ISSN: 2676-7309

Plant Genetic Researches

Volume 11, Issue 2 (2025)

Lorestan University

Research Article

http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.10

Determining the Genetic Diversity of Some Iranian *Alyssum* spp. Species Using Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences

Akram Veisi[1], Hamed Khodayari[2,*] and Kourosh Kavousi[3]

1- Former M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3- Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding author: *khodayari.h@lu.ac.ir*

Citation: Veisi, A., Khodayari, H. and Kavousi, K. (2025). Determining the genetic diversity of some Iranian *Alyssum* spp. species using internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Plant Genetic Researches*, **11(2):** 155-166. http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.10

(Received: December 22, 2024; Final Revised: March 06, 2025; Accepted: Revised: March 10, 2025; Published online: March 17, 2025)

Extended abstract

Introduction

The genus *Alyssum* L., a member of the Brassicaceae family, comprises approximately 170 to 195 species worldwide, including 35 taxa native to Iran, 28 recognized as distinct species and 7 varieties. *Alyssum* is notable for its ecological diversity and pharmacological potential, serving as a valuable reservoir of biodiversity and traditional medicinal applications. Several species have been historically used in traditional medicine, particularly for the treatment of rabies, coughs, and as sedatives. Despite growing scientific interest, the phylogenetic relationships within the genus remain inadequately resolved, largely due to morphological homoplasy and polyphyly observed in key sections such as *Odontarrhena* and *Meniocus*. To overcome these challenges, molecular markers have become essential tools in systematic studies, using nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region (ITS1–5.8S–ITS2) proving especially useful information in resolving complex taxonomic relationships. This study represents a pioneering effort to conduct a comprehensive phylogenetic analysis of Iranian *Alyssum* species using ITS sequence data, with the aim of clarifying taxonomic ambiguities and illuminating their evolutionary relationships.

Materials and methods

In this study, a total of 56 accessions representing 16 *Alyssum* species identified in Iran were systematically collected from diverse ecological regions across the country. The sampling strategy included 40 freshly collected specimens and 10 herbarium specimens to ensure comprehensive representation. Voucher specimens have been deposited in recognized institutional herbaria for future reference and taxonomic validation. Species identification was carried out based on the taxonomy outlined in *Flora Iranica*, supplemented by recent taxonomic revisions of the genus. Genomic DNA was extracted using a modified CTAB protocol, optimized to yield high-quality DNA suitable for downstream molecular analyses. The nuclear ribosomal ITS region was amplified using the universal primers ITS4 and ITS5 using standard PCR protocols. Sequencing was performed by Pouyagene Gostar Co. (Tehran, Iran), and chromatograms were validated for quality and accuracy using FinchTV software. Sequence alignment was conducted using ClustalX2, and phylogenetic trees were constructed using both Maximum Parsimony (MP) and Maximum Likelihood (ML) methods implemented in PAUP*4 and

©2025 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

MEGA6, respectively. The robustness of tree topology was assessed via bootstrap analysis with 1000 replicates. *Aethionema grandiflorum* was used as the outgroup.

Results and discussion

Phylogenetic trees were constructed using both maximum likelihood and maximum parsimony methods, yielding largely congruent topologies. The analyses resolved two primary clades within the genus. Notably, this study represents the first report of ITS sequence data for 16 Iranian Alyssum species. The findings of this study support the monophyletic nature of the Alyssum section and highlight a polytomy within the Odontarrhena and Meniocus sections. These results contribute valuable insights into the taxonomy and phylogenetic structure of Alyssum in Iran and provide a robust foundation for future ecological and biochemical investigations. The findings of this study support the idea that both Odontarrhena and Meniocus could be considered as new genera. Interestingly, the placement of A. homalocarpum (section Meniocus) within Clade I may reflect convergent evolution in seed morphology rather than close evolutionary relationships. Additionally, the clade-specific clustering of A. inflatum and A. stapfii underscores their potential as candidates for targeted phytochemical investigations. Species in Clade II, due to their metal-tolerant traits, are promising candidates for phytoremediation research. Finally, endemic species such as A. polycladum, with their restricted distributions, warrant prioritized conservation efforts.

Conclusion

This study provides, the first ITS-based Phylogeny analysis of Iranian *Alyssum*, *contributing to the partial resolution of taxonomic ambiguities within the genus*. The findings confirm the monophyly of section *Alyssum* and support taxonomic revisions that advocate the separation of polyphyletic sections into distinct genera. Sixteen new ITS sequences were deposited in NCBI databases aiding future studies in biogeography and possible pharmaceutical application of Alyssum. Furthermore, the taxonomic revisions of this study support splitting polyphyletic sections into distinct genera. It is recommended that *trnL-F* molecular marker may help to further reveal Alyssum phylogenetic problems.

Keywords: Phylogeny, DNA sequence, Flora, ITS region

پژوهش‌های ژنتیک گیاهی
جلد ۱۱، شماره ۲، ۱۴۰۳
شاپا الکترونیکی: ۷۳۰۹-۲۶۷۶
دانشگاه لرستان
مقاله پژوهشی
http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.2.10

تعیین تنوع ژنتیکی تعدادی از گونه‌های قدومه (*Alyssum* spp.) ایران با استفاده از توالی‌های ناحیه ITS

اکرم ویسی[۱]، حامد خدایاری[۲*] و کوروش کاووسی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۲؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷)

چکیده

سرده *Alyssum* L. یکی از بزرگترین سرده‌های خانواده Brassicaceae با حدود ۱۹۰-۱۷۰ گونه بومی در سراسر جهان است. تاکنون ۳۵ آرایه (Taxon) شامل ۲۸ گونه و ۷ واریته از این تیره در ایران شناسایی شده است. در طب سنتی از برخی از گونه‌های قدومه به‌عنوان پادزهر مخصوص در برابر بیماری هاری و همچنین به‌عنوان آرام بخش، درمان سکسکه، خلط آور و درمان سرفه استفاده می‌شود. برای تعیین رابطه تبارزایشی بین ۴۲ گونه از سرده قدومه (شامل ۱۶ گونه از ایران و ۲۶ گونه از سایر کشورها) از توالی های ناحیه ITS ریبوزومی استفاده شد. بیشینه احتمال و تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی توالی‌های ITS، درختان تبارزایشی را ایجاد کردند که تقریباً یکسان بودند. تجزیه و تحلیل تبارزایشی دو کلاد اصلی را نشان داد. نتایج این مطالعه ضمن اینکه تک‌نیایی بخشه *Alyssum* و پلیتومی بخشه‌های *Odontarrhena* و *Meniocus* را تأیید نمود، می‌تواند در شناسایی و تبارشناسی گونه‌های این گیاه در ایران مفید باشد. تأیید تک‌نیایی بودن بخشه *Alyssum* پایه علمی محکمی برای مطالعات اکولوژیکی و بیوشیمیایی آینده فراهم می‌کند.

