

Genetic Diversity Assessment of Some *Salvia* Species in the Central Zagros Region Using iPBS Molecular Markers

Mostafa Hajhadi¹  | Mohammad Rabiei^{1*}  | Majid Ghorbani Nohooji²  | Behrouz Shiran¹ 

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Medicinal Plants Research Institute, ACECR, Karaj, Iran

*Corresponding author ✉: rabiei@sku.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: April 19, 2026;
Received in revised form: June 10, 2026;
Accepted: June 19, 2026;
Available online: June 30, 2026

Keywords:

Cluster analysis,
Genetic variation,
Genetic conservation,
Retrotransposon,
Population structure

ABSTRACT

The genus *Salvia* is one of the most important genera of medicinal plants in the Lamiaceae family due to its bioactive compounds and pharmaceutical values, requiring the identification and conservation of its genetic resources. Retrotransposon-based molecular markers, particularly inter Primer Binding Site (iPBS) markers, are considered efficient approaches for assessing genetic diversity because of their high ability to detect genetic polymorphism. In this study, the genetic diversity and population structure of 50 ecotypes belonging to seven *Salvia* species collected from the Central Zagros region of Iran were evaluated using 10 iPBS primers. The results demonstrated the high efficiency of iPBS markers in detecting genetic variation among the studied species. The average percentage of polymorphic bands and polymorphism information content (PIC) were 98.33% and 0.36, respectively. Cluster analysis based on the Dice similarity coefficient and Neighbor-Joining method separated the studied genotypes into distinct genetic groups. The Mantel test showed a significant correlation between the genetic similarity matrix and clustering pattern ($r = 0.68$, $p = 0.002$), confirming the reliability of the obtained grouping. Population genetic analysis revealed that *S. macrosiphon* and *S. spinosa* populations possessed the highest levels of genetic diversity, indicating their potential as valuable germplasm resources for breeding programs. In contrast, *S. reuterana* showed the lowest genetic diversity indices and greater genetic distance from other populations, suggesting that it represents a genetically distinct group requiring special attention in conservation and germplasm management. Furthermore, *S. multicaulis* and *S. limbata* exhibited considerable genetic differentiation due to their independent positions in the dendrogram and higher genetic distances, highlighting their importance for maintaining genetic diversity within the genus *Salvia*.



Cite this article: Hajhadi, M., Rabiei, M., Ghorbani Nohooji, M. and Shiran, B. (2026). Genetic diversity assessment of some *salvia* species in the central zagros region using iPBS molecular markers. *Plant Genetic Research*, 13(1): 83–100 (In Persian).

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2026.2087225.1034>

Introduction

The genus *Salvia* is one of the most important genera of medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. Due to the presence of valuable bioactive compounds and pharmaceutical properties, identification and conservation of its genetic resources are of great value. Molecular markers based on retrotransposons, particularly inter-primer binding site (iPBS) markers, have been widely used as efficient tools for assessing genetic diversity because of their high ability to detect genetic polymorphism. Understanding the genetic diversity and population structure of *Salvia* species is essential for effective germplasm conservation, and breeding selection. Therefore, this study was designed to evaluate the genetic diversity and population structure of different *Salvia* species distributed throughout the Central Zagros region of Iran using iPBS markers.

Materials and Methods

In this study, 50 ecotypes belonging to seven *Salvia* species were collected from the Central Zagros region of Iran. The genetic diversity of the collected samples were assessed using 10 iPBS primers. The obtained amplification patterns were analyzed based on polymorphism parameters, including the percentage of polymorphic loci and polymorphism information content (PIC). Genetic relationships among genotypes were evaluated using Dice similarity coefficient and Neighbor-Joining clustering method. The Mantel test was performed to determine the correlation between genetic similarity matrix and clustering pattern. Population genetic parameters were analyzed using GenAlEx and POPGene software. In addition, analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted to determine the distribution of genetic variation within and among populations.

Results and Discussion

The results showed that iPBS markers had a high ability to detect genetic diversity among the studied *Salvia* species. The average percentage of polymorphic loci was 98.33%, and the mean polymorphism information content (PIC) value was 0.36. This high level of polymorphism indicated the efficiency of iPBS markers in detecting genetic differences among genotypes of the *Salvia* genera. Cluster analysis based on Dice similarity coefficient and the Neighbor-Joining method separated the genotypes into distinct genetic clusters. Furthermore, the Mantel test revealed a significant correlation between the genetic similarity matrix and clustering pattern ($r=0.68$, $p=0.002$), confirming the reliability of the obtained grouping results. The analysis of genetic diversity among populations showed that *S. macrosiphon* and *S. spinosa* populations exhibited the highest levels of genetic diversity among the studied populations. This high genetic variation identifies these populations as valuable germplasm resources for the selection of diverse parents, increasing the genetic base, and their application in breeding programs of medicinal *Salvia* species. In contrast, *S. reuterana* stands out as a distinct genetic lineage due to its minimal genetic diversity and significant genetic distance from other populations, underscoring its critical role in conservation efforts. Moreover, *S. multicaulis* and *S. limbata* demonstrated substantial genetic differentiation as separate branches on the dendrogram, representing distinct groups crucial for preserving *Salvia* diversity. The results of analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 93% of the genetic variation was attributed to within-population variation, while only 7% occurred among populations, indicating a high proportion of genetic diversity within populations.

Conclusion

This study represents the first report on the application of iPBS markers for assessing genetic diversity among different *Salvia* species in Iran. The results demonstrated that this marker has high potential for detecting polymorphism, distinguishing genetic groups, and identifying

valuable genetic resources. The findings provide useful information for the selection of superior germplasm, development of breeding programs, genetic resource management, and the establishment of conservation strategies for sustainable utilization of medicinal *Salvia* species.

Author Contributions

M. Hajhadi: Plant sample collection, DNA extraction, PCR and laboratory experiments, genetic data analysis, and original draft preparation. M. Rabiei: Conceptualization, project administration, methodology design, scientific supervision, manuscript review, and final approval. M. Ghorbani Nohooji: Botanical identification and taxonomic verification of *Salvia* species, scientific supervision, and manuscript review. B. Shiran: Project advisement and manuscript review.

Data Availability Statement

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

This article is derived from the Ph.D. dissertation of Mostafa Hajhadi, conducted under the supervision of Dr. Mohammad Rabiei and Dr. Majid Ghorbani Nohooji, and the co-supervision/advisement of Dr. Behrouz Shiran at the Department of Plant Breeding and Biotechnology, Shahrekord University. The authors extend their sincere gratitude to Dr. Ghorbani Nohooji for the precise botanical identification and taxonomic verification of the collected *Salvia* species.

Ethical Considerations

All experimental research and field collection of *Salvia* plant materials were conducted in full compliance with relevant institutional, national, and international guidelines and legislation. The field sampling did not involve any endangered or protected plant species.

Funding

This work was partially supported by Shahrekord University as part of a Ph.D. dissertation.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.



بررسی تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌های جنس *Salvia* منطقه زاگرس مرکزی با استفاده از نشانگر مولکولی iPBS

مصطفی حاج هادی^۱ | محمد ربیعی^{۱*} | مجید قربانی نهوجی^۲ | بهروز شیران^۱

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

جنس *Salvia* از مهم‌ترین جنس‌های گیاهان دارویی تیره نعنائیان است که به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست فعال و ارزش دارویی، نیازمند شناسایی و حفاظت ذخایر ژنتیکی می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها، به ویژه نشانگر iPBS، به دلیل توانایی بالا در آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی، رویکردی کارآمد برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی محسوب می‌شود. در این پژوهش تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ۵۰ اکوتیپ از هفت گونه جنس *Salvia*، منطقه زاگرس مرکزی ایران با استفاده از ۱۰ آغازگر iPBS بررسی شد. نتایج نشان داد که نشانگرهای iPBS توانایی بالایی در آشکارسازی تنوع ژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه داشتند؛ به طوری که میانگین درصد نوارهای چندشکل ۹۸/۳۳ درصد و میانگین شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) برابر ۰/۳۶ به دست آمد. تحلیل خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه دایس و روش Neighbor-Joining، ۵۰ ژنوتیپ مورد مطالعه را در گروه‌های ژنتیکی متمایز تفکیک کرد و آزمون مانتل نیز با مقادیر $r=0/68$ و مقدار احتمال بسیار معنی دار ($p=0/002$) همبستگی بین ماتریس تشابه ژنتیکی و الگوی خوشه‌بندی را نشان داد. نتایج تحلیل تنوع جمعیتی نشان داد که جمعیت‌های *S. spinosa* و *S. macrosiphon* دارای بالاترین سطح تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه بودند. وجود این سطح بالای تنوع ژنتیکی، این جمعیت‌ها را به عنوان منابع ژرمپلاسم ارزشمند برای برنامه‌های بهنجاری معرفی می‌کند. در مقابل جمعیت‌های *S. reuterana* با کمترین میزان تنوع شاخص‌های ژنتیکی نسبت به سایر جمعیت‌ها، یک ذخیره ژنتیکی متمایز محسوب می‌شود که نیازمند توجه ویژه در برنامه‌های حفاظت و نگهداری ژرمپلاسم است. همچنین، گونه‌های *S. multicaulis* و *S. limbata* به دلیل قرارگیری در شاخه‌های مستقل دندروگرام و تمایز ژنتیکی بالا، می‌توانند نماینده گروه‌های ژنتیکی منحصربه‌فردی باشند که حفاظت آن‌ها برای حفظ تنوع ژنتیکی جنس *Salvia* اهمیت دارد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۱/۳۰

