Genetic diversity and relationships of populations of three *Lepidium* species using combined data analysis of molecular markers

Niloufar Jelvehgar[1], Seied Mehdi Miri[2*], Khodadad Mostafavi[3], Abdollah Mohammadi[3]

1. Ph.D Student, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Abstract

Aim and Background: The genus *Lepidium* L. is one of the three large genera of the Brassicaceae family, which are used as vegetables or medicinal plants. Knowing the relationships and genetic diversity of *Lepidium* L. species by molecular markers is an ideal approach to improve and conserve of their germplasm.

Material and methods: The genetic diversity and relationships among 22 populations belonging to three species of *L. sativum*, *L. draba* and *L. latifolium* using combined data of SSR, ISSR and SCoT markers based on analysis of molecular variance, indices of genetic diversity, cluster analysis, principal coordinates analysis and genetic structure were investigated.

Results: Analysis of molecular variance showed that the genetic diversity within the groups is more than between the groups. The highest and lowest genetic diversity was related to *L. sativum* and *L. latifolium*, respectively. The highest Nei genetic similarity matrix was observed between *L. draba* and *L. latifolium* and the lowest similarity between *L. sativum* and *L. latifolium*. Neighbor-Joining cluster analysis divided the *Lepidium* populations into three groups and there was a weak separation between the species, which was confirmed by principal coordinate's analysis and genetic structure, and it seems to be due to the gene flow among the populations of different *Lepidium* species and the existence of a common gene pool between them.

Conclusion: The results showed that the populations of the three studied *Lepidium* species have a high level of genetic diversity and gene flow, which can be used as valuable genetic resources in breeding programs.

Keywords: Lepidium, genetic diversity, molecular markers, Iau science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

Corresponding author:
Department of Agriculture and Natural Resources, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
Email: smmiri@kiau.ac.ir

مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی توده‌های سه گونه لپیدیوم با استفاده از تجزیه داده‌های ترکیبی نشانگرهای مولکولی

نیلوفر جلوه‌گر[۱]، سید مهدی میری[۲*]، خداداد مصطفوی[۳]، عبداله محمدی[۳]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲. دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۳. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: جنس لپیدیوم (*Lepidium* L.) یکی از سه جنس بزرگ خانواده شب‌بو هست که به عنوان سبزی و گیاه دارویی مورد مصرف قرار می‌گیرد. اطلاع از روابط و تنوع ژنتیکی گونه‌های لپیدیوم به وسیله نشانگرهای مولکولی یک راه‌کار مطلوب برای اصلاح و حفاظت از ژرم‌پلاسم آنها می‌باشد. این پژوهش با هدف مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی توده‌های سه گونه لپیدیوم با استفاده از تجزیه داده‌های ترکیبی سه نشانگر مولکولی SSR، ISSR و SCoT انجام شد.

مواد و روش‌ها: تنوع ژنتیکی و روابط بین ۲۲ توده متعلق به سه گونه لپیدیوم ساتیوم (*L. sativum*) ، لپیدیوم درابا (*L. draba*) و لپیدیوم لاتیفولیوم (*L. latifolium*) با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، شاخص‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و ساختار ژنتیکی بررسی شد.

یافته‌ها: تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی درون گروهی بیشتر از بین گروهی است. بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی به ترتیب مربوط به لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم لاتیفولیوم بود. بیشترین ماتریس تشابه ژنتیکی Nei بین لپیدیوم درابا و لپیدیوم لاتیفولیوم و کمترین تشابه بین لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم لاتیفولیوم مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-Joining توده‌های لپیدیوم را به سه گروه تقسیم کرد و تفکیک ضعیفی بین گونه‌ها وجود داشت که توسط تجزیه به مختصات اصلی و ساختار ژنتیکی تایید شد و به نظر می‌رسد به دلیل جریان ژنی بین توده‌های گونه‌های مختلف لپیدیوم و وجود مخزن ژنی مشترک بین آن‌ها باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد توده‌های سه گونه لپیدیوم مورد مطالعه سطح بالایی از تنوع ژنتیکی و جریان ژنی دارند که می توانند به عنوان منابع ژنتیکی ارزشمندی در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: لپیدیوم، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، Iau science.

مقدمه

لپیدیوم (*Lepidium* L.) یکی از سه جنس بزرگ خانواده Brassicaceae هست که حدود ۲۶۰ گونه در جهان دارد. مناطق پراکنش گونه‌های این جنس بیشتر آسیای مرکزی، میانه و جنوب غربی بوده و در ایران ۱۶ گونه آن شناسایی شده است (۱،۲). برخی از گونه‌های لپیدیوم در دسته سبزیجات قرار دارند و یا در درمان بیماری‌های مختلف مانند بیماری‌های دستگاه گوارش و تنفسی مورد مصرف قرار می‌گیرند (۳،۴). تنوع ژنتیکی یکی از اجزا مهم تنوع زیستی است که به تنوع صفات وراثتی اشاره دارد و موجب تغییرات در خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و توالی DNA می‌شود (۵،۶). برنامه‌های اصلاحی نه تنها نیازمند دسترسی به این تنوع‌ها می‌باشند بلکه وابسته به نگهداری و مدیریت صحیح حفظ و استفاده از آنها نیز هستند. بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصین بهنژادی گیاهان را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف بهنژادی مهم یاری می‌نماید. همچنین مطالعه الگوپذیری تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ‌ها نشان دهنده سازگاری‌های احتمالی آنها با محیط‌های متفاوت و تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد (۷). امروزه استفاده از این ابزار به دلیل دارا بودن مزایای مطلوب زیاد مانند داشتن وراثت مندلی، چندشکلی بالا، هم‌بارز بودن، داشتن قدرت تمایز بین افراد هتروزیگوت

نویسنده مسئول:
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
پست الکترونیکی: smmiri@kiau.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

و هموزیگوت، تکرارپذیری بالا، بیان مستقل از محیط، نماینده‌ای از کل ژنوم فرد بودن، کم هزینه بودن و قابلیت استفاده سریع و راحت آنها موجب موفقیت بسیاری از برنامه‌های بهنژادی گیاهان شده است (۸). با توجه به اینکه هر روش مزایا و محدودیت‌های خود را دارد، می‌توان با انتخاب ترکیبی از نشانگرهای مختلف به راحتی برای غلبه بر معایب هر نشانگر استفاده کرد (۹).