واژگان کلیدی: تبارزایی، توالی DNA، فلور، ناحیه ITS

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: khodayari.h@lu.ac.ir

مقدمه

خانواده شب‌بو یا کلم (Brassicaceae یا Cruciferae) در سراسر جهان در تمام قاره‌ها به‌جز قطب جنوب پراکنش دارند (Koch and Kiefer, 2006). گونه‌های این جنس تقریباً در سراسر جهان، عمدتاً در مناطق معتدل، اروپا، آسیای جنوب‌غربی و شمال آفریقا توزیع شده‌اند (Dudley, 1964). این خانواده از ۵۸ قبیله، حدود ۳۴۹ سرده و ۴۰۰۰ گونه تشکیل شده است (Hendriks *et al*., 2023). اگرچه، خانواده شب بو را می‌توان به‌راحتی با برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، یعنی تاج صلیبی، برچه‌های تترادینام، و میوه‌های خورجین تشخیص داد، اما هنوز طبقه‌بندی در این خانواده دچار برخی مشکلات است و از نظر تبارزایشی به‌خوبی درک نشده است (Al-Shehbaz *et al*., 2006; Hendriks *et al*., 2023). طبقه‌بندی‌هایی که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی در این تیره انجام شده به‌دلیل داشتن هم‌نمایی (Homoplasy) بالای صفات مذکور، مصنوعی می‌باشند (Al-Shehbaz and Ihsan, 2012).

گونه‌های جنس *Alyssum* L. شامل گیاهان علفی یک‌ساله و چندساله و تعداد اندکی درختچه‌ای کوچک، با برگ‌های بیضوی شکل و عمدتاً با گل‌های زرد یا سفید، کرک‌های ستاره‌ای، گرز مانند یا بدون شکل و میوه‌های سیلیسی منقطع است (Warwick *et al*., 2006). این جنس با حدود ۱۷۰ تا ۱۹۵ گونه در سراسر جهان به‌عنوان دارو، گیاهان زینتی و تجمع‌دهنده فلزات سنگین مورد استفاده قرار گرفته است (Al-Shehbaz *et al*., 2006; Bailey *et al*., 2006). بیشترین تعداد گونه‌های تجمع‌کننده یا بیش‌انباشته‌گر (Hyperaccumulator) نیکل متعلق به جنس *Alyssum* است (Mengoni *et al*., 2003; Cecchi *et al*., 2010). برخی از گونه‌های آلیسوم در طب عامیانه به‌عنوان پادزهر مخصوص در برابر بیماری هاری، آرام‌بخش، درمان سکسکه، خلط‌آور و ضدسرفه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ozay and Mammadov, 2016).

تعداد ٥٤ گونه از *Alyssum* در ترکیه گزارش شده است که از میان آن‌ها ۲۵ گونه بومی بودند (Španiel *et al*. 2015). بر اساس فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1968)، تعداد ۳۱ گونه *Alyssum* از ایران شناخته شده است؛ با این حال، بر اساس آخرین مطالعات طبقه‌بندی (Kavousi *et al*., 2014; Mirzadeh Vaghefi *et al*., 2016)، تعداد کل گونه‌های *Alyssum* در ایران به ۳۵ تاکسون (۲۸ گونه و ۷ واریته) رسیده است که از این تعداد هفت گونه بومی ایران بودند. براساس طبقه بندی که وارویک و همکاران (Warwick *et al*., 2002) و منگونی و همکاران (Mengoni et al., 2003) انجام داده‌اند سرده *Alyssum* به شش بخشه (Section) تقسیم شده است که شامل: *Alyssum*، *Gamosepalum* (Hausskn.) T. R. Dudley، *Meniocus* (Desv.) Hook. f.، *Psilonema* (C. A. Mey.) Hook. f.، و *A.* sect. *Tetradenia* (Spach) T. R. Dudley و *Odontarrhena* (C. A. Mey.) W. D. J. Koch می‌باشند. با این حال، مطالعات تبارزایی (Phylogenetics) مولکولی نشان می‌دهد که *Alyssum* یک سرده چندنیایی (Polyphyletic) می‌باشد و محدوده طبقه‌بندی فعلی این جنس نیاز به تجدید نظر دارد (Rešetnik *et al*., 2013; Li *et al*., 2014). دو بخش از سرده *Alyssum* شامل *Odontarrhena* و *Meniocus* از سطح تاکسونومیکی بخشه به سطح جنس ارتقا داده شده‌اند (Cecchi *et al*., 2010). بر اساس مطالعات طبقه‌بندی اخیر، *Alyssum* شامل دو کلاد است که یکی از آن‌ها بخشه *Alyssum* است که بیشتر تاکسون‌های متعلق به آن یک‌ساله و تعداد اندکی چندساله هستند و دیگری بخشه *Gamosepalum* است که بیشتر تاکسون‌های متعلق به آن چندساله و تعداد اندکی یک‌ساله هستند (Al-Shehbaz, 2002; Španiel *et al*., 2015). بر اساس شواهد جدید حاصل از تجزیه و تحلیل تبارزایشی، *Alyssum* یک سرده چندنیایی (Polyphyletic) است. هم شواهد ریخت‌شناسی و هم داده‌های توالی‌یابی توالی‌های ناحیه ITS (Internal transcribed spacer) نشان می‌دهند که سرده *Clypeola* باید با *Alyssum* ادغام شود (Warwick

et al., 2008). مطالعات تبارزایی دو دودمان اصلی در سرده قدومه را نشان داده که شامل دودمان اول: بخشه‌های *Alyssum*، *Gamosepalum* و *Psilonema* و دودمان دوم: بخشه‌های *Odontarrhena*، *Meniocus* و *Clypeola* می‌باشد (Al-Shehbaz *et al*, 2006).

