اکوتیپ‌ها متناسب با موقعیت جغرافیایی آن‌ها موفق بودند، لیکن فواصل ژنتیکی از فواصل جغرافیایی تبعیت ننمود که علت این موضوع می‌تواند جریان ژنی بین اکوتیپ‌ها به دلیل اختلاط بذور، انتقال خزانه‌ژنی از یک مکان به مکان دیگر، دگرگرده‌افشانی گیاه و یا خاستگاه مشترک اکوتیپ‌ها باشد. بر اساس تمامی نتایج، اکوتیپ‌های قزوین-افغانستان و قزوین-سه‌قلعه به‌عنوان دورترین و اکوتیپ‌های فریمان-سه‌قلعه به‌عنوان نزدیک‌ترین اکوتیپ‌ها شناخته شدند. به این ترتیب می‌توان تلاقی اکوتیپ قزوین-افغانستان را به‌منظور ایجاد تنوع و بهره‌جستن از هتروزیس توصیه نمود. بر اساس نتایج این آزمایش تنوع قابل‌توجهی در میان اکوتیپ‌های شاهدانه مشاهده شد. پیشنهاد می‌گردد تا در مطالعات آینده اکوتیپ‌های مذکور با نشانگرهای بیشتری مورد مطالعه قرار گیرند و ارتباط بین صفات مورفولوژیکی، فنولوژیکی و کمی با نشانگرها مورد واکاوی قرار گیرد.

سپاسگزاری

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

References

- Agrama, H. and Tuinstra, M. (2003). Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology*, 2: 334-340.
<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1069>
- Aina, A., Wenger, J.P., Stanton, E., Majumdar, C.G., ElSohly, M., Weiblen, G.D. and Ellison, S. (2025). Genetic diversity, population structure, and cannabinoid variation in feral *Cannabis sativa* germplasm from the United States. *Scientific Reports*, 15(1): 20423.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-07912-8>
- Alsaleh, A. and Yilmaz, G. (2025). Exploring cannabidiol variations, investigation of genetic diversity, population structure and unveiling male-specific genetic marker in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 72: 797-814.
<https://doi.org/10.1007/s10722-024-02015-1>