مطالعات متعددی بر روی تنوع ژنتیکی گونه‌های لپیدیوم با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام شده که عمدتاً روی گونه شاهی (لپیدیوم ساتیوم) بوده است (۱۰). هدف از این مطالعه، ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط بین جمعیت‌های سه گونه لپیدیوم با استفاده از تجزیه داده‌های ترکیبی سه نشانگر مولکولی SSR[1]، ISSR[2] و SCoT[3] برای استفاده از آنها در برنامه‌های بهنژادی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این تحقیق شامل ۲۲ توده لپیدیوم از گونه-های لپیدیوم ساتیوم (شاهی)، لپیدیوم درابا (ازمک) و لپیدیوم لاتیفولیوم (ترتیزک برگ پهن یا موچه) بودند که بذر آنها از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور و کشاورزان محلی تهیه و مشخصات آن در جدول ۱ ارایه شده است.

پس از کشت بذرها در سینی‌های مخصوص نشا در گلخانه و تولید گیاهچه، استخراج DNA ژنومی از بافت برگ‌های جوان با استفاده از کیت تجاری (Qiagen, USA, Cat. No. 69104) انجام شد. کیفیت DNA استخراجی توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۷ درصد و اسپکتوفتومتر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی از ۱۴ آغازگر برای هر کدام از نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT استفاده شد. پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرهای منتخب، اجزای واکنش PCR[4] شامل ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۳ میکرولیتر آب دیونیزه و ۵ میکرولیتر مسترمیکس (۲X) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود و کلیه واکنش‌های تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Corbett CGI–96, Palm–Cycler Thermal Cycler, USA) انجام شد. برنامه دمایی هر واکنش شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه در دمای بهینه سازی شده برای آغازگر مربوطه (جدول ۲) و توسعه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. پس از انجام واکنش تکثیر، محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برای نشانگرهای ISSR و SCoT و ۲ درصد برای نشانگرهای SSR تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با اتیدیوم بروماید انجام و عکس‌برداری از آنها صورت گرفت.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی و کد توده‌های سه گونه لپیدیوم مورد استفاده در این پژوهش

شماره	گونه	استان، شهر	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (m)	کد جمعیت	محل تهیه
۱	لپیدیوم لاتیفولیوم	یزد، خاتم	۳۰°۳۵'۰۷"N	۵۳°۵۹'۶۴"E	۲۱۸۶	۳۳۸۴۵	RIFR
۲	لپیدیوم لاتیفولیوم	یزد، طبس	۳۳°۲۱'۳۵"N	۵۶°۲۰'۳۲"E	۱۵۶۵	۳۳۸۲۸	RIFR
۳	لپیدیوم لاتیفولیوم	یزد، طبس	۳۳°۴۹'۲۲"N	۵۶°۵۲'۳۴"E	۹۴۸	۳۳۷۶۰	RIFR

1. Simple sequence repeat
2. Inter simple sequence repeat
3. Start codon targeted
4. Polymerase chain reaction

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

۴	لپیدیوم لاتیفولیوم	یزد، طبس	۳۳°۳۷'۵۷"N	۵۷°۰۹'۴۶"E	۱۳۶۶	۳۳۷۸۰	RIFR
۵	لپیدیوم لاتیفولیوم	یزد، مهریز	۳۱°۳۰'۲۳"N	۵۴°۱۸'۲۸"E	۲۱۸۹	۳۳۸۱۳	RIFR
۶	لپیدیوم لاتیفولیوم	اصفهان، شهرضا	۳۱°۴۰'۶۷"N	۵۱°۴۷'۲۵"E	۱۷۶۵	۲۷۲۶۲	RIFR
۷	لپیدیوم لاتیفولیوم	یزد، تفت	۳۱°۳۴'۴۳"N	۵۳°۵۴'۴۱"E	۲۷۵۳	۳۳۶۷۸	RIFR
۸	لپیدیوم درابا	کهکیلویه و بویراحمد، یاسوج	۳۰°۵۸'۱۹"N	۵۱°۱۳'۱۱"E	۱۵۹۵	۳۱۲۱۴	RIFR
۹	لپیدیوم درابا	همدان، همدان	۳۴°۴۸'۱۰"N	۴۸°۲۸'۵۴"E	۱۸۶۰	۴۳۶۹۹	RIFR
۱۰	لپیدیوم درابا	خراسان جنوبی، سربیشه	۳۲°۰۸'۹۰"N	۵۹°۰۶'۰۰"E	۱۵۴۰	۴۱۶۱۸	RIFR
۱۱	لپیدیوم درابا	اردبیل، نیر	۳۸°۰۱'۲۵"N	۴۷°۵۷'۶۷"E	۱۷۳۲	۳۶۸۳۴	RIFR
۱۲	لپیدیوم درابا	همدان، اسدآباد	۳۴°۵۰'۱۵"N	۴۸°۱۰'۱۸"E	۲۰۸۹	۳۳۱۶۹	RIFR
۱۳	لپیدیوم درابا	خراسان جنوبی، خوسف	۳۲°۳۹'۰۶"N	۵۸°۷۲'۴۵"E	۱۳۵۴	۴۴۴۸۵	RIFR
۱۴	لپیدیوم درابا	مرکزی، ساوه	۳۵°۰۶'۳۰"N	۴۹°۴۰'۵۲"E	۱۶۲۰	۳۵۴۱۸	RIFR
۱۵	لپیدیوم ساتیوم	اصفهان، اصفهان	۳۲°۴۰'۲۲"N	۵۱°۳۹'۵۵"E	۱۵۷۹	P۱۰۱۲۴۸۴	IBRC
۱۶	لپیدیوم ساتیوم	تهران، تهران	۳۵°۳۵'۵۶"N	۵۱°۲۶'۰۹"E	۱۰۶۵	P۱۰۱۳۴۷۳	IBRC
۱۷	لپیدیوم ساتیوم	آذربایجان شرقی، تبریز	۳۸°۰۴'۱۸"N	۴۶°۱۷'۳۲"E	۱۳۹۲	–	کشاورز
۱۸	لپیدیوم ساتیوم	خراسان رضوی، مشهد	۳۶°۱۴'۵۵"N	۵۹°۳۹'۱۶"E	۹۷۲	P۱۰۱۲۲۳۰	IBRC
۱۹	لپیدیوم ساتیوم	مرکزی، اراک	۳۴°۰۵'۱۵"N	۴۹°۴۲'۱۰"E	۱۷۳۷	P۱۰۱۲۴۴۰	IBRC