لی و همکاران (Li *et al*., 2014) بر اساس توالی‌های ITS، تعدادی از گونه‌های متعلق به بخشه‌های مختلف سرده قدومه را از نظر تبارزایشی و جغرافیای زیستی مورد مطالعه قرار دادند و نتایج تحقیق آن‌ها دو دودمان اصلی را نشان داد: دودمان ۱ شامل بخشه *Alyssum*، *Gamosepalum* و *Psilonema* و دودمان ۲ شامل بخش *Odontarrhena*، *Meniocus* و *Clypeola* بود. نتایج مطالعه بیوسیستماتیک سرده *Alyssum* به کمک تجزیه و تحلیل‌های داده‌های مولکولی تبارزایشی، از جمله توالی‌های ITS و توالی ژن کلروپلاستی trnL-F نشان داده‌اند که در این جنس دو کلاد اصلی وجود دارد (Li *et al*., 2015). در مطالعه مذکور کلاد اول شامل بخش‌های *Alyssum*، *Gamosepalum* و بیشتر گونه‌های بخش *Psilonema* و کلاد دیگر شامل بخش‌های *Meniocus*، *Odontarrhena* و جنس *Clypeola* بود. جمعه‌قاسم‌آبادی و همکاران (Jomeh Ghasem Abadi *et al*., 2019) تنوع مولکولی نواحی ITS در ۱۵ ژنوتیپ کاهوی ایرانی را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که ITS می‌تواند ابزار موثری برای ارزیابی ژنتیکی بین گونه‌ای و بین سرده‌ای باشد. همچنین شناسایی برخی گونه‌های سرده *Cardamine* از خانواده کلم در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی توسط قربانی مرغشی و همکاران (Ghorbani Marghashi *et al*., 2019) انجام گرفت که یافته های آن پژوهش، علاوه بر تأیید حداقل چهار گونه کاردامینه در ایران، کارآمدی نشانگر ITS را در تفکیک گونه‌های مختلف جنس کاردامینه به‌خوبی نشان داد. درویشیان و همکاران (Darvishian *et al*., 2016) از نشانگرهای مولکولی تصادفی جهت مطالعه روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم غرب کشور ایران استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که تشابه بالایی بین ژنوتیپ‌های مختلف گندم غرب کشور وجود دارد. اسلامی فاروجی و همکاران (Eslami-Farouji *et al*., 2021) تبارزایی و جغرافیای زیستی جنس *Hesperis* (Brassicaceae، قبیله Hesperideae) را با استفاده از داده‌های توالی DNA ریبوزومی هسته‌ای مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که تنوع زیستی در هسپریس تحت تأثیر تغییرات اقلیمی جهانی، بازآرایی‌های قابل توجه تکتونیکی و گسترش سیستم‌های پوشش گیاهی باز در میوسن قرار گرفته است که همگی تأثیر زیادی بر تاریخ گونه‌زایی گیاهان و جانوران ایرانی–تورانی داشته‌اند. نشانگرهای مولکولی از ابزارهایی هستند که چشم‌انداز جدیدی را برای پیشرفت‌های اصلاح گیاهان فراهم کرده‌اند (MirMohammadi Maibody and Golkar, 2019).

در مطالعه حاضر، برای اولین‌بار در ایران، تحلیل تبارزایشی جامع با استفاده از توالی‌های ITS (شامل ITS1-5.8S-ITS2) برای حل روابط تبارزایی فروسرده‌ای گونه‌های ایرانی متعلق به سرده *Alyssum* انجام شد. همچنین یک طبقه‌بندی جدید براساس توالی‌های ITS از این سرده و بخشه‌های آن ارائه گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در مجموع ۵۶ نمونه جمعیتی از ۱۶ گونه از سرده *Alyssum* (۴۰ نمونه در طی اواخر زمستان و بهار توسط نویسندگان از نقاط مختلف ایران و ۱۰ نمونه نیز از هرباریوم‌های مختلف دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی) جمع‌آوری گردید (جدول ۱ و شکل ۱). همه نمونه‌ها بر اساس فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1968) و سایر مقالات منتشر شده در سال‌های اخیر شناسایی شدند. از میان نمونه‌های مذکور، مواد گیاهی متعلق به ۱۶ گونه از سرده *Alyssum* بومی ایران (که تاکنون ژن‌های ITS آن‌ها تعیین توالی نشده بود) به‌منظور استخراج DNA برای تجزیه و تحلیل ITS بر اساس نتایج منتشر شده قبلی (Franzke *et al*., 2011; Li *et al*., 2014) انتخاب شدند. اطلاعات دقیق توالی، محل جمع‌آوری و شماره دسترسی بانک ژن در جدول ۱ ارائه شده است.

استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: به‌منظور استخراج DNAی ژنومی از نمونه‌های تازه و هرباریومی از روش CTAB با تغییرات جزئی استفاده شد (Gawel and Jarret, 1991). پس از استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از یک جفت آغازگر (5´-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3´) به‌عنوان آغازگر رفت و 5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´ به‌عنوان آغازگر برگشت) انجام شد (شکل ۲). واکنش PCR استاندارد در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تحت شرایط دمایی و زمانی درج شده در جدول ۲ انجام شد.

