



## Genetic Diversity of *Hesperis persica*, Based on Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism

### Esfandani-Bozchaloyi S\*

<sup>a</sup> Research Institute of Modern Biological Techniques ,University of Zanjan, Zanjan, Iran

#### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Esfandani-Bozchaloyi S, Genetic Diversity of *Hesperis persica*, Based on Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism. Journal of Cell and Tissue . 2026; 16(4): 322-336.

<https://doi.org/10.66224/JCT.16.4.322>

#### KEYWORDS

Gene flow, IRAP, *Hesperis persica*, Population Differentiation

#### ABSTRACT

**Introduction:** Knowledge of spatial genetic structures provides a valuable tool for inferring the evolutionary forces such as selective pressures and drift. Low gene flow due to spatial isolation of populations may even increase the degree of local differentiation. Nevertheless, phenotypic plasticity rather than genetic differentiation may be an alternative way of matching genotypes to environment; indeed increasing environmental variation favors higher levels of plasticity. Genetic diversity is one aspect of biological diversity that is extremely important for conservation strategies, especially in rare and narrowly endemic species. The genus *Hesperis* L. (Brassicaceae) comprises biennial and perennial herbs and consists of 46 species worldwide, mainly occurring in different parts of Europe, Caucasus, Transcaucasia, and to a lesser extent in northern and central Asia, and mostly in Turkey with 28 species. The genus is represented by 11 or six species belonging to sections *Hesperis* Dvořák, *Diaplectos* Dvořák and *Pachycarpos* Fourn. in Iran.

**Aim:** Moreover, due to extensive morphological variability of this species in the country, there is possibility of having infra-specific taxonomic forms in this species. Therefore, we carried out population genetic analysis and morphometric study of 11 geographical populations for the first time in the country. For genetic study, we used the inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) method that displays insertional polymorphisms by amplifying the segments of DNA between two retrotransposons. It has been used in numerous studies of genetic diversity. The objectives of this research

\* Corresponding author. Tel: 02433054250

E-mail address: Somayehesfandani@znu.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.66224/JCT.16.4.322>

Received: 26 Jan. 2025; Received in revised form: 10 Sep. 2025; Accepted: 9 Nov. 20

Original Article

© Author



were to study genetic diversity *Hesperis persica* with a different geographical origin by inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) method.

**Materials and Methods:** A total of 73 individuals were sampled representing 11 natural populations of *H. persica* Boiss. subsp. *persica* and *H. persica* subsp. *kurdica* (F. Dvořák & Hadac) F. Dvořák, in Mazandaran, East Azerbaijan, Kohgilouye-Boirahmad, Chaharmahal Bakhtiari, Fars, Zanjan, Tehran, Kordestan, Provinces of Iran during July-August 2019-2024.

Fresh leaves were used randomly from 6-10 plants in each of the studied populations. These were dried by silica gel powder. CTAB activated charcoal protocol was used to extract genomic DNA. The quality of extracted DNA was examined by running on 0.8% agarose gel. A set of six outward-facing LTR primers were used for IRAP analysis. We also used 15 different combinations of outward-facing LTR pair primers. PCR reactions were carried in a 25 $\mu$ l volume containing 10 mM Tris-HCl buffer at pH 8; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM of each dNTP (Bioron, Germany); 0.2  $\mu$ M of a single primer; 20 ng genomic DNA and 3 U of *Taq* DNA polymerase (Bioron, Germany). The thermal program was carried out with an initial denaturation for 1 min at 94°C, followed by 40 cycles in three segments: 35 s at 95°C, 40s at 47°C and 55s at 72°C. Final extension was performed at 72°C for 5 min. The amplification products were observed by running on 1% agarose gel, followed by the ethidium bromide staining. The fragment size was estimated by using a 100 bp molecular size ladder (Fermentas, Germany). The IRAP profiles obtained for each samples were scored as binary characters. Parameter like Nei's gene diversity (H), Shannon information index (I), number of effective alleles, and percentage of polymorphism were determined. Nei's genetic distance among populations was used for Neighbor Joining (NJ) clustering and Neighbor-Net networking. Mantel test checked the correlation between geographical and genetic distance of the studied populations. These analyses were done by PAST ver. 2.17, DARwin ver. 5 (2012) and SplitsTree4 V4.13.1 (2013) software. AMOVA (Analysis of molecular variance) test (with 1000 permutations) as implemented in GenAlex 6.4, and Nei's G<sub>st</sub> analysis as implemented in GenoDive ver.2 (2013) were used to show genetic difference of the populations. Moreover, populations' genetic differentiation was studied by G'<sub>ST</sub> est = standardized measure of genetic differentiation, and D<sub>est</sub> = Jost measure of differentiation. The genetic structure of populations was studied by Bayesian based model STRUCTURE analysis, and maximum likelihood-based method of K-Means clustering of GenoDive ver. 2. (2013). For STRUCTURE analysis, data were scored as dominant markers. The Evanno test was performed on STRUCTURE result to determine proper number of K by using delta K value. In K-Means clustering, two summary statistics, pseudo-F, and Bayesian Information Criterion (BIC), provide the best fit for k.

**Results:** The highest value of percentage polymorphism (57.41%) was observed in Mazandaran, 30 km S. of Ramsar between Kash-e Chal mountain and Miankuh (population No.8, *H. persica* subsp. *kurdica*) which shows high value for gene diversity (0.34) and Shannon, information index (0.43). Population Chaharmahal Bakhtiari, Shahr-e Kurd, tang-e Sayyad protected area, Pir kuh mountain (No.3, *H. persica* subsp. *persica*) has the lowest value for percentage of polymorphism (28.11%) and the lowest value for Shannon, information index (0.088), and He (0.022). AMOVA (PhiPT = 0.98, P = 0.010), and G<sub>st</sub> analysis (0.654, p = 0.001) revealed significant difference among the studied populations. It also revealed that, 40% of total genetic variability was due to within population diversity and 60% was due to among population genetic differentiation. Pairwise AMOVA produced significant difference among the studied populations. Moreover, we got high values for Hedrick standardized fixation index after 999 permutation (G'<sub>st</sub> = 0.654, P = 0.001)