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

۲۰	لپیدیوم ساتیوم	گیلان، رشت	۳۷°۱۴'۲۸"N	۴۹°۵۳'۰۷"E	۵۹۶	P۱۰۱۲۲۷۶	IBRC
۲۱	لپیدیوم ساتیوم	قزوین، قزوین	۳۶°۱۶'۴۰"N	۵۰°۰۰'۲۶"E	۱۳۱۰	P۱۰۱۲۳۲۴	IBRC
۲۲	لپیدیوم ساتیوم	آذربایجان غربی، ارومیه	۳۷°۳۲'۴۳"N	۴۵°۰۳'۲۹"E	۱۳۶۰	–	کشاورز

RIFR: موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، IBRC: مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

جدول ۲- آغازگرهای سه نشانگر مورد استفاده و دمای اتصال آنها

SSR			ISSR			SCoT		
نام آغازگر	دمای اتصال (°C)	منبع	نام آغازگر	دمای اتصال (°C)	منبع	نام آغازگر	دمای اتصال (°C)	منبع
Lsub01	۵۱/۸	۱۵	812	۵۶	۱۸	SCoT-02	۴۸/۹	۳۶
Lsub02	۵۵/۹	۱۵	834	۵۸	۱۸	SCoT-03	۴۹	۳۶
Lsub07	۵۲/۳	۱۵	873	۵۱	۱۸	SCoT-05	۴۷	۳۶
Lsub08	۵۱/۸	۱۵	9974-052	۴۷	۳۴	SCoT-06	۴۹	۳۶
Lsub10	۵۱/۸	۱۵	9974-060	۷۲	۳۴	SCoT-12	۴۹	۳۶
Lsub11	۵۰/۵	۱۵	9973-006	۵۵	۳۴	SCoT-14	۵۴/۷	۳۶
Lsub12	۵۱/۸	۱۵	BH-02	۵۸	۳۴	SCoT-15	۵۴/۷	۳۶
Na10-B10	۵۳/۸	۳۳	UBC-823	۵۵	۳۵	SCoT-16	۵۴/۷	۳۶
Na10-D09	۵۵/۹	۳۳	KJ-10	۵۲	۳۴	SCoT-17	۵۴/۷	۳۶
Ni2-B01	۵۰/۵	۳۳	KJ-11	۶۳/۷	۳۴	SCoT-18	۵۴/۷	۳۶
Ni2-B02	۵۳/۸	۳۳	KJ-15	۵۹	۳۴	SCoT-19	۴۹	۳۶
Ni2-F02	۵۲/۳	۳۳	9973-007	۵۲/۳	۳۴	SCoT-20	۴۹	۳۶
Ni10-G10	۵۱/۱	۳۳	9974-051	۵۱/۱	۳۴	SCoT-21	۴۹	۳۶
O109-A03	۴۹/۷	۳۳	880	۴۹/۷	۱۸	SCoT-39	۴۷	۳۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

پس از امتیازدهی الگوهای باندی بر اساس معیار یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند)، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA[5]) و محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد الل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد الل‌های موثر (Ne)، شاخص اطلاعات شانون (I)، شاخص تنوع ژنی نی (He) و درصد چندشکلی مکان‌های ژنی (PPL) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.5 انجام شد. مقادیر تشابه ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه و به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها، آنالیزهای مربوطه شامل تجزیه به مختصات اصلی (PCoA[6]) و تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-Joining (NJ) با استفاده از نرم‌افزارهای GenAlEx 6.5 و DARwin 5 صورت گرفت. همبستگی بین ماتریس ضرایب کوفنتیک و ماتریس ضرایب تشابه جاکارد توسط نرم‌افزار NTSYS انجام شد. برای درک بهتر تنوع ژنتیکی موجود در توده‌ها، وجود زیرجمعیت‌ها با روش Bayesian و نرم‌افزار Structure 2.3.4 با ۱۰۰۰۰۰ جایگشت بررسی شد (۱۱). تعداد خوشه‌هایی که ساختار جمعیت را بهتر نشان می‌دادند (K) با نرم‌افزار Structure Harvester 6.0 تعیین گردید (۱۲).