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

تحلیل خوشه‌ای،

تنوع ژنتیکی،

حفاظت ژنتیکی،

رتروترانسپوزون،

ساختار جمعیت



مقدمه

گیاهان منبع مهمی از ترکیبات دارویی با ارزش هستند و در دهه‌های اخیر به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی و ناکارآمدی برخی از آنها، توجه به داروهایی با منشأ گیاهی به‌طور چشمگیری افزایش یافته است، به‌طوری‌که حدود یک‌چهارم داروهای مورد استفاده در جهان منشأ گیاهی دارند (Mulabagal *et al.*, 2004). با این حال، گونه‌های بومی و خویشاوندان وحشی گیاهان دارویی به‌عنوان بخشی از ژرمپلاسزم ارزشمند در معرض تهدیدهای جدی مانند خشکسالی، چرای بی‌رویه و بهره‌برداری ناپایدار قرار دارند و حفاظت از این منابع ضروری است (Zaman *et al.*, 2025). این راستا، شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی نقش کلیدی در حفاظت و بهره‌برداری پایدار از این ذخایر دارد، در حالی که روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی به دلیل تأثیرپذیری از شرایط محیطی و شباهت‌های فنوتیپی، دقت محدودی در تفکیک ژنوتیپ‌ها دارند، استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ابزار مؤثری برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف است (Sarwat *et al.*, 2012).

عناصر جابه‌جا شونده ژنومی (ترانسپوزون‌ها) که نخستین بار توسط McClintock در ذرت معرفی شدند، به‌عنوان یکی از منابع مهم ایجاد تنوع ژنتیکی شناخته می‌شوند (Biswas *et al.*, 2010). این عناصر در ژنوم بسیاری از گیاهان حضور داشته و با ایجاد جابه‌جایی و بازآرایی‌های ژنومی، موجب چندشکلی ژنتیکی در سطح گونه و جمعیت می‌شوند (Nadeem *et al.*, 2017). بر این اساس، نشانگر iPBS به‌عنوان یک روش مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها توسعه یافته و با تولید الگوی بانندی چندشکل، امکان ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی را فراهم می‌کند (Kalendar *et al.*, 2014). اساس این تکنیک بر تکثیر نواحی ژنومی بین دو رتروترانسپوزون مجاور با جهت‌گیری معکوس استوار است و چندشکلی مشاهده‌شده حاصل درج رتروترانسپوزون‌ها در جایگاه‌های مختلف ژنوم می‌باشد. آغازگرها در این روش بر اساس ناحیه PBS (Primer Binding Site) طراحی می‌شوند؛ ناحیه‌ای حفاظت‌شده در مجاورت انتهای 5' از LTR که محل اتصال مولکول tRNA میزبان بوده و برای آغاز فرآیند رونوشت‌برداری معکوس ضروری است. در نشانگر iPBS معمولاً برای هر واکنش PCR تنها از یک آغازگر

منفرد استفاده می‌شود که این امر، اجرای این تکنیک را در مطالعات تنوع ژنتیکی ساده‌تر و اقتصادی‌تر می‌سازد (Kalendar *et al.*, 2021).

پژوهش‌های مختلف کارایی بالای این نشانگر را در گونه‌های گیاهی متعدد تأیید کرده‌اند. به عنوان نمونه در پژوهشی که در سال ۲۰۱۶ به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ چای رشد یافته در ویتنام انجام شد، آن‌ها از ۶ آغازگر iPBS استفاده کردند. این نشانگر توانست تفکیک مؤثری بین ژنوتیپ‌ها ایجاد کند (Phong *et al.*, 2016). گائو و همکاران در سال ۲۰۱۴ (Gao *et al.*, 2014) در تحقیقی از ۱۵ آغازگر iPBS به‌منظور بررسی تنوع ۱۵ واریته ی انگور استفاده کردند. در نهایت آنها بیان کردند که از مجموع ۹۹ باند DNA تشکیل شده ۸۶ درصد از باندها چندشکلی نشان دادند. همچنین آن‌ها بیان داشتند که در مقایسه با دیگر نشانگرهای ترانسپوزونی، iPBS در بررسی تنوع ژنتیکی انگور کارایی بالاتری دارد. استفاده از نشانگر iPBS در گیاهان دارویی نیز توانایی بالای این نشانگر را در آشکارسازی تنوع ژنتیکی نشان داده است. وانجیاجیوا و پورنپونگ رانگروئنگ (Vanijajiva and Pornpongrueng, 2020) با بررسی تنوع ژنتیکی دو گونه از جنس دارویی *Cissampelos* با استفاده از ۲۰ نشانگر iPBS، تعداد ۱۲۰ باند چندشکل شناسایی کردند. نتایج حاصل از تحلیل‌های خوشه‌ای، PCoA و AMOVA در مطالعه مذکور نشان داد که این نشانگر توانایی مناسبی در تفکیک گونه‌ها و بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها دارد. همچنین برنا و همکاران (Borna *et al.*, 2017) با استفاده از نشانگر iPBS در ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی *Leonurus cardiaca* از تیره نعنائیان، ۱۹۱ باند چندشکل ایجاد کردند و گزارش دادند که این نشانگر ابزاری کم‌هزینه و مؤثر برای تمایز ژنوتیپ‌ها و بررسی روابط ژنتیکی گونه‌های دارویی مرتبط است.

کاربرد نشانگر iPBS در ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنس *Salvia*، تاکنون کمتر مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به توانایی این نشانگر در آشکارسازی چندشکلی‌های ژنتیکی، قدرت تفکیک مناسب، هزینه اجرایی پایین و عدم نیاز به اطلاعات توالی ژنومی قبلی، استفاده از iPBS می‌تواند رویکردی کارآمد برای بررسی روابط ژنتیکی، شناسایی تنوع ژرمپلاسزم و تکمیل مطالعات مولکولی در گونه‌های ارزشمند دارویی جنس *Salvia* باشد. این رویکرد می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری برای

حفاظت، مدیریت و بهره‌برداری پایدار از ذخایر ژنتیکی این گیاهان فراهم کند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی: مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ۵۰ اکوتیپ متعلق به گونه‌های مختلف جنس *Salvia* بود که در خرداد و تیرماه سال ۱۴۰۳ از مناطق مختلف زاگرس مرکزی شامل استان‌های چهارمحال و بختیاری، اصفهان، مرکزی، لرستان و خوزستان جمع‌آوری شدند. شناسایی و تعیین هویت این اکوتیپ‌ها بر اساس صفات ریخت شناسی، استفاده از

فلورهای گیاهی معتبر و منابع علمی مرتبط، تحت نظر متخصص سیستماتیک گیاهی انجام گرفت. در نهایت، نمونه‌های جمع‌آوری شده در قالب ۷ گونه مختلف جنس *Salvia* طبقه‌بندی شدند. با توجه به تعلق اکوتیپ‌های مورد مطالعه به هفت گونه مختلف این جنس، نمونه‌های مربوط به هر گونه به‌عنوان یک گروه جمعیتی مبتنی بر گونه در نظر گرفته شده و با کدهای POP1 تا POP7 نام‌گذاری شدند. اطلاعات مربوط به شماره اکوتیپ‌ها، گونه، محل جمع‌آوری و موقعیت جغرافیایی نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی مربوط به جمعیت‌های جمع‌آوری شده از گونه‌های مختلف جنس *Salvia*

Table 1. Geographical information of the collected populations of *Salvia* spp.

ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)	عرض جغرافیایی Latitude (UTM)	طول جغرافیایی Longitude (UTM)	منطقه Location	شماره اکوتیپ Sample No.	گونه Species	شماره جمعیت Population number
2304	50.7206	32.9318	کرد علیا Kord-e Olya	S1	<i>Salvia syriaca</i>	1
2370	50.4952	33.0459	خوانسار Khansar	S2	<i>Salvia syriaca</i>	1
2436	50.1091	33.0408	بوئین میاندشت Buin Miandasht	S3	<i>Salvia syriaca</i>	1
2433	50.2176	33.021	فریدون شهر Fereydunshahr	S4	<i>Salvia syriaca</i>	1
2374	50.4923	32.9021	جاده داران به چادگان Daran to Chadegan road	S5	<i>Salvia syriaca</i>	1
2236	50.7674	32.9081	کرد سفلی Kord-e Sofla	S6	<i>Salvia syriaca</i>	1
2277	50.8124	32.8509	دشت مرغاب دالانکوه Morghab Plain, Dalankuh	S7	<i>Salvia syriaca</i>	1
2415	50.2376	32.4186	روستای امیرآباد چلگرد Amirabad village, Chelgerd	S8	<i>Salvia syriaca</i>	1
2403	50.5537	32.4496	سودجان قبل از روستای مرغملک Sudjan, before Marghamolk village	S9	<i>Salvia syriaca</i>	1
2230	50.2523	32.5072	چلگرد دیمه قبل از روستای قلعه سبزی Chelgerd, Dimeh, before Ghaleh Sabzi village	S10	<i>Salvia syriaca</i>	1
2143	50.7694	32.2967	فارسان شهرکرد Farsan, Shahrekord	S11	<i>Salvia syriaca</i>	1
2323	51.0727	32.2371	جاده شهرکردبروجن Shahrekord to Borujen road	S12	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2092	49.7119	33.4695	جاده خمین الیگودرز Khomein to Aligudarz road	S13	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2246	50.3685	32.9685	نزدیک روستای نماگرد Near Namagard village	S14	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2344	50.5567	32.4426	سورشجان به سودجان بعد از روستای هارونی Sureshjan to Sudjan road, after Haruni village	S15	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2408	50.5542	32.4494	سورشجان سودجان قبل از روستای مرغملک Sureshjan to Sudjan road, before Marghamolk village	S16	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2216	50.2445	32.5119	چلگرد به دیمه روستای قلعه سبزی Chelgerd to Dimeh road, Ghaleh Sabzi village	S17	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2433	50.3128	32.3803	چلگرد به فارسان روستای نصیر آباد Chelgerd to Farsan road, Nasirabad village	S18	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2525	51.5726	31.4217	سمیرم Semirom	S19	<i>Salvia nemorosa</i>	2
2489	51.3706	31.8332	جاده سمیرم بروجن Semirom to Borujen road	S20	<i>Salvia nemorosa</i>	2

ادامه جدول ۱-

Table 1. (Continued)

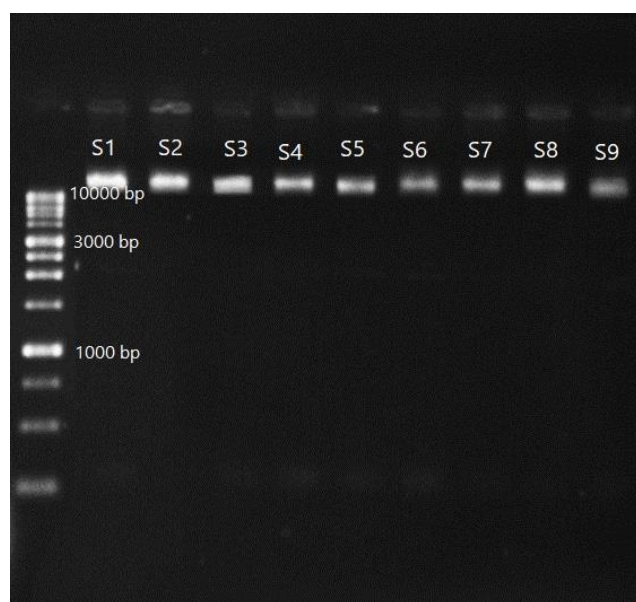
شماره اکوتیپ Sample No.	تعداد جمعیت Population number	گونه Species	منطقه Location	طول جغرافیایی Longitude (UTM)	عرض جغرافیایی Latitude (UTM)	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)
S21	2	<i>Salvia nemorosa</i>	کامو کاشان Kamu, Kashan	33.6396	51.2575	2578
S22	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	جاده اشن داران Oshn to Daran road	33.0462	50.5823	2417
S23	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	جاده اشن نمازگاه نزدیک روستای چغاسوخته Oshn to Namazgah road, near Chaghasookhiteh village	33.1021	50.6713	2205
S24	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	روستای جوبین کاشان Juvinan village, Kashan	33.6833	51.4384	2149
S25	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	جاده رباط مراد به گلپایگان Robat Morad to Golpayegan road	33.6782	50.2679	1687
S26	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	چادگان Chadegan	32.752	50.6322	2089
S27	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	آبشار شالولاک چرمهین Shaloolak Waterfall, Chermahin	32.2999	51.1547	2190
S28	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	نزدیک روستای مرغملک Near Marghamolk village	32.4675	50.5164	2562
S29	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	لردگان به دهلزد بعد از روستای لپر خوزستان Lordegan to Dehdez road, after Lapar village, Khuzestan	31.6083	50.3952	985
S30	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	چشمه کامو کاشان Kamu Spring, Kashan	33.6631	51.2674	2687
S31	3	<i>Salvia macrosiphon</i>	روستای سه Seh village	33.4453	51.4602	2400
S32	4	<i>Salvia spinosa</i>	سامان به هوره Saman to Hureh road	32.5478	50.8422	2051
S33	4	<i>Salvia spinosa</i>	روستای ایل بگی Il-Begi village	32.4986	50.9001	1865
S34	4	<i>Salvia spinosa</i>	شوراب صغیر Shurab-e Saghir	32.4877	50.9338	1918
S35	4	<i>Salvia spinosa</i>	سفید دشت به ورنامخواست Sefiddasht to Varnamkhast road	32.1941	51.298	2066
S36	4	<i>Salvia spinosa</i>	رباط مراد به گلپایگان روستای یمن Robat Morad to Golpayegan road, Yaman village	33.6731	50.2324	1726
S37	4	<i>Salvia spinosa</i>	جاده خمین گلپایگان Khomein to Golpayegan road	33.6013	50.2121	1961
S38	4	<i>Salvia spinosa</i>	گلپایگان کوچری نزدیک روستای قرغن Golpayegan, Kucheri, near Gharghan village	33.4336	50.0661	2075
S39	4	<i>Salvia spinosa</i>	ازنا لرستان Azna, Lorestan	33.4296	49.4689	1865
S40	4	<i>Salvia spinosa</i>	اشترانکوه نزدیک روستای چمنار Oshtorankuh, near Chamnar village	33.4312	49.1928	1618
S41	4	<i>Salvia spinosa</i>	جاده تیران شهرکرد Tiran to Shahrekord road	32.6052	51.0281	2073
S42	4	<i>Salvia spinosa</i>	روستای قلعه موسی خان Ghaleh-ye Musa Khan village	32.6166	50.9856	2092
S43	4	<i>Salvia spinosa</i>	روستای کهریز لطفی Kahriz-e Lotfi village	32.5415	51.1082	1953
S44	4	<i>Salvia spinosa</i>	لردگان قبل از روستای مال خلیفه Lordegan, before Mal-e Khalifeh village	31.2965	51.2227	1822
S45	4	<i>Salvia spinosa</i>	آبشار سمیرم Semirom Waterfall	31.416	51.6047	2416
S46	5	<i>Salvia reuterena</i>	جاده گلپایگان کوچری نزدیک سد کوچری Golpayegan to Kucheri road, near Kucheri Dam	33.4366	50.1702	1945
S47	5	<i>Salvia reuterena</i>	نزدیک روستای مرغملک Near Marghamolk village	32.4675	50.5164	2562
S48	5	<i>Salvia reuterena</i>	دهاقان روستای محمود آباد Dehaghan, Mahmoudabad village	31.9365	51.7212	1979
S49	6	<i>Salvia multicaulis</i>	آبشار شالولاک چرمهین Shaloolak Waterfall, Chermahin	32.2986	51.1538	2299
S50	7	<i>Salvia limbata</i>	قهروند قبل از امامزاده Ghahroud, before the Imamzadeh	33.6803	51.4279	2187

Salvia با ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داده شده است. بعد از بررسی کمیت و کیفیت DNA، از تمامی نمونه‌ها غلظت ۲۵ نانوگرم جهت انجام واکنش PCR، تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): واکنش PCR بر اساس روش کالندر و همکاران (Kalendar *et al.*, 2010) انجام شد. به‌منظور انتخاب آغازگرهای iPBS مورد استفاده در این پژوهش، پیش از انجام واکنش‌های PCR اصلی، مرحله غربالگری اولیه بر روی تعدادی از نمونه‌ها انجام گرفت. در این مرحله، آغازگرهایی که قادر به ایجاد الگوهای نواری واضح، تکرارپذیر و دارای سطح مناسب چندشکلی بودند، انتخاب شدند. همچنین، ویژگی‌های توالی آغازگرها، از جمله درصد محتوای GC، به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر بر اتصال مناسب آغازگر به DNA الگو و افزایش کارایی تکثیر در واکنش PCR مورد توجه قرار گرفت. در نهایت ۱۰ آغازگر iPBS با عملکرد مناسب که پیش‌تر در پژوهش کالندر و شولمن (Kalendar and Schulman, 2014) استفاده شده بودند، انتخاب و از شرکت سیناکلون تهران سفارش داده شدند. توالی آغازگرهای مورد استفاده و دمای اتصال مربوط به هرکدام در جدول ۲ ارائه شده است.

