

Research Paper

Assessment of the Genetic Diversity of Lentil (*Lens culinaris* Medic) Genotypes using ISSR Markers

Arman Rahmani¹, Massoud Dehdari², Reza Amiri Fahliani³ and
Rahmatollah Karimizadeh⁴

1- MSc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran,
(Corresponding author: adehdari@yu.ac.ir)

3- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

4- Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gachsaran, Iran

Received: 25 September, 2025

Revised: 30 December, 2025

Accepted: 31 January, 2026

Extended Abstract

Background: Lentil (*Lens culinaris* Medic) is one of the most important plants of the legume family, playing an important role in providing human food, known as an important source of protein. There is a rich germplasm of this plant in Iran and the world. Given that a large number of varieties and breeding lines are produced and introduced by internal and exotic breeders every year, it is essential to study their genetic diversity for use in breeding programs. It is possible to study genetic diversity through morphological, biochemical, and DNA markers. The use of molecular markers to study genetic diversity is more reliable than other markers due to the lack of influence of environmental factors and extensive polymorphism. ISSR markers have shown high efficiency as a dominant marker in studying genetic diversity and genetic relationships between different genotypes of plants, especially lentil. Therefore, this study was designed and implemented to study the genetic diversity of different lines and several common varieties of lentil using the ISSR marker.

Methods: In this experiment, fresh leaf samples of 36 lentil genotypes (including 33 new breeding lines and three common cultivars), which were obtained from the Gachsaran Rainfed Research Station, were collected and frozen at -40 °C. Leaf DNA was extracted using the CTAB method, and its quality and quantity were examined on agarose gel and using a spectrophotometer, respectively, in the central laboratory of the Faculty of Agriculture, Yasouj University. DNA samples with suitable quality were selected for the further step, and then PCR amplification was performed using 20 ISSR primers that had shown high polymorphism in other plants in previous studies. In the desired samples, the presence and absence of bands were scored as one and zero, respectively. The percentage of polymorphic bands, polymorphic information content, and the Shannon index were calculated with statistical analyses, followed by examining the efficiency of the ISSR markers. Then, the genotypes were grouped by cluster analysis (Jaccard's similarity coefficient and the UPGMA method) and principal component analysis. The genotypes with the greatest genetic distance were introduced for further breeding programs. Excel, NTSYS PC 2.02, and Popgene 1.32 software were used for the analyses.

Results: In total, 186 out of 190 produced bands were polymorphic. UBC840 marker produced the highest number of bands (17 bands), all of which showed polymorphism. Among the markers, the highest and the lowest polymorphic information content (PIC) belonged to UBC830 (0.49) and UBC814 (0.13) markers, respectively. Nine markers had PICs greater than 0.4, which were considered suitable for the genetic differentiation of genotypes. The average Shannon index was 0.845. The highest and the lowest Shannon index, which indicates intra-population variation, were recorded for UBC853 (1.4) and UBC814 (0.3) primers, respectively. In general, considering the measured characteristics, UBC855 and UBC853 primers are recommended for genetic studies in lentil. Cluster analysis classified 36 lentil genotypes into five groups. There were two genotypes in the first group (C1), most of the genotypes (55.6%) were in the second group (C2), two genotypes were in the third group (C3), 11 genotypes were in the fourth group (C4), and only one genotype was in the fifth group (C5). The greatest genetic distance was observed between the fifth and second groups (for example, the Jaccard similarity coefficient was 0.08 between genotype 33 and genotype 19). Therefore, it is expected that the crossing between genotype 33 (group 5) and the genotypes of the second group would witness more transgressive segregation.



The Sepehr and Kimiya cultivars were placed in one group, which probably indicates their common origin, while the Gachsaran cultivar was placed in a different group. Most genotypes with the same origin were placed in the same group, although some differences were also observed. Principal component analysis showed that many components played a role in explaining the total variance; for example, the first five components explained 51.82% of the total variance. This result indicates a suitable distribution of the markers in the lentil genome. The grouping of genotypes based on the first two components partially confirmed the grouping obtained from cluster analysis, although it also had some differences. In cluster analysis, all the variance contributed to the grouping, while only 42.09% of the total variance contributed to the grouping obtained from the first two components. Therefore, the existence of differences in the grouping results is not far from expected.

Conclusion: Similar to some studies, the ISSR markers used in this study showed high efficiency for examining genetic diversity and distinguishing lentil genotypes. Among them, two primers, including UBC855 and UBC853, were superior to the other markers. Given the extensive polymorphism shown by these markers, it is suggested that they can be used to study the association analysis with important lentil traits, including drought tolerance, grain yield, and protein percentage, to take a fundamental step toward improving these traits. On the other hand, a wide diversity was observed among the studied genotypes in terms of ISSR markers. The grouping of genotypes showed that genotypes with high genetic distance can be selected and introduced for continuing lentil breeding programs. Among them, the highest genetic distance was observed between only the fifth group genotype and the second group genotypes, which is suggested to be used in future studies.

Keywords: Molecular markers, Polymorphism, Polymorphism information content, Shannon index

How to Cite This Article: Rahmani, A., Dehdari, M., Amiri Fahliani, R., & Karimizadeh, R. (2026). Assessment of the Genetic Diversity of Lentil (*Lens culinaris* Medic) Genotypes using ISSR Markers. *J Crop Breed*, 18(2), 79-91. DOI: 10.61882/jcb.2026.1634



مقاله پژوهشی

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های عدس با استفاده از نشانگرهای ISSR

آرمان رحمانی^۱، مسعود دهداری^۲، رضا امیری فهلیانی^۳ و رحمت‌الله کریمی‌زاده^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
 ۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، (نویسنده مسوول: adehdari@yu.ac.ir)
 ۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
 ۴- موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گچساران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۱

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹
صفحه: ۹۱ تا ۹۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۳

چکیده مبسوط:

مقدمه و هدف: عدس با نام علمی *Lens culinaris Medic* یکی از مهمترین گیاهان خانواده بقولات است که نقش مهمی در تأمین غذای انسان دارد و به‌عنوان منبع مهمی از پروتئین شناخته می‌شود. ژرمپلاسم غنی از این گیاه در ایران و دنیا وجود دارد. با توجه به این که هر ساله تعداد زیادی رقم و لاین‌های اصلاحی توسط به‌نژادگران داخلی و خارجی تولید و معرفی می‌گردند، بررسی تنوع ژنتیکی آنها جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی امری ضروری است. بررسی تنوع ژنتیکی از طریق نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و DNA امکان‌پذیر است. استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی نسبت به سایر نشانگرها به دلیل عدم تأثیر عوامل محیطی و چندشکلی گسترده اعتبار بیشتری دارد. در این میان، نشانگر ISSR به‌عنوان یک نشانگر غالب کارایی بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان به‌خصوص عدس از خود نشان داده است. به‌همین دلیل، این پژوهش جهت بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های مختلف و چند رقم متداول عدس به کمک نشانگر ISSR طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش، نمونه‌های برگ تازه ۳۶ ژنوتیپ عدس (شامل ۳۳ لاین جدید و سه رقم متداول)، که از ایستگاه تحقیقات دیم گچساران تهیه شده بودند، برداشت و در دمای ۴۰- درجه سلسیوس منجمد شدند. سپس، DNA به روش CTAB استخراج گردید و کیفیت آن بر روی ژل آگارز و کمیت آن به کمک اسپکتروفتومتر در آزمایشگاه مرکزی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های DNA با کیفیت مناسب جهت ادامه کار انتخاب شدند. سپس، تکثیر به کمک PCR با کمک ۲۰ آغازگر ISSR که در مطالعات قبلی چندشکلی بالایی در سایر گیاهان نشان داده بودند، انجام گردید. در نمونه‌های مطلوب، وجود و عدم وجود نوار به ترتیب با یک و صفر امتیازبندی شدند. سپس، تجزیه و تحلیل‌های آماری از قبیل درصد نوارهای چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص شانون محاسبه شد و کارایی آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت. سپس گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به وسیله تجزیه خوشه‌ای (ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA) و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد و ژنوتیپ‌های با بیشترین فاصله ژنتیکی جهت ادامه برنامه‌های اصلاحی معرفی شدند. از نرم‌افزارهای NTSYS PC 2.02، Excel و Popgene 1.32 در این مطالعه استفاده شد.