and Jost, differentiation index ( $D_{\text{est}} = 0.769$ ,  $P = 0.001$ ). These results indicate that the geographical populations of *Hesperis persica* are genetically differentiated from each other. The mean  $N_m = 0.455$  was obtained for all IRAP loci, which indicates low amount of gene flow among the populations. Population assignment test also agreed with  $N_m$  result and could not identify significant gene flow among these populations. However, reticulogram obtained based on the least square method, revealed some amount of shared alleles among populations 2 and 3, and between 7 and 8, also between 1, and 4. This result is in agreement with grouping we obtained with PCoA plot, as these populations were placed close to each other. As evidenced by STRUCTURE plot based on admixture model, these shared alleles comprise very limited part of the genomes in these populations and all these results are in agreement in showing high degree of genetic stratification within *Hesperis persica* populations. In total 76 IRAP bands (loci) were obtained, out of which 14 bands were private. Populations 2 and 5-7 contained 2-5 private bands.

**Conclusion:** PCoA plot of populations was in agreement with WARD clustering of molecular data. These results indicated that geographical populations of *Hesperis persica* are well differentiated based on (IRAP) markers.



## تنوع ژنتیکی *Hesperis persica* بر اساس DNA چند شکلی تقویت شده بین رتروترانسپوزونی (IRAP)

سمیه اسفندانی بزچلویی\*

دانش آموخته دکتری، پژوهشکده فناوری نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

واژگان کلیدی	چکیده
جریان ژن، IRAP، <i>Hesperis persica</i> ، تمایز جمعی	<p><b>هدف:</b> این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی <i>Hesperis persica</i> در ایران با استفاده از نشانگرهای IRAP انجام شد. تنوع ژنتیکی یکی از جنبه های تنوع زیستی است که برای استراتژی های حفاظتی، به ویژه در گونه های کمیاب و اندمیک بسیار مهم است. سرده <i>Hesperis L.</i> از تیره شب بو شامل گیاهان دو ساله و چند ساله است و از ۴۶ گونه در سراسر جهان تشکیل شده است که عمدتاً در مناطق مختلف اروپا، قفقاز، ماورای قفقاز و به میزان کم تر در شمال و آسیای مرکزی و به میزان بیشتر در ترکیه با ۲۸ گونه یافت می شود. از این میان هفت تاکسون در ایران پراکنش دارد که تاکسون های ایرانی <i>Hesperis</i> متعلق به سه بخش <i>Hesperis Dvořák</i>, <i>Diaplectos Dvořák</i> and <i>Pachycarpus Fourn</i> می باشد. <b>مواد و روش ها:</b> در این مطالعه در مجموع ۷۳ فرد به نمایندگی از ۱۱ جمعیت طبیعی <i>H. persica</i> Boiss subsp. <i>persica</i> and <i>H. persica</i> subsp. <i>kurdica</i> (F. Dvořák &amp; Hadac) F. Dvořák شدند. مجموعه ای از شش پرایمر LTR برای تجزیه و تحلیل IRAP استفاده شد. تجزیه و تحلیل های آماری چند متغیره نظیر UPGMA و PCoA مورد استفاده قرار گرفتند. <b>نتایج:</b> آزمون AMOVA تفاوت ژنتیکی معنی داری (<math>P=, 0.98\text{PhiPT}0.010=</math>) در بین جمعیت های مورد مطالعه مشخص کرد و همچنین نشان داد که ۴۰ درصد از کل تنوع ژنتیکی به دلیل تنوع درون جمعیتی و ۶۰ درصد به دلیل تمایز ژنتیکی بین جمعیت است. <b>نتیجه گیری:</b> نمودار PCoA جمعیت ها با خوشه بندی WARD داده های مولکولی مطابقت داشت. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی جمعیت های جغرافیایی <i>Hesperis persica</i> بر اساس نشانگرهای (IRAP) می تواند در سطوح متفاوت میان افراد یک جمعیت و غیره مطرح و منبع بی نظیری در بهبود ویژگی های ژنتیکی و اصلاحی محصولات گیاهی باشد.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۷	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۱۹	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۱۸	
۴	

۱-مقدمه

\* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۴۳۳۰۵۴۲۵۰

آدرس پست الکترونیک: Somayehsfandani@znu.ac.ir

دانش و آگاهی از ساختارهای ژنتیکی ابزار ارزشمندی برای استنتاج نیروهای تکاملی مانند انتخاب طبیعی و رانش ژنتیکی فراهم می‌کند (۱ و ۲ و ۳). میزان پایین جریان ژنی به دلیل ایزوله شدن جمعیت‌ها حتی ممکن است منجر به افزایش درجه تمایز جمعیت‌ها گردد (۴ و ۵ و ۶). با این وجود، انعطاف‌پذیری فنوتیپی به جای تمایز ژنتیکی ممکن است راهی جایگزین برای تطبیق ژنوتیپ‌ها با محیط باشد (۲ و ۳). در واقع افزایش تنوع محیطی به نفع سطوح بالاتر انعطاف‌پذیری است (۷).

سرده (*Hesperis L. (Brassicaceae)* شامل گیاهان دو ساله و چند ساله است و از ۴۶ گونه در سراسر جهان تشکیل شده است. این سرده عمدتاً در مناطق مختلف اروپا، قفقاز، ماوراء قفقاز و به‌میزان کم‌تر در شمال و آسیای مرکزی و به‌میزان بیشتر در ترکیه با ۲۸ گونه یافت می‌شود. از این میان هفت تاکسون در ایران پراکنش دارد که تاکسون‌های ایرانی *Hesperis* متعلق به سه بخش *Hesperis Dvořák*، *Diaplectos Dvořák* و *Pachycarpos Fourn* می‌باشد.

در ایران اولین مطالعات مربوط به زیرسرده و بخش در سرده *Hesperis* مربوط به ارزیابی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، سیتولوژیکی و گرده‌شناسی می‌باشد، اما هنوز هم تاکسونومیست‌ها سعی می‌کنند طبقه‌بندی‌های جدید زیر سرده را معرفی کنند.