استخراج DNA ژنومی: نمونه‌های برگ‌ی مورد نیاز جهت استخراج DNA در ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور انجام مطالعه مولکولی، DNA ژنومی نمونه‌های برگ‌ی به‌وسیله روش CTAB تغییریافته استخراج شد. تمامی نمونه‌های استخراج شده با آنزیم RNase A خالص‌سازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین کمیت و کیفیت DNA: کمیت DNA نمونه‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل Thermo- ND-ONE برحسب نانوگرم بر میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفت. نسبت قرائت شده نمونه‌ها در بازه‌ی ۲-۱/۷ تعیین شد. این مقدار نشان دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراج شده بود که جهت انجام واکنش زنجیره‌ای PCR مناسب می‌باشد. کیفیت نمونه‌های DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر 1× TBE تعیین شد. نتیجه بررسی کیفیت DNA در دستگاه ژل‌داک (شرکت کیاژن (KIAGEN)) ارزیابی شد. با توجه به وجود تک نواری منفرد در زیر هر چاهک بدون هیچ‌گونه پس‌زمینه‌ای، کیفیت مطلوب DNA استخراجی تأیید شد. در شکل ۱ کیفیت DNA استخراج شده نمونه‌های گیاه



شکل ۱- کیفیت DNA استخراج شده نمونه‌های گیاه *Salvia* با ژل آگارز ۰/۸ درصد (نمونه S1 تا S9 مطابق جدول ۱)

Figure 1. The quality of extracted DNA of *Salvia* samples using 0.8% agarose gel. (sample S1 – S9 according to table 1) .

جدول ۲- توالی آغازگرهای iPBS مورد استفاده در تکثیر نواحی ژنومی گونه‌های جنس *Salvia*

Table 2. The sequences of iPBS primers used for amplification of genomic regions of *Salvia* plant

آغازگر iPBS	توالی آغازگر (۵'→۳')	دمای اتصال (°C)
iPBS primer	Primer sequences (5'→3')	Annealing temperature (°C)
iPBS 1	GCTCCGATGCCA	50
iPBS 2	CTCACGATGCCA	48
iPBS 8	GCTCATCATGCCA	48
iPBS 10	TCAACGGCTCTGATACCT	48
iPBS 12	TCGCATCAACCA	48
iPBS 13	TAGATGGCACCA	48
iPBS 15	GGTCCTCATCCA	48
iPBS 17	CCATTGGGTCCA	48
iPBS 19	GCAACAACCCCA	48
iPBS 21	GAACCCTTGCCGATACCA	48

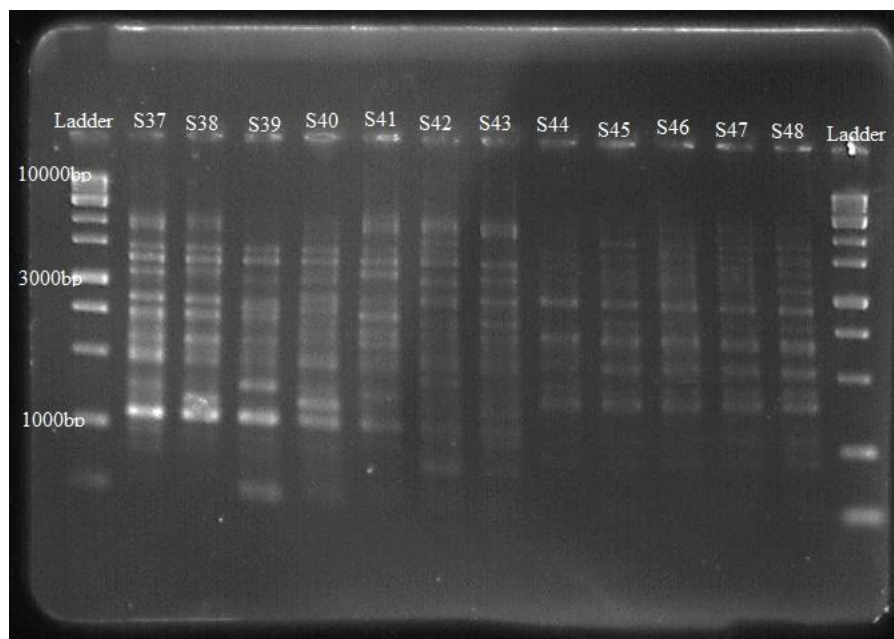
گرفت (Nei and Li, 1979). در این ارزیابی تعداد آل‌های مشاهده شده، تعداد آل‌های مؤثر، شاخص شانون برای هر جمعیت و همچنین تحلیل واریانس مولکولی یا به اختصار AMOVA بر اساس روش پیکال و اسموس (Peakall and Smouse, 2006) و با استفاده از نرم‌افزار GenA1Ex (نسخه ۶/۵) انجام گردید. به منظور تعیین شاخص‌های تنوع ژنتیکی، داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی با استفاده از نرم‌افزار POPGene (نسخه ۱/۳۲) مورد تحلیل قرار گرفت. این نرم‌افزار به طور اختصاصی برای محاسبه پارامترهای پایه تنوع ژنتیکی شامل درصد لوکوس‌های چندشکل (PPL)، شاخص اطلاعاتی شانون (I) و میانگین تنوع ژنی نی (H) مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب این شاخص‌ها به دلیل کارایی بالای آن‌ها در برآورد میزان تغییرات و غنای ژنتیکی در سطح جمعیت‌های مورد مطالعه صورت گرفت.

نتایج و بحث

کارایی و توان تفکیک نشانگرهای iPBS در ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف جنس *Salvia*: در این مطالعه، کارایی و قدرت تمایز ۱۰ نشانگر مولکولی iPBS برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ اکوتیپ جنس *Salvia* متعلق به هفت گونه مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. شاخص‌های مختلفی از جمله تعداد نوارها (Total Bands)، درصد نوارهای چندشکل (% Polymorphic Bands)، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک (RP) برای هر نشانگر محاسبه شد (جدول ۳).

به منظور انجام واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل T100 Thermal Cycler (شرکت BIORAD) استفاده شد. اجزای مورد استفاده برای واکنش PCR به حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر آب دیونیزه، ۳/۵ میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱ پیکومولار و ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس AMPILIQON با غلظت ۲× بود. جهت تعیین بهترین دمای اتصال هرکدام از آغازگرها از گرادیانت ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد که در نهایت دمای اتصال هرکدام از آغازگرها مشخص شد. محصولات نهایی با ژل آگارز ۱/۴ درصد تفکیک و مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت رنگ آمیزی ژل از ماده رنگی DNA Green Viewer (شرکت پارس توس) استفاده شد و نمونه‌ها در بافر ۱× TBE در دستگاه الکتروفورز افقی (شرکت پایا پژوهش) قرار گرفتند. در پایان کار، ژل به دستگاه ژل‌داک (شرکت پدیده نوژن پارس) منتقل و تصویربرداری زیر نور UV انجام شد، سپس نوارهای تفکیک شده مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ای از نوارهای تکثیر یافته در شکل ۲ ارائه شده است.

تحلیل‌های آماری: وجود الگوی نواری با امتیاز یک و عدم حضور آن با امتیاز صفر مشخص شد. ماتریس صفر و یک حاصل به عنوان ورودی برای تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc (نسخه ۲/۲) استفاده شد. روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس (Dice) و با روش اتصال همسایگی (Neighbor-Joining) و با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc (نسخه ۲/۲) انجام



شکل ۲- نوارهای تکثیر یافته با استفاده از آغازگر IPBS1 در اکوتیپ‌های مختلف گیاه جنس *Salvia* (نمونه ۳۷ تا ۴۸ مطابق جدول ۱).

Figure 2. iPBS-PCR amplification products of 12 *Salvia* spp ecotypes amplified by marker iPBS1. (Samples S37-S48 according to table 1).