یافته‌ها: در مجموع، ۱۹۰ نوار تولید شد که ۱۸۶ تایی آن‌ها چندشکلی بودند. آغازگر UBC840 بیشترین تعداد نوار (۱۷ نوار) را تولید نمود که همگی آن‌ها چندشکلی نشان دادند. در بین آغازگرها، بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) متعلق به آغازگر UBC830 (۰/۴۹) و کمترین میزان آن متعلق به آغازگر UBC814 (۰/۱۳) بود. نه آغازگر دارای PIC بیشتر از ۰/۴ بودند که برای تفکیک ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مناسب تشخیص داده شدند. میانگین شاخص شانون ۰/۸۴۵ بود. بیشترین شاخص شانون که تنوع درون جمعیتی را نشان می‌دهد مربوط به آغازگر UBC853 با (۱/۴) و کمترین آن مربوط به آغازگر UBC814 (۰/۳) بود. به‌طور کلی، با توجه به ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، آغازگرهای UBC855 و UBC853 جهت مطالعات ژنتیکی در عدس معرفی شدند. تجزیه خوشه‌ای ۳۶ ژنوتیپ عدس را به پنج گروه تفکیک نمود. در گروه اول (C1) دو ژنوتیپ، در گروه دوم (C2) اکثر ژنوتیپ‌ها (۵۵/۶ درصد)، در گروه سوم (C3) دو ژنوتیپ، در گروه چهارم (C4) ۱۱ ژنوتیپ، و در گروه پنجم (C5) فقط یک ژنوتیپ قرار گرفتند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ گروه پنجم و ژنوتیپ‌های گروه دوم بود (به‌عنوان مثال، ضریب تشابه جاکارد ۰/۰۸ بین ژنوتیپ ۳۳ و ژنوتیپ ۱۹). بنابر این، انتظار می‌رود که از تلاقی بین ژنوتیپ ۳۳ (گروه پنجم) با ژنوتیپ‌های گروه دوم شاهد تفکیک متجاوز بیشتری بود. ارقام سپهر و کیمیا در یک گروه قرار گرفتند که احتمالاً بیانگر منشأ یکسان آن‌ها است در حالی که رقم گچساران در گروه متفاوت قرار گرفت. اکثر ژنوتیپ‌ها با منشأ یکسان در یک گروه قرار گرفتند، هرچند تفاوت‌هایی نیز مشاهده گردید. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که مؤلفه‌های زیادی در توجیه واریانس کل نقش داشتند؛ به‌عنوان مثال، پنج مؤلفه اول ۵۱/۸۲ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند. این نتیجه بیانگر توزیع مناسب آغازگرهای مورد استفاده در ژنوم عدس است. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس دو مؤلفه اول تا حدی گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود هر چند که تفاوت‌هایی نیز با آن داشت. در تجزیه خوشه‌ای، تمام واریانس‌ها در گروه‌بندی نقش داشتند در حالی که فقط ۴۲/۰۹ درصد از واریانس کل در گروه‌بندی حاصل از دو مؤلفه اول نقش داشتند. بنابر این، وجود تفاوت در نتایج گروه‌بندی‌ها دور از انتظار نیست.

نتیجه‌گیری: همانند برخی مطالعات، نشانگرهای ISSR مورد استفاده در این پژوهش کارایی بالایی را جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تفکیک ژنوتیپ‌های عدس نشان دادند. در این میان، دو آغازگر UBC855 و UBC853 در مقایسه با سایر آغازگرها برتر بودند. با توجه به چندشکلی گسترده که این آغازگرها نشان دادند، پیشنهاد می‌گردد که از آنها جهت مطالعه تجزیه ارتباطی با صفات مهم عدس از جمله تحمل به خشکی، عملکرد دانه و درصد پروتئین استفاده نمود تا بتوان گام اساسی برای اصلاح این صفات برداشت. از طرف دیگر، تنوع وسیعی میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر نشانگرهای ISSR مشاهده شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نشان داد که می‌توان ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی زیاد را جهت ادامه برنامه‌های اصلاحی عدس انتخاب و معرفی نمود. در این میان، بیشترین فاصله ژنتیکی بین تنها ژنوتیپ گروه پنجم با ژنوتیپ‌های گروه دوم مشاهده شد که پیشنهاد می‌گردد از آن‌ها در مطالعات بعدی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، شاخص شانون، محتوای اطلاعات چندشکلی، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

دیم کشت می‌شود؛ به‌عنوان مثال، در آخرین سرشماری کشاورزی (Statistical Center of Iran, 2024) سطح زیر کشت آن در ایران ۴۲۰۷۷ هکتار بیان شده است در حالی که در سال ماقبل آن ۸۱۹۸۰ گزارش گردیده است (Ministry of Agriculture Jihad, 2024) که در هر دو گزارش بیش از ۹۴ درصد به کشت دیم اختصاص داشته است. شاید دلیل این

عدس با نام علمی *Lens culinaris Medic* یکی از مهمترین گیاهان خانواده بقولات است که نقش مهمی در تأمین غذای انسان دارد و به‌عنوان منبع مهمی از پروتئین شناخته می‌شود. این گیاه خودگشن و دیپلوئید (2n = 2x = ۱۴) است (Anjam, et al., 2005). گیاه عدس در ایران بیشتر به‌صورت

۷۹ نوار از ۹۰ نوار تولیدشده چندشکل بودند. همچنین، ۱۳ ژنوتیپ مورد مطالعه در دو گروه به روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA قرار گرفتند. گروه‌بندی به کمک PCA گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود. در گوجه‌فرنگی نیز نشانگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی به کار گرفته شده است، یک نشانگر با کارایی بالاتر نسبت به سایر نشانگرها معرفی شده است و دامنه PIC از ۰/۲۲ تا ۰/۴ گزارش گردیده است (GolCheshmeh, et al., 2023).

در مطالعه‌ای، تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی ۱۰ واریته عدس ایتالیایی با استفاده از نه صفت اگرومورفولوژیکی و چهار آغازگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی با استفاده از آغازگرهای ISSR، چندشکلی خوبی نشان دادند (Fikiru et al., 2011). در آزمایش نهاس و همکاران (El-Nahas, et al., 2011)، با به کارگیری نشانگرهای ISSR در عدس تعداد نوارهای چندشکل از سه نوار تا ده نوار متغیر بود اما درصد چندشکلی از ۲۰ تا ۶۰ درصد متغیر بود. ممدوف و آقایاوا (Mammadova & Aghayeva, 2023) نیز با مطالعه ۴۶ ژنوتیپ عدس به کمک نه نشانگر ISSR مجموع ۷۶ درصد چندشکلی مشاهده کردند. در مطالعه دیگر، الموسی و همکاران (Al-Mousa et al., 2023) ۳۷ ژنوتیپ عدس را به کمک ۲۰ نشانگر ISSR بررسی نمودند. استفاده از سایر نشانگرها در عدس چندشکلی کمتری در مقایسه با نشانگر ISSR داشتند به عنوان مثال، نشانگر SCOT ۶۷/۸۶ درصد (El-Danasoury et al., 2017) و نشانگر SSR ۴۱/۴۵ درصد (Tomar et al., 2023) چندشکلی در عدس داشتند. در عین حال، برخی پژوهش‌ها از کارایی بالای سایر نشانگرها حکایت دارند. به عنوان مثال، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار جمعیت ۹۰ ژنوتیپ عدس با استفاده از ۳۰ نشانگر SSR نشان از توانایی بالای این نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی دارد و می‌تواند ژنوتیپ‌ها را به خوبی از هم تفکیک کند (Sarvmeili et al., 2020).

ال-داناسوری و همکاران (El-Danasoury et al., 2017) جمعیت‌های مختلف عدس را به کمک ۱۷ نشانگر SCOT به روش UPGMA در دو گروه مختلف قرار دادند. تومار و همکاران (Tomar et al., 2023) نیز ۳۷ ژنوتیپ عدس را به کمک نشانگر SSR در دو گروه مجزا گروه‌بندی نمودند. در مطالعه‌ای روی ژنوتیپ‌های عدس، تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در ضریب تشابه ۵۶/۰ در چهار گروه اصلی طبقه‌بندی نمود. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی زیادی بین ژنوتیپ‌های عدس وجود داشت و نشانگر مولکولی RAPD ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های عدس تشخیص داده شد (Nouri et al., 2014). ممدوف و آقایاوا (Mammadova & Aghayeva, 2023) ۴۶ ژنوتیپ عدس را به کمک ۲۰ نشانگر ISSR و ال-موسی و همکاران (Al-Mousa et al., 2023) ۳۷ ژنوتیپ عدس را به کمک ۱۸ نشانگر ISSR در شش گروه تفکیک نمودند. از این گروه‌بندی‌ها برای یافتن ژنوتیپ‌های مطلوب جهت ادامه برنامه‌های اصلاحی در عدس استفاده می‌شود.

