



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 14, Issue, No. 4, Winter 2022
Document Type: Research Paper
Received: 23/10/2023 Accepted: 18/12/2023

Investigating Specific Diversity of Aquatic Plant *Ceratophyllum* L. in Iran Using Morphological Characters and ISSR and SRAP Molecular Markers

Hanieh Bahadori¹, Saeed Afsharzadeh^{1*} , Shabnam Abbasi²

¹ Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² Department of Biology Education, Farhangian University, P.O. Box 14665-889, Tehran, Iran

Abstract

The genus *Ceratophyllum* L. is a submerged aquatic plant of the Ceratophyllaceae family, with six species recognized worldwide. So far, two species, *C. demersum* and *C. submersum*, have been reported for the flora of Iran. Considering the importance of this plant from an environmental and ecological point of view, its taxonomic and molecular studies have been carried out in this study to investigate the species diversity of this genus. Following the identification of species by assessing morphological features in individuals from different populations, 7 ISSR primers and 3 pairs of SRAP primers were used to confirm the identifications and study the genetic diversity of distinct populations. Molecular investigations showed the number of 5 genetic groups, whose intra-population diversity (52%) was higher than inter-population diversity (48%) with $P < 0.05$. Furthermore, the data revealed that the populations of this plant in Iran have relatively the same genetic pool. Based on this, it can be concluded that several elements, including the connectedness of aquatic ecosystems, particularly in the north of the country, as well as the high adaptability of this submerged plant with aquatic habitats, can be effective in producing such conditions. Recent droughts have increased the sexual reproduction of this plant, and as a result, the species diversity within the populations has increased.

Introduction

Aquatic plants (macrophytes) are important components of freshwater ecosystems that affect the functioning and diverse services of the ecosystem. Aquatic plants grow along the edge of the lake and are both a protective and nourishing component of the

* Corresponding Author: s.afshar@sci.ui.ac.ir



ecosystem for healthy lakes. *Ceratophyllum* has about 2 to 30 species that have global distribution. The determination of genetic relationships of plant materials is important in terms of choosing the right parental combination for producing suitable populations, designing effective breeding programs, responding to long-term selection and reducing genetic vulnerability. The study of genetic relationships is a prerequisite for the improvement of agricultural plants and also a prerequisite for the preservation of genetic resources. Considering that in the *Ceratophyllum*, the separation of species is done by intermediate morphological characteristics, the study of the genetic diversity of different populations of this species in Iran using molecular markers seems necessary. In addition, considering the recent droughts in the country and the destruction of many aquatic habitats, the study of this aquatic plant can provide useful knowledge for the protection of the country's environment. Therefore, in this study, some of the important morphological traits of the samples, the relationships of the species of this genus, as well as their genetic diversity were investigated using molecular markers.

Materials and Methods

In this study, 50 individuals and 29 populations of two species, *C. submersum* and *C. demersum*, were examined. The modified CTAB method was used to extract DNA from 50 individuals from 29 studied aquatic plant populations. Seven ISSR primers and three SRAP primer pairs were selected. For data analysis and statistical analysis of populations, individuals were scored based on the presence of band (1) and the absence of band (0). Using NTSYSpc software and the Jaccard and Nei similarity coefficient, cluster analysis was performed and two dendrograms were obtained. GenAlex software was used for principal component analysis and STRUCTURE software was used to examine the genetic structure of populations.

