Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Journal of Crop Breeding Vol. 18, Issue 2, 2026 p: 79-91

OPEN ACCESS

Research Paper

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

Arman Rahmani[1], Massoud Dehdari[2], Reza Amiri Fahliani[3] and Rahmatollah Karimizadeh[4]

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.

Copyright ©2026. Rahmani et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

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

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

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 دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۱
صفحه: ۷۹ تا ۹۱

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 این‌که 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 به‌دلیل عدم تاثیر 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 به‌کمک 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 اسپکتروفوتومتر 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 به‌ترتیب با یک و صفر امتیازبندی شدند. سپس، تجزیه و تحلیل‌های آماری از قبیل درصد نوارهای چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص شانون محاسبه شد و کارایی آغازگرها مورد بررسی قرار گرفت. سپس گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به‌وسیله 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 شدکه ۱۸۶تای آن‌ها چندشکل 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 درون‌جمعیتی 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 احتمالا بیانگر منشا یکسان آن‌ها است در حالی‌که رقم گچساران در گروه متفاوت قرار گرفت. اکثر ژنوتیپ‌ها با منشا یکسان در یک گروه قرار گرفتند، هرچند تفاوت‌هایی نیز مشاهده گردید. تجزیه به مولفه‌های 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 حالی‌که 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

عدس با نام علمی *Lens culinaris* Medic یکی از مهمترین گیاهان خانواده بقولات است که نقش مهمی در تامین غذای انسان دارد و به عنوان منبع مهمی از پروتئین شناخته می‌شود. این گیاه خودگشن و دیپلوئید (۲n = 2x = ۱۴) است (Anjam, *et al.*, 2005). گیاه عدس در ایران بیشتر به‌صورت 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 حالی‌که 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

کاهش فاحش، خشکسالی‌های اخیر باشند و بنابر این، به‌دلیل 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 (به‌عنوان مثال عملکرد) هدف اصلی است که بررسی به روش متداول نیاز به‌مدت زمان طولانی دارد. در عین‌حال، تأثیر عوامل محیطی هم مشکل‌ساز است و بر کارایی انتخاب اثر سوء دارد. استفاده از نشانگرهای مولکولی برای نیل به این اهداف به‌دلیل وراثت‌پذیری ۱۰۰ درصد و عدم تاثیرپذیری از محیط راهکاری مناسب و کارا است (Collard *et al*., 2005). مطالعات اولیه تنوع ژنتیکی در عدس عمدتاً بر اساس صفات مورفولوژیکی انجام شده‌اند (Tyagi & Khan, 2010؛ Rao *et al*., 1988؛ Fikiru *et al*., 2011؛ Anjam *et al*., 2005). با معرفی نشانگرهای DNA (از جمله ISSR) و کارایی بالاتر آنها نسبت به نشانگرهای پروتئینی و مورفولوژیکی، استفاده از آن‌ها به‌صورت چشم‌گیری افزایش یافته است. در دهه اخیر، نشانگرهای مولکولی متنوعی به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان از جمله عدس به‌کار گرفته شده‌اند. به‌عنوان مثال، از نشانگرهای RAPD (Nouri *et al.,* 2014)، ScOT (El-Danasoury *et al*., 2017)، SSR (Kumar Mishra *et al*., 2019)، ISSR (El-Nahas, *et al*., 2011) و SNP (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 ریزماهواره‌ای (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 به‌کار می‌روند (Liu & Wendel, 2001). به‌دلیل 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). به‌علاوه، دارای ویژگی‌های مناسب مثل تجزیه همزمان تعداد زیادی مکان ژنی است و به‌دلیل 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. به‌عنوان مثال، صخراوی و همکاران (Sakhravi *et al*., 2023) تنوع‌ژنتیکی 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. به‌علاوه، 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 به‌کمک نشانگر ISSR مطالعه نمودند. در مطالعه آنها، ۷۹ نوار از ۹۰ نوار تولیدشده چندشکل بودند. همچنین، ۱۳ ژنوتیپ مورد مطالعه در دو گروه به روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA قرار گرفتند. گروه‌بندی به‌کمک PCA گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود. در گوجه‌فرنگی نیز نشانگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی به‌کار 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 اتیوپیائی 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 النهاس و همکاران (El-Nahas, *et al*., 2011)، با به‌کارگیری 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 به‌کمک نه نشانگر ISSR در مجموع ۷۶ درصد چندشکلی مشاهده کردند. در مطالعه دیگر، الموسی و همکاران (Al-Mousa *et al*., 2023) ۳۷ ژنوتیپ عدس را به‌کمک ۲۰ نشانگر ISSR بررسی نمودند. استفاده از سایر نشانگرها در عدس چندشکلی کمتری در مقایسه با نشانگر ISSR داشتند به‌عنوان 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. به‌عنوان 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 به‌خوبی از هم تفکیک کند (Sarvmeili *et al*., 2020).