کاهش فاحش، خشکسالی‌های اخیر باشند و بنابر این، به دلیل استفاده از نزولات آسمانی و عدم نیاز به آبیاری موردتوجه قرار می‌گیرد. ژرم‌پلاسم غنی از این گیاه در ایران و دنیا وجود دارد و هر ساله ارقام و لاین‌های جدیدی توسط پژوهشگران به این مجموعه اضافه می‌شود. در برنامه‌های به‌نژادی، وجود تنوع و سپس انتخاب برای بهبود یک صفت مطلوب (به عنوان مثال عملکرد) هدف اصلی است که بررسی به روش متداول نیاز به مدت زمان طولانی دارد. در عین حال، تأثیر عوامل محیطی هم مشکل ساز است و بر کارایی انتخاب اثر سوء دارد. استفاده از نشانگرهای مولکولی برای نیل به این اهداف به دلیل وراثت‌پذیری ۱۰۰ درصد و عدم تأثیرپذیری از محیط راهکاری مناسب و کارا است (Collard et al., 2005). مطالعات اولیه تنوع ژنتیکی در عدس عمدتاً بر اساس صفات مورفولوژیکی انجام شده‌اند (Rao et al., 1988; Tyagi & Khan, 2010). با معرفی نشانگرهای DNA (از جمله ISSR) و کارایی بالاتر آنها نسبت به نشانگرهای پروتئینی و مورفولوژیکی، استفاده از آنها به صورت چشم‌گیری افزایش یافته است. در دهه اخیر، نشانگرهای مولکولی متنوعی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان از جمله عدس به کار گرفته شده‌اند. به عنوان مثال، از نشانگرهای RAPD (Nouri et al., 2014)، ScOT (Kumar Mishra et al., 2017)، SSR (El-Danasoury et al., 2019)، SNP (El-Nahas, et al., 2011) و ISSR (Khazaei et al., 2016) استفاده شده است. در این میان، نشانگرهای ISSR کارایی بسیار بالایی را نشان داده‌اند (Sicard et al., 2005). نشانگرهای ISSR که بر پایه تکثیر نواحی بین توالی‌های ریزماهورهای (SSR) طراحی می‌شوند، چندشکلی بالایی (معمولاً > ۹۰٪) را نشان می‌دهند و نسبت به RAPD تکرارپذیری بهتری دارند. همچنین، برخلاف SSR و SNP، ISSR نیازی به اطلاعات توالی ژنوم ندارد و با هزینه کمتر قابل اجرا است که برای تشخیص تنوع ژنتیکی به کار می‌رود (Liu & Wendel, 2001). به دلیل ویژگی‌های مناسب مانند دقت بالا، تنوع بسیار بالا، تکرارپذیری، هزینه کم و اجرای آسان آن، این نشانگر مورد توجه به‌نژادگران قرار گرفته است (Souframanien & Gopalkrishna, 2004; Terzopoulos & Bebeli, 2008). به علاوه، دارای ویژگی‌های مناسب مثل تجزیه همزمان تعداد زیادی مکان ژنی است و به دلیل سرعت جداسازی، قدرت زیادی در آشکار کردن تنوع ژنتیکی دارد (Hassani Tesie et al., 2015; Reddy et al., 2002). در سایر گیاهان نیز این نشانگر کارایی بالایی داشته است. به عنوان مثال، صخراوی و همکاران (Sakhravi et al., 2023) تنوع ژنتیکی ۴۱ ژنوتیپ لوبیا چیتی را با استفاده از ۲۰ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق، در مجموع ۱۹۳ نوار تولید شد که ۱۷۲ نوار چندشکلی نشان دادند. به علاوه، براساس شاخص‌های مختلف پنج نشانگر کارا معرفی شدند و ژنوتیپ‌هایی که بیشترین فاصله ژنتیکی را داشتند جهت ادامه برنامه‌های اصلاحی معرفی گردیدند. جعفری و همکاران (Jafari, et al., 2023) تنوع ژنتیکی داخل و بین جوامع مختلف کینوا را به کمک نشانگر ISSR مطالعه نمودند. در مطالعه آنها،

مواد و روش‌ها

بذور ۳۶ ژنوتیپ عدس (شامل سه رقم و ۳۳ لاین پیشرفته) از ایستگاه تحقیقات دیم گچساران تهیه و در آذر ماه ۱۳۹۹ در شرایط مزرعه در شهرستان گچساران کشت داده شدند (جدول ۱). نمونه‌های برگ‌ی از برگ‌های جوان (قبل از مرحله گلدهی) ده بوته عدس برداشت و در ازت مایع قرار داده شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

با توجه به این که هر ساله تعداد زیادی رقم و لاین‌های اصلاحی توسط به‌نژادگران داخلی و خارجی تولید و معرفی می‌گردند، بررسی تنوع ژنتیکی آنها جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی امری ضروری است. به همین دلیل و با توجه به کارایی بالای نشانگر ISSR، این پژوهش جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی، معرفی نشانگرهای کارآمد و ژنوتیپ‌های مناسب با به کارگیری ۳۶ ژنوتیپ (۳۳ لاین پیشرفته جدید و سه رقم متداول) مختلف عدس بوسیله ۲۰ آغازگر ISSR طراحی گردید.

جدول ۱- نام، شجره و منشا ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه

Table 1. The names of the studied lentil genotypes, pedigrees and origins.

شجره یا نام ژنوتیپ Name or pedigree	منشا Origin	ردیف No.
FLIP2013-048L(ILL11301)-ILL7616 X ILL7723	ICARDA	1
FLIP2014-069L(ILL11479)-ILL7723 x ILL5883	ICARDA	2
FLIP2014-074L(ILL11484)-ILL6994 x ILL9932	ICARDA	3
FLIP2014-078L(ILL11488)-ILL6994 x ILL5725	ICARDA	4
FLIP2014-118L(ILL11528)-ILL6212 x ILL1005	ICARDA	5
FLIP2012-31L(ILL11006)- ILL7502XILL590	ICARDA	6
FLIP2012-51L(ILL11026)- ILL7981XILL7706	ICARDA	7
FLIP2012-62L(ILL11037)-L- 5125XILL8006	ICARDA	8
FLIP2012-68L(ILL11043)- ILL7980XILL7666	ICARDA	9
FLIP2012-109L(ILL11084)- ILL7617XILL5883	ICARDA	10
FLIP2012-120L(ILL11095)- ILL4605XILL6024	ICARDA	11
FLIP2012-123L(ILL11098)- ILL4605XILL7537	ICARDA	12
FLIP2012-124L(ILL11099)- ILL8008XILL7201	ICARDA	13
FLIP2013-60L(ILL11313)- ILL9835XILL7010	ICARDA	14
FLIP2013-74L(ILL11327)-ILL 10870 XILL8176	ICARDA	15
PRECOZ-4605-	Argentina	16
FLIP2010-40L-10770-ILL 8119 / ILL 7686	ICARDA	17
FLIP 2009-52L ILL 5883/91517	ICARDA	18
FLIP2011-13L-10893-ILL 358 / ILL 590	ICARDA	19
FLIP2010-50L-10780-ILL 5883 / ILL 8188	ICARDA	20
ILL 7547 x ILL 9892 2006-06-0G-0GA- 0GA-11	ICARDA	21
FLIP2010-90L-10820-ILL 7115 / AKM 27	ICARDA	22
ILL 6434 x ILL 8008 2006-02-0G-0GA- 0GA-11	ICARDA	23
FLIP2007-16L ILL 2126 X ILL 4659	ICARDA	24
ILL 7547 x ILL 6002 2006-03-0G-0GA- 0GA-11	ICARDA	25
GACH LOC 2010-01	IRAN	26
ILL 6211 x ILL 6002 2006-07-0G-0GA- 0GA-11	ICARDA	27
FLIP 2005-32L	ICARDA	28
FLIP1996-15L(Ibla 1) ILL 6209xILL5671	ICARDA	29
FLIP2011-1L ILL 6443 X ILL 1005	ICARDA	30
FLIP2011-6L ILL 6434 X ILL 6972	ICARDA	31
FLIP2010-8L ILL 2126 X ILL 6199	IRAN	32
FLIP2013-136L(ILL11389)- ILL7617XILL5883	IRAN	33
Sepehr	IRAN	34
Gachsaran	IRAN	35
Kimiya	IRAN	36