Results and Discussion

The morphological studies of this plant showed an herbaceous perennial state. The stem of this plant has multiple nodes and internodes, and the stem mostly branches in the upper 1/3. In the *C. demersum* species, they have 1 or 2 divisions and in the *C. submersum* species, they have 3 or 4 dichotomy divisions. The shape of the leaves is thin, long, pointed, and fork-like, which are stringy or linear. In both dendrograms, the samples from the north of the country and the central region of the country (Isfahan) are almost separated, but a kind of genetic connection can be seen between the samples from the north of the country and the center of the country. Through humans and also through water birds, they show a kind of genetic connection. Regarding the *C. demersum* and *C. submersum* species that exist in Iran, it seems that the *C. demersum* species has a wider genetic treasure in the aquatic habitats of the country and the species *C. submersum* has been found only in a region in the north of the country (Izbaran, Amirkalaye, and Bandar Anzali) in our sampling. Therefore, it seems that *C. demersum* is ecologically more compatible with various environmental factors and the *C. submersum* species exists only in limited ecological water niches in the country due to the lack of suitable living conditions. The results of the principal component analysis were in agreement with the cluster analysis and showed some kind of connection and continuity between populations. The results of AMOVA showed 52% genetic diversity within populations and 48% genetic diversity between populations. The results of the Mantel test indicated that there is no relationship between the genetic distance and the geographical distance ($R = 0.019$ and $P = 0.320$), which is due to the fact that in the principal component analysis, we saw the lack of separation of the populations. The molecular analysis of *Ceratophyllum* intraspecies relationships through STRUCTURE analysis showed 5 genetic groups and demonstrated the relationship between


individuals of different populations, whose gene pool was relatively similar.

Conclusion

According to analyses done, it can be said that the gene pool of *Ceratophyllum* population in Iran is somewhat distorted and there is a relationship and genetic similarity between different populations and only some populations in the north of the country are more uniform. As was stated, various factors can be effective in creating such conditions. A high intra-population genetic diversity has been shown in the populations of this study.

Keywords: *Ceratophyllum* L., Specific Diversity, Morphology, Molecular Markers

بررسی تنوع گونه ای گیاه آبی *Ceratophyllum L.* در ایران با صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی ISSR و SRAP

حانیه بهادری^۱، سعید افشارزاده^{۱*} , شبنم عباسی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ گروه آموزش زیست‌شناسی، دانشگاه فرهنگیان، صندوق پستی ۸۸۹-۱۴۶۶۵، تهران، ایران

چکیده

جنس *Ceratophyllum L.* یک گیاه آبی غوطه‌ور از خانواده Ceratophyllaceae است که شش گونه آن در سراسر جهان شناخته شده است. تاکنون دو گونه *C. demersum* و *C. submersum* برای فلور ایران گزارش شده‌اند. با توجه به اهمیت این گیاه از نظر زیست‌محیطی و اکولوژیکی، پژوهش‌های تاکسونومی و مولکولی آن برای آشنایی با تنوع گونه ای این جنس انجام شد. پس از شناسایی گونه‌ها با ارزیابی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در افرادی از جمعیت‌های مختلف، از ۷ آغازگر ISSR و ۳ جفت آغازگر SRAP برای تأیید هویت‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های متمایز استفاده شد. بررسی‌های مولکولی تعداد ۵ گروه ژنتیکی را نشان داد که تنوع درون جمعیتی آنها (۵۲٪) از تنوع بین جمعیتی (۴۸٪) با $P < 0.05$ زیادتر بود. علاوه بر این، داده‌ها نشان داده‌اند که جمعیت‌های این گیاه در ایران دارای خزانه ژنتیکی نسبتاً مشابهی است. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که عوامل متعددی از جمله پیوستگی اکوسیستم‌های آبی به‌ویژه در شمال کشور و همچنین سازگاری بالای این گیاه غوطه‌ور با زیستگاه‌های آبی می‌تواند در ایجاد چنین شرایطی مؤثر باشد. خشکسالی‌های اخیر در کشور سبب افزایش تولید مثل جنسی این گیاه شده و در نتیجه تنوع گونه ای درون جمعیت‌ها افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: *Ceratophyllum L.*، تنوع گونه‌ای، ریخت‌شناسی، نشانگرهای مولکولی