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

با توجه به این‌که 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.

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.

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

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

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

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش سی‌تب (Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB,) انجام گرفت (Doyl & Doyl, 1990). ۰/۵ گرم از نمونه برگی در هاون چینی و در حضور ازت مایع سریع پودر و به درون میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته شد. ۴۹۰ میکرولیتر بافر استخراج (CTAB)، ۵ میکرولیتر محلول پروتئیناز k (با غلظت ۱۰ mg/ml) و ۵ میکرولیتر مرکاپتواتانل به هرکدام از 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 به‌خوبی 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 ۱:۲۴) اضافه گردید و بعد نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه و سرعت

۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ 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، معمولا کلاف DNA قابل دیدن بود، ولی برای تشکیل کلاف کامل، امولسیون حاصله به‌مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شدند تا کلاف در ته لوله باقی بماند. جهت شستشو، نمونه DNA در حضور۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس، با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی حذف گردید. برای شستشوی مجدد، ۸۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد استفاده شد و با شرایط مرحله قبل سانتریفیوژ انجام شد. DNA در هوای آزاد به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه نگهداری شد تا الکل باقی‌مانده در کلاف DNA کاملا تبخیر شود. ۳۰-۵۰ میکرولیتر تی‌ای (TE) به میکروتیوب‌ها اضافه شد و برای حل شدن کلاف، تیوب‌ها به‌مدت 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 A۲۶ و A۲۸۰ به‌ترتیب 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 DNAی ژنومی با آغازگرهای ISSR به‌وسیله PCR

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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.

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

از تعداد ۲۰ آغازگر ISSR (Izzatullayeva, *et al.*, 2014) که در مطالعات قبلی تنوع وسیعی بروی گیاهان مختلف نشان داده بودند، به‌همراه لودر ۵۰ جفت بازی استفاده گردید که توسط شرکت سینا ژن تهیه شدند. مشخصات این نشانگرها در جدول ۳ آورده شده‌اند.

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 5'-3' 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	TCTCTCTCTCTCTCRT	48
7	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTYG	48
8	UBC824	CTCTCTCTCTCTCTCG	48
9	UBC844	AGAGAGAGAGAGAGAYT	48
10	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAT	48
11	UBC836	ACACACACACACACYA	48
12	UBC848	CACACACACACACACRG	48
13	UBC838	AGAGAGAGAGAGAGYC	48
14	UBC864	ATCATGATGATGATG	48
15	UBC859	ACACACACACACACYG	48
16	UBC827	ACACACACACACACG	48
17	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAYT	48
18	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRE	48
19	UBC835	ACACACACACACACYT	48
20	UBC857	ACACACACACACACYG	48

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 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.

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
واسرشت‌سازی اولیه Initial denaturation	94	180	1
واسرشته‌سازی 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 به‌ترتیب به‌صورت یک و صفر امتیازبندی شدند. ویژگی‌های مختلف مربوط به نشانگرها از قبیل تعداد کل نوارهای تولید شده، تعداد نوارهای چندشکل، و تعداد نوارهای تک‌شکل محاسبه شدند. سپس، پارامترهای مختلف به شرح زیر محاسبه شدند.

درصد چندشکلی (PPB)، شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC[1]) به‌صورت میانگینی از PICهای به‌دست آمده از تمامی نوارهای 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)

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

در این روابط np: تعداد نوارهای چند شکل، n: تعداد کل نوارها، fi فراوانی آللی (وجود نوار) و Pi فراوانی نسبی آلل (وجود نوار) هستند.