یافته‌ها

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۳۰ درصد از تغییرات کل مربوط به تنوع بین گروهی است در حالی که ۷۰ درصد از تغییرات با تنوع درون گروهی قابل توجیه می‌باشد (جدول ۳). افزون بر واریانس بین و درون گروهی، مقادیر تمایز ژنتیکی بین گونه‌ها (Gst) و جریان ژنی (Nm) محاسبه شد. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش، مقدار Gst برای ۲۲ توده لپیدیوم مورد بررسی برابر ۰/۲۵ و میزان Nm برابر ۱/۵۰ بود.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی ۲۲ توده لپیدیوم با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مولفه‌های واریانس تخمینی	درصد واریانس	تمایز ژنتیکی بین گونه‌ها	جریان ژنی	آزمون فرض $p < 0.001$
بین گروهی	۲	۱۸۶/۱۶	۹۳/۰۸	۹/۶۱	۳۰	۰/۲۵	۱/۵۰	۰/۲۹
درون گروهی	۱۹	۴۳۲/۱۱	۲۲/۷۴	۲۲/۷۴	۷۰			
کل	۲۱	۶۱۸/۲۷		۳۲/۳۵	۱۰۰			

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مورد بررسی، شاخص‌های ژنتیکی محاسبه شد (جدول ۴). در مقایسه بین گونه‌های مورد مطالعه، گونه‌های لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم درابا بر اساس میانگین تعداد الل‌های مشاهده شده و درصد مکان‌های چندشکل از تنوع بیشتری برخوردار بوده و به ترتیب برابر ۱/۷۷ و ۸۴/۸۷ بودند. مقادیر تعداد الل‌های موثر، شاخص شانون و مقدار تنوع ژنی Nei (۱۳) در لپیدیوم ساتیوم بیشتر و به ترتیب ۱/۵۰، ۰/۴۴ و ۰/۲۹ بود. کمترین شاخص‌های ژنتیکی نیز به گونه لپیدیوم لاتیفولیوم تعلق داشت، بطوریکه مقادیر Na، Ne، I، He و PPL به ترتیب برابر ۱/۳۹، ۱/۳۴، ۰/۳۰، ۰/۲۰ و ۵۹/۸۷ بدست آمد.

5. Analysis of molecular variance

6. Principal coordinates analysis

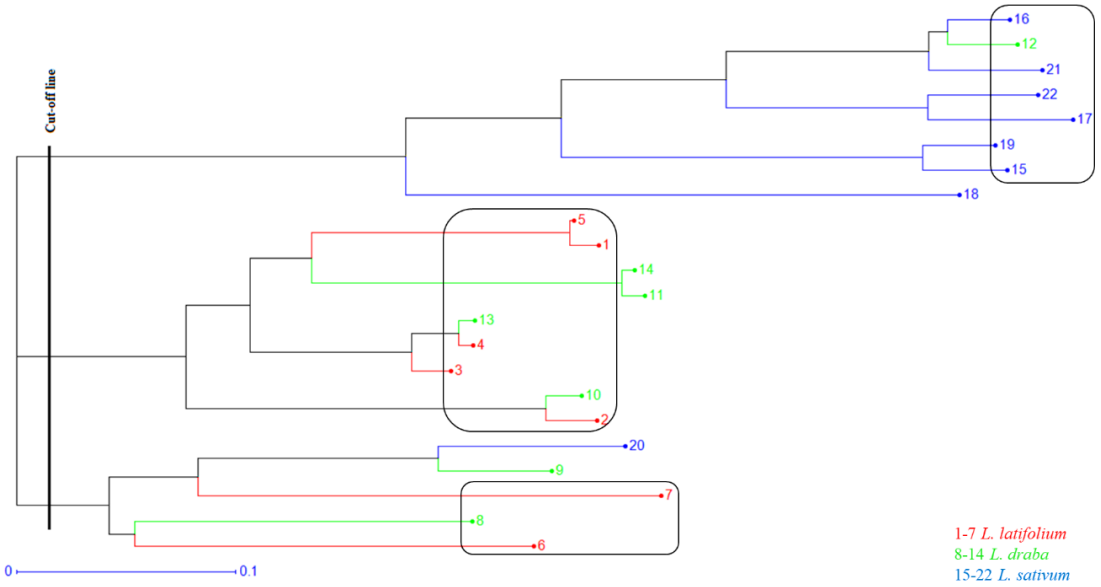
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

جدول ۴- مقادیر پارامترهای تنوع ژنتیکی سه گونه لپیدیوم با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT

گونه	Na	Ne	I	He	PPL
لپیدیوم لاتیفولیوم	۱/۳۹	۱/۳۴	۰/۳۰	۰/۲۰	۵۹/۸۷
لپیدیوم درابا	۱/۷۷	۱/۴۷	۰/۴۲	۰/۲۸	۸۴/۸۷
لپیدیوم ساتیوم	۱/۷۷	۱/۵۰	۰/۴۴	۰/۲۹	۸۴/۸۷

Na: میانگین تعداد الل‌های مشاهده شده ، Ne: تعداد الل‌های مؤثر، I: شاخص شانون ، He: مقدار تنوع ژنی نی، PPL: درصد مکان‌های چندشکل

به‌منظور تخمین روابط ژنتیکی میان توده‌های سه گونه لپیدیوم، گروه‌بندی بر اساس ضریب شباهت جاکارد و الگوریتم NJ صورت گرفت. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس داده‌های ترکیبی هر سه نشانگر، ۲۲ توده لپیدیوم را به سه گروه مجزا تقسیم کرد (شکل۱). گروه اول شامل پنج توده لپیدیوم لاتیفولیوم و چهار توده لپیدیوم درابا، گروه دوم شامل یک توده از لپیدیوم درابا و تمام توده‌های لپیدیوم ساتیوم (به جز توده شماره ۲۰)، و گروه سوم شامل دو توده از هر دو گونه لپیدیوم لاتیفولیوم و لپیدیوم درابا و همچنین یک توده از لپیدیوم ساتیوم بود. ضریب همبستگی کوفنتیک بین دندروگرام NJ و ماتریس شباهت ژنتیکی نیز برازش خوبی را نشان داد (r = ۰/۹۸). بر اساس ماتریس تشابه دو به دوی گونه‌ها به روش Nei (۱۴)، بیشترین تشابه (r = ۰/۹۴) بین گونه‌های لپیدیوم درابا و لپیدیوم لاتیفولیوم و کمترین تشابه (r = ۰/۷۱) بین لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم لاتیفولیوم بدست آمد (جدول ۵). ضریب همبستگی کوفنتیک که معیاری برای نکویی برازش گروه‌بندی می‌باشد در این مطالعه r = ۰/۹۸ بود که برازش مناسب تجزیه خوشه‌ای در تفکیک توده‌ها و صحت گروه‌بندی را نشان می‌دهد. نمودار پراکندگی حاصل از PCoA برای درک بهتر روابط ژنتیکی بین توده‌ها انجام شد (شکل ۲). دو مولفه نخست به ترتیب ۶۲/۴۹ و ۱۵/۳۹ درصد و در مجموع ۷۷/۸۸ درصد از کل تغییرات ژنتیکی موجود در توده‌های لپیدیوم را توجیه نمودند مشابه گروه‌بندی NJ، تمام توده‌های لپیدیوم درابا (به جز شماره ۱۲) و لپیدیوم لاتیفولیوم با هم در دو گروه قرار گرفتند، در حالی که بیشتر توده‌های لپیدیوم ساتیوم (به جز شماره‌های ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰) در یک گروه مجزا قرار گرفتند.