*Hesperis* با داشتن غدد ساقه‌دار با ساقه‌های تک سلولی که به یک غده تک سلولی ختم می‌شود، به‌راحتی از بقیه *Brassicaceae* قابل تشخیص است (۸). این سرده ابتدا توسط آندژیوفسکی (۱۸۲۱) بازنگری شد و او این سرده را در یک بخش منفرد قرار داد. بعدها طبقه‌بندی این سرده توسط چندین محقق مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی به بخش‌های مختلفی تقسیم شد. دو بخش *Hesperidium DC* و *Deilosma Andrzej* (توسط دکاندول) سه بخش *Hesperidium*، *Deilosma* و *Pachycarpos Fourn. Emend. Tzvelev* (توسط فورنیر و تزولف) و دو بخش *sect. Purpureae Boiss* و *Boiss Lividae* (توسط بوسییه) پیشنهاد شد. دووراک این سرده را به ۵ زیرجنس، *Hesperis Mediterranea Borbas*، *Cvelevia Dvorak*، *Contorta Dvorak* و *Diaplectos Dvorak* تفکیک نمود. کالان گونه‌های این سرده در ترکیه را در بخش‌ها جای نداد. علی‌رغم مطالعات متعدد در مورد طبقه‌بندی زیر جنس و زیرگونه‌های این سرده، مشکلات تعیین حدود، هنوز حل نشده است (۹ و ۱۰).

دوران و همکاران (۱۲) در میان صفات گرده‌شناسی، سیتولوژیکی و ریزریخت‌شناسی (کرک)، از صفات ریخت‌شناسی سنتی، به‌عنوان مثال، فرم رویشی، ارتفاع ساقه، شکل برگ و ویژگی‌های تنوع میوه برای طبقه‌بندی در سطح بخش استفاده کرده‌است. اهمیت ریخت‌شناسی گرده و دانه *Hesperis* توسط دوران و اوجاک، دوران، پینار و همکاران، دوران و همکاران، پادوره و همکاران برای اهداف طبقه‌بندی انجام شده است. ریز ریخت‌شناسی سطح بذر منعکس‌کننده انتخاب طبیعی و سازش است. بنابراین این خصوصیات، در سطح سرده و گونه از اهمیت سیستماتیک برخوردار است. ریخت‌شناسی گرده رویکردی برای ارتباطات سیستماتیک بین سرده‌های تیره شب بو فراهم می‌کند (۱۱ و ۱۲). آراس و همکاران (۲) روابط فیلوژنتیکی در میان طبقات زیرگونه‌ای، گونه و فرا گونه‌ای ۶ گونه از سرده *Hesperis* که از مناطق مختلف ترکیه جمع آوری شده بود را با تجزیه و تحلیل RAPD مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها از این ایده حمایت می‌کند که (*H. H. bicuspidata* (sect. *Hesperis*))، *H. H. kotschyi* (sect. *Cvelevia*)، *H. H. breviscapa*، *H. H. pendula* (sect. *Pachycarpos*)، *H. schischkinii* (sect. *Mediterranea*) و *H. H. cappadocica* (sect. *Contorta*) باید بر اساس ویژگی‌های ریختی در بخش‌های مختلف قرار گیرند.

در سال‌های اخیر، سیستم‌های نشانگر مولکولی مانند چندشکلی قطعات DNA تکثیر یافته تصادفی (RAPD)، چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته (AFLP)، تکرار توالی ساده (ISSR)، توالی تکراری ساده (SSR) و چندشکلی تقویت‌شده بین رتروترانسپوزونی (IRAP) برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی و روابط در ارقام و توده‌های *Hesperis persica* مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین با توجه به تنوع ظاهری وسیع این گونه در ایران، امکان وجود فرم‌های زیرگونه‌ای در این گونه وجود دارد. بنابراین، برای اولین بار در کشور، تجزیه و تحلیل ژنتیکی و ریخت‌شناسی ۱۱ جمعیت جغرافیایی را انجام دادیم. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی *Hesperis persica* با منشا جغرافیایی متفاوت با روش چندشکلی تقویت‌شده بین رتروترانسپوزونی (IRAP) است.

## ۲- مواد و روش‌ها

**مواد گیاهی:** در مجموع، تعداد ۷۳ فرد از ۱۱ جمعیت جغرافیایی از دو زیرگونه *H. persica* و *H. persica subsp. persica* طی ماه‌های تیر و مرداد سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۳ از استان‌های مازندران، آذربایجان شرقی، کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، فارس، زنجان، تهران و کردستان نمونه‌برداری شدند (جدول ۱). از هر جمعیت، برگ تازه ۶ تا ۱۰ فرد جمع‌آوری و بلافاصله در سیلیکا ژل خشک شد. شناسایی گونه‌ها بر اساس منابع معتبر فلورستیک و تاکسونومیکی انجام شد (۶). جزئیات کامل محل‌های نمونه‌برداری در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: جمعیت‌های مورد مطالعه و موقعیت مکانی و بوم‌شناختی گونه *H. persica*

No	Subsp.	Locality	Altitude (m)
Pop1	<i>subsp. persica</i>	Azarbayejan, 25 km SE of Jolfa, Kiamaki Protected area, Gheshlagh village, Ghelenj mountain (NH3)	776
Pop2	<i>subsp. persica</i>	Fars, S. of Estahbanat, kuh-e Bah	1540
Pop3	<i>subsp. persica</i>	Chaharmahal Bakhtiari, Shahr-e Kurd, tang-e Sayyad protected area, Pir kuh mountain,	1610
Pop4	<i>subsp. persica</i>	Kohgiluyeh and Boirahmad, Yasuj, Sisakht, Bijan neck	1870
Pop5	<i>subsp. persica</i>	Tehran, SW of Kalan Lavasan	2500
Pop6	<i>subsp. kurdica</i>	Azarbayejan, Khoy, Belahzuk	1185
Pop7	<i>subsp. kurdica</i>	Fars, 25 km S. E. of Fasa, Salou village, kuh-e Raz	1550
Pop8	<i>subsp. kurdica</i>	Mazandaran, 30 km S. of Ramsar between Kash-e Chal mountain and Miankuh	54
Pop9	<i>subsp. kurdica</i>	Tehran, between Karaj and Chalus, Kandavan	1807
Pop10	<i>subsp. kurdica</i>	Zanjan, From Zanjan to Mahneshan, 12 km after andabad	1638
Pop11	<i>subsp. kurdica</i>	Kordestan, 61 km from Marivan on road to Pavah	1487