برآورد تعداد کل نوارها، درصد نوارهای چندشکل و شاخص شانون به‌کمک نرم‌افزار Popgene 1.32، محتوی اطلاعات چندشکلی به‌کمک پردازشگر Excel، محاسبه ماتریس تشابه جاکارد، تجزیه خوشه‌ای به‌روش 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 نوارهای واضح و چندشکل و دو نشانگر نوارهای با وضوح کم تشکیل دادند (جدول ۵). شکل ۱ الگوی نوارهای مربوط به آغازگر UBC851 را نشان می‌دهد. در مجموع، تعداد نوارهای تشکیل شده ۱۹۰ عدد بودند که از میان آن‌ها ۱۸۶ نوار چندشکل و چهار نوار تک‌شکل بودند. تعداد آلل‌های آشکار شده از یک تا ۱۷ برای هر نشانگر متفاوت بود. تمام نوارهای مربوط به آغازگرهای UBC814، UBC823، UBC853، UBC851، UBC824، UBC834، UBC842، UBC856، UBC848، UBC835، UBC864، UBC859، UBC827، UBC840 و UBC855 چندشکل بودند. کمترین تعداد و درصد نوارهای چندشکلی (۵۰٪) مربوط به آغازگر UBC830 بود. در مطالعه‌ای، فکیرو و همکاران (Fikiru *et al*., 2011) تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی ۱۰ واریته عدس اتیوپیائی 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 نوارهای 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 آقایاوا (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 به‌کمک ۲۰ آغازگر ISSR بررسی نمودند که همانند مطالعه حاضر ۱۸ آغازگر تکثیر شدند و در مجموع، ۱۸۴ نوار با ۸۷/۳۱ درصد چند شکلی تولید نمودند که برخی نوارها 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. به‌عنوان 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 عین‌حال، برخی پژوهش‌ها از کارایی بالای سایر نشانگرها حکایت دارند. به‌عنوان 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 به‌خوبی از هم تفکیک کند (Sarvmeili *et al*., 2020). بنابر این، بسته به نوع مطالعه کارایی آغازگرها متفاوت است؛ به‌همین دلیل، برای مقایسه دقیق آغازگرهای مختلف باید ژنوتیپ‌های یکسان را در آزمایش به‌کار گرفت.

[1] Polymorphic information content

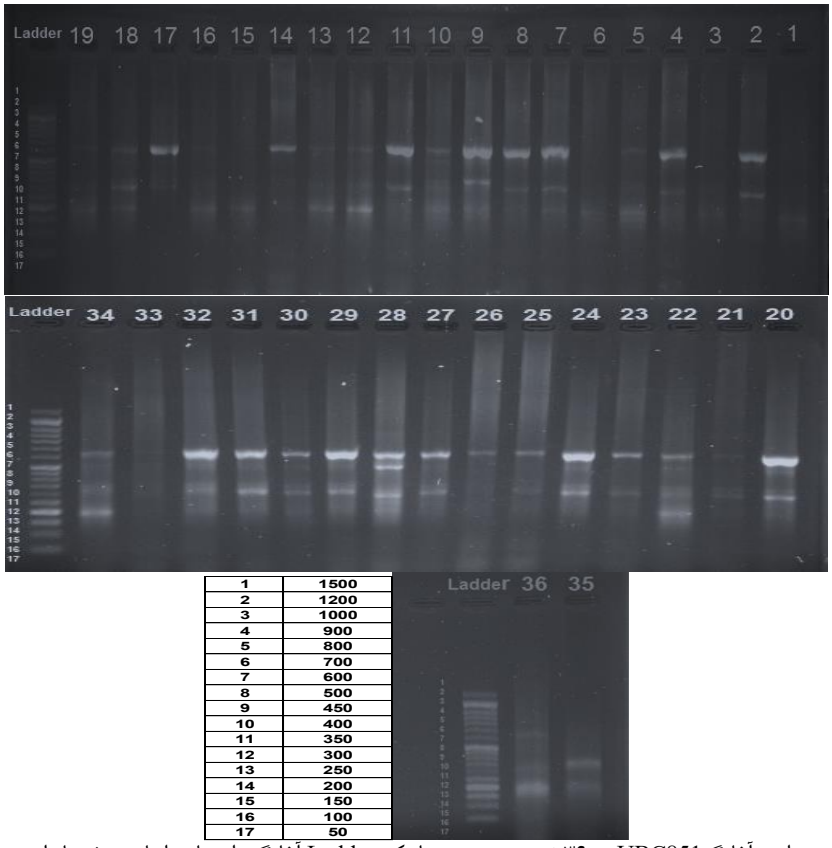
بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی PIC متعلق به آغازگر UBC830 (۰/۴۹) و کمترین آن متعلق به آغازگر UBC814 به‌میزان ۰/۱۳ بودند (جدول ۵). در آغازگرهای غالب، آغازگرهایی که PIC بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ دارند کاراً و آن‌هایی که PIC کمتری دارند اطلاعات مفید کمتری دارند (Qi, e*t al*., 2006). بنابر این، در این آزمایش ۱۶ آغازگر PIC خوبی داشتند. آغازگرهای UBC826، UBC830، UBC847، UBC853، UBC851، UBC834، UBC856، UBC855 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 حالی‌که در نشانگرهای هم‌بارز این مقدار ۱ است. مثلا، در آزمایش تومار و همکاران (Tomar, *et al*., 2023) که از نشانگر SSR در 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 آقایاوا (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 ۱۰/۶۰داشتند (Sakhravi *et al*., 2023) که حاکی از کارایی بیشتر در مقایسه با عدس است.