مقدمه

تاکسونومی گیاهی به عنوان علم شناسایی، نام‌گذاری و طبقه‌بندی گیاهان شناخته شده است. از آنجایی که شناسایی و نام‌گذاری شرط مهم در طبقه‌بندی است، تاکسونومی به عنوان علم طبقه‌بندی شامل پایه‌ها، اصول، قوانین و روش کار است (Wilkins, 2009). گیاهان آبی (ماکروفیت‌ها) اجزای مهم اکوسیستم‌های آب شیرین هستند که بر عملکرد و خدمات متنوع اکوسیستم اثر می‌گذارند. گیاهان آبی در امتداد لبه دریاچه رشد می‌کنند و به عنوان یک جزء محافظ و هم به عنوان جزء تغذیه کننده اکوسیستم برای دریاچه‌های سالم هستند. جامعه گیاهان آبی یک زیستگاه و مهد حیاتی برای ماهی‌ها، منبع اکسیژن برای همه موجودات، پناهگاهی برای طعمه‌ها و همچنین منطقه‌ای برای جستجوی شکارچیان، حائلی در برابر فرسایش و تعلیق رسوب از امواج و ورودی‌های ساحلی است و می‌تواند به طور قابل توجهی به بهره‌وری اولیه دریاچه کمک کند (Carr et al., 1997). خانواده Ceratophyllaceae که به نام شاخ علفی یا چنگال آبی معروف است دارای یک جنس به نام *Ceratophyllum* است (APGIV, 2016). این جنس دارای ۲ تا ۳۰ گونه است که پراکنش جهانی دارند. از این گیاه در ایران گونه‌های *Ceratophyllum demersum* L. و *Ceratophyllum submersum* L. در مرداب انزلی و برخی دیگر از آبگیرهای شمالی و جنوبی کشور به وفور یافت می‌شود (Ghasemi et al., 2016). گیاه آبی چند ساله که به طور گسترده در زیستگاه‌های آب شیرین سراسر جهان توزیع

شده‌اند. در پائیز این گیاهان در آب غوطه‌ور می‌شوند تا از خود در برابر دمای پائین محافظت کنند، حدود ۳ متر و دارای ساقه تانن‌دار، دارای یک رشته آوندی منفرد با مجرای هوایی مرکزی که توسط سلول‌های کشیده حاوی نشاسته احاطه شده است؛ برگ‌ها چرخه‌ای، ساده، غالباً دوشاخه و منقسم و رشته‌ای، کامل تا دندان‌اره‌ای فاقد روزنه و گوشواره هستند. گل آذین متشکل از گل‌های منفرد جانبی، گل‌ها تک جنس، شعاعی، با یک چرخه ۷ تا تعداد زیادی برگه (احتمالاً تپال‌ها). پرچم‌ها ۱۰ عدد تا تعداد زیاد، جدا، میله‌ها به طور آشکار از بساک متمایز نیستند. دانه‌گرده فاقد شیاری، با اگزین تحلیل رفته و لوله‌گرده منشعب و برچه ۱ عدد و تخمدان فوقانی است، کلالة دراز و به یک سمت خامه‌پهن شده است. میوه فندقه و در بعضی گونه‌ها دارای خار است. گل‌های نر سفید رنگ و گل‌های ماده به رنگ سبز است (Dinarvand et al., 2022). بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته در ایران روی جنس *Ceratophyllum* به نظر می‌رسد خصوصیات ریخت‌شناسی به ویژه در ساقه با توجه به حالات حد واسطی که مشاهده شده، تحت تأثیر محیط می‌باشد و برای تفکیک دو گونه باید متکی به بررسی و مشاهده خصوصیات صفات مولکولی بود. تاکنون پژوهش‌های پراکنده‌ای بر روی این جنس انجام شده است. (Ghasemi et al., 2016) با استفاده از نشانگر مولکولی SRAP نشان دادند تنوع بین جمعیت‌ها به دلیل جریان ژنی (بر اثر مهاجرت پرندگان یا تکثیر به روش غیر جنسی) کم است و تنوع درون جمعیتی بیشتر از بین جمعیتی است و این نشانگر توانسته گونه‌های این جنس را از هم