جدول ۳- شاخص‌های تنوع در ۱۰ نشانگر مولکولی iPBS استفاده شده در این آزمایش

Table 3. Diversity indices of 10 iPBS molecular markers used in this experiment

نشانگرها	تعداد	درصد باندهای	محتوای	نسبت	شاخص	قدرت
Markers	باند	چندشکل	اطلاعات چندشکلی	چندگانه مؤثر	نشانگر	تفکیک
	Number of Bands	Percentage of polymorphic bands	Polymorphic information content (PIC)	Effective Multiplex Ratio (EMR)	Marker Index (MI)	Resolving power (RP)
iPBS 1	11	100	0.28	11	3.17	9.52
iPBS 2	11	100	0.16	11	1.79	8.66
iPBS 8	9	100	0.59	9	5.33	7.58
iPBS 10	9	100	0.59	9	5.31	7.34
iPBS 12	8	100	0.49	8	3.97	6.16
iPBS 13	7	100	0.58	7	4.10	5.52
iPBS 15	13	100	0.10	13	1.42	9.68
iPBS 17	11	100	0.47	11	5.18	8.38
iPBS 19	6	83.33	0.36	4.16	1.51	4.32
iPBS 21	9	100	0.01	9	0.16	6.62
Mean	9.4	98.33	0.36	9.21	3.19	7.37

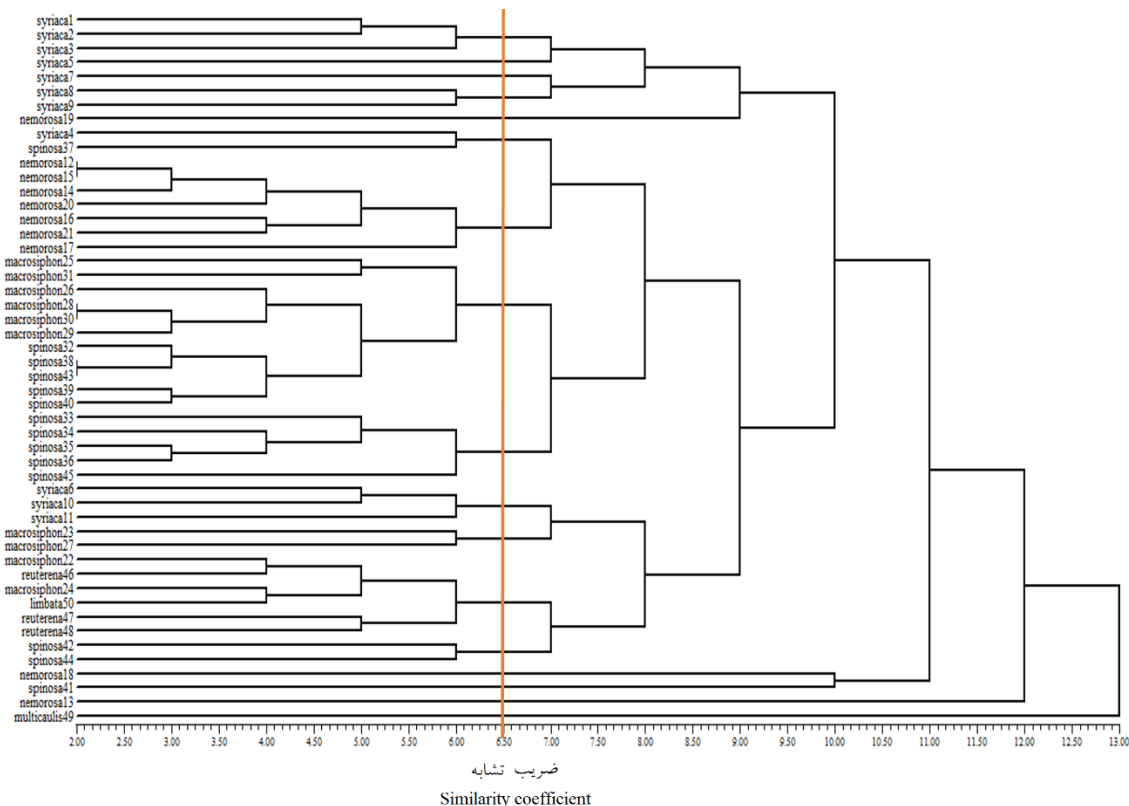
دارای درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد بودند که نشان‌دهنده کارایی بسیار بالای این نشانگرها است. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای نشانگرها ۰/۳۶ محاسبه شد. در بین نشانگرهای مورد مطالعه، نشانگرهای iPBS8 و iPBS10 به ترتیب با مقادیر PIC برابر ۰/۵۹ و ۰/۵۹، بالاترین میزان را از خود نشان دادند که بیانگر قدرت تشخیص بالا و توانایی مناسب آن‌ها

نشانگرهای مورد استفاده از نظر تولید چندشکلی در سطح بسیار مطلوبی عمل کردند، به طوری که میانگین درصد نوارهای چندشکل برای تمامی نشانگرها ۹۸/۳۳ درصد محاسبه شد. این نتیجه حاکی از آن است که تقریباً تمامی نوارهای تولید شده توسط این نشانگرها چندشکل بوده و قابلیت بالایی در تشخیص تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دارند. نه نشانگر از ده نشانگر مورد استفاده،

ژنوتیپ‌ها از یکدیگر نشان دادند. میانگین این شاخص ۷/۳۷ بود که بیانگر قدرت تفکیک رضایت بخش نشانگرها در سطح مجموعه ژنوتیپی است. در نتیجه با وجود عملکرد متفاوت نشانگرها می‌توان گفت نشانگرهای iPBS مورد استفاده در این مطالعه از کارایی و قدرت کافی برای افتراق ژنوتیپ‌های گیاهی برخوردار بودند. نشانگرهای iPBS10، iPBS8 و iPBS17 به دلیل دارا بودن مقادیر بالای PIC، MI و RP به عنوان کارآمدترین نشانگرها برای مطالعات تنوع ژنتیکی در این جنس پیشنهاد می‌گردند. نشانگر iPBS21 دارای پایین ترین عملکرد در بین نشانگرهای مورد مطالعه می‌باشد.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم Neighbour-Joining: ماتریس شباهت با استفاده از ضریب تشابه دایس محاسبه گردید. این ضریب به دلیل عدم حساسیت به داده‌های منفی (عدم حضور باند در هر دو نمونه) و تمرکز بر روی حضور مشترک باندها، برای داده‌های حاصل از نشانگرهای غالب مانند iPBS بسیار مناسب است (Meyer *et al.*, 2004).

در تمایز ژنوتیپ‌ها است. در مقابل، نشانگر iPBS21 با مقدار PIC بسیار پایین (۰/۰۱)، کمترین میزان اطلاعاتمندی را داشت و بنابراین برای مطالعات تنوع ژنتیکی در این مجموعه ژرم پلاسِم مناسب نمی‌باشد. از نظر توانایی تولید داده‌های مفید، میانگین نسبت چندگانه مؤثر (EMR) برابر ۹/۲۱ به دست آمد که حاکی از بازدهی مناسب نشانگرها در تولید نوارهای چندشکل است. نشانگر iPBS15 با تولید ۱۳ نوار چندشکل، بالاترین مقدار EMR (۱۳) را به خود اختصاص داد. ترکیب شاخص‌های PIC و EMR در قالب شاخص نشانگر (MI) نشان داد که نشانگرهای iPBS10، iPBS8 و iPBS17 به ترتیب با مقادیر ۵/۳۳، ۵/۳۱ و ۵/۱۸، بالاترین کارایی کلی را در بین نشانگرهای مورد مطالعه دارا بودند. این نشانگرها به دلیل ترکیب بهینه از تعداد نوارهای چندشکل و محتوای اطلاعاتی بالا، گزینه‌های ایده‌آلی برای مطالعات تنوع ژنتیکی در این مجموعه ژنوتیپی محسوب می‌شوند. بر اساس مقادیر قدرت تفکیک (RP)، نشانگرهای iPBS1، iPBS15 و iPBS2 به ترتیب با مقادیر ۹/۶۸، ۹/۵۲ و ۸/۶۶، بالاترین توانایی را در تمایز و تشخیص



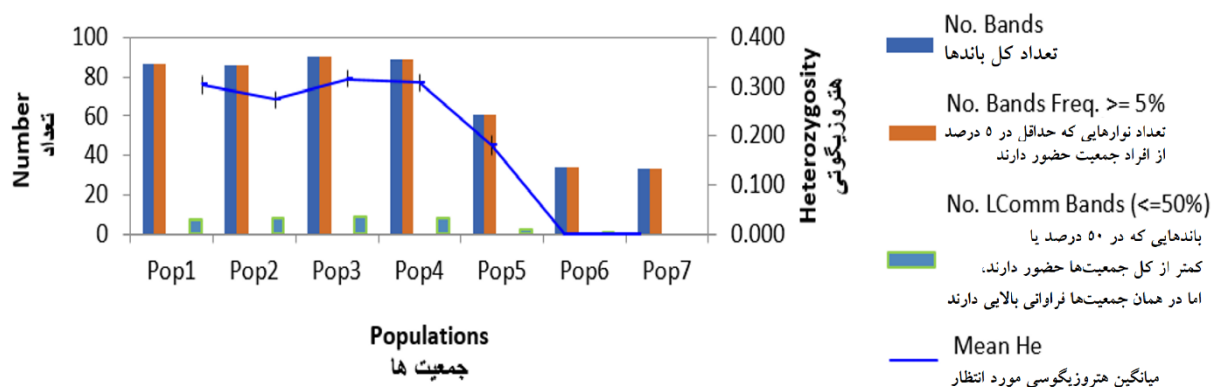
شکل ۳- ترسیم دندروگرام ۵۰ اکوتیپ مختلف جنس *Salvia* با روش Neighbor-Joining و ضریب تشابه دایس

Figure 3. Dendrogram of *Salvia* species constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method based on Dice similarity coefficient.