جدول ۱- نام و مشخصات مواد گیاهی در این تحقیق

Table 1. Name and characterization of the plant materials used in this research

بخشه Section	نام گونه Species name	محل جمع‌آوری Collecting location	شماره نمونه جمعیتی Accession number	منبع مواد گیاهی Source material
Alyssum	*A. strictum* Willd.	Iran, Khorramabad	KU342036	F
	A. contemptum Schott & Kotschy	China	KJ206132.1	n.a
	A. contemptum Schott & Kotschy	Iran, Sepidasht	KX227108	F
	A. szowitsianum Fisch. & C.A.Mey.	Iran, Shiraz	KU342037	F
	A. desertorum Stapf	Iran, Nahavand	KX227111	F
	A. desertorum Stapf	Croatia	KF022535.1	n.a
	A. strigosum Banks & Sol.	Iran, Aligoudarz	KX227115	F
	A. strigosum Banks & Sol.	Greece	KF022600.1	n.a
	A. marginatum Steud.	China	KJ206133.1	n.a
	A. minutum Schltdl. ex DC.	Croatia	KF022549.1	n.a
	A. stapfii Ten.	China	KJ206122.1	n.a
	A. stapfii Ten.	Iran,Buin,Miandasht	KX227105	F
	A. repens Baumg.	Croatia	KF022581.1	n.a
	A. hirsutum M.Bieb.	Croatia	KF022541.1	n.a
	A. turkestanicum Regel & Schmalh.	Croatia	KF022606.1	n.a
Psilonema	*A. homalocarpum* (Fisch. & C.A.Mey.) Boiss.	Croatia	KF022542.1	n.a
Gamasepalum	*A. corningii* Dudley	Croatia	KF022528.1	n.a
	A. corningii Dudley	Iran, Eresk	KX227104	H
	A. baumgartnerianum Bornm. ex Baumg.	Croatia	KF022524.1	n.a
	A. baumgartnerianum Bornm. ex Baumg.	Iran, Zoshk	KX227110	H
	A. lanigerum DC.	Iran, Mashhad	KX227114	H
	A. tetrastemon Boiss.	Croatia	KF022602.1	n.a
	A. tetrastemon Boiss.	Iran, Sabzevar	KX227107	H
	A. sulphureum Dudley & Hub.-Mor.	China	KJ206123.1	n.a
	A. sulphureum Dudley & Hub.-Mor.	Iran, Mashhad	KX227109	H
	A. niveum Dudley	Croatia	KF022574.1	n.a
	A. niveum Dudley	Iran, Kashmar	KX227106	H
	A. paphlagonicum (Hausskn.) Dudley	Croatia	KF022577.1	n.a
	A. harputicum Dudley	Croatia	KF022540.1	n.a
	A. lepidotostellatum (Hausskn. & Bornm.) Dudley	Croatia	KF022545.1	n.a
Meniocus	*A. meniocoides* Boiss.	Canada	EF514612.1	n.a
	A. linifolium	Iran, Delfan	KX227112	F
Odontarrhena	*A. penjwinense* Dudley	China	KJ206125.1	n.a
	A. penjwinense Dudley	Iran, Kermanshah	KX255633	F
	A. condensatum Boiss. & Hausskn.	Croatia	KF022527.1	n.a
	A. argenteum Kotschy	Italy	GQ284854.1	n.a
	A. inflatum Nyár.	Iran, Yasouj	KX227113	H
	A. inflatum Nyár.	Iran	KJ206126	n.a
	A. murale Boiss.	Croatia	KF022570.1	n.a
	A. polycladum Rech.f.	Iran, Arasbaran	KX174303	H
	A. bracteatum Boiss. & Bushe	China	KJ206143.1	n.a
	A. filiforme Nyár.	China	KJ206128.1	n.a

F: نمونه تازه، H: نمونه هرباریوم، n.a: مطالبی در مورد داده‌های منبع موجود نیست

F: Fresh specimen, H: Herbarium specimen, n.a: not available

شکل ۱- برخی از گونه‌های قدومه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران

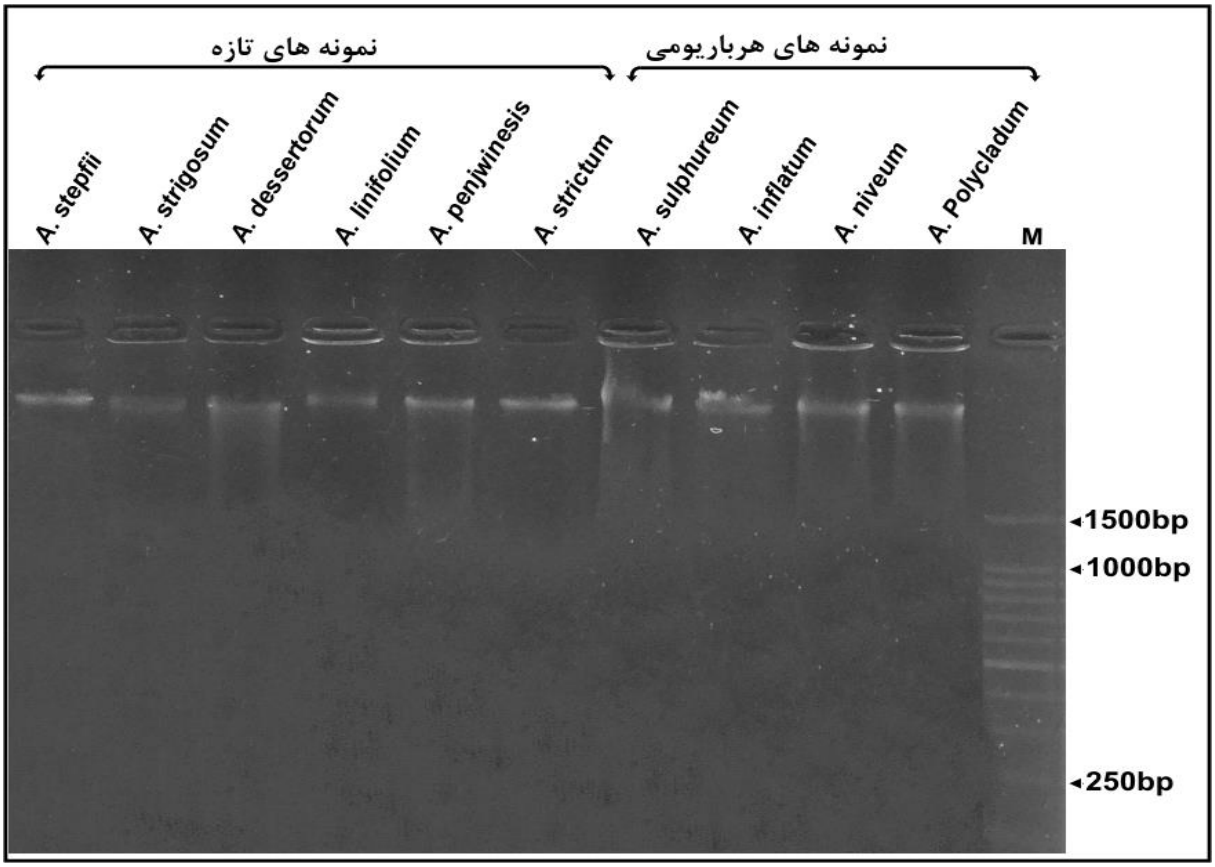
Figure 1. Some of Iranian *Alyssum* species collected from different regions of Iran.