میکروتیوب‌ها اضافه گردید و بعد از کمی مخلوط کردن با دستگاه ورتکس (Vortex) در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سلسیوس و مدت زمان ۷۰ دقیقه قرار داده شدند. در این مدت، هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی تکان داده شدند تا پودر گیاهی به خوبی در بافر استخراج حل شود و تخریب سلول‌ها و استخراج DNA از هسته‌های سلولی تسهیل شوند. بعد از کمی تکان دادن، به اندازه حجم نمونه کلروفرم و ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲:۴) اضافه گردید و بعد نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و سرعت

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش سی‌تب (Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB,) انجام گرفت (Doyle & Doyle, 1990). ۰/۵ گرم از نمونه برگ‌ی در هاون چینی و در حضور ازت مایع سریع پودر و به درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. ۴۹۰ میکرولیتر بافر استخراج (CTAB)، ۵ میکرولیتر محلول پروتئیناز k (با غلظت ۱۰ mg/ml) و ۵ میکرولیتر مرکاپتواتانل به هر کدام از

برای حل شدن کلاف، تیوب‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال ۴ درجه قرار داده شدند. سپس تا زمان استفاده در فریزر ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای تعیین غلظت DNA، ابتدا دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل Eppendorf AG-22331 Bio. Photometer) به کمک ۱۰۰ میکرولیتر تریس کالیبره شد. طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ به ترتیب نشان‌دهنده میزان جذب نوری توسط DNA و پروتئین هستند. پس از کالیبره کردن، داخل کووت دیگر ۹۸ میکرولیتر TE و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی ریخته و میزان جذب نوری DNA ژنومی تعیین شد. نمونه‌هایی که نسبت A_{260}/A_{280} آن‌ها در محدوده ۲-۱/۸ بود، جهت ادامه کار با پی‌سی‌آر (PCR) انتخاب شدند. روش اندازه‌گیری کیفیت DNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز انجام شد.

تکثیر DNA ژنومی با آغازگرهای ISSR به وسیله PCR

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ترکیب مواد مورد نیاز شامل، نمونه DNA، مسترمیکس، آغازگر و آب مقطر دوبار استریل صورت پذیرفت. ترکیبات لازم برای انجام واکنش PCR طبق جدول ۲ بود.

۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شدند. در این مرحله، سه فاز مجزا مشاهده شد که فاز بالایی به آرامی با استفاده از سمپلر برداشته و به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری جدید منتقل شد. به اندازه ۲/۳ از حجم فاز بالایی حاصل از مرحله قبل، ایزوپروپانول مطلق (۱۰۰٪) سرد اضافه و به آرامی تکان داده شد تا امولسیون کاملی مشاهده گردید. در پایان این مرحله، معمولاً کلاف DNA قابل دیدن بود، ولی برای تشکیل کلاف کامل، امولسیون حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند تا کلاف در ته لوله باقی بماند. جهت شستشو، نمونه DNA در حضور ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد و سپس مایع روئی حذف گردید. برای شستشوی مجدد، ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد استفاده شد و با شرایط مرحله قبل سانتیفریوژ انجام شد. DNA در هوای آزاد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه نگهداری شد تا الکل باقی‌مانده در کلاف DNA کاملاً تبخیر شود. ۳۰-۵۰ میکرولیتر تی‌ای (TE) به میکروتیوب‌ها اضافه شد و

جدول ۲- مقدار مواد لازم برای هر واکنش PCR

Table 2. The amount of materials required for each PCR reaction

نوع ماده Components	مقدار (میکرولیتر) Amount
PCR Master Mix 2X	7.0
DNA (50 ng)	5.0
Primer (10 μM)	0.8
آب دو بار تقطیر	7.2
حجم نهایی	20.0

که توسط شرکت سینا ژن تهیه شدند. مشخصات این نشانگرها در جدول ۳ آورده شده‌اند.

از تعداد ۲۰ آغازگر ISSR (Izzatullayeva, et al., 2014) که در مطالعات قبلی تنوع وسیعی بروی گیاهان مختلف نشان داده بودند، به همراه لودر ۵۰ جفت بازی استفاده گردید

جدول ۳- نام، توالی و دمای اتصال ۲۰ آغازگر ISSR مورد استفاده

Table 3. Name, sequences, and annealing temperatures of the studied ISSR primers

ردیف No.	نام آغازگر Name	توالی آغازگر Sequence (5'-3')	دمای اتصال (سلسیوس) Annealing temperature (°C)
1	UBC826	ACACACACACACACC	47.1
2	UBC830	TGTGTGTGTGTGTGG	47.1
3	UBC814	CTCTCTCTCTCTCTA	44.6
4	UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTC	47.1
5	UBC847	CACACACACACACACRC	48
6	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCCT	48
7	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTYG	48
8	UBC824	CTCTCTCTCTCTCTCG	48
9	UBC844	AGAGAGAGAGAGAGAGAYT	48
10	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48
11	UBC836	ACACACACACACACACYA	48
12	UBC848	CACACACACACACACRG	48
13	UBC838	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	48
14	UBC864	ATCATGATGATGATGATG	48
15	UBC859	ACACACACACACACACYG	48
16	UBC827	ACACACACACACACACG	48
17	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGYT	48
18	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRE	48
19	UBC835	ACACACACACACACACYT	48
20	UBC857	ACACACACACACACACYG	48

شدند. الگوی دمایی مورد استفاده در جدول ۴ آمده است. پس از اتمام واکنش، نمونه‌ها از دستگاه خارج و در فریزر در دمای ۴۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

مواد واکنش در تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شدند و بعد تیوب‌ها به آرامی در چاهک‌های دستگاه PCR ترموسایکلر (مدل PCR-MJ Mini-BIO RAD, Germany) قرار داده

جدول ۴- الگوی دمایی PCR در مراحل مختلف تکثیر

Table 4. PCR temperature patterns at different stages of amplification

مراحل واکنش Reaction steps	دما (سلسیوس) Temperature (°C)	زمان (ثانیه) Duration (seconds)	تعداد چرخه Number of cycles
واشرشت‌سازی اولیه Initial denaturation	94	180	1
واشرشته‌سازی ثانویه Secondary denaturation	94	30	34
اتصال آغازگرها Annealing of primers	41.2-48	45	
بسط اولیه Initial elongation	72	60	
بسط نهایی Final elongation	72	300	1

تجزیه‌های آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، الگوهای نواری حاصل از تکثیر آغازگرها بر اساس حضور و یا عدم حضور به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازبندی شدند. ویژگی‌های مختلف مربوط به نشانگرها از قبیل تعداد کل نواریهای تولید شده، تعداد نواریهای چندشکل، و تعداد نواریهای تک‌شکل محاسبه شدند. سپس، پارامترهای مختلف به شرح زیر محاسبه شدند.

درصد چندشکلی (PPB)، شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC^1) به صورت میانگینی از PIC های به دست آمده از تمامی نواریهای هر نشانگر در کل جمعیت (Roldán-ruiz *et al.*, 2000) و شاخص شانون (H) با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند:

$$PPB = \frac{np}{n} \times 100$$

$$PIC = 2fi(1-fi)$$

$$H = - \sum_{i=1}^s Pi \times \ln Pi$$

در این روابط np : تعداد نواریهای چند شکل، n : تعداد کل نواریها، fi فراوانی آلی (وجود نوار) و Pi فراوانی نسبی آلی (وجود نوار) هستند.

برآورد تعداد کل نواریها، درصد نواریهای چندشکل و شاخص شانون به کمک نرم‌افزار Popgene 1.32، محتوای اطلاعات چندشکلی به کمک پردازشگر Excel، محاسبه ماتریس تشابه جاکارد، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و تجزیه مولفه‌های اصلی به کمک نرم‌افزار NTSYS PC 2.02 صورت گرفت. تعداد گروه‌ها در تجزیه خوشه‌ای از طریق آماره T^2 کاذب هتلینگ (Johnson, 1998) و به کمک نرم‌افزار SAS 9.1 تعیین گردید.