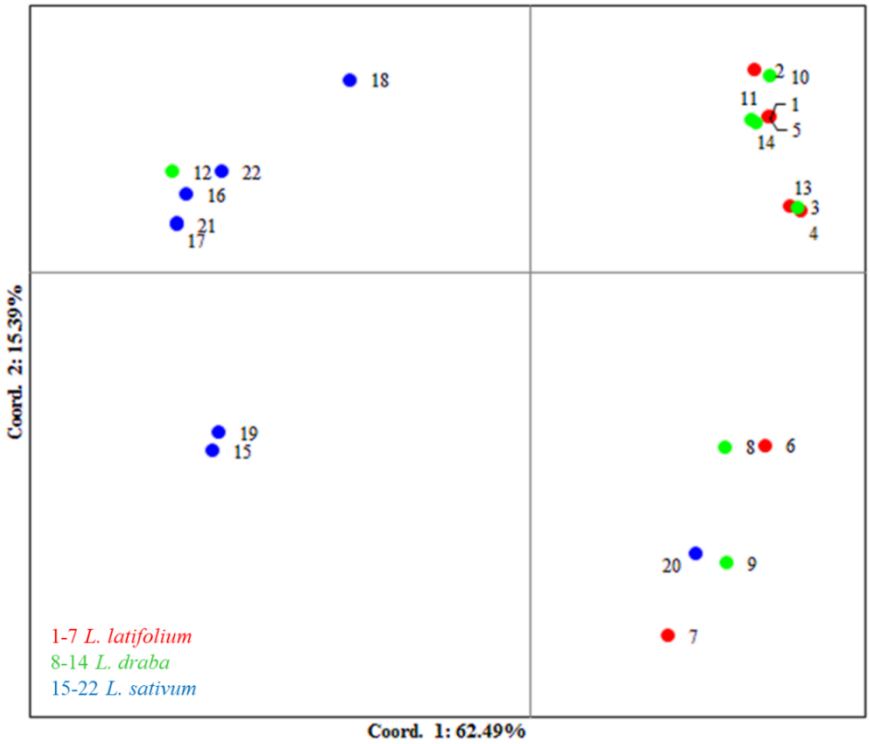


شکل ۱- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۲۲ توده لپیدیوم بر اساس ضریب فاصله جاکارد و الگوریتم Neighbor-Joining با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT. اعداد تصویر مطابق شماره توده‌ها در جدول ۱ است. توده‌های داخل یک کادر در موقعیت جغرافیایی یا اکولوژیکی مشابهی قرار دارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

جدول ۵- ضرایب تشابه ژنتیکی Nei بین سه گونه لپیدیوم با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT

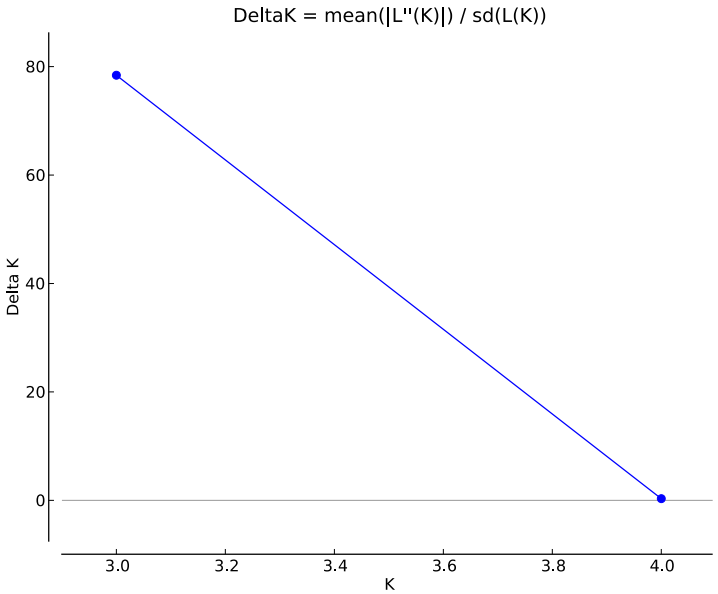
گونه	لپیدیوم درابا	لپیدیوم لاتیفولیوم
لپیدیوم درابا		۰/۹۴
لپیدیوم ساتیوم	۰/۸۳	۰/۷۱