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



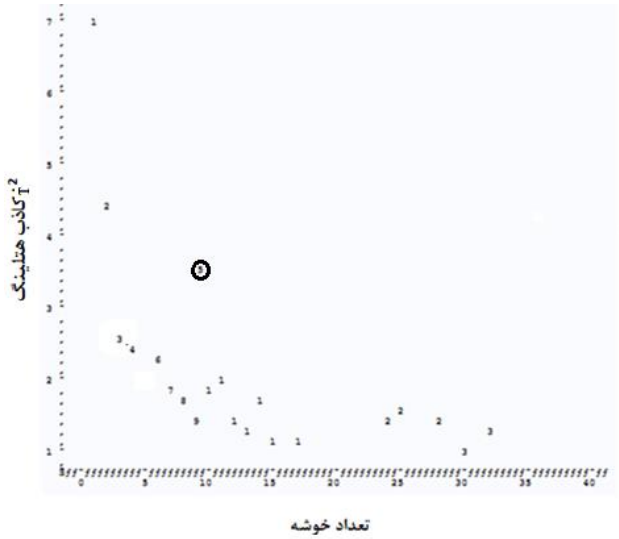
1	1500
2	1200
3	1000
4	900
5	800
6	700
7	600
8	500
9	450
10	400
11	350
12	300
13	250
14	200
15	150
16	100
17	50

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.

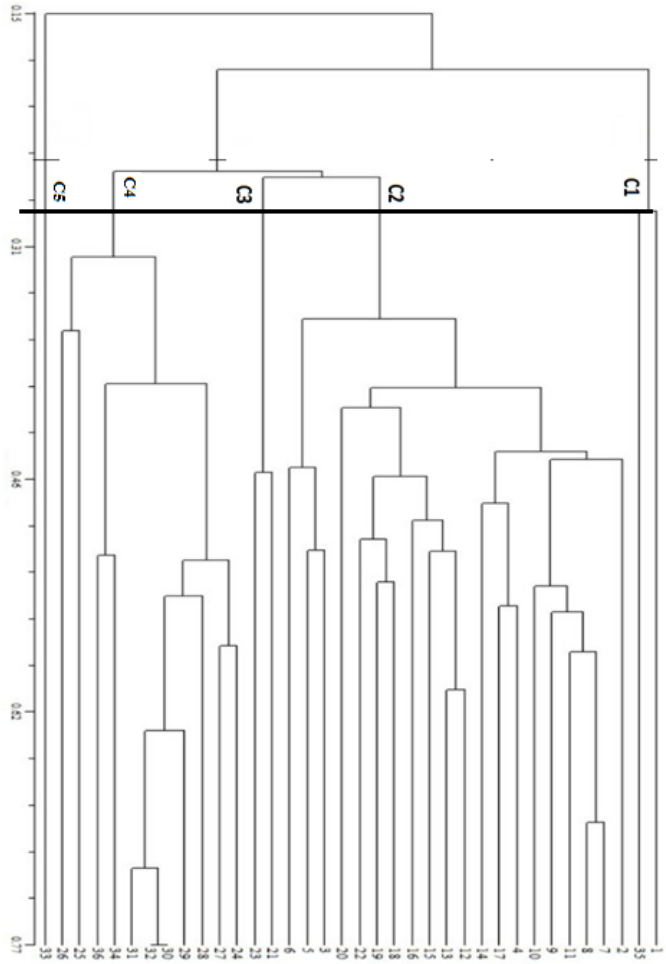
Figure 1. The band patterns of PCR products with the primer UBC851 in 36 lentil genotypes. The ladder column belongs to the ladder marker, and the other columns correspond to genotypes as in Table 1.