جدول ۲- PCR ITS

Table 2. PCR thermal cycling used to amplify ITS region in *Alyssum* species

مرحله Step		درجه حرارت (سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (دقیقه) Time (Min)
واسرشته‌سازی اولیه Initial denaturation		95	10
35 Cycle	واسرشته‌سازی Denaturation	95	0.5
	اتصال Annealing	52	0.5
	گسترش Extension	72	1.5
گسترش نهایی Final extension		72	10

تجزیه و تحلیل و ترسیم درخت تبارزایشی: پس از انجام واکنش PCR، برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر و میزان خلوص آن، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شده و در ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت یک ساعت الکتروفورز شدند (شکل ۲). پس از اطمینان از صحت واکنش PCR و تکثیر، قطعات مورد نظر برای توالی‌یابی به سرویس تعیین‌توالی (شرکت پویا ژن‌گستر) فرستاده شدند. مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های بانک ژن، توسط برنامه BLASTn انجام شد. اختلافات نوکلئوتیدی محصول PCR نمونه‌های مختلف پس از بررسی در برنامه CLUSTALX2 مشخص گردید. کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نواحی تکثیری ابتدا به‌صورت چشمی و سپس با استفاده از نرم‌افزار FinchTV (نسخه ۱/٤) همردیف شده و براساس روش برآورد درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند. محاسبات آماری فوق و رسم درخت تبارزایشی (دندروگرام) با استفاده از نرم‌فزارهای ClustalX (نسخه ۲) و Paup (نسخه ٤) و نرم‌افزار MEGA6 با استفاده از روش بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) با ۱۰۰۰ تکرار (بوت‌استرپ) رسم شد. شایان ذکر است که ۱٦ توالی ITS متعلق به ۱٦ گونه *Alyssum* از ایران به‌علاوه ۲٦ نمونه از سایر منابع جهت تجزیه و تحلیل تبارزایشی استفاده شدند. به‌منظور مقایسه و ترسیم یک درخت فیلوژنی قطعی، در مجموع ٤۲ نمونه از گونه‌های *Alyssum* و یک نمونه از گونه *Aethionema* به‌عنوان برون-گروه از پایگاه بانک‌ژن (GenBank) دریافت و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه بهتر هرکدام از بخشه‌ها (sections) با رنگی مشخص، متمایز شده‌اند. اعداد در گره‌ها مقادیر بوت استرپ به دست آمده برای تجزیه و تحلیل با ۱۰۰۰ تکرار را نشان می دهند. طبقه‌بندی بخشه‌ها بر اساس رده‌بندی دودلی (Dudley, 1964) در مقابل نام گونه‌ها نشان داده شده است.



شکل ۲- الکتروفورز DNAی ژنومی در تعدادی از نمونه‌های قدومه

Figure 2. Genomic DNA electrophoresis in a number of *Alyssum* samples

نتایج و بحث

به‌طور کلی ٤٢ نمونه *Alyssum* از مناطق مختلف ایران و بانک‌ژن از سایر کشورها به اضافه یک نمونه از *Aethionema grandiflorum* به‌عنوان برون‌گروه در این تحقیق مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها و نتایج توالی‌یابی DNA مربوط به ١٦ گونه ایرانی قدومه در بانک ژن NCBI ثبت شدند (جدول ١).

هم‌ترازی توالی چندگانه (Multiple sequence alignment) حاصل از ناحیه ITS، از جمله ژن 5.8s، ٦٤٠ جفت‌باز بود (شکل ٣). در این مطالعه، همان‌گونه که در شکل ٤ مشاهده می‌شود گونه‌های *Alyssum* دو کلاد مجزا (کلاد I و II) را تشکیل دادند. از توالی‌های ITS تراز شده در مجموع ٦٤٠ کاراکتر به دست آمد که ٢٣ مورد از این کاراکترها به‌صورت متغیر و ٢١ کاراکتر دارای صرفه‌جویی (Parsimony) بودند. تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی برای توالی‌های ITS منجر به ترسیم ١٣٤١ درخت (robust trees) شد (طول درخت = ١٥٤؛ شاخص سازگاری (CI) معادل ٠/٦ و شاخص حفظ (RI) نیز ٠/٨ به‌دست آمد).