وجود تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی مواد گیاهی از نظر انتخاب ترکیب والدینی مناسب برای تولید جمعیت های مناسب، طراحی برنامه های اصلاحی موثر، پاسخ به گزینش طولانی مدت و کاهش آسیب پذیری ژنتیکی حائز اهمیت می باشد (Troyer et al., 1998). بررسی روابط ژنتیکی، پیش نیازی برای اصلاح گیاهان زراعی و همچنین پیش نیازی برای حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی است. تفاوت بین افراد ناشی از تفاوت در توالی DNA کروموزوم های آنها است. از این تفاوت ها می توان به عنوان یک نشانه یا نشانگر ژنتیکی استفاده کرد (Moshtaghi et al., 2013).

در میان تکنیک های انگشت نگاری DNA، نشانگر (Inter Simple Sequence Repeat) ISSR به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز در حضور یک آغازگر مکمل با توالی موتیف ریز ماهواره ها در ژنوم تکثیر می شود. این نشانگر قابلیت تکثیر بین جایگاه های ریز ماهواره را داشته و به اطلاعات قبلی از ژنوم مورد نظر نیاز ندارد. این یک روش سریع، کم هزینه و مطمئن برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و نشان دادن روابط خویشاوندی می باشد (Wang et al., 2008).

نشانگر SRAP قابلیت تشخیص میزان بالایی از پلی مورفیسم را بین گونه ها دارد (Robarts & Wolfe, 2014). در تکنیک استفاده از این نشانگر توالی کددهنده ژنوم توسط دو آغازگر توسعه دهنده با توالی دلخواه که طول آنها ۱۷ تا ۲۱ نوکلئوتید باشد، مورد هدف قرار می گیرند که به خصوص برای تقویت و توسعه ORF ها (Open Reading Frame) به کار می رود. در مولکول های

تفکیک کند. در پژوهش دیگری مشخص شد *Ceratophyllum demersum* توانایی زیادی برای جذب و تخریب زیستی در حذف رنگ دارد (Eftekhari et al., 2020). همچنین نتایج به دست آمده از پژوهش دیگری بیانگر قابلیت بالای سراتوفیلوم اصلاح شده با ترکیبات دیگر، به عنوان یک جاذب زیستی مطلوب برای حذف کادمیوم از محیط آبی است (Szalontai et al., 2018). در بررسی دیگری که با عنوان بیوستتر نانو ذرات نقره زیست فعال از گیاه آبی انجام شده (Aghajani, 2016)، یک روش تولید نانو ذرات، استفاده از روش های بیولوژیک است که به تازگی استفاده از عصاره گیاهان برای تهیه ذرات فلزی مطرح شده است. نتایج حاصل از تشکیل نانو ذرات نقره بیوستتری از عصاره آبی گیاه *C. demersum* حکایت دارد، با وجود این با تغییر رنگ واضح و انجام طیف گیری های متعدد نتایج بر سنتز نانو ذرات نقره تأکید داشتند. تست سمیت سلولی نشان داد که با افزایش زمان مجاورت نانو ذرات بیوستتری و نیز افزایش غلظت نانو ذرات شاهد افزایش میزان اثرگذاری بر سلول های مختلف بودند. در بررسی دیگری که بر روی قابلیت تصفیه *Ceratophyllum demersum* جمع آوری شده از رودخانه سیاه درویشان در سیستم مدار بسته با فیلتر مصنوعی انجام شد (Asadi & Imanpour, 2014)، شاخص های رشد و بقا برای موجودات آن محیط، هنگام استفاده از فیلتر زیستی به همراه گیاه سراتوفیلوم عملکرد خوبی را نسبت به سایر تیمارها نشان داد و از این ترکیب می توان به عنوان تصفیه کننده زیستی استفاده کرد.