دندروگرام حاصل از تحلیل Neighbor-Joining بر اساس ضریب تشابه دایس، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را تفکیک نمود. با در نظر گرفتن خط برش (خط عمودی مشخص شده در شکل ۳)، ژنوتیپ‌ها در چند خوشه مجزا تقسیم شدند که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در بین ژنوتیپ‌ها است. در این دندروگرام، ژنوتیپ‌های متعلق به گونه‌ها/گروه‌های یکسان عموماً تمایل به تجمع در یک خوشه مشترک نشان دادند که این امر نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی بالاتر میان آن‌ها است. با این حال، پراکندگی برخی ژنوتیپ‌های هم نام در خوشه‌های متفاوت حاکی از وجود تنوع ژنتیکی درون گروهی قابل توجه می‌باشد. خوشه‌بندی به‌دست آمده نشان داد که ژنوتیپ‌های گونه *syriaca* عمدتاً در یک خوشه مستقل با فاصله ژنتیکی کمتر نسبت به سایر گروه‌ها قرار گرفتند، در حالی که ژنوتیپ‌های گونه‌های *spinosa* و *macrosiphon* در چند زیرخوشه مجزا توزیع شدند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالاتر در این گروه‌ها است. ژنوتیپ‌های گونه‌های *nemorosa* و *reuterana* نیز با توجه به فاصله ژنتیکی، در خوشه‌های مجزا یا نیمه‌نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند که می‌تواند بیانگر خاستگاه‌های متفاوت یا تاریخچه تکاملی و اصلاحی متمایز آن‌ها باشد.

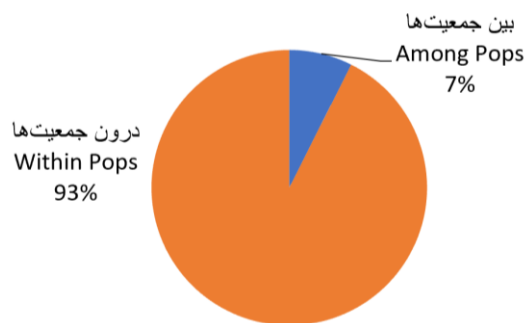
اعتبارسنجی خوشه‌بندی و تحلیل همبستگی مانتل: ماتریس فاصله کوفتیک از روی درخت استخراج گردید. برای ارزیابی میزان انطباق بین این ماتریس (که نمایانگر ساختار درختی است) و ماتریس تشابه اولیه، از آزمون مانتل استفاده شد. ضریب همبستگی مانتل ($r = 0.76$) و مقدار احتمال بسیار معنی‌دار ($p = 0.002$) حاکی از آن است که همبستگی قوی و غیرتصادفی بین دو ماتریس وجود دارد. این نتیجه بیانگر آن است که

ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها: داده‌های ژنتیکی ۵۰ نمونه از ۷ جمعیت (pop1 تا pop7) با ۹۴ جایگاه ژنی (لوکوس) با استفاده از نرم افزار GenAIX تحلیل شد. داده‌ها به‌صورت باینری (وجود یا عدم وجود باند) کدگذاری شده و مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها به‌طور قابل توجهی متفاوت است. جمعیت‌های ۱ تا ۴ سطوح نسبتاً بالایی از تنوع ژنتیکی را نشان دادند، به‌طوری‌که میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) در این جمعیت‌ها از ۰/۲۷ در جمعیت ۲ تا ۰/۳۱ در جمعیت ۳ متغیر بود. در مقابل، جمعیت‌های ۶ و ۷ فاقد هرگونه تنوع ژنتیکی بودند و مقدار H_e در هر دو جمعیت مقدار صفر برآورد شد. جمعیت ۵ با مقدار H_e برابر با ۰/۱۸ در سطح متوسطی از تنوع ژنتیکی قرار گرفت. الگوی تنوع باندهای مشاهده‌شده در جمعیت‌های مورد مطالعه در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود، جمعیت‌های ۱ تا ۴ بیشترین تعداد باند (در محدوده ۸۶ تا ۹۰ عدد) را دارا بودند. جمعیت ۵ با ۶۱ باند در سطح میانی قرار گرفت، در حالی که جمعیت‌های ۶ و ۷ به ترتیب با ۳۴ و ۳۳ باند، پایین‌ترین سطح تنوع ژنتیکی را نشان دادند. بررسی فراوانی (شکل ۴) بیانگر آن است که تمامی باندهای حاصل، دارای فراوانی بالاتر از ۵ درصد بوده و هیچ باند خصوصی شناسایی نشد که این امر می‌تواند نشان‌دهنده جریان ژنی یا وجود اجداد مشترک در میان جمعیت‌ها باشد.



شکل ۴- مقایسه تعداد باندهای تکثیر شده و شاخص‌های تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه

Figure 4. Comparison of the total number of amplified bands and genetic diversity patterns across the studied populations



شکل ۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و سهم

واریانس بین و درون جمعیت‌ها

Figure 5. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showing the percentage of genetic variance within and among populations

تنوع ژنتیکی درون جمعیتی: به منظور دستیابی به تصویری جامع از ساختار ژنتیکی، داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی در قالب استاندارد برای نرم‌افزار POPGene (نسخه ۱/۳۲) آماده‌سازی شدند. این داده‌ها شامل فراوانی آلل‌های چندین لوکوس برای ۵ جمعیت (با شناسه‌های ۱ تا ۵) بود. این نرم‌افزار به‌طور اختصاصی برای محاسبه پارامترهای پایه تنوع ژنتیکی شامل درصد لوکوس‌های چندشکل (PPL)، شاخص اطلاعاتی شانون (I) و میانگین تنوع ژنی نی (H) مورد استفاده قرار گرفت. خلاصه نتایج در جدول شماره ۴ آمده است.

تحلیل شاخص‌های تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار POPGene (نسخه ۱/۳۲) نشان داد که سطح تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه متغیر است. بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت ۳ بود که بالاترین مقادیر شاخص شانون ($I = 0.47$) و تنوع ژنی نی ($H = 0.31$) را به همراه درصد بالای لوکوس‌های چندشکل (۹۰/۴۳ درصد) نشان داد. جمعیت ۴ نیز با ۹۱/۴۹ درصد لوکوس چندشکل از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بود، اگرچه مقادیر I و H آن اندکی کمتر از جمعیت ۳ برآورد شد. جمعیت‌های ۱ و ۲ دارای تنوع ژنتیکی متوسط تا بالا بودند، در حالی که جمعیت ۵ کمترین سطح تنوع ژنتیکی را نشان داد. این نتایج بیانگر ناهمگونی در ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها بوده و نشان می‌دهد که برخی جمعیت‌ها، به‌ویژه جمعیت ۵، ممکن است تحت تأثیر رانش ژنتیکی یا محدودیت جریان ژنی قرار گرفته باشند.