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 کوفنتیک (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، ۲، ۳، ۵ و ۶، در گروه سوم ژنوتیپ‌های ۲۱و 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؛ Mousa). تفاوت در تعداد گروه در آزمایش‌های مختلف می‌تواند به‌دلیل 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 به‌روش 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 مولفه 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.

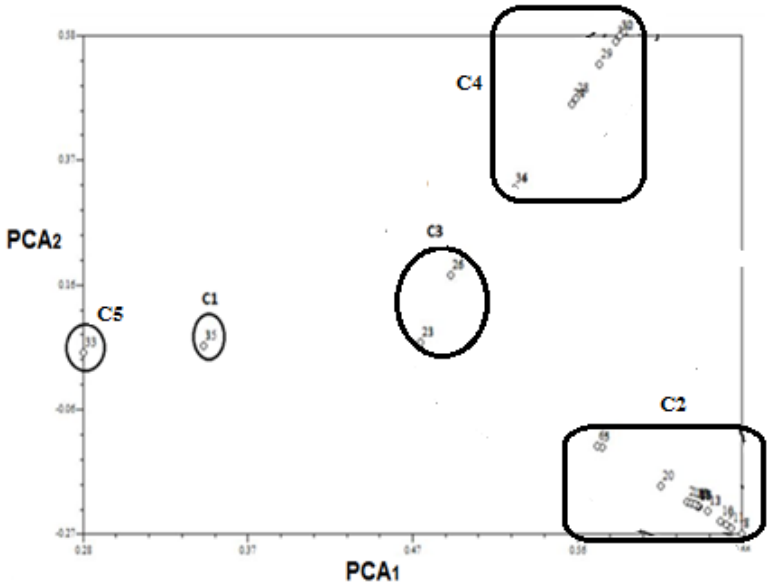
در اکثر مطالعات، گروه‌بندی به‌وسیله دو یا سه مولفه اول جهت اطمینان از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به‌کار گرفته شده است. دلیل مقداری تفاوت در این گروه‌بندی‌ها را می‌توان به‌میزان توجیه واریانس به‌وسیله دو روش نسبت داد. در تجزیه خوشه‌ای از تمامی واریانس (۱۰۰ درصد) استفاده می‌شود در حالی‌که در گروه‌بندی به‌وسیله دو یاسه مؤلفه اصلی بخشی از واریانس در گروه‌بندی شرکت داده می‌شود؛ به‌عنوان مثال، در مطالعه حاضر فقط ۴۲/۰۹ درصد از کل واریانس در گروه‌بندی سهیم 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 گوغری و همکاران (Nouri, *et al*., 2014)، گلریدو و همکاران (Gleridou, *et al*., 2022) و ممدوف و آقایاوا (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 مولفه‌های 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

Table 6. Variances explained by the first five principal components based on ISSR observations

شماره مولفه 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

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 تنوع‌ژنتیکی 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 تنوع‌ژنتیکی بین آن‌ها در حد مطلوبی است. ارقام مورد مطالعه 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.

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., & Shoaei 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., & Fahliani, 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=saLia3FTPD5vyhKo9Qci1Q%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.