با توجه به اینکه در گیاه *Ceratophyllum*، تفکیک گونه‌ها و تشخیص آنها توسط ویژگی‌های ظاهری حد واسط و نزدیک به هم صورت می‌گیرد، مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف این گونه در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ضروری به نظر می‌رسد. همچنین با توجه به خشکسالی‌های اخیر در کشور و تخریب بسیاری از زیستگاه‌های آبی، مطالعه این گیاه آبرزی می‌تواند در این زمینه دانش مفیدی را برای حفاظت محیط زیست کشور ارائه نماید. بنابراین در این مطالعه بعضی از صفات مهم ریخت‌شناسی نمونه‌ها، روابط گونه‌های این جنس و همچنین تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، تعداد ۵۰ پایه و ۲۹ جمعیت از دو گونه *C. demersum* و *C. submersum* از نمونه‌های موجود در هرباریوم دانشگاه اصفهان (HUI) و نمونه‌های گیاهی که از تالاب‌ها و رودخانه‌های مختلف جمع‌آوری شد (جدول ۱)، مورد بررسی قرار گرفت. صفات ظاهری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه استریومیکروسکوپ و کاغذ میلی‌متری مورد بررسی قرار گرفت. سپس استخراج DNA ژنومی از ۵۰ پایه از ۲۹ جمعیت گیاه آبرزی مورد مطالعه، از روش تغییر یافته CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) استفاده شد (Abbasi & Afsharzadeh, 2016).

ژنتیکی، ORF ها بخشی از قالب خوانش هستند که قابلیت ترجمه شدن را دارند. برای ۵ چرخه اول PCR دمای اتصال ۳۵ درجه و برای ۳۵ چرخه بعدی دما روی ۵۰ درجه تنظیم می‌شود (Agarwal et al., 2008).

در ایران پژوهش‌های مختلفی در ارتباط با بررسی تنوع گونه‌ای گیاهان با نشانگرهای ریخت‌شناسی و نشانگر مولکولی انجام شده است. et. (2022) Mofid Bojnoordi در بررسی تنوعات ریخت‌شناسی و مولکولی *Lactuca undulata* Ledeb. با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و نشانگر مولکولی ISSR، تنوع ریخت‌شناسی بالایی را گزارش نمودند و در مطالعه آنها تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بیشتر از تنوع ژنتیکی بین جمعیتی بود. (2022) Atapour et al. در بررسی تنوع ژنتیکی *Prunus avium* L. بر اساس صفات ریخت‌شناسی جمعیت‌های این گونه را به دو گروه تقسیم کردند، ولی با استفاده از آنالیزهای حاصل از نشانگر مولکولی SCoT، جمعیت‌های این گونه را به ۸ گروه تفکیک کردند. (2017) Khodadoost et al. در بررسی تنوع ژنتیکی *Malus Orientalis* Uglitz. درون جمعیتی قابل ملاحظه‌ای را گزارش نمودند. (2017) Zare Rashnoodi et al. خویشاوندی ژنتیکی زیادی را در بین ژنوتیپ‌های گردو در غرب ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، گزارش کردند. (2018) Latifi et al. در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Cordia myxa* L. تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالاتری را نشان دادند.