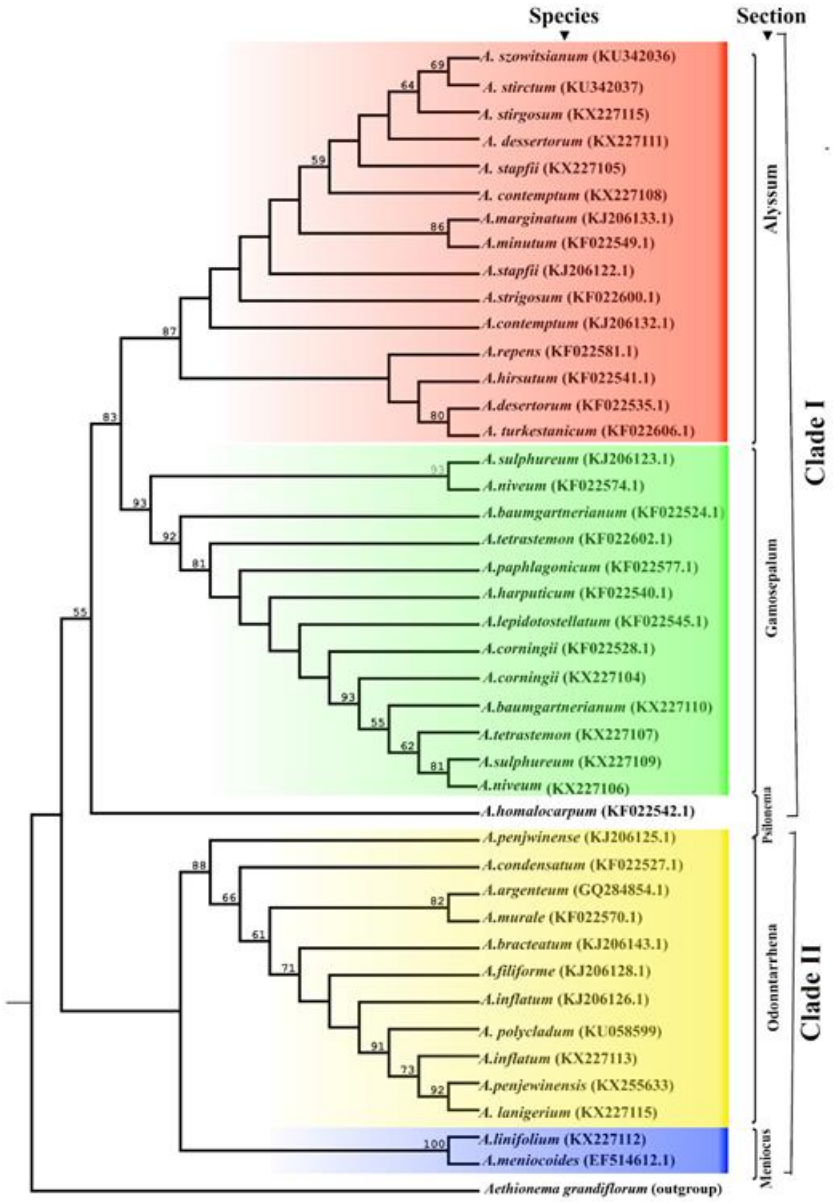
هم‌ردیفی ناحیه ITS در گونه‌های مورد مطالعه شامل ١٦ توالی به طول ٦٤٧-٦٢٤ نوکلئوتید بود. در این همردیفی ناحیه‌ی ٦٠ تا ٦٤٠ به شدت متغیر بود و در آن تعداد زیادی حذف و اضافه در توالی‌های متعدد ملاحظه گردید. بیشترین میزان حذف مربوط به ١٦ توالی در فاصله ٦٠٠ جفت‌باز تا ٥٨٠ جفت‌باز با ١٢٤ نوکلئوتید حذف شده وکم‌ترین نوکلئوتید حذف شده مربوط به فاصله بین نواحی ٤٠٠ -٣٨٠ جفت‌باز و همچنین ٤٢٠- ٤٠٠ جفت-باز که فاقد نوکلئوتید حذف شده می‌باشد. در همردیفی ١٦ توالی مورد مطالعه، تعداد ٤٩٨ نوکلئوتید حذف شده مشاهده شد. بیشترین تعداد حذف و اضافه‌ها طولی برابر با یک تا نه جفت‌باز داشتند. میانگین محتوای G+C در نمونه‌های مورد مطالعه ٥٤/٦ درصد بود. محتوای G+C از ٥٠/٥ تا ٥٨/٥ درصد متغیر بود. گونه‌های *A. lanigerum* و *A. stapfii* با میزان ٥٨/٥ و ٥٠/٥ درصد به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقدار G+C را دارا بودند.

درخت حاصل از تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی (MP) برای نشانگر ITS در گونه‌های مورد مطالعه در شکل ٤ مشاهده می‌شود.

```
LOCUS       Alyssum szowitsianum (NV)          742 bp    DNA
SOURCE
ORGANISM
COMMENT
BASE COUNT      189 a       214 c       168 g       171 t
ORIGIN
        1 cctagaaaca aaaaacatag cattacgtgc atagactaac atttgtcaat acgtgaacaa
       61 aacacaacga cccttaaact aacgatcctc cctcccggcg ccccttttcc tttcgcattc
      121 cgtccccttc tggttccgtt gttcccctaa cttctcaatt ttcgtactca cgtccgtatc
      181 agttctttgt tctttgcttc tggacttaac caaaccacgg aaggaagagt gtaaagtgaa
      241 catgaaaccg aacgtctctg cgcccgcggc cccggagacg gtgcgtccgc ggatcctctg
      301 ctgaaaaaaa aaaagtctaa aacgactctc ggaaacgtat atctcgcctc tcgcatcgat
      361 aaagaacgaa gcgaaatgcg atacttggtg tgaattgcag aatcccgtga accatcgagt
      421 ctttgaacgc aagtcgcgcc ctaagccttc tggccgaggc ccgtctgcct gggtgtcaca
      481 aatcgtcgtc cccccaaact atatctttcg cggacggatg cgcaacacgt aagctgctct
      541 ccggtgtgtt accgcacgcg tttggccaaa atcagagcag aaggacccag gagcgtctcg
      601 acgtggggtg gtgtgaatcg acatatcggc gtgcgctccc atgccggaag ctctattgag
      661 acccgatgtc tcaacgcgac accggtcagg cggcaccccc cgctgagtta agcatacaaa
      721 cgggggaaaa aatttttttt ta
```

شکل ٣- نمونه‌ای از توالی‌های ITS مربوط به گونه‌ی *A. szowitsianum*

Figure 3. Example of ITS sequences from *A. szowitsianum*



شکل ٤- درخت تبارزایشی به‌دست آمده از داده‌های مولکولی nrDNA ITS گونه‌های مورد مطالعه

Figure 4. The Phylogenetic tree obtained from the nrDNA ITS molecular data of the studied species

همان طوری‌که در شکل ٤ مشاهده می‌شود، تاکسون‌های متعلق به سرده *Alyssum* در این مطالعه از دو کلاد اصلی تشکیل شده‌اند، که در آن، کلاد I شامل ١١ گونه از بخشه *Alyssum* و ٨ گونه متعلق به بخشه *Gamamsepalum* بود. همچنین نتایج نشان داد که گونه *A. homalocarpum* متعلق به بخشه *Meniocus* می‌باشد که نشان دهنده قرابت تبارزایشی این دو بخشه با هم‌دیگر است. کلاد II شامل ٩ گونه از بخشه *Odontarrhena* و دو گونه *A. linifolium* و *A. meniocoides* از بخشه *Meniocus* است که بیانگر رابطه تبارزایشی نزدیک این دو بخشه با هم است. به طور کلی نتایج تحقیق حاضر، طبقه‌بندی‌های سنتی قبلی که بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی و تشریحی انجام شده را تأیید می‌کند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ناحیه ITS دارای ارزش زیادی برای بررسی روابط تبارزایشی در میان بخشه‌های مختلف و تجزیه و تحلیل تبارزایشی تاکسون‌های متعلق به سرده *Alyssum* است (شکل ٤).