**استخراج DNA و سنجش IRAP:** برگ‌های تازه به‌طور تصادفی از ۱۰-۶ بوته در هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه استفاده شدند. این نمونه‌ها با پودر سیلیکاژل خشک شدند. برای استخراج DNA ژنومی از پروتکل زغال فعال CTAB استفاده شد (۶). پس از انجام مراحل استخراج DNA از نمونه‌های مورد مطالعه، به‌منظور بررسی کیفیت DNA، از روش ژل آگارز و دستگاه الکتروفورز استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA Stock (نمونه رقیق نشده DNA) در داخل چاهک‌های ژل آگارز بارگذاری شد. سپس ژل بارگذاری شده در تانک الکتروفورز تحت جریان ۱۰۰ ولت قرار گرفت، هنگامی که باندهای DNA به میانه ژل رسید جریان برق از تانک الکتروفورز قطع شده و از ژل مربوطه با دستگاه UV-transilluminator تصویری تهیه شد. باندهایی که در بالا قرار گرفته‌اند در واقع نشان دهنده DNA هستند که وزن مولکولی بالایی دارند. در این ارزیابی از لدر bp 100 (Fermentas، آلمان) به‌عنوان نشانگر استفاده شد. مجموعه‌ای از شش پرایمر LTR (جدول ۲) برای تجزیه و تحلیل IRAP استفاده شد. ما همچنین از ۱۵ ترکیب مختلف از پرایمرهای جفت LTR استفاده شد. به‌طور کلی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاوی ۲۵ میکرولیتر حجم بود. این حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی بافر ۱۰ میلی‌مول، Tris-HCl، ۵۰۰ میلی‌مول، KCl بود. ۱/۵ میلی‌مول MgCl<sub>2</sub> و از هر ۰/۲ میلی‌مول dNTP و ۰/۲ میکرومولاز یک آغازگر واحد؛ ۲۰ نانوگرم، DNA ژنومی و ۳ U از Taq DNA پلیمرز (Bioron، آلمان). چرخه‌ها و شرایط زیر برای مراحل PCR مشاهده شد.

جدول ۲: آغازگرهای IRAP بر اساس SMYKAL و همکاران (۲۰۱۱)

IRAP	Sequence (5'-3')
GU735096	ACCCCTTGAGCTAACTTTTGGGGTAAG
GU980589	AGCCTGAAAAGTGTGGGTTGTGC
GU929878	GCATCAGCCTGGACCAGTCCTCGTCC
GU735096	CACTTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC
GU929877	TCGAGGTACACCTCGACTCAGG
GU980590	ATTCTCGTCCGCTGCGCCCCTACA

**مراحل PCR:** چرخه PCR شامل یک مرحله اولیه دناتوراسیون به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۴۰ چرخه شامل: دناتوراسیون به‌مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر (Annealing) به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۲ تا ۵۷ درجه (بسته به آغازگر) و گسترش (Extension) به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۷ تا ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه بود.

### ۳- آنالیز آماری

بررسی‌های آماری صفات ریخت‌شناسی: میزان متوسط و انحراف استاندارد صفات کمی در تاکسون‌های مورد مطالعه تعیین شد. برای گروه‌بندی تاکسون‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه بر پایه صفات ریخت‌شناسی، داده‌های حاصله استاندارد شده (میانگین

= صفر و واریانس = یک) و برای فرایندهای تجزیه و تحلیل‌های آماری چند متغیره نظیر **UPGMA** و **PCoA** مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری **ANOVA** برای تعیین معنی‌دار بودن تفاوت‌های صفات کمی در بین تاکسون‌ها و جمعیت‌های مورد مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. همچنین ضریب همبستگی **Pearson** برای نمایش میزان پیوستگی محتمل بین صفات ریخت‌شناسی کمی با عوامل اکولوژیکی نظیر طول و عرض جغرافیایی ارتفاع محل رویش، متوسط حداقل و حداکثر دمای سالیانه زیستگاه به‌وسیله نرم افزار **SPSS** صورت پذیرفت.

**بررسی های آماری بخش مطالعه تنوع مولکولی IRAP.** باندهای مشاهده شده به‌صورت صفات دو حالتی کد گذاری شدند (حضور = ۱، عدم حضور = ۰) پارامترهای تنوع ژنتیکی از جمله تعداد آلل‌های موثر، اندیس شانون، هتروزیگوتی و میزان پلی مورفیسم در هر جمعیت مشخص شد (۱۳ و ۱۴). محاسبه فاصله ژنتیکی **Nei's** در میان جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از خوشه‌بندی **Neighbor Joining (NJ)** و روش شبکه‌ای **NeighborNet** با ۱۰۰۰ بار بوت استرپ (۱۵ و ۱۶) استفاده شد. دو روش برای مشخص شدن تفاوت ژنتیکی معنی‌دار در میان جمعیت‌های مورد مطالعه و استان‌ها به‌کار گرفته شد:

۱- آزمون **AMOVA (Analysis of molecular variance)** توسط نرم افزار **GenAlex ver. 6,4** انجام شد (۱۷ و ۱۸).

۲- پارامترهای **Gest** و **Dest** با **GenoDive ver.1** (۲۰۱۳) محاسبه شدند (۱۹ و ۲۰).

آزمون **Mantel** برای مطالعه ارتباط بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار **PAST** و **GenAlex** انجام شد. برای پرهیز از اشتباهات احتمالی محاسباتی در تعیین اختلاف معنی‌دار، مقادیر **Fst** و آنالیز **AMOVA** برای داده‌های **IRAP** توسط نرم افزار **Hickory (ver.1)** در میان جمعیت‌ها به‌صورت دو به دو (جفت شده) محاسبه شد.