نتایج و بحث

از ۲۰ جفت آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۸ عدد از آن‌ها نواریهای واضح و چندشکل و دو نشانگر نواریهای با وضوح کم تشکیل دادند (جدول ۵). شکل ۱ الگوی نواریهای مربوط به آغازگر UBC851 را نشان می‌دهد. در مجموع، تعداد نواریهای تشکیل شده ۱۹۰ عدد بودند که از میان آن‌ها ۱۸۶ نوار چندشکل و چهار نوار تک‌شکل بودند. تعداد آلی‌های آشکار شده از یک تا ۱۷ برای هر نشانگر متفاوت بود. تمام نواریهای مربوط

به آغازگرهای UBC851, UBC853, UBC823, UBC814, UBC824, UBC834, UBC842, UBC856, UBC848, UBC835, UBC864, UBC859, UBC827, UBC840 و UBC855 چندشکل بودند. کمترین تعداد و درصد نواریهای چندشکلی (۵۰٪) مربوط به آغازگر UBC830 بود. در مطالعه‌ای، فکیرو و همکاران (Fikiru *et al.*, 2011) تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی ۱۰ واریته عدس ایتالیایی را با استفاده از نه صفت اگرومورفولوژیکی و چهار آغازگر ISSR مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه، آغازگرهای ISSR چندشکلی خوبی نشان دادند. در آزمایش النهاس و همکاران (El-Nahas, *et al.*, 2011)، با به کارگیری نشانگرهای ISSR در عدس تعداد نواریهای چندشکل از سه نوار تا ده نوار متغیر بود که شبیه به آزمایش حاضر است اما درصد چندشکلی از ۲۰ تا ۶۰ درصد متغیر بود که به مراتب کمتر از آزمایش ما بود. ممدوف و آقاپاوا (Mammadova & Aghayeva, 2023) نیز با مطالعه ۴۶ ژنوتیپ عدس به کمک نه نشانگر ISSR در مجموع ۷۶ درصد چندشکلی را مشاهده کردند. در مطالعه دیگر، الموسی و همکاران (Al-Mousa, *et al.*, 2023) ۳۷ ژنوتیپ عدس را به کمک ۲۰ آغازگر ISSR بررسی نمودند که همانند مطالعه حاضر ۱۸ آغازگر تکثیر شدند و در مجموع، ۱۸۴ نوار با ۸۷/۳۱ درصد چند شکل تولید نمودند که برخی نواریها در عدس جدید بودند. با توجه به این که ژنوتیپ و نوع نشانگر و توالی آنها در این گونه مطالعات بسیار مهم هستند، دلیل تفاوت در نتایج را می‌توان به این عوامل نسبت داد. استفاده از برخی نشانگرها در عدس چندشکلی کمتری در مقایسه با نشانگر ISSR داشتند. به عنوان مثال، نشانگر SCoT ۶۷/۸۶ درصد (El-Danasoury, *et al.*, 2017) و نشانگر SSR ۴۱/۴۵ درصد (Tomar, *et al.*, 2023) چندشکلی در عدس داشتند. در عین حال، برخی پژوهش‌ها از کارایی بالای سایر نشانگرها حکایت دارند. به عنوان مثال، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار جمعیت ۹۰ ژنوتیپ عدس با استفاده از ۳۰ آغازگر SSR نشان از توانایی بالای این نشانگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی دارد و می‌تواند ژنوتیپ‌ها را به خوبی از هم تفکیک کند (Sarvmeili *et al.*, 2020). بنابر این، بسته به نوع مطالعه کارایی آغازگرها متفاوت است؛ به همین دلیل، برای مقایسه دقیق آغازگرهای مختلف باید ژنوتیپ‌های یکسان را در آزمایش به کار گرفت.

¹ Polymorphic information content

در نشانگرهای هم‌بارز این مقدار ۱ است. مثلاً، در آزمایش تومار و همکاران (Tomar, et al., 2023) که از نشانگر SSR عدس استفاده کردند دامنه PIC از ۰/۳۷ تا ۰/۷۷ متغیر بود، و یا در آزمایش کومار می‌شرا (Kumar Mishra et al., 2019) این مقدار برای نشانگرهای SSR به‌کار رفته بیشتر از ۰/۵ گزارش گردید.

میانگین شاخص شانون در این آزمایش ۰/۸۴۵ بود. بیشترین شاخص شانون که تنوع درون‌جمعیتی را نشان می‌دهد مربوط به آغازگر UBC853 (۱/۴) و کمترین میزان شاخص شانون مربوط به آغازگر UBC814 (۰/۳) بودند (جدول ۵). برای بررسی تنوع بین ژنوتیپ‌ها در درون جمعیت از شاخص شانون استفاده می‌شود. مکان‌های ژنی که میزان شاخص شانون بالایی دارند، تنوع بین ژنوتیپ‌ها را نشان می‌دهند. این شاخص میزان چندشکلی مجموع آغازگرها را در ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. دامنه شاخص تنوع ژنتیکی شانون در مطالعه ممدوف و آقاییوا (Mammadova & Aghayeva, 2023) در عدس به‌کمک نشانگر ISSR از ۰/۵۶ تا ۰/۸۱ گزارش گردید که کمتر از آزمایش ما بود. این نشان می‌دهد که تنوع ژنوتیپ‌ها در جمعیت به‌کار رفته در آزمایش ما بیشتر است.

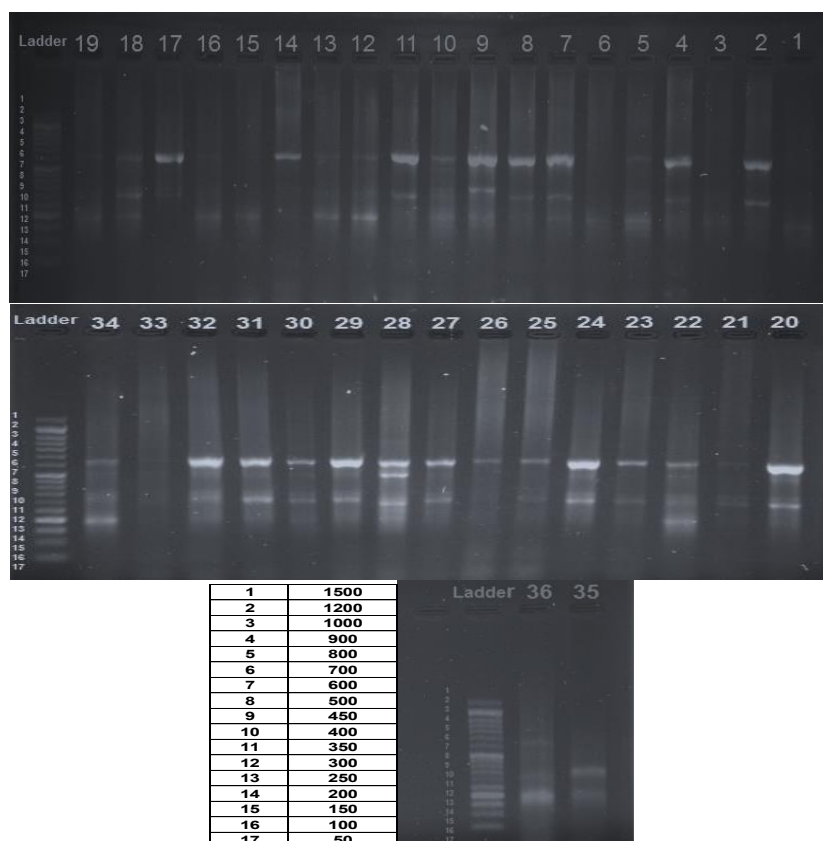
این آغازگرها در لوبیا چیتی درصد چندشکلی از ۵۰-۱۰۰ درصد، دامنه PIC از ۰/۳۵ تا ۰/۵۰ و شاخص شانون از ۱/۲۳ تا ۱۰/۶۰ داشتند (Sakhravi et al., 2023) که حاکی از کارایی بیشتر در مقایسه با عدس است.

بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی PIC متعلق به آغازگر UBC830 (۰/۴۹) و کمترین آن متعلق به آغازگر UBC814 به‌میزان ۰/۱۳ بودند (جدول ۵). در آغازگرهای غالب، آغازگرهایی که PIC بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ دارند کاراً و آن‌هایی که PIC کمتری دارند اطلاعات مفید کمتری دارند (Qi, et al., 2006). بنابر این، در این آزمایش ۱۶ آغازگر PIC خوبی داشتند. آغازگرهای UBC826، UBC830، UBC847، UBC853، UBC855، UBC834، UBC856، UBC851 و UBC857 دارای PIC بیشتر از ۰/۴ بودند که برای تفکیک ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مناسب تشخیص داده شدند. با وجود این که آغازگر UBC830 بالاترین مقدار PIC دارا بود اما به‌دلیل داشتن تنها یک نوار چندشکل توصیه نمی‌شود. در این میان، آغازگرهای UBC855 با ۱۳ آلل و UBC853 با نه آلل نسبت به سایر آغازگرها برتر بودند. آغازگرهای UBC814، UBC859، UBC824 و UBC845 محتوای اطلاعات چندشکلی کمتری نسبت به بقیه نشان دادند. آغازگرهایی که محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بالاتری دارند نسبت به دیگر آغازگرها، فاصله ژنتیکی را بهتر مشخص می‌کنند (Das et al., 2013). در مطالعه‌ای که توسط سیدی مرادی و طالبی (Seyedimoradi & Talebi, 2014) بر روی ۳۱ ژنوتیپ عدس انجام شد، مقدار PIC را برای آغازگر ISSR به‌مقدار ۰/۳۷ و برای نشانگر DAMP ۰/۴۱ گزارش کردند. آنها هر دو نشانگر را برای بررسی تنوع ژنتیکی در عدس کارا معرفی کردند. در نشانگرهای غالب، بیشترین مقدار PIC ۰/۵ است در حالی که

جدول ۵ - خلاصه نتایج حاصل از تکثیر ۲۰ آغازگر ISSR در ژنوتیپ‌های عدس

Table 5. Summarized results of the molecular data analysis of the 20 ISSR primers used in the lentil genotypes

شماره No.	نام آغازگر Primer name	تعداد کل نوارها Total number of bands	تعداد نوار چندشکل Number of polymorphism bands	تعداد نوار تک‌شکل Number of monomorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism bands percentage	محتوی اطلاعات چندشکلی Polymorphism Band percentage (PIC)	شاخص شانون Shannon index
1	UBC826	6	5	1	83.3	0.47	0.5
2	UBC830	2	1	1	50	0.49	0.7
3	UBC814	9	9	-	100	0.13	0.3
4	UBC823	10	10	-	100	0.37	0.6
5	UBC847	10	9	1	90	0.48	1.2
6	UBC853	9	9	-	100	0.45	1.4
7	UBC851	7	7	-	100	0.48	0.6
8	UBC824	13	13	-	100	0.21	0.5
9	UBC844	6	6	-	100	0.42	1.3
10	UBC842	7	7	-	100	0.36	0.6
11	UBC836	7	7	-	100	0.44	0.6
12	UBC848	9	9	-	100	0.35	0.6
13	UBC838	15	15	-	100	0.35	1.2
14	UBC864	10	10	-	100	0.29	0.6
15	UBC859	1	1	-	100	0.23	0.7
16	UBC827	13	13	-	100	0.37	1.3
17	UBC840	17	17	-	100	0.35	1.0
18	UBC845	12	12	-	100	0.14	1.0
19	UBC835	13	13	-	100	0.40	1.1
20	UBC857	14	13	1	92.8	0.41	1.1
جمع	-	190	186	4	-	-	-
میانگین	-	-	-	-	-	-	0.845



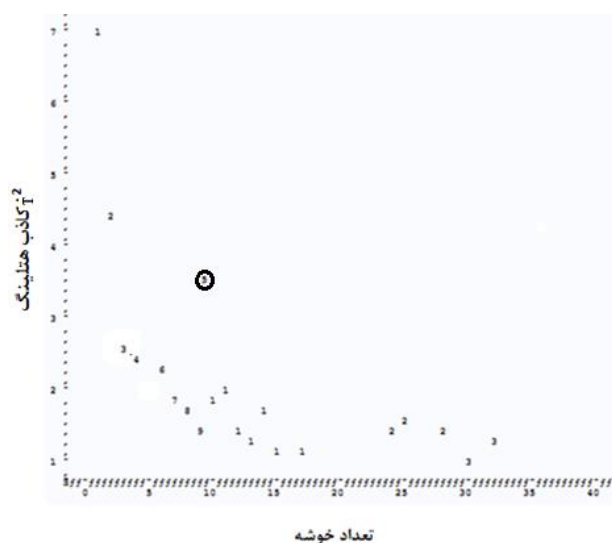
شکل ۱- الگوی نواری آغازگر UBC851 در ۳۶ ژنوتیپ عدس. چاهک Ladder آغازگر راهنما بر اساس جفت‌باز است. سایر ستون‌ها مربوط به ژنوتیپ‌ها طبق جدول ۱ هستند.

Figure 1. The band patterns of PCR products with the primer UBC851 in 36 lentil genotypes. The ladder column belongs to the ladder marker, and the other columns correspond to genotypes as in Table 1.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها

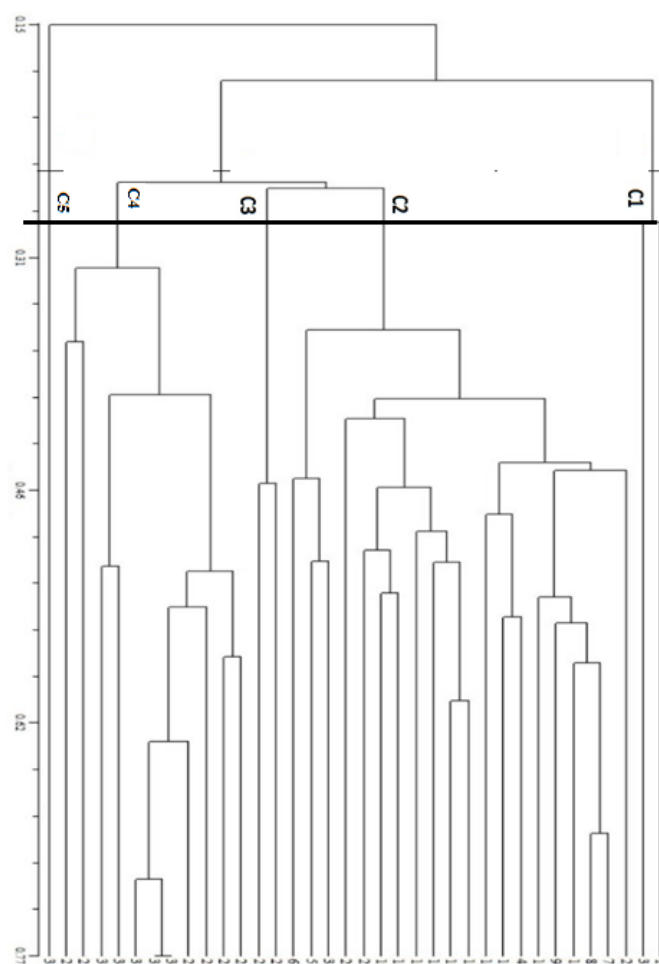
با مقایسه سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده ضریب تشابه جاکارد به‌عنوان مناسب‌ترین ضریب برای گروه‌بندی انتخاب گردید. همچنین بیشترین ضریب همبستگی کوفاکتیک (۰/۸۸) بین ماتریس تشابه جاکارد و روش خوشه‌بندی UPGMA مشاهده گردید. بنابر این، از ماتریس تشابه جاکارد و روش UPGMA برای خوشه‌بندی استفاده شد. با توجه به دندروگرام به‌دست‌آمده ۳۶ ژنوتیپ عدس بر اساس آزمون T^2 کاذب هتلینگ (شکل ۲) در فاصله ۰/۲۹ به پنج گروه تفکیک شدند (شکل ۳). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند که در گروه اول (C1) دو ژنوتیپ شامل رقم گچساران و ژنوتیپ شماره ۱، در گروه دوم (C2) اکثر ژنوتیپ‌ها (۵۵/۶ درصد) شامل رقم‌های سپهر و کیمیا و ژنوتیپ‌های ۲۰، ۲۲، ۱۸، ۱۶، ۱۹، ۱۵، ۱۳، ۱۱، ۱۲، ۱۰، ۹، ۸، ۷، ۱۷، ۱۴، ۴، ۳، ۵ و ۶ در گروه سوم ژنوتیپ‌های ۲۱ و ۲۳ (C3)، در گروه چهارم (C4) ژنوتیپ‌های ۲۴، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۲، ۲۹، ۳۱، ۲۵ و ۲۶، و در گروه پنجم (C5) فقط ژنوتیپ ۳۳ قرار گرفتند. ضریب تشابه جاکارد در این مطالعه در دامنه ۰/۰۸ تا ۰/۷۱۶ بود که بیانگر تنوع وسیع میان ژنوتیپ‌ها است. بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه پنجم و گروه دوم بود. بنابر این، انتظار می‌رود که از تلاقی بین ژنوتیپ ۳۳ (گروه پنجم) با ژنوتیپ‌های گروه دوم تفکیک متجاوز بیشتری مشاهده شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی

برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در مقایسه با نشانگرهای مورفولوژیکی از اعتبار بیشتری برخوردار است. در گروه‌های دوم و چهارم اکثر لاین‌های جدید که هنوز به‌عنوان رقم معرفی نشده‌اند قرار گرفتند. با توجه به نحوه اصلاح آنها و شجره درج شده در جدول ۱، این نتایج دور از انتظار نیستند. تمام ژنوتیپ‌های موجود در گروه‌های دوم و سوم به جز ژنوتیپ‌های ۳۵ (با منشا ایران) و ۱۶ (با منشا برزیل) از ایکاردا بودند که اکثر آنها دارای جد مشترک هستند. از شش ژنوتیپ ایرانی، چهار ژنوتیپ در گروه چهارم قرار گرفتند که خود بیانگر شباهت ژنتیکی و منشا یکسان آنها است. قرار گرفتن سایر ژنوتیپ‌های ایرانی در گروه‌های دیگر را می‌توان به اختلاط و جابجایی بذور یا اجداد غیر مشترک نسبت داد. این گروه‌بندی می‌تواند برای ادامه برنامه‌های اصلاحی و همچنین یافتن نشانگرهای مرتبط با صفات مهم در عدس مورد استفاده قرار گیرد. از نشانگرهای مولکولی برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس در داخل و خارج از ایران استفاده شده است (El-Danasoury, et al., 2017; Nouri, et al., 2014; Tomar, et al., 2023; Al-et al., 2023; Mammadova & Aghayeva, 2023). تفاوت در تعداد گروه در آزمایش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع نشانگر، نوع ژنوتیپ و هر دوی این‌ها باشد.



شکل ۲- نمودار دوبعدی T^2 هتلینگ کاذب و تعداد خوشه.

Figure 2. The bi-plot of the pseudo Hotelling T^2 statistic and the number of clusters.



شکل ۳- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس مورد مطالعه بر اساس مشاهدات مولکولی نشانگر ISSR به روش UPGMA. شماره‌ها ژنوتیپ‌ها را مطابق جدول ۱ نشان می‌دهند.

Figure 3. Classification of lentil genotypes based on ISSR markers data using the UPGMA method. Numbers correspond to genotypes as in Table 1.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

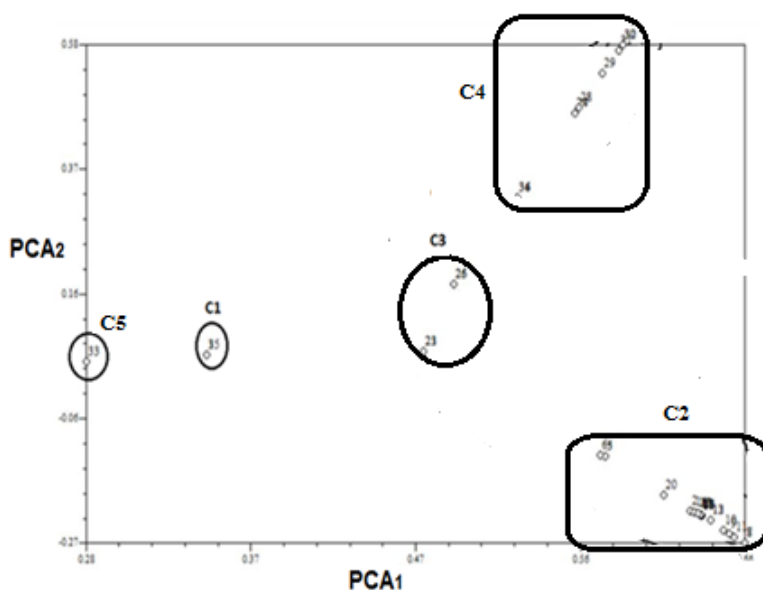
نتایج به‌دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان دادند که پنج مؤلفه اول، ۵۱/۸۲ درصد از تنوع کل را توجیه کردند (جدول ۶). مؤلفه اول ۳۳/۳۱ درصد، مؤلفه دوم ۸/۷۸ درصد، مؤلفه سوم ۳/۵۷ درصد، مؤلفه چهارم ۳/۳۴ درصد و مؤلفه پنجم ۲/۸ درصد از تغییرات کل را تبیین کردند. با توجه به سهم مؤلفه‌های اصلی در توجیه واریانس، می‌توان گفت که توزیع این نشانگرها در ژنوم عدس مناسب است.

توزیع ژنوتیپ‌ها در نمودار دو بعدی (شکل ۴) حاصل از دو مؤلفه اول، تا حدودی گروه‌بندی به‌وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد و توانست ژنوتیپ‌ها را از هم تفکیک کند. به‌طور مثال، گروه اول حاصل از تحلیل مؤلفه‌های اصلی با گروه اول در تجزیه خوشه‌ای حدود ۵۰ درصد تطابق داشت. تفاوت اصلی این دو گروه آن بود که ژنوتیپ شماره ۱ در گروه‌بندی PCA قرار نگرفت. گروه دوم تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با گروه دوم تجزیه خوشه‌ای حدود ۹۵ درصد نسبت به هم شباهت داشتند؛ تنها تفاوت این دو گروه‌بندی اضافه شدن ژنوتیپ شماره یک به گروه دوم تجزیه به مؤلفه‌ها بود. گروه سوم تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با گروه سوم تجزیه خوشه‌ای ۵۰ درصد با هم شباهت داشتند. ژنوتیپ ۲۱ در گروه سوم حاصل از دو مؤلفه اول قرار نگرفت. شباهت گروه چهارم در هر دو گروه‌بندی نیز بیش از ۸۰ درصد بود و بالاخره در هردو گروه‌بندی ژنوتیپ ۳۳ در گروه پنجم قرار گرفت.

در اکثر مطالعات، گروه‌بندی به‌وسیله دو یا سه مؤلفه اول جهت اطمینان از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به‌کار گرفته شده است. دلیل مقداری تفاوت در این گروه‌بندی‌ها را می‌توان به‌میزان توجیه واریانس به‌وسیله دو روش نسبت داد. در تجزیه خوشه‌ای از تمامی واریانس (۱۰۰ درصد) استفاده می‌شود در حالی که در گروه‌بندی به‌وسیله دو یا سه مؤلفه اصلی بخشی از واریانس در گروه‌بندی شرکت داده می‌شود؛ به‌عنوان مثال، در مطالعه حاضر فقط ۴۲/۰۹ درصد از کل واریانس در گروه‌بندی سهمیم بوده است. با توجه به این موضوع، می‌توان گفت که گروه‌بندی با تجزیه خوشه‌ای از اعتبار بالاتری برخوردار است. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در بیان تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی نظیر نشانگرهای مولکولی کاربرد زیادی دارد و با استفاده از آن می‌توان الگوهای تنوع را به‌صورت چند بعدی نشان داد و تفسیر بیشتر در مورد ارتباط بین افراد را ممکن کرد (Johnson, 1998). به‌عنوان مثال، نوری گوگری و همکاران (Nouri, et al., 2014)، گلریدو و همکاران (Gleridou, et al., 2022) و ممدوف و آقاییاوا (Mammadova & Aghayeva, 2023) از این روش برای تایید یا عدم تایید گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف عدس حاصل از تجزیه خوشه‌ای استفاده نموده‌اند. در تمامی این مطالعات ذکر کرده‌اند که گروه‌بندی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی تا حدی گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تایید می‌کند، هر چند که تفاوت‌هایی نیز وجود دارند.

جدول ۶- واریانس توجیه شده پنج مؤلفه اول بر اساس داده‌های آغازگرهای ISSR

شماره مؤلفه Components	مقدار ویژه Eigenvalues	واریانس جزء Proportion variance%	واریانس کل Cumulative variance%
1	11.99	33.31	33.31
2	3.16	8.78	42.09
3	1.28	3.57	45.67
4	1.2	3.34	49.01
5	1.0	2.80	51.82



شکل ۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس به‌وسیله دو مؤلفه اول حاصل از مشاهدات نشانگرهای ISSR

Figure 4. Classification of lentil genotypes using the first two principal components. The numbers correspond to genotypes as in Table 1.