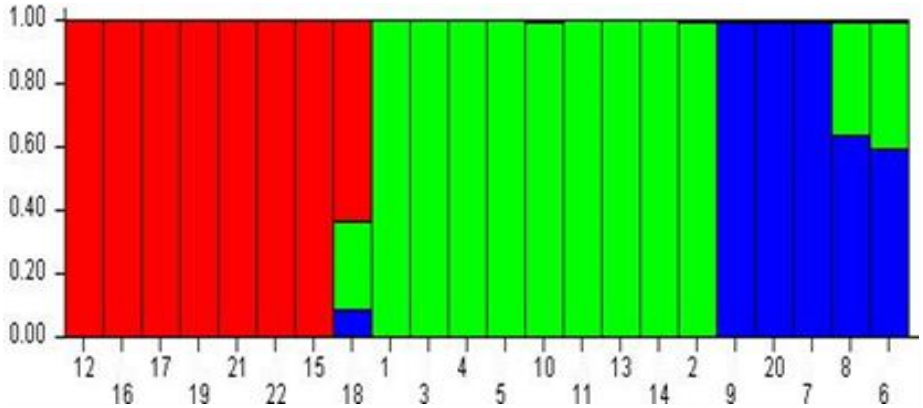
شکل ۲- پراکنش ۲۲ توده لپیدیوم بر اساس دو بردار نخست حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT. اعداد تصویر مطابق شماره توده‌ها در جدول ۱ است.

مدل خوشه‌بندی Bayesian برای بررسی ساختار ژنتیکی در بین ۲۲ توده گونه‌های لپیدیوم اجرا شد. تعداد بهینه زیرجمعیت‌ها بر اساس بالاترین مقادیر ΔK و L(K) به دست آمده از طریق Structure Harvester تعیین شد و مناسب‌ترین تعداد زیرجمعیت‌ها برابر ۳ = K برای داده‌های ترکیبی بدست آمد (شکل ۳). ساختار جمعیت بر اساس داده‌های ترکیبی سه نشانگر سه زیرجمعیت را شناسایی کرد که ۹ توده در زیرجمعیت ۱ (قرمز)، ۸ توده در زیرجمعیت ۲ (سبز) و ۵ توده در زیرجمعیت ۳ (آبی) قرار گرفتند (شکل۴). نمودار ساختار ژنتیکی نشان داد که چهار توده از هر دو گونه لپیدیوم درابا و لپیدیوم لاتیفولیوم (۵۷/۱ درصد توده‌ها) خالص و سه توده دیگر از هر دو گونه مخلوط بودند، در حالی که در لپیدیوم ساتیوم، فقط دو توده (۲۵/۰ درصد توده‌ها) خالص و شش توده دیگر مخلوط بودند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]



شکل ۳- تعیین تعداد مناسب زیرجمعیت‌های لپیدیوم بر اساس ΔK با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT



شکل ۴- ساختار زیرجمعیت‌های لپیدیوم با استفاده از داده‌های ترکیبی نشانگرهای SSR، ISSR و SCoT. اعداد تصویر مطابق شماره توده‌ها در جدول ۱ است.

بحث

تجزیه واریانس مولکولی بر اساس داده‌های ترکیبی سه نشانگر، تنوع ژنتیکی درون گروهی بیشتری را نسبت به تنوع بین گروهی نشان داد. سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های لپیدیوم ساتیوم با استفاده از نشانگرهای SSR (۱۵) و ISSR (۱۶) و در لپیدیوم درابا با استفاده از ISSR (۱۷) قبلا گزارش شده است که ممکن است به ماهیت دگرگشن بودن این گونه‌ها مرتبط باشد. Mohammed و Tesfaye (۱۸) با استفاده از نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بیشتری را در مقایسه با بین جمعیتی در لپیدیوم ساتیوم مشاهده کردند و پیشنهاد دادند که این پدیده می‌تواند به دلیل جریان ژنی بالا بین جمعیت‌ها و مناطق از طریق تبادل بالای بذر در بین جوامع محلی و بازارها باشد. عوامل متعددی مانند روش تولید مثل، جریان ژنی، اندازه جمعیت و انتخاب بر میزان و توزیع تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها تاثیر می‌گذارد. منشا یک گونه گیاهی نیز عامل مهمی در حفظ سطوح بالای تنوع ژنتیکی است (۱۶، ۱۹). جنس لپیدیوم بیشتر در مناطق آسیای مرکزی، میانه و جنوب غربی پراکنده شده است (۱) که این می‌تواند دلیل احتمالی تنوع ژنتیکی بالای توده‌های لپیدیوم در ایران به عنوان یکی از مراکز تنوع باشد. مقدار Gst یک شاخص بسیار مفید برای نسبت تنوع ژنی است که بین جمعیت‌ها توزیع شده است و جمعیت‌هایی با مقادیر Gst بیش از ۰/۱۵ دارای سطوح بالایی از تمایز ژنتیکی هستند (۲۰). در نتایج ما، مقادیر Gst برابر ۰/۲۵ بود که نشان‌دهنده نسبت بزرگی از تمایز ژنتیکی در بین گونه‌ها است. از سوی دیگر، اگر Nm بیش از یک باشد، جریان ژنی می‌تواند از تمایز بین جمعیت‌ها به دلیل رانش ژنتیکی جلوگیری کند (۲۱). در مطالعه حاضر، مقدار Nm برابر ۱/۵۰ بود که نشان دهنده امکان جریان ژنی بین گونه‌های لپیدیوم مورد مطالعه است. میزان جریان ژنی به اندازه جمعیت، جداسازی مکانی، سیستم جفت‌گیری و توزیع دانه‌ها یا گرده‌ها