جهت گروه‌بندی افراد و جمعیت‌ها از **PCoA (Principal coordinate analysis)** استفاده شد. آنالیز **(MDS) (Non-metric multidimensional scaling)** برای فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها با استفاده از برنامه **PAST ver. 2,17**، استفاده شد. از جمله نرم افزارهای آماری دیگر مورد استفاده در این مقاله برای رسم خوشه‌ها و گراف‌ها می‌توان به نرم افزارهای زیر اشاره کرد: **PAST ver. 2.17, DARwin ver. 5, SplitsTree4 V4.13.1**

#### ۴- نتایج

پارامترهای تنوع ژنتیکی در ۱۱ جمعیت جغرافیایی **H. persica** تعیین شد که در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین مقدار درصد چندشکلی (۵۷/۴۱) درصد در جمعیت مازندران در ۳۰ کیلومتری جنوب شرقی رامسر بین کوه کش چال و میانکوه مشاهده شد (جمعیت شماره ۸، **H. persica subsp. kurdica**) که ارزش بالایی برای تنوع ژنی (۰/۳۴) و اندکس شانون (۰/۴۳) نشان می‌دهد. جمعیت چهارم‌حال بختیاری، شهرکرد، منطقه حفاظت شده تنگ صیاد، پیرکوه (شماره ۳، **H. persica subsp. persica**) کم‌ترین مقدار را برای درصد چندشکلی (۲۸/۱۱) درصد و کم‌ترین مقدار را برای اندکس شانون (۰/۸۸) و **He** (۰/۰۵۴) دارد.

جدول ۳: پارامترهای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه = N تعداد نمونه، Na = تعداد آلل‌های مختلف Ne = تعداد آلل‌های موثر، I = شاخص اطلاعات شانون، He = تنوع ژنی، UHe = تنوع ژنی بی طرف، P = درصد چندشکلی

Pop	N	Na	Ne	I	He	UHe	%P
pop1	7.000	0.198	1.112	0.159	0.115	0.111	29.14%
pop2	6.000	0.233	1.231	0.289	0.222	0.224	38.14%
pop3	7.000	0.289	1.011	0.088	0.022	0.044	28.11%
pop4	10.000	1.190	1.211	0.242	0.267	0.236	32.43%
pop5	9.000	1.195	1.322	0.213	0.165	0.104	45.15%
pop6	8.000	0.586	1.283	0.138	0.177	0.131	39.10%
pop7	7.000	0.298	1.295	0.196	0.277	0.223	33.09%
pop8	17.000	1.375	1.190	0.432	0.344	0.392	57.41%
pop9	12.000	0.488	1.290	0.227	0.128	0.142	36.20%
pop10	15.000	0.188	1.199	0.291	0.295	0.286	44.18%
pop11	7.000	0.388	1.285	0.223	0.295	0.273	31.22%

### تمایز ژنتیکی جمعیت

AMOVA (PhiPT = 0.98, P = 0.001) و تجزیه و تحلیل (G'st = 0.654, P = 0.001) تفاوت معنی‌داری را بین جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد (جدول ۴). همچنین ۴۰ درصد از کل تنوع ژنتیکی به دلیل تنوع درون جمعیتی و ۶۰ درصد به دلیل تمایز ژنتیکی بین جمعیت است. AMOVA تفاوت معنی‌داری در بین جمعیت‌های مورد مطالعه ایجاد کرد. این نتایج نشان می‌دهد که جمعیت‌های جغرافیایی *H. persica* از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایز می‌شوند.

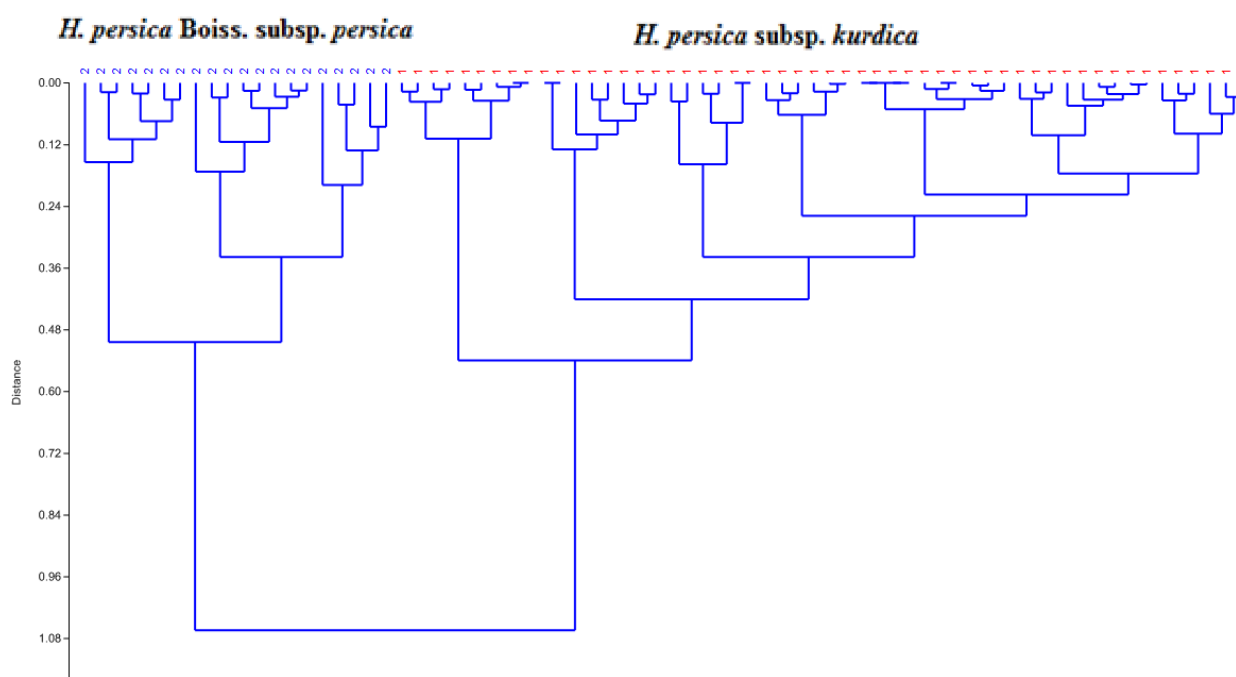
جدول ۴: تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) گونه‌های مورد مطالعه.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%	PhiPT
Among Pops	112	1361.781	70.122	18.011	60%	
Within Pops	120	21.227	36.340	15.431	40%	60%
Total	232	1382.112		33.442	100%	

df: درجه آزادی؛ SS: مجموع مشاهدات مربعی. MS: میانگین مشاهدات مربعی. EV: واریانس تخمینی. PhiPT: نسبت کل واریانس ژنتیکی در بین افراد در یک الحاق، (P < 0.001).