تحلیل روابط ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها: بر اساس ماتریس فاصله و همانندی ژنتیکی نی (Nei's genetic distance and identity)، سلسله مراتب روابط ژنتیکی بین هفت جمعیت مورد مطالعه به وضوح قابل تشخیص است. نتایج نشان می‌دهد که چهار جمعیت ۱، ۲، ۳ و ۴ از شباهت ژنتیکی بسیار بالایی برخوردارند، به‌طوری‌که مقادیر همانندی ژنتیکی Nei بین آن‌ها در بازه ۰/۹۲ تا ۰/۹۴ قرار دارد و فاصله ژنتیکی متناظر بسیار پایین و بین ۰/۰۵ تا ۰/۰۸ است. این الگو حاکی از نزدیکی ژنتیکی قابل توجه این جمعیت‌ها بوده و می‌تواند مؤید وجود جریان ژنی مؤثر بین آن‌ها یا جدایی نسبتاً اخیر از یک نیای مشترک باشد. در مقابل، سه جمعیت ۵، ۶ و ۷ انحراف محسوسی از این خوشه اصلی نشان می‌دهند. جمعیت ۵ با فاصله ژنتیکی بالاتر نسبت به چهار جمعیت نخست (۰/۱۰ تا ۰/۱۸) و کاهش میزان همانندی ژنتیکی (۰/۸۲ تا ۰/۹۰)، به‌عنوان یک جمعیت با تمایز ژنتیکی متوسط شناسایی شد. بیشترین واگرایی ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های ۶ و ۷ است؛ به‌طوری‌که این دو جمعیت بیشترین مقادیر فاصله ژنتیکی (تا حدود ۰/۴۳) و کمترین میزان همانندی ژنتیکی (کمتر از ۰/۸۰ و حتی تا ۰/۶۴) را نه تنها در مقایسه با چهار جمعیت اصلی، بلکه نسبت به جمعیت ۵ و حتی در مقایسه با یکدیگر نشان دادند. این الگو به‌وضوح بیانگر کاهش شدید تنوع ژنتیکی، افزایش انزوا و تشدید اثر رانش ژن در جمعیت‌های ۶ و ۷ است. با توجه به هشدار مربوط به اندازه نمونه کوچک (کمتر از پنج فرد) در سه جمعیت اخیر، مقادیر عددی باید با احتیاط تفسیر شوند؛ با این حال، الگوی کلی کاهش تنوع ژنتیکی و افزایش فاصله ژنتیکی در این جمعیت‌ها کاملاً آشکار، منسجم و قابل اتکا است. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) که در شکل ۵ نمایش داده شده است، نشان می‌دهد که بخش عمده‌ای از تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها متمرکز است. برای افزایش دقت آماری تحلیل، جمعیت‌های ۶ و ۷ به دلیل تک‌ژنوتیپی بودن از این آنالیز حذف گردیدند. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، ۹۳ درصد از واریانس کل مولکولی به تنوع درون‌جمعیتی و تنها ۷ درصد از آن به تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها اختصاص دارد.

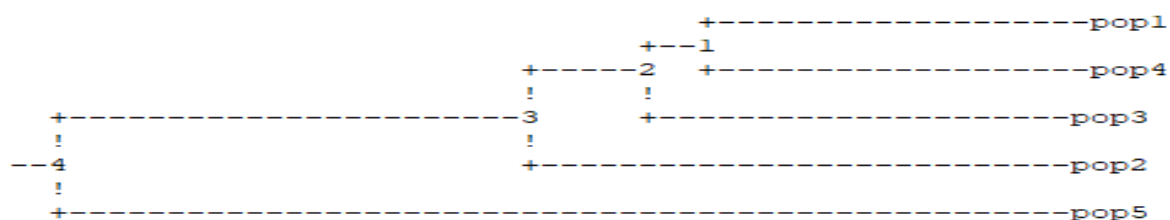
فاصله ژنتیکی و ساختار خوشه‌ای جمعیت‌ها: ماتریس فاصله ژنتیکی نی برای کلیه جفت جمعیت‌ها محاسبه شد. نتایج نشان داد که کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های ۱ و ۴ با مقدار ۰/۰۵ بوده که نشان‌دهنده نزدیکی ژنتیکی بسیار بالا و احتمال وجود جریان ژنی مؤثر یا جدایی اخیر میان این دو جمعیت است. در مقابل، بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های ۲ و ۵ با مقدار ۰/۱۸ مشاهده شد که بیانگر بالاترین سطح واگرایی ژنتیکی بین جفت جمعیت‌های مورد بررسی می‌باشد. دندروگرام

بر اساس فاصله ژنتیکی نی با روش UPGMA رسم شد،
بر این اساس جمعیت‌های ۱ و ۴ نزدیکترین رابطه را
نشان می‌دهند. جمعیت ۳ نیز به این گروه نزدیک است.
جمعیت ۲ در موقعیت حد واسط قرار دارد. جمعیت ۵
دورترین فاصله ژنتیکی را از سایرین دارد. تنوع ژنتیکی
درون جمعیت‌ها در سطح مطلوبی قرار دارد، اما تمایز
ژنتیکی بین جمعیت‌ها به‌ویژه جمعیت ۵ قابل‌توجه است.
دندروگرام روابط فیلوژنتیکی در شکل ۶، الگوی روشنی از
گروه‌بندی جمعیت‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی بر اساس نرم افزار POPGENE

Table 4. Genetic diversity estimates for the studied populations based on POPGENE analysis

شماره جمعیت Population ID	میانگین تنوع ژنی نی Nei's Gene Diversity (H)	شاخص شانون Shannon's information index (I)	درصد لوکوس‌های چندشکل Percentage of Polymorphic Loci (PPL)
1	0.30	0.45	87.23
2	0.27	0.41	81.91
3	0.31	0.47	90.43
4	0.30	0.46	91.49
5	0.17	0.26	47.87



* File Name: dgram1.plt

Between	And	Length
-----	---	-----
4	3	3.13606
3	2	0.79065
2	1	0.29291
1	pop1	2.64892
1	pop4	2.64892
2	pop3	2.94183
3	pop2	3.73248
4	pop5	6.86854

شکل ۶ - دندروگرام بر اساس فاصله ژنتیکی نی با روش UPGMA

Figure 6. Dendrogram of *Salvia* species based on Nei's genetic distance using the UPGMA clustering method.

Salvia با استفاده از نشانگرهای AFLP، ISSR و SSR، میزان چندشکلی گزارش شده معمولاً در محدوده متوسط تا بالا بوده است (Erbano et al., 2015; Taha et al., 2024). با این حال، مقادیر بالای درصد نوارهای چندشکل در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که iPBS، به‌ویژه در گونه‌هایی با ژنوم غنی از توالی‌های تکراری، می‌تواند قدرت تفکیک بالاتری نسبت به برخی نشانگرهای غالب متداول داشته باشد. این موضوع احتمالاً به ماهیت تکثیری و پویایی بالای رتروترانسپوزون‌ها بازمی‌گردد که در پاسخ به فشارهای محیطی و تکاملی، موجب افزایش تنوع ژنتیکی می‌شوند (Mita et al., 2016). مقادیر شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌دست آمده در این پژوهش در محدوده قابل قبول برای نشانگرهای غالب قرار داشت و با مقادیر گزارش شده برای iPBS در گونه‌هایی نظیر *Hordeum*، *Triticum* و گیاهان دارویی دیگر همخوانی دارد (Lemos et al., 2019; Kalendar et al., 2021). تفاوت مشاهده شده در مقادیر PIC و MI بین آغازگرها نیز نشان‌دهنده این واقعیت است که تمامی جایگاه‌های PBS از نظر سطح حفاظت‌شدگی و تعداد نسخه‌ها در ژنوم یکسان نیستند. بر این اساس، کارایی بالاتر نشانگرهای iPBS8، iPBS10 و iPBS17 در این پژوهش می‌تواند ناشی از هدف‌گیری نواحی فعال‌تر ژنوم و یا توالی‌های رتروترانسپوزونی با پراکنش وسیع‌تر باشد. الگوهای به‌دست آمده از تحلیل‌های مختلف در این تحقیق نشان داده‌اند که بخش عمده تنوع ژنتیکی معمولاً در سطح درون‌جمعیتی متمرکز است، در حالی که تمایز بین جمعیت‌ها در حد کم تا متوسط باقی می‌ماند (Schulman et al., 2012).

نتایج AMOVA در این پژوهش که بیانگر غالب بودن واریانس درون‌جمعیتی و تمایز متوسط بین جمعیت‌هاست، با یافته‌های گزارش شده برای سایر گیاهان دارویی تیره نعنائیان از جمله *Thymus* مطابقت دارد (Yuan et al., 2010). جریان ژنی نسبتاً متوسط مشاهده شده نیز می‌تواند نقش مهمی در جلوگیری از واگرایی شدید ژنتیکی ایفا کرده باشد. واگرایی قابل‌توجه برخی جمعیت‌ها، به‌ویژه

دندروگرام مبتنی بر فاصله ژنتیکی نی با روش UPGMA نشان می‌دهد که ساختار جمعیتی به‌صورت یک خوشه اصلی و یک جمعیت واگرا سازمان یافته است. جمعیت‌های ۱ و ۴ در نزدیک‌ترین فاصله ژنتیکی نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند و اولین زیرخوشه را تشکیل می‌دهند، که نشان‌دهنده بیشترین شباهت ژنتیکی بین این دو جمعیت است. جمعیت ۳ در مرحله بعدی به این زیرخوشه متصل می‌شود و یک خوشه نسبتاً همگن شامل جمعیت‌های ۱، ۳ و ۴ را شکل می‌دهد. جمعیت ۲ با فاصله ژنتیکی بیشتر نسبت به این خوشه، در موقعیتی بینابینی قرار گرفته و پل ارتباطی بین خوشه اصلی و جمعیت دورافتاده‌تر محسوب می‌شود. جمعیت ۵ با بیشترین طول شاخه به‌طور مشخص از سایر جمعیت‌ها جدا شده و واگراترین جمعیت از نظر ژنتیکی است؛ این موضوع حاکی از تمایز ژنتیکی قابل‌توجه و احتمال تأثیر رانش ژنی یا محدودیت جریان ژنی در این جمعیت می‌باشد. الگوی کلی دندروگرام بیانگر آن است که شباهت ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌های ۱، ۳ و ۴ وجود دارد، در حالی که جمعیت ۵ مسیر تکاملی یا تاریخچه ژنتیکی متفاوت‌تری را تجربه کرده است.