- Asadi, S., Moghadam, H., Naghdi Badi, H., Naghavi, M. and Salami, S. (2019). A review on agronomic, phytochemical and pharmacological aspects of cannabis (*Cannabis sativa* L.). Journal of Medicinal Plants, 18 (70): 1-20.
<https://doi.org/10.29252/jmp.2.70.1>
- Babaei, M., Nemati, H., Arouiee, H. and Torkamaneh, D. (2024). Characterization of indigenous populations of cannabis in Iran: a morphological and phenological study. BMC Plant Biology, 24: 151.
<https://doi.org/10.1186/s12870-024-04841-y>
- Bahari, Z., Shojaeiyan, A., Rashidi Monfared, S., Mirshekari, A., Nasiri, K. and Amiriyan, M. (2015). Investigation of genetic diversity among some Iranian dill (*Anethum graveolens* L.) landraces, using ISSR markers. Plant Genetic Research, 2(1): 11-22 (In Persian).
<https://doi.org/10.29252/pgr.2.1.11>
- Botstein, D., White, R.L. and Skolnick, M. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 314-322.
- Datwyler, S.L. and Weiblen, G.D. (2006). Genetic Variation in Hemp and Marijuana Cannabis. Journal of Forensic Sciences, 51: 371-375.
<https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00061.x>
- Del Rio, A.H., Bamberg, J.B., Huaman, Z., Salas, A. and Vega, S.E. (1997). Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 2. In situ vs ex situ. Theoretical and Applied Genetics, 95(1): 199-204.
<https://doi.org/10.1007/s001220050548>
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry, 19: 11-15.
- Dufresnes, C., Jan, C., Bienert, F., Goudet, J. and Fumagalli, L. (2017). Broad-scale genetic diversity of cannabis for forensic applications. Public Library of Science One Journal, 12: e0170522.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170522>
- Faeti, V., Mandolino, G. and Ranalli, P. (1996). Genetic diversity of *Cannabis sativa* germplasm based on RAPD markers. Plant Breeding, 115: 67-370.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00935.x>
- Forapani, S., Carboni, A., Paoletti, C., Moliterni, V.M.C., Ranalli, P. and Mandolino, G. (2001). Comparison of hemp varieties using random amplified polymorphic DNA markers. Crop Science, 41: 1682-1689.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2001.1682>
- Gillan, R., Cole, M.D., Linacre, A., Thorpe, J.W. and Watson, N.D. (1995). Comparison of *Cannabis sativa* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study. Science Justice, 35: 169-177.
[https://doi.org/10.1016/S1355-0306\(95\)72658-2](https://doi.org/10.1016/S1355-0306(95)72658-2)
- Golmohammadi, S., Bakhshi, D. and Jahangirzadeh Khiavi, S. (2025). Evaluation of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) germplasm from northern Iran using AFLP markers. Plant Genetic Research, 12(1): 75-90 (In Persian).
<https://doi.org/10.29252/pgr.2.1.11>
- Hakki, E.E., Kayis, S.A., Pinarkara, E. and Sag, A. (2007). Inter simple sequence repeats separate efficiently hemp from marijuana (*Cannabis sativa* L.). Electronic Journal of Biotechnology, 10: 570-581.
<https://doi.org/10.2225/vol10-issue4-fulltext-4>
- Hakki, E.E., Uz, E., Sag, A., Atasoy, S. and Akkaya, S.M. (2003). DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* L. accessions using RAPD and AFLP markers. Conference: 3rd European-Academy-of-Forensic-Science Meeting, 136: 31.
- Jagdish, V., Robertson, J. and Gibbs, A. (1996). RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. Forensic Science International, 79: 113-121.
[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(96\)01898-1](https://doi.org/10.1016/0379-0738(96)01898-1)
- 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.
- Khatak, S., Ghai, M. and Dahiya, S. (2016). ISSR marker based inter and intra-specific diversity analysis in different genotypes of *Cannabis sativa*. International Journal of Engineering Technology Science and Research, 4: 3.
- Lapierre, É., Ronne, D.M., Boulanger, R. and Torkamaneh, D. (2023). Comprehensive phenotypic characterization of Diverse Drug-Type Cannabis varieties from the Canadian Legal Market. Plants, 12: 3756.
<https://doi.org/10.3390/plants12213756>
- Lata, H., Chandra, S., Techen, N., Khan, I.A. and ElSohly, M.A. (2016). In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 3(1): 18-26.
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.12.001>
- Lemeshev, N., Rummyantseva, L. and Clarke, R.C. (1994). Maintenance of cannabis germplasm in the vavilov research institute gene bank. Journal of the International Hemp Association, 1: 1-5.
- Lewontin, R.C. (1972). The Apportionment of Human Diversity. In: Dobzhansky T., Hecht M.K., and Steere W.C., Eds., Evolutionary Biology, 381-398, Springer, New York, NY, USA.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9063-3_14
- Lynch, R.C., Vergara, D., Tittes, S., White, K., Schwartz, C.J., Gibbs, M.J., and Kane, N.C. (2016). Genomic and chemical diversity in Cannabis. Critical Reviews in Plant Sciences, 35 (5-6): 349-363.
<https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1265363>