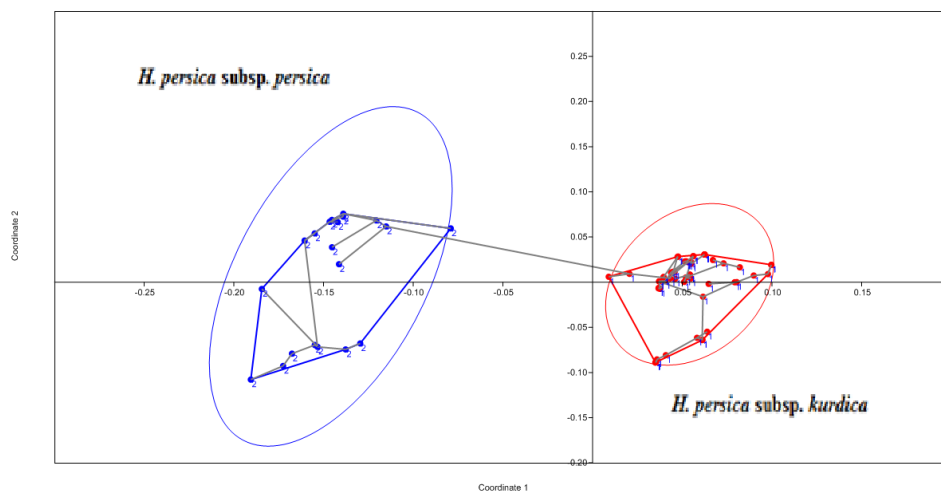
## قرابت ژنتیکی

در درخت NJ، نمونه‌های گیاهی هر جمعیت با هم گروه‌بندی شدند و خوشه‌های جداگانه تشکیل دادند. در نمونه‌های مورد مطالعه با فرم‌های میانی مواجه نشد. این نتایج نشان داد که داده‌های IRAP می‌توانند جمعیت‌های *H. persica* را در دو خوشه یا گروه اصلی مختلف متمایز کنند (شکل ۱). اولین خوشه اصلی که با مقدار قابل توجه بوت استریپینگ ۹۵ درصد حمایت می‌شود خود به دو زیر خوشه اصلی تقسیم می‌شود تا گیاهان *H. persica subsp. persica* (شماره ۱-۵) به دلیل تشابه ژنتیکی اولین زیر خوشه را تشکیل می‌دهد، در حالی که گیاهان *H. persica subsp. kurdica* (شماره ۶-۱۱) دومین خوشه اصلی را تشکیل داد.



شکل ۱: خوشه‌بندی NJ از جمعیت‌ها در *H. persica* بر اساس داده‌های IRAP

واگرایی ژنتیکی و جدایی جمعیت‌های *H. persica subsp. persica* (No.1-5) (شماره ۱-۵) و همچنین گیاهان *H. persica subsp. kurdica* (شماره ۶-۱۱) از سایر جمعیت‌ها در نمودار PcoA داده‌های IRAP پس از ۹۰۰ جایگشت مشهود است (شکل ۲). سایر جمعیت‌ها قرابت ژنتیکی بیشتری را نشان دادند. آزمون منتل پس از ۵۰۰۰ جایگشت همبستگی معنی‌داری بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی در این جمعیت‌ها ایجاد کرده است. بنابراین، جمعیت‌هایی که از نظر جغرافیایی دورتر هستند، جریان ژنی کم‌تری دارند و جداسازی با فاصله (IBD) در *H. persica* را دارد.



شکل ۲: نمودار PcoA جمعیت‌ها در *H. persica* بر اساس داده‌های IRAP

## ۵- بحث

تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت در مطالعات ژنتیکی و اصلاحی مهم است. آن‌ها اطلاعاتی را در مورد سطوح تنوع ژنتیکی، تقسیم‌بندی تنوع ژنتیکی در درون/بین جمعیت‌ها، خود لقاحی و دگر لقاحی، اندازه موثر جمعیت ارائه می‌دهند (۲۱ و ۲۲ و ۲۳ و ۲۴). ظهور نشان‌گرهای مولکولی مطالعات ژنتیکی جمعیت را بسیار بهبود بخشیده است. این نشانگرها برای شناسایی ژنوتیپ‌های بالقوه جدید در میان بسیاری از نمونه‌های *Hesperis* استفاده شده‌اند (۲۵ و ۲۶ و ۲۷). در سال‌های اخیر، سیستم‌های نشانگر مولکولی مانند چندشکلی قطعات DNA تکثیر یافته تصادفی (RAPD)، چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته (AFLP)، توالی تکرار ساده (ISSR)، توالی تکرار ساده (SSR) و چندشکلی تقویت‌شده بین رتروترانسپوزونی (IRAP) برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی و ارتباط در میان ارقام و کولتیوارهای نژادهای بومی استفاده می‌شود (۲۸ و ۲۹ و ۳۰). عناصر قابل انتقال، به‌ویژه رتروترانسپوزون‌ها، بیشتر ژنوم گیاهان را تشکیل می‌دهند. تکثیر آن‌ها تنوع ژنومی ایجاد می‌کند و آن‌ها را به منبع عالی از نشان‌گرهای مولکولی تبدیل می‌کند (۳۱ و ۳۲). روش چند شکلی تقویت‌شده بین رتروترانسپوزونی (IRAP) پلی‌مورفیسم‌های درج شده را با تقویت بخش‌های DNA بین دو رتروترانسپوزون نشان می‌دهد که در مطالعات متعددی در مورد تنوع ژنتیکی استفاده شده است (۲۵ و ۲۸).