نتایج این پژوهش دو کلاد اصلی (کلاد I شامل بخشه‌های *Alyssum* و *Gamosepalum* و کلاد II شامل *Odontarrhena*

و *Meniocus*) را شناسایی کرد که با یافته‌های لی و همکاران (Li *et al*., 2014) و رستنیک و همکاران (Rešetnik *et al*., 2013) هم‌خوانی دارد. در این مطالعه دو دودمان مجزا در سرده *Alyssum* یافت شد که این تقسیم‌بندی مبتنی بر تفاوت‌های ریخت‌شناختی و اکولوژیکی (مانند یک‌ساله بودن گونه‌های کلاد I در مقابل چندساله بودن گونه‌های کلاد II) بود. مطالعه قربانی مرغشی و همکاران (Ghorbani Marghashi *et al*., 2019) روی گونه‌های *Cardamine* نیز نشان داد که ناحیه ITSابزار مؤثری برای تفکیک گونه‌ها در خانواده Brassicaceae است، که این نتیجه با کاربرد موفق ITS در تفکیک بخشه‌های *Alyssum* در پژوهش حاضر مطابقت دارد.

پژوهش حاضر تک‌نیایی (مونوفیلتیک) بودن بخشه *Alyssum* را تأیید کرد، که با نتایج وارویک و همکاران (Warwick *et al*., 2008) و الشهباز (Al-Shehbaz, 2002) مطابقت دارد. این یافته‌ها پایه‌ای محکم برای مطالعات آینده در زمینه تکامل و پراکنش جغرافیایی این گروه فراهم می‌کند. در مقابل، نتایج برخی مطالعات مانند پژوهش دودلی (Dudley, 1964) که مبتنی‌بر صفات ریخت‌شناختی بود، سرده *Alyssum* را به شش بخشه تقسیم کرد؛ اما نتایج مولکولی پژوهش حاضر نشان داد که این تقسیم‌بندی نیاز به بازنگری دارد، چرا که برخی بخشه‌ها (مانند *Meniocus*) در کلادهای متفاوتی قرار گرفتند. این تناقض احتمالاً ناشی **از** هم‌نمایی (Homoplasy) صفات ریخت‌شناختی باشد که پیشتر توسط الشهباز (Al-Shehbaz, 2002) نیز گزارش شده است.

این مطالعه در موافقت با یافته‌های سچی و همکاران (Cecchi *et al*., 2010) است که پیشنهاد دادند Odontarrhena و Meniocus باید به سطح جنس ارتقا یابند. تجزیه‌وتحلیل ITS نشان داد که این دو بخشه از نظر تبارزایی از *Alyssum* جدا هستند و حتی با جنس Clypeola قرابت دارند. ثبت توالی‌های ITS برای ۱۶ گونه ایرانی *Alyssum* (برای اولین‌بار) در پایگاه NCBI نشان داد که این گونه‌ها از نظر ژنتیکی با نمونه‌های غیرایرانی (مثلاً از چین یا کرواسی) تفاوت‌های معناداری دارند. برای مثال، *A. desertorum* جمع‌آوری‌شده از ایران (شماره دسترسی KX227111) با نمونه کرواتی (شماره دسترسی KF022535.1) در برخی جایگاه‌های نوکلئوتیدی تفاوت داشت. این تفاوت می تواند ناشی از انزوای جغرافیایی **یا** تکامل موازی باشد. مطالعه اسلامی فاروجی و همکاران (Eslami-Farouji *et al*., 2021) نیز تأثیر تغییرات اقلیمی و جغرافیایی بر تنوع گونه‌ای در خانواده Brassicaceae را تأیید کرده است، که می‌تواند توضیحی برای تفاوت‌های مشاهده‌شده در این پژوهش باشد.

به‌طور کلی این مطالعه نخستین تحلیل جامع تبارزایشی سرده *Alyssum* در ایران با استفاده از توالی ITS است که نقش کلیدی این ناحیه ژنی در روشن‌سازی روابط تبارشناسی را تأیید می‌کند. در مطالعه حاضر برای اولین‌بار توالی ITS برای ۱۶ گونه ایرانی *Alyssum* در NCBI ثبت شد که می‌تواند منبعی ارزشمند برای مطالعات آینده در حوزه تنوع زیستی و حفاظت از گونه‌های بومی ایران به‌شمار آید. علاوه بر این در مطالعه حاضر ساختار دو کلادی (تأیید تقسیم سرده *Alyssum* به دو کلاد اصلی با پشتیبانی آماری بالا) مورد تأیید قرار گرفت که نیاز به بازتعریف مرزهای طبقه‌بندی در بخشه‌های *Odontarrhena* و *Meniocus* را نشان می‌دهد.همچنین یافته‌های پژوهش حاضر تک‌نیایی بخشه *Alyssum* را تأیید نمود که یافته مذکور می‌تواند پایه علمی محکمی برای مطالعات اکولوژیکی و بیوشیمیایی آینده بخشه *Alyssum* را فراهم سازد.

References

Al-Shehbaz, I.A. (2002). New species of *Alyssum*, *Aphragmus*, *Arabis*, and *Sinosophiopsis* (Brassicaceae) from China and India. *Novon, A Journal for Botanical Nomenclature*, **12(3):** 309-313.

AL-Shehbaz, I.A., Beilstein, M.A. and Kellogg, E.A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae: an overview. *Plant Systematics and Evolution*, **259:** 89-120.