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

بین جمعیت‌ها بستگی دارد (۲۲). شاخص‌های تنوع ژنتیکی مانند Na، Ne، I، He و PPL پارامترهای مهم مورد استفاده در ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشند (۲۳). در مطالعه حاضر مقادیر بالاتری از این پارامترها در لپیدیوم ساتیوم و به دنبال آن لپیدیوم درابا و لپیدیوم لاتیفولیوم به دست آمد. این نتایج برخلاف یافته‌های Roughani و همکاران (۲۴) است که در آن بیشترین تنوع بر اساس صفات زراعی-مورفولوژیکی را در توده‌های لپیدیوم لاتیفولیوم در مقایسه با لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم درابا گزارش کردند. لپیدیوم ساتیوم یک گیاه یک ساله است در حالی که لپیدیوم درابا و لپیدیوم لاتیفولیوم گیاهانی چند ساله هستند (۲۵). علاوه بر این، لپیدیوم درابا سیستم خودناسازگاری اسپوروفیتیک دارد در حالی که لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم لاتیفولیوم گیاهانی خود- و دگرگرده‌افشان هستند (۲۴). تنوع ژنتیکی بالاتر لپیدیوم ساتیوم یا لپیدیوم درابا نسبت به لپیدیوم لاتیفولیوم ممکن است به ماهیت یک ساله بودن لپیدیوم ساتیوم و خودناسازگاری لپیدیوم درابا نسبت داده شود و این ویژگی‌های تولید مثلی ممکن است منجر به افزایش هتروزیگوسیتی شوند. علاوه بر این، لپیدیوم ساتیوم به طور گسترده توسط کشاورزان کشت می‌شود و پراکندگی نسبتاً بالایی دارد. به طور کلی، هرچه ناحیه توزیع بزرگتر باشد، تنوع ژنتیکی نیز بالاتر است (۲۳). مقادیر تشابه ژنتیکی نااریب Nei (۱۳) در میان گونه‌های لپیدیوم نشان داد که لپیدیوم ساتیوم و لپیدیوم لاتیفولیوم بیشترین فاصله را از یکدیگر دارند که قبلاً توسط صفات مورفولوژیکی (۲۴) و مقدار DNA هسته‌ای (۲۶) تأیید شده بود.

برازش خوب ضریب همبستگی کوفنتیک بین دندروگرام NJ و ماتریس شباهت ژنتیکی بیانگر آن است که داده‌های ترکیبی سه نشانگر مورد استفاده ابزار قابل اعتمادی برای تعیین ارتباط بین شباهت ژنتیکی و توزیع جغرافیایی و اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی بودند (۲۷). با توجه به تجزیه خوشه‌بندی NJ، سه گونه لپیدیوم در سه گروه اصلی قرار گرفتند که این گروه‌بندی با رده‌بندی گونه‌ها تطابق نداشته و توده‌های مربوط به هر گونه بطور توام در کنار یکدیگر قرار گرفتند. نتایج مشابهی توسط Roughani و همکاران (۲۸) روی سه گونه لپیدیوم ساتیوم، لپیدیوم درابا و لپیدیوم لاتیفولیوم بر اساس صفات مورفولوژیک بذر بدست آمد. Dianat و Hosseini (۲۹) نیز در بررسی تنوع مورفولوژِیکی ۴۰ جمعیت لپیدیوم درابا ایران بیان کردند که روش گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نتوانست جمعیت‌ها را به طور کامل از هم تفکیک کند که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین نمونه‌ها می‌باشد. با این حال، الگوهای گروه‌بندی با پراکنش جغرافیایی توده‌ها در اکثر زیر گروه‌ها همراه بود که ممکن است در اثر فرآیند سازگاری طولانی مدت توده‌ها با شرایط خاک و اقلیم منطقه باشد (۱۰، ۳۰). رابطه بین الگوهای گروه‌بندی و پراکنش جغرافیایی در لپیدیوم لاتیفولیوم (۳۱) نیز قبلاً گزارش شده است، هر چند که Mortazavi Moghadam و همکاران (۳۲) رابطه معنی‌داری میان تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی جمعیت‌های لپیدیوم ساتیوم با استفاده از نشانگرهای RAPD[7] بدست نیاوردند. برای تمایز بیشتر پراکنش این گونه‌ها، از تجزیه به مختصات اصلی و ساختار ژنتیکی استفاده شد که در نتیجه توده‌ها در سه گروه طبقه‌بندی شدند. الگوی گروه‌بندی ۲۲ توده لپیدیوم در دندروگرام NJ با نتایج تجزیه به مختصات اصلی مطابقت داشت. تجزیه ساختار ژنتیکی نیز عدم وجود یک ساختار ژنتیکی متمایز را در میان گونه‌های لپیدیوم مورد مطالعه نشان داد. گروه‌بندی برخی از توده‌های مربوط به گونه‌های متفاوت با هم می‌تواند منعکس‌کننده این باشد که توده‌ها از منشاها یا طبقه‌بندی‌های مختلف دارای مخزن ژنی مشترک هستند که با نتایج جریان ژنی مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه اولین پژوهش برای نشان دادن توانایی داده‌های ترکیبی سه نشانگر مولکولی SSR، ISSR و SCoT در تعیین تنوع ژنتیکی چندین توده از سه گونه لپیدیوم می‌باشد. نتایج ما سطح بالایی از تنوع ژنتیکی و جریان ژنی را در توده‌های سه گونه لپیدیوم نشان داد و اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی و روابط بین و درون گونه‌های لپیدیوم مشاهده شده در این مطالعه می تواند در استراتژی‌های برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم-پلاسم مفید باشد.