این مطالعه با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی در *H. persica* به منظور کمک به ژرم پلاسما آن انجام شد. اطلاعات به‌دست آمده در مورد تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های مختلف، زمینه را برای تدوین استراتژی‌های حفاظتی مناسب فراهم می‌کند. تحلیل حاضر نشان داد که *H. persica* بسیار متغیر است، احتمالاً به دلیل زمینه‌های ژنتیکی محلی خاص، فشار تولید مثل و یا تبادل محدود مواد ژنتیکی می‌باشد. ماهیت منحصر به فرد ژرپلاسما *H. persica* که توسط نتایج نشان داده شد، از این مورد برای اجرای استراتژی‌های شناسایی، حفاظت و تولید مثل حمایت می‌کند. همچنین نشان‌گرهای IRAP مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت گونه‌های گیاهی در ایران مفید بودند. نتایج این سنجش مولکولی در ۱۱ جمعیت مربوط به *H. persica* در جدول ۳ ارائه شده است. در مجموع ۸۶ باند توسط ۶ آغازگر تکثیر شد که به‌طور متوسط ۱۱ باند در هر آغازگر که ۷۰ باند (۸۵٪) چندشکلی بودند. تعداد کل قطعات تکثیر شده بین ۱۰ تا ۱۸ و تعداد قطعات چندشکل بین ۹ تا ۱۵ بود.

تنوع ژنتیکی برای بقای گونه‌ها اهمیت اساسی دارد (۱۵ و ۱۷). سطح تنوع ژنتیکی در هر گونه به شدت با سیستم تولیدمثل آن مرتبط است، به طوری که دگرگشتی معمولاً منجر به سطوح بالاتر تنوع ژنتیکی می‌شود (۱۴). بر اساس مطالعات، گونه‌های خودگشن در مقایسه با گونه‌های دگرگشن از تنوع ژنتیکی کم‌تری برخوردارند.

مطالعه حاضر سطح پایینی از هتروزیگوسیتی ( $He = 0.054 - 0.22$ ) را در *H. persica* نشان می‌دهد. نرخ بالای خودلقاحی در این گونه، که احتمالاً علت اصلی پایین بودن سطح هتروزیگوسیتی برآورد شده است، مشاهده شده است. میانگین  $Nm = 0.455$  برای جایگاه‌های IRAP مورد بررسی در این مطالعه، جریان ژن محدود بین جمعیت‌ها را نشان داد که توسط تجزیه و تحلیل STRUCTURE تایید می‌شود.

بررسی نتایج بیولوژیکی نشان می‌دهد که با کاهش فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، شباهت آن‌ها به یکدیگر افزایش می‌یابد. این امر احتمالاً به دلیل سهولت پراکنش بذر توسط باد در این گونه است. همان‌طور که در تجزیه و تحلیل AMOVA نشان داده شده، درصد تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌ها نسبی است. از آنجایی که *H. persica* گیاهی خودگشن است و بازتولید در درون جمعیت‌های همان گونه رخ می‌دهد، تمایز بین جمعیت‌ها در صفات فنوتیپی و تنوع آلی می‌تواند نتیجه رانش ژن، اثرات بنیان‌گذار و انتخاب طبیعی باشد (۳۰).

ویژگی‌های ریخت‌شناسی گرده و بذر در گونه‌های ایرانی متعلق به سه بخش *Hesperis*، *Diaplectos* و *Pachycarpus* برای اولین بار با استفاده از میکروسکوپ نوری (LM) و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات فیلوژنتیک مولکولی *Hesperis* هنوز در مقیاس جهانی انجام نشده است. با این حال، در سایر اعضای تیره *Brassicaceae*، سیستم‌های طبقه‌بندی سنتی عمدتاً به دلیل موازی‌سازی و هم‌گرایی صفات ریخت‌شناسی با مطالعات بیوسیس‌ماتیک مدرن در تضاد هستند (۲۱). در نتیجه، درک موقعیت واقعی هر گونه دشوار خواهد بود.

پس از ترکیه، ایران دومین کشور از لحاظ تنوع برای سرده *Hesperis* محسوب می‌شود (۱۷) و علیرغم مطالعات متعدد در سطح فراگونه‌ای و زیرگونه‌ای روی این سرده، مشکلات طبقه‌بندی آن هنوز حل نشده است (۲۴).

## ۶- نتیجه‌گیری

تاکنون هیچ تلاشی برای مطالعه تنوع ژنتیکی، سازگاری اکولوژیکی و تمایز درون و بین گونه‌های همراه با مطالعات ریخت‌شناسی بر روی گونه *Hesperis* وجود ندارد. بنابراین مطالعه ریخت‌شناسی و مولکولی در ۷۳ فرد از ۱۱ جمعیت جغرافیایی *H. persica* از دو مرکز بزرگ *Hesperis* در دنیا است. نتایج حاضر نشان داد که بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای IRAP در برخی از افراد *Hesperis persica* اطلاعاتی را که برای حفاظت ژرم پلاس *H. persica* مرتبط است را ارائه کرد. نتایج فعلی نشان داد که *H. persica* تنوع ژنتیکی متوسطی دارند و بنابراین برای حفاظت ژنتیکی و برنامه‌ریزی برنامه‌های اصلاحی آتی بسیار مهم هستند.