نتیجه‌گیری کلی

در گروه‌های مختلف قرار گرفتند که بیانگر منشا مختلف آنها است. با برنامه‌های اصلاحی مناسب در آینده می‌توان گام‌های مهمی در جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در کشور برداشت. قرار گرفتن ارقام و ژنوتیپ‌ها در یک گروه مشترک نشان دهنده تشابه ژنتیکی بین آنها است. با دقت و توجه کافی به گروه‌بندی‌های انجام شده برای ژنوتیپ‌ها، می‌توان ژنوتیپ‌ها و ارقام مناسب را جهت برنامه‌های به‌نژادی به‌کار گرفت. در این راستا، بیشترین فاصله ژنتیکی ملاک خواهد بود. کمترین ضرایب تشابه در این مطالعه ۰/۰۸ و ۰/۰۸۸ بودند. بنابر این، انتظار می‌رود که از تلاقی بین ژنوتیپ ۳۳ (گروه پنجم با منشا ایران) با ژنوتیپ‌های گروه دوم که بیشتر آنها دارای منشا ایکاردا هستند، تفکیک متجاوز بیشتری مشاهده شود.

به‌طور کلی، نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهند که نشانگر ISSR جهت آشکارسازی روابط مولکولی بین ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد آزمایش، نشانگری کارا است. در واقع، نشانگر ISSR ابزار مهمی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در عدس است. در مجموع، آغازگرهای UBC855 و UBC853 نسبت به سایر آغازگرها برتر بودند. با توجه به چندشکلی گسترده این آغازگرها می‌توان تجزیه ارتباطی آنها با صفات مهم عدس را بررسی نمود تا در امر انتخاب از آنها بهره جست. از نتایج به دست آمده در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد آزمایش عدس می‌توان این نتیجه را گرفت که سطوح تنوع ژنتیکی بین آنها در حد مطلوبی است. ارقام مورد مطالعه

References

- Al-Mousa, R., Abbas, S., Alshaal, A., & Kountar, K. (2023). ISSR analysis to detect genetic variation among some lentil genotypes in Syria. *Al-Mukhtar Journal of Sciences*, 38(2), 150–159. <https://doi.org/10.54172/mjsc.v38i2.1204>
- Anjam, M.S., Ail, A., Iqbal, S.H. M. & Haqqani, A.M. (2005). Evaluation and correlation of economically important traits in exotic germplasms of lentil. *Internatonal Journal of Agriculture and Biology*, 7(6), 959-961.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J. & Bandpang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. *Euphytica*, 142, 169-196. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
- Das, B., Sengupta, S. & Parida, S. K. (2013). Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India. *BioMed Central Genetics*, 71, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-71>
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 11-15.
- El-Danasoury, M., El-Hamamsy, S., El-halwagi A. & Yusuf, M.M. (2017). Molecular characterization of some lentil cultivars using SCoT markers. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 7(4), 840-847.
- El-Nahas, A.I., El-shazly, H.H., Ahmed, Sh.M. & Omran, A.A.A. (2011). Molecular and biochemical markers in some lentil, *Lens culinaris* medik., genotypes. *Annals of Agricultural Science*, 56(2), 105-112.
- Fikiru, E., Tesfaye, K. & Bekele, E. (2011). Morphological and molecular variation in Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medikus) varieties. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 3, 60-67.
- Gleridou, A., Tokatlidis, I. & Polidoros, A. (2022). Genetic variation of a lentil (*Lens culinaris*) landrace during three generations of breeding. *Applied Sciences*, 12(450), 1-14. <https://doi.org/10.3390/app12010450>
- GolCheshmeh, S., Kiani, G., Kazemi Tabar, K. & Navabpour, S. (2023). Evaluation of genetic distance of tomato lines using ISSR marker. *Journal of Crop Breeding*, 15(47), 14-20. doi:10.61186/jcb.15.47.14 [In Persian]
- Hassani Tesie, F., Samizadeh Lahiji, H., & Shoaie Deilami, M. (2015). Study of genetic diversity among and within types of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using ISSR markers. *Modern Genetics Journal*, 9, 1-12. <https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.20084439.1393.9.1.2.1> [In Persian]
- Izzatullayeva, V., Akparov, Z., Babayeva, S., Ojaghi, J., & Abbasov, M. (2014). Efficiency of using RAPD and ISSR markers in valuation of genetic diversity in sugar beet. *Turkish Journal of Biology*, 38, 429–438. <https://doi.org/10.3906/biy-1312-35>
- Jafari, F., Farkhari, M., Siahpoush, A., Bagheri, M., & Ghanavati, M. (2023). Assessment of genetic diversity in some quinoa (*Chenopodium quinoa*) genotypes using ISSR markers. *Journal of Crop Breeding*, 15(45), 125-134. doi:10.61186/jcb.15.45.125 [In Persian]
- Johnson, D.E. (1998). *Applied Multivariate Methods for Data Analysts*. Pacific Grove, CA: Duxbury Press. 567p.
- Khazaei, H., Caron, C.T., Fedoruk, M., Diapari, M., Vandenberg, A., Coyne, C.J., McGee, R., & Bett, K.E. (2016). Genetic diversity of cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.) and Its Relation to the World's Agro-ecological Zones. *Frontiers in Plant Sciences*, 7:1093. doi: 10.3389/fpls.2016.01093
- Kumar Mishra, K., Ghimire, T.B., Thapa, P., & Maharjan, J. (2019). Genetic Diversity of Lentil Genotypes Using DNA Marker. *Proceedings of 31th National Winter Crops Workshop, Nepal Agricultural Research Council*. 20-21 MAY.

- Liu, B., & Wendel, J. F. (2001). Inter- simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1, 205-208. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00073.x>
- Mammadova, S.E. & Aghayeva, S.A. (2023). Genetic polymorphism assessment in a new lentil (*Lens culinaris* Medik., 1787) collection using ISSR markers. *Acta Biologica Sibirica*, 9, 1181-1188. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10421062>
- Ministry of Agriculture Jihad. (2024). Agricultural Statistics Yearbook of Iran (2022-2023). Tehran: Deputy of Planning and Economic Affairs, Department of Statistics and IT. Available at: <https://get.agrodl.ir/statistics/field-crops/401-402.pdf>
- Nouri, M., Dashti, H., Maddah Hosseini, S., & Dehghan, E. (2014). Evaluation of genetic diversity of lentil germplasm using RAPD molecular marker. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 45(2), 183-190. doi: 10.22059/ijfcs.2014.51897 [In Persian]
- Qi, J. M., Liang, J. X. Chen, M. X., Xu, J. T., Niu, X.P., Zhou, D.X., Wang, T., & Chen, S. H. (2006). Genetic diversity and genetic relative's analysis of tobacco germplasm based on inter Simple sequence repeat (ISSR). *Acta Agronomica Sinica*, 32, 373-378.
- Rao, S.K., & Yadav, S.P. (1988). Genetic analysis of biological yield, harvest index and seed yield in lentil. *Lens Newsletter*, 15, 3-5.
- Reddy, P.M., Sarla, N., & Siddig, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- Roldán-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., Van Eijk, M. J. T., & De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 6, 593- 602. <https://doi.org/10.1023/A:1011398124933>
- Sakhravi, A., Dehdari, M., & Fahlani, R.M. (2023). Genetic relationship among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using markers. *Gene Reports*, 32, 101797. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2023.101797>.
- Sarvmeili, J., Saidi, A., Farrokhi, N., Pouresmael, M., & Talebi, R. (2020). Assessment of genetic diversity and determination of population structure lentil genotypes Using SSR Markers. *Agricultural Biotechnology Journal*, 12(1), 45-62. <https://doi.org/10.22103/jab.2020.13507.1114>
- Seyedimoradi, H. & Talebi, R. (2014). Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in Lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm: comparison of ISSR and DAMD marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 495-500. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0253-3>
- Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., & Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and p. *coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124, 464-472.
- Souframanien, J., & Gopalkrishna, T. (2004). A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1687-1693. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1797-3.x>
- Statistical Center of Iran (2024). Detailed results of the general agricultural census. Available at: <https://amar.org.ir/Portals/0/Articles/Final%20Report%20%20Agri%20Census%201403%20ed.%201.111.pdf?ver=salLia3FTPD5vyhKo9Qci1Q%3d%3d>
- Terzopoulos, P. J., & Bebeli, P. J. (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, 108, 39-44. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.02.015>
- Tomar, S., Sharma, S., Tripathi, N., Thakur, S., Pathak, N., Sharma, R., & Tiwari, P. (2023). SSR Marker-based Molecular Characterization of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes. *Legume Research*, 46(7), 837-842. <https://doi.org/10.18805/LR-5072>.
- Tyagi, S. D., & Khan, M. H. (2010). Studies on genetic variability and interrelationship among different traits in microsperma lentil (*Lens culinaris* Medik). *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 2(1), 15-20.