7. Random amplified polymorphic DNA

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

منابع

1. German DA. Taxonomic remarks on some Asian *Lepidium* s. l. (Brassicaceae). Phytotaxa, 2014; 186(2):97-105.
2. Nasseh Y, Joharchi MR. A new record of *Lepidium* (Brassicaceae) for the flora of Iran. Nova Biol Rep, 2019; 6(3):347-51.
3. Dehshiri MM. A review on the traditional applications of medicinal plants of the Brassicaceae in Iran. J Plant Res (Iran J Biol), 2020; 33(4):907-18.
4. Roughani A, Miri SM. *Lepidium* species as antidiabetic herbal medicines. The First National Congress and International Fair of Medicinal Plants and Strategies for Persian Medicine that Affect Diabetes, 9-11 Oct, Mashhad, Iran, 2018.
5. Begna T. Role and economic importance of crop genetic diversity in food security. J Agric Sci Food Technol, 2021; 7(1):164-9.
6. Roughani A, Miri SM, Hassandokht MR, Moradi P, Abdossi V. Agro-morphological study on several accessions of garden cress (*Lepidium sativum*–Brassiaceae) in Iran. Pak J Bot, 2018; 50:655-60.
7. Jahani Seghale M, Nematzadeh Gh. The importance of examining genetic diversity in medicinal plants. National Conference on Medicinal Plants, 2 Mar, Sari, Iran, 2011.
8. MirMohammadi Maibody SAM, Golkar P. Application of DNA molecular markers in plant breeding. Plant Genet Res, 2019; 6(1):1-30.
9. Marakli S. A brief review of molecular markers to analysis medicinally important plants. Int J Life Sci. Biotechnol, 2018; 1(1):29-36.
10. Jelvehgar N, Miri SM, Mostafavi Kh, Mohammadi A. Genetic analysis of *Lepidium* spp. by SSR and ISSR molecular markers. Plant Gene, 2021; 28(100332).
11. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genet, 2000; 155:945-59.
12. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol, 2005; 14:2611-20.
13. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978; 89:583-90.
14. Nei M. Analysis of gene diversity in sub divided populations. Proc Natl Acad Sci, 1973; 70(12):3321-23.
15. Tadesse L, Mekbib F, Wakjira A, Tadele Z. Genetic diversity in the Ethiopian garden cress (*Lepidium sativum* L.) using microsatellite markers. Curr Plant Biol, 2018; 16:32-40.
16. Kumar V, Yadav HK. Assessment of genetic diversity in *Lepidium sativum* L. using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. Physiol Mol Biol Plants, 2019; 25:399-406.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

17. Aksakal O, Sunar S, Kaya Y, Agar G. Genetic diversity within and among *Lepidium draba* populations from Eastern Anatolia based on RAPD analysis. Biochem Genet, 2010; 48:603-11.
18. Mohammed S, Tesfaye K. Molecular genetic diversity study of *Lepidium sativum* population from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Afr J Biotechnol, 2015; 14(17):1461-70.
19. Ramanatha Rao V, Hodgkin T. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Cell Tiss Org Cult, 2002; 68:1-19.
20. Wright S. Evolution and genetics of population. USA: University of Chicago Press; 1978.
21. Hutchison DW, Templeton AR. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. Evolution, 1999; 53:1898-914.
22. Fry, CT, Neel MC. Benefits of gene flow are mediated by individual variability in self compatibility in small isolated populations of an endemic plant species. Evol Appl, 2017; 10:551-62.
23. Yang S, Xue S, Kang W, Qian Z, Yi Z. Genetic diversity and population structure of *Miscanthus lutarioriparius*, an endemic plant of China. PLOS ONE, 2019; 14(2):e0211471.
24. Roughani A, Miri SM, Hassandokht MR, Moradi P, Abdossi V. Genetic variation within Iranian *Lepidium* species using morphological traits. The First National Congress and International Fair of Medicinal Plants and Strategies for Persian Medicine that Affect Diabetes, 9-11 Oct, Mashhad, Iran, 2018.
25. Bona M. Taxonomic revision of *Lepidium* (Brassicaceae) from Turkey. J Fac Pharm İst Üniv, 2014; 44:31-62.
26. Roughani A, Miri SM, Hassandokht MR, Moradi P, Abdossi V. Cytogenetic and micro–morphological studies on several accessions of some *Lepidium* L. species in Iran. Iran J Sci Technol Trans A Sci, 2021; 45:417-426.
27. Zhang Y, Zhang X, Chen X, Sun W, Li J. Genetic diversity and structure of tea plant in Qinba area in China by three types of molecular markers. Hereditas, 2018; 155(22).
28. Roughani A, Miri SM, Hassandokht MR, Moradi P, Abdossi V. 2017. Study of morphological and cytogenetic variation in some accessions and species of *Lepidium*. Ph.D Thesis in Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University-Science and Research Branch.
29. Dianat M, Hosseini SM. Morphological variations among hoary cress (*Lepidium draba* L.) populations in Iran. J Plant Res (Iran J Biol), 2017; 30(1):85-98.
30. Velasco-Ramírez AP, Torres-Morán MI, Molina-Moret S, Sánchez-González JdeJ, Santacruz-Ruvalcaba F. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

polymorphisms and genetic relationships in camote de cerro (*Dioscorea* spp.). Electron J Biotechnol, 2014; 17:65-71.

31. Roughani A, Miri SM, Hassandokht MR, Moradi P, Abdossi V. Morphological variation of some *Lepidium draba* and *L. latifolium* populations. Taiwania, 2018; 63:41-48.
32. Mortazavi Moghadam FA, Qaderi A, Sharifi-Sirchi GhR. Evaluation of genetic diversity of 17 populations (*Lepidium sativum* L.) plant collected from different regions of Iran by RAPD marker. ACS Agric Sci Technol, 2021; 1(6):684-90.
33. Lowe A, Jones AE, Raybould AF, Trick M, Moule CL, Edwards KJ. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. Mol Ecol Notes, 2002; 2:7-11.
34. Kaur A, Kumar R, Rani S, Grewal A. Genetic diversity analysis of *Lepidium sativum* (Chandrasur) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. J For Res, 2015; 26:107-14.
35. Srivastava S, Krishna R, Sinha RP, Singh M. TDZ-induced plant regeneration in *Brassica oleracea* L. var. Botrytis: effect of antioxidative enzyme activity and genetic stability in regenerated plantlets. *In Vitro* Cell Dev Biol Plant, 2017; 53:598-605.
36. Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M. Assessment of genetic diversity among Iranian *Triticum* germplasm using agro morphological traits and start codon targeted (SCoT) markers. Cereal Res Commun, 2017; 45(4):574-86.
37. Luo C, He XH, Chen H, Ou SJ, Gao MP, Brown JS, Tondo CT, Schnell RJ. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. Biochem Syst Ecol, 2011; 39:676-84.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]