AL-Shehbaz, I.A. and Ihsan A.A. (2012). Generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, **61(5):** 931-954.

Bailey, C.D., Koch, M.A., Mayer, M., Mummenhoff, K., O'kane, S.L.,Warwick, S.I., Windham, M.D. and Al-Shehbaz, I.A. (2006). Toward a global phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **23:** 2145-2160.

Cecchi, L., Gabbrielli, R., Arnetoli, M., Gonnelli, C., Hasko, A. and Selvi, F. (2010). Evolutionary lineages of nickel hyperaccumulation and systematics in European Alysseae (Brassicaceae): evidence from nrDNA sequence data. *Annals of Botany*, **106(5):** 751-67.

Darvishian, A., Ismaili, A., Nazarian-Firouzabadi, F., MirDrikvand, R. and Hosseinpour, T. (2016). Assessment of genetic diversity among wheat genotypes of west Iran, using randomized markers. *Plant Genetic Researches*, **2(2):** 47-56 (In Persian).

Dudley, T. (1964). Studies in *Alyssum*: near Eastern representatives and their allies, I. *Journal of the Arnold Arboretum*, **45:** 57-100.

Eslami-Farouji, A., Khodayari, H., Assadi, M., Çetin, O., Mummenhoff, K. and Özüdoğru, B. (2021). Phylogeny and biogeography of the genus *Hesperis* (Brassicaceae, tribe Hesperideae) inferred from nuclear ribosomal DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, **307(17):** 1-22.

Franzke, A., Lysak, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Koch, M.A. and Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*, **16:** 108-116.

Gawel, N.J., and Jarret, R.L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9:** 262-266.

Ghorbani Marghashi, M., Bagheri, H. and Gholami, M. (2019). Identification of some Iranian Cardamine species using the ITS molecular marker, *Journal of Plant Research*, **32(1):** 28-38 (In Persian).

Hendriks, K.P., Kiefer, C., Al-Shehbaz, I.A., Bailey, C.D., Hooft van Huysduynen, A., Nikolov, L.A., Nauheimer, L., Zuntini, A.R., German, D.A., Franzke, A., Koch, M.A., Lysak, M.A., Toro-Núñez, Ó., Özüdoğru, B., Invernón, V.R., Walden, N., Maurin, O., Hay, N.M., Shushkov, P., Mandáková, T., Schranz, M.E., Thulin, M., Windham, M.D., Rešetnik, I., Španiel, S., Ly, E., Pires, J.C., Harkess, A., Neuffer, B., Vogt, R., Bräuchler, C., Rainer, H., Janssens, S.B., Schmull, M., Forrest, A., Guggisberg, A., Zmarzty, S., Lepschi, B.J., Scarlett, N., Stauffer, F.W., Schönberger, I., Heenan, P., Baker, W.J., Forest, F., Mummenhoff, K. and Lens, F. (2023). Global Brassicaceae phylogeny based on filtering of 1,000-gene dataset. *Current Biology*, **33:** 4052-4068.e6.

Jomeh Ghasem Abadi, Z., Fakheri, B. and Fazeli-Nasab B. (2019). Study of the molecular diversity of internal transcribed spacer region (ITS1.4) in some lettuce genotypes. *Journal of Crop Breeding*, **11(29):** 29-39 (In Persian).

Kavousi, K., Nazary, Z. and Ghahremani Nejad, F. (2014) New Species of *Alyssum* (Brassicaceae) from Northeastern Iran. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, **23(1):** 59-61.

Koch, M. Kiefer, C. (2006). Molecules and migration: biogeographical studies in cruciferous plants, *Plant Systematics and Evolution*, **259:** 121-142.

Li, Y., Feng, Y., Lv, G., Liu, B. and Qi, A. (2015). The phylogeny of *Alyssum* (Brassicaceae) inferred from molecular data. *Nordic Journal of Botany*, **33:** 715-721.

Li, Y., Kong, Y., Zhang, Z., Yin, Y., Liu, B., Guanghui, L.V. and Wang, X. (2014). Phylogeny and biogeography of *Alyssum* (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Journal of Genetics*, **93(2):** 313-323.

Mengoni, A., Baker, A.J.M., Bazzicalupo, M., Reeves, R.D., Adiguzel, N., Chianni, E. *et al.* (2003). Evolutionary dynamics of nickel hyperaccumulation in *Alyssum* revealed by ITS nrDNA analysis. *New Phytologist*, **159:** 691-699.

MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P. (2019) Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1):** 1-30 (In Persian).

Mirzadeh Vaghefi, S.S., Asadi, M. and Sheidai, M. (2016). A new species of the genus *Alyssum* section *Alyssum* (Brassicaceae) from Iran. Nova Biologica Reperta, **3(2):** 145-150.

Ozay, C. and Mammadov, R. (2016). Assessment of some biological activities of *Alyssum* L. known as madwort. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **73(5):** 1213-1220.

Rechinger, K. (1968) *Alyssum* in Flora Iranica. Cruciferae, **57:** 146-170.

Rešetnik, I., Satovic, Z., Schneeweiss, G. M., and Liber, Z. (2013). Phylogenetic relationships in Brassicaceae tribe *Alysseae* inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **69(3):** 772-786.

Španiel, S., Kempa, M., Salmerón-Sánchez, E., Fuertes-Aguilar, J., Mota, J.F., Al-Shehbaz, I.A., German, D.A., Olšavská, K., Šingliarová, B., Zozomová-Lihová, J. and Marhold, K. (2015). AlyBase: database of names, chromosome numbers, and ploidy levels of Alysseae (Brassicaceae), with a new generic concept of the tribe. *Plant Systematics and Evolution*, **301:** 2463-2491.

Warwick, S., Francis, A. and Al-Shehbaz, I. (2006). Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution*, **259(2-4):** 249-258.

Warwick, S.I., Al-Shehbaz, I.A., Price, R.A. and Sauder, C. (2002). Phylogeny of Sisymbrium (Brassicaceae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Canadian Journal of Botany, **80:** 1002-1017.

Warwick, S.I., Sauder, C.A. and Al-Shehbaz, I.A. (2008). Phylogenetic relationships in the tribe Alysseae (Brassicaceae) based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. Botany, **86(4):** 315-336.