- Kimura, M. and Crow, J.F. (1964) The Number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
<https://doi.org/10.1093/genetics/49.4.725>
- Mehdi, J., Husain, D., Srivastava, A., Gupta, N., Shanker, K., Talha, R.M., Kishor, A.L., Birendra, K. and Gupta, A.K. (2023). The genetic diversity and chemical profiling of natural populations of Indian Cannabis. *Industrial Crops and Products*, 203: 117187.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117187>
- 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 Plant Breeding*, 3: 127-136.
<https://doi.org/10.1023/A:1009633005390>
- Mir Drikvand, R. and Samiei, K. (2020). Evaluation and comparison of the efficiency of different molecular markers in estimating genetic distance of different persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) populations in Lorestan province, Iran. *Plant Genetic Research*, 7(1): 33-46 (In Persian).
<https://doi.org/10.52547/pgr.7.1.3>
- Mohammadi, S.A. (2006). The analysis of molecular data from the point of view of studying genetic diversity. The 9th Iranian Congress of Crop Science and Plant Breeding, University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian).
- Mostafaei Dehnavi, M., Ebadi, A., Peirovi, A., Taylor, G. and Salami, S.A. (2022). THC and CBD fingerprinting of an elite cannabis collection from Iran: quantifying diversity to underpin future cannabis breeding. *Plants*, 11(1): 129.
<https://doi.org/10.3390/plants11010129>
- Naim-Feil, E., Pembleton, L.W., Spooner, L.E., Malthouse, A.L., Miner, A., Quinn, M., Polotnianka, R.M., Baillie, R.C., Spangenberg, G.C. and Cogan, N.O.I. (2021). The characterization of key physiological traits of medicinal cannabis (*Cannabis sativa* L.) as a tool for precision breeding. *BMC Plant Biology*, 21: 294.
<https://doi.org/10.1186/s12870-021-03079-2>
- Pandey, Y., Chaturvedi, T., Swaroop, H., Gupta, A.K., Shanker, K. and Tiwari, G. (2023). Phytochemical and genetic marker (SCoT and CBDP) based study of genetic diversity and population structure in natural populations of Cannabis sativa L.: A high-value sustainable biodiversity of North-Indian Himalaya. *Industrial Crops and Products*, 200: 116892.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116892>
- Prentout, D., El Aoudati, S., Mathis, F., Marais, G.A.B. and Henri, H. (2025). Promising high fidelity genetic markers for sexing Cannabis sativa seedlings. *G3 (Bethesda)*, 4: 15(6): jkaf077.
<https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaf077>
- Punja, Z.K., Rodriguez, G. and Chen, S. (2017). Assessing genetic diversity in Cannabis sativa using molecular approaches. In: Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M., Eds., *Cannabis Sativa L. Botany and Biotechnology*, Springer, Cham, 395-418.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_19
- Riahi, L., Shokrpour, M., Salami, S.A. and Khandan, A. (2016). Some quantitative traits associations and their application in characterization of Iranian accessions of Cannabis (*Cannabis sativa* L.). *Iranian Journal of Field Crop Science*, 46(4): 629-639 (In Persian).
<https://doi.org/10.22059/ijfcs.2015.56812>
- Roder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Bömer, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. and Ganai, M.W. (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*, 246: 327-333.
<https://doi.org/10.1007/BF00288605>
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Bockstaele, V.E., Depicker, A. and Loose, D.M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6(2): 125-134.
<https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
- Salentijn, E.M.J., Zhang, Q., Amaducci, S., Yang, M. and Trindade, L.M. (2015). New developments in fiber hemp (*Cannabis sativa* L.) breeding. *Industrial Crops and Products*, 68: 32-41.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.011>
- Sawler, J., Stout, J.M., Gardner, K.M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L., Page, J.E. and Myles, S. (2015) The genetic structure of marijuana and hemp. *PLOS ONE*, 10(8): e0133292.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133292>
- Shams, R., Azizi, R., Hamzei, J., Noroozisharaf, A.R., Moghadam, S. and Kordrostami, M. (2020). Genetic structure and diversity of Iranian Cannabis populations based on phytochemical, agro-morphological and molecular markers. *Industrial Crops and Products*, 158: 112950.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112950>
- Soler, S., Gramazio, P., Figàs, M.R., Vilanova, S., Rosa, E., Llosa, E.R., Borràs, D., Plazas, M. and Prohens, J. (2017). Genetic structure of Cannabis sativa var. indica cultivars based on genomic SSR (gSSR) markers: Implications for breeding and germplasm management. *Industrial Crops and Products*, 104: 171-178.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.043>
- Soorani, A., Fatahi, R., Haak, D.C., Salami, S.A. and Bombarely, A. (2017). Assessment of genetic diversity and population structure in Iranian cannabis germplasm. *Scientific Reports*, 7(1): 1-10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15816-5>
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G.S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 120(3): 411-417.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.11.022>
- Wei, Y.M., Hou, Y.C. and Yan, Z.H. (2005). Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 46: 3-9.