1. Andrzejewski, A. L. *Hesperis* L. DC. Syst. 1821; 2: 447-448.
2. Aras S, Duran A, Yenilmez G, Duman DC. Genetic relationships among some *Hesperis* L. (Brassicaceae) species from Turkey assessed by RAPD analysis. *Afr Journ. Biot.* 2009; 8: 3128-3134.
3. Brochmann C. Pollen and seed morphology of Nordic *Draba* (Brassicaceae): phylogenetic and ecological implications. *Nord J Bot1.* 1992; 657-673.
4. Duran A, Ocak A. *Hesperis turkmendaghensis* (Sect. *Hesperis*) (Cruciferae/Brassicaceae), a new species from the Central Anatolia region, Turkey. *Bot. J. Lin. Soc.* 2005;147: 239-247.
5. Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA. Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Pl. Syst. Evol.* 2006; 259: 89-120.
6. Assadi M, Sajedi S, Fakhr Ranjbari H, Mirzadeh Vaghefi S, Moazzeni H, Khodashenas M, Khosravi AR, Hatami A, Mehrnia M, Kaffash Sh, Heidarnia N, Sheidai M, Heidari Rikan M, Kavousi K, Sonboli A, Veiskarami Gh. & Aminian F. *Hesperis* L. In: Assadi, M. & Maassoumi, A. A. (Eds.) *Flora of Iran*. Vol. 143. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 2017; 647-663.
7. De Candolle AP. *Prodromus*. 1824; 1:188-190.
8. Duran A, Ünal F, Pınar NM. & Çetin Ö. Morphological, palynological, seed-coat surface and karyological studies of *Hesperis bicuspidata* and *H. stellata* (Cruciferae) from Turkey. *Nordic J. Bot.* 2011; 29: 641-651.
9. Cullen J. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Davis PH (ed.). 1965; 1: 452-460. Edinburgh: Edinburgh Univ. Press.
10. Duran A. A taxonomic update of the genus *Hesperis* in Turkey. 5th International Conference on Agriculture, Environment and Biological Sciences (ICAEBs-16), Pattaya, Thailand, 2016; 26-29.
11. Dvořák F. *Hesperis* L. In: Rechinger K.H. (Eds.) *Flora Iranica*. Vol. 57/28.2. Akademische Druck- u, Verlagsanstalt, Graz. 1968; 266-273.
12. Dvořák F. Infrageneric classification of *Hesperis* L. *Feddes. Rep.* 1973; 84: 259-272.
13. Duran A, Ünal F. & Pınar M. The Revision of the Genus *Hesperis* L. in Turkey. The Scientific and Technical Research Council of Turkey, Ankara, XV 2003: 293.
14. Duran A. Two new species with pendulous fruits in *Hesperis* (Brassicaceae) from South Anatolia region, Turkey. *Novon.* 2008; 18: 453-463.
15. Duran A. *Hesperis ozcelikii* (Brassicaceae), a new species from Turkey. *Ann. Bot. Fen.* 2009; 46: 577-584.
16. Ellis JR, JM, Burke. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, (2007); 99: 125-132.

17. Evanno G S, Regnaut J, Goudet. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14:2611-2620.
18. Esfandani Bozchaloyi S M, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Genetic Diversity and Morphological Variability in *Geranium Purpureum* Vill. (Geraniaceae) of Iran. *Genetika.* 2017a; 49: 543-557.
19. Esfandani Bozchaloyi S M, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Species Delimitation In *Geranium* Sect. *Batrachioidea*: Morphological and Molecular. *Act. Bot. Hung.* 2017b; 59(3-4):319-334.
20. Eslami Farouji A, Khodayari H, Assadi M, Özüdoğru B, Çetin Ö, Mummenhoff K. & Bhattacharya S. Numerical taxonomy contributes to delimitation of Iranian and Turkish *Hesperis* L. (Brassicaceae) species. *Phytotaxa.* 2018; 234-568.
21. De Kort H, Vandepitte K, Honnay O. A meta-analysis of the effects of plant traits and geographical scale on the magnitude of adaptive differentiation as measured by the difference between QST and FST. *Evol. Ecol.* 2012; 27:622-677.
22. Franzke A, Lysak MA, Al-Shehbaz IA, Koch MA, Mummenhoff K. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends Plant Sci.* 2011; 16: 108-116.
33. Fournier ME. Monographie du genre *Hesperis*. *Bul. de la Soc. Bot. de Fra.* 1868; 13: 326-362.
23. Esfandani Bozchaloyi SM, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Genetic and morphological diversity in *Geranium dissectum* (Sec. *Dissecta*, Geraniaceae) populations. *Biologia.* 2017c;72(10): 1121-1130
24. Esfandani Bozchaloyi SM, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Morphometric and ISSR-analysis of local populations of *Geranium molle* L. from the southern coast of the Caspian Sea. *Cytology and genetics.* 2018c; 52, 4: 309-321.
25. Esfandani-Bozchaloyi SM, Sheidai M. Molecular diversity and genetic relationships among *Geranium pusillum* and *G. pyrenaicum* with inter simple sequence repeat (ISSR) regions, *Caryologia.* 2018d; 71, 4: 1-14.
26. Esfandani-Bozchaloyi S, M, Sheidai M. Comparison of DNA Extraction Methods from *Geranium* (Geraniaceae). *Acta Botanica Hungarica.* 2019; 61(3-4): 251-266.
27. Eslami Farouji A, Khodayari H, Assadi M, Özüdoğru B, Çetin Ö, Mummenhoff K. & Bhattacharya S. Numerical taxonomy contributes to delimitation of Iranian and Turkish *Hesperis* L. (Brassicaceae) species. *Phytotaxa.* 2018;222-234.
28. Falush DM, Stephens JK, Pritchard. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes.* 2007. 7:574-578.
29. Freeland Jr, H, Kirk SD, Peterson. *Molecular Ecology*, 2nd Ed. Wiley-Blackwell, Chichester. 2011;464-477.
30. Esfandani Bozchaloyi SM, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Analysis of genetic diversity in *Geranium robertianum* by ISSR markers. *Phytologia Balcanica.* 2017d; 23(2):157-166.

31. Esfandani Bozchaloyi S M, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Species Relationship and Population Structure Analysis In Geranium Subg. Robertium (Picard) Rouy With The Use of ISSR Molecular Markers. Act. Bot. Hung. 2018a; 60(1-2): 47-65.
32. Esfandani Bozchaloyi SM, Sheidai M, Keshavarzi Z, Noormohammadi. Species Identification and Population Structure Analysis In Geranium Subg. Geranium (Geraniaceae) . Hacquetia. 2018b; 17/2: 235-246.