جمع‌بندی و تفسیر نتایج: نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای رتروترانسپوزونی iPBS از توان بالایی در آشکارسازی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه برخوردارند. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها به دلیل پراکنش گسترده و فعالیت بالای این عناصر در ژنوم گیاهان عالی، معمولاً چندشکلی بیشتری نسبت به نشانگرهای تصادفی مانند RAPD و ISSR ایجاد می‌کنند (Haliloğlu et al., 2022). نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون مانند IRAP و REMAP در مطالعات تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنگ‌دانه (*Hyoscyamus spp.*) کارایی بالایی از خود نشان داده‌اند (Asghari Mirak et al., 2022). و نشانگرهای iPBS نیز علاوه بر ارزیابی تنوع، در مکان‌یابی QTL صفات مهم زراعی در جو به کار گرفته شده‌اند (Kaviani Charati et al., 2025). در پژوهش‌های انجام شده بر روی جنس

جمعیت های کم تنوع، احتمالاً ناشی از ترکیبی از عوامل شامل انزوای جغرافیایی، کاهش اندازه مؤثر جمعیت، رانش ژنتیکی و فشارهای اکولوژیکی خاص منطقه است؛ عواملی که در مطالعات مشابه بر روی گیاهان دارویی وحشی نیز به عنوان مهم ترین محرک های کاهش تنوع ژنتیکی معرفی شده اند.

این مطالعه نخستین گزارش کاربرد نشانگر iPBS در بررسی تنوع ژنتیکی گونه های مختلف جنس *Salvia* در ایران است. نتایج حاصل از نشانگرهای iPBS نشان داد که این نشانگرها توانایی مناسبی در آشکارسازی چندشکلی و تفکیک ژنتیکی اکوتیپ های مورد مطالعه دارند. مقادیر بالای درصد لوکوس های چندشکل و شاخص های تنوع ژنتیکی نشان دهنده وجود تنوع قابل توجه در ژرمپلاسم مورد بررسی بود.

بر اساس شاخص های تنوع ژنتیکی، جمعیت های POP3 (*Salvia macrosiphon*) و POP4 (*Salvia spinosa*)

بیشترین سطح تنوع ژنتیکی را نشان دادند و می توانند به عنوان منابع ژنتیکی مناسب برای برنامه های اصلاحی، انتخاب والدین متنوع و مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرند. در مقابل، جمعیت POP5 (*Salvia reuterena*) به دلیل کاهش سطح تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی بیشتر نسبت به سایر جمعیت ها، به عنوان یک گروه ژنتیکی متمایز اهمیت ویژه ای در مدیریت و حفاظت ذخایر ژرمپلاسم دارد. علاوه بر این، دندروگرام حاصل از تحلیل خوشه ای نشان داد که نمونه های مربوط به POP6 (*Salvia multicaulis*) و POP7 (*Salvia limbata*) به دلیل قرارگیری در شاخه های ژنتیکی مجزا و فاصله ژنتیکی بیشتر نسبت به سایر گروه ها، تمایز ژنتیکی قابل توجهی نشان می دهند. با توجه به محدود بودن تعداد اکوتیپ های بررسی شده از این گونه ها، این جدایی ژنتیکی می تواند نشان دهنده اهمیت بالقوه آن ها در حفظ تنوع ژنتیکی جنس *Salvia* باشد.

References

- Asghari Mirak, A., Alavikia, S.S. and Mohammadi, S.A. (2022). Investigating genetic diversity and relationships in some henbane (*Hyoscyamus* spp.) populations based on polymorphisms resulting from retrotransposon insertion. *Plant Genetic Researches*, 9(1): 117-134 (In Persian).
<https://doi.org/10.52547/pgr.9.1.9>
- Biswas, M.K., Baig, M., Cheng, Y.J. and Deng, X.X. (2010). A Retro-transposon based genetic similarity within the genus *Citrus* and its relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57:963-972.
<https://doi.org/10.1007/s10722-010-9533-0>
- Borna, F., Luo, S., Ahmad, N.M., Nazeri, V., Shokrpour, M. and Trethowan, R. (2017). Genetic diversity in populations of the medicinal plant *Leonurus cardiaca* L. revealed by inter-primer binding site (iPBS) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64: 479-492.
<https://doi.org/10.1007/s10722-016-0373-4>
- Erbano, M., Schühli, G.S. and Santos, É.P. (2015). Genetic variability and population structure of *Salvia lachnostachys*: implications for breeding and conservation programs. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 7839-7850.
<https://doi.org/10.3390/ijms16047839>
- Haliloğlu, K., Türkoğlu, A., Öztürk, H.I., Özkan, G., Elkoca, E. and Pocza, P. (2022). iPBS-retrotransposon markers in the analysis of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Türkiye. *Genes*, 13: 1147- 1150.
<https://doi.org/10.3390/genes13071147>
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P. and Schulman, A.H. (2010). iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 121: 1419–1430.
<https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>

- Kalendar, R. and Schulman, A.H. (2014). Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. *Methods in Molecular Biology*, 8: 233-255.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_12
- Kalendar, R., Sabot, F., Rodriguez, F., Karlov, G.I., Natali, L. and Alix, K. (2021). Editorial: mobile elements and plant genome evolution, comparative analyses and computational tools. *Frontiers in Plant Science*, 12: 735134.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.735134>
- Kaviani Charati, A., Sabouri, H., Fallahi, H.A. and Jorjani, E. (2016). QTL mapping of spike characteristics in barley using F₃ and F₄ families derived from Badia × Komino cross. *Plant Genetic Research*, 3(1): 13–28 (In Persian).
<https://doi.org/10.29252/pgr.3.1.13>
- Lemos, S.C.M., Silveira, R.L.R., Buuron, S.K., Santos, R.S.M.D. and Moro, S.C. (2019). Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*, 686: 144175.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>
- Meyer, A., Garcia, A., Souza, A.P. and Souza, C.L. (2004). Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 27: 83–91.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000100014>
- Mita, P. and Boeke, J.D. (2016). How retrotransposons shape genome regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 37: 90-100.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.01.001>
- Mulabagal, V., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S., Lin, C. and Tsay, H.S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 1-22.
- Nadeem, M., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Cömertpay, G., Yildiz, M., Hatipoglu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Ozkan, H., Chung, G. and Baloch, F. (2017). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32: 261-285.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nei, M. and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269-5273.
<https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Phong, N.H., Pongnak, W., Soyong, K., Poeaim, S. and Poeaim, A. (2016). Diversity of tea (*Camellia sinensis*) grown in Vietnam based on morphological characteristics and inter-primer binding sites (iPBS) marker. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18: 385-392.
<https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0100>
- Sarwat, M., Nabi, G., Das, S. and Srivastava, P.S. (2012). Molecular markers in medicinal plant biotechnology: past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(1): 74-92.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2011.551872>
- Schulman, A.H., Flavell, A.J., Paux, E. and Ellis, T.H. (2012). The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods in Molecular Biology*, 859: 115-153.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-603-6_7

Taha, M., Tawfik, A., Mahmoud, A. and Mohamed, M. (2024). Assessment of somaclonal variants of *Salvia splendens* at different subcultures using molecular markers. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 55: 78-96.

<https://doi.org/10.21608/ajas.2024.279071.1349>

Vanijajiva, O. and Pornpongrungrueng, P. (2020). Inter-primer binding site (iPBS) markers reveal the population genetic diversity and structure of tropical climbing cissampelopsis (Asteraceae) in thailand. in *biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21: 1-9.

<https://doi.org/10.13057/biodiv/d210901>

Yuan, Q.J., Zhang, Z.Y., Hu, J., Guo, L.P., Shao, A.J. and Huang, L.Q. (2010). Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae). *BMC Genetics*, 11: 29.

<https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-29>

Zaman, W., Ayaz, A. and Park, S. (2025). Climate change and medicinal plant biodiversity: conservation strategies for sustainable use and genetic resource preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 72: 6275-6308.

<https://doi.org/10.1007/s10722-025-02410-2>