جدول ۱- مشخصات نمونه های مورد مطالعه

Table 1- Characteristics of the studied samples

کد رهباریومی	نوع اکوسیستم آبی	طول و عرض جغرافیایی	ارتفاع (m)	محل	نام مخفف	نام گونه
25645	رودخانه	N: 32°43'95.23" E: 52°37'99.86"	1480	اصفهان، اژیبه	cer38, cer39	<i>C. demersum</i>
25649	رودخانه	N: 32°52'66.40" E: 52°03'77.58"	1519	اصفهان، برسیان	cer35, cer44	<i>C. demersum</i>
25655	رودخانه	N: 37°22'59.2" E: 50°59'36.7"	1780	اصفهان، چم حیدر	cer50	<i>C. demersum</i>
25656	رودخانه	N: 32°30'39.5" E: 50°50'34.7"	1902	اصفهان، حجت آباد	cer6	<i>C. demersum</i>
25667	رودخانه	N: 32°66'33" E: 51°69'00"	1610	اصفهان، یزدآباد	cer42	<i>C. demersum</i>
25668	رودخانه	N: 32°50'85.23" E: 51°93'85.17"	1529	اصفهان، زیار	cer37	<i>C. demersum</i>
25647	رودخانه	N: 32°22'54.8" E: 51°11'31.2"	1681	اصفهان، باغ بهادران	cer32	<i>C. demersum</i>
25643	سد	N: 32°22'21.91" E: 51°13'25.89"	1750	اصفهان، چم آسمان	cer36, cer40	<i>C. demersum</i>
25657	تالاب	N: 36°58'51.25" E: 45°47'43.08"	1000	آذربایجان غربی، کانی برازان	cer12, cer13	<i>C. demersum</i>
25664	رودخانه	N: 38°81'33" E: 47°06'09"	1300	تبریز، جاده اهر	cer41	<i>C. demersum</i>
25662	رودخانه	N: 31°11'66.49" E: 52°72'03.36"	1958	جاده اصفهان شیراز	cer4, cer25	<i>C. demersum</i>
25650	رودخانه	N: 31°57'35.8" E: 51°19'37.7"	2128	چهارمحال بختیاری، بروجن	cer5	<i>C. demersum</i>
25648	رودخانه	N: 31°34'38.4" E: 51°12'31.9"	1635	چهارمحال بختیاری، چشمه برم	cer2, cer4 3	<i>C. demersum</i>
25651	تالاب	N: 31°55'24.7" E: 50°55'58.2"	2320	چهارمحال بختیاری، چغاخور	cer47, cer48, cer49	<i>C. demersum</i>
25653	تالاب	N: 32°22'36.3" E: 51°31'38.5"	2254	چهارمحال بختیاری، گندمان	cer1	<i>C. demersum</i>
25640	رودخانه	N: 31°15'35.73" E: 48°35'11.65"	500	خوزستان، آبادان به اهواز	cer3	<i>C. demersum</i>
25652	رودخانه	N: 30°06'54.5" E: 52°55'23.6"	1674	دلیجان	cer14	<i>C. demersum</i>
25654	رودخانه	N: 29°39'23.1" E: 53°20'12.4"	1621	فارس، حسن آباد	cer33, cer34	<i>C. demersum</i>
25658	رودخانه	N: 29°52'42.1" E: 57°44'12.5"	1727	کرمان، گلیاف	cer16	<i>C. demersum</i>
25641	رودخانه	N: 37°16'38.8" E: 50°13'19.9"	76	گیلان، امیرکلاهی	cer23	<i>C. submersum</i>
25642	رودخانه	N: 37°28' E: 49°28'	-26	گیلان، بندر انزلی	cer17, cer18, cer20	<i>C. submersum</i>
25661	رودخانه	N: 37°22'59.2" E: 50°10'54.4"	-2	گیلان، سفیدرود	cer7, cer8, cer15, cer24	<i>C. demersum</i>

25644	تالاب	N: 36° 39' 03.5" E: 52° 28' 37.1"	100	مازندران، ازاباران	cer10,cer21	<i>C. submersum</i>
25646	رودخانه	N: 36°34'10" E: 52°44'20"	-2	مازندران، بابل	cer26,cer27	<i>C. demersum</i>
25663	رودخانه	N: 36° 18' 12.4" E: 52° 53' 09.4"	62	مازندران، سیاه رود	cer19,cer22	<i>C. demersum</i>
25660	تالاب	N: 36°54'62.0 " E: 52°72'6."	-2	مازندران، تالاب نیلوفر آبی بابل	cer29,cer31	<i>C. demersum</i>
25665	رودخانه	N: 36° 33' 52.9" E: 53° 05' 12.2" N: 36° 47' 0.137"	1000	مازندران، تجن	cer28, cer30,cer45,cer46	<i>C. demersum</i>
25666	رودخانه	E: 50° 54' 0.878"	-20	مازندران، تنکابن	cer9	<i>C. demersum</i>
25659	رودخانه	N: 36° 37.413' E: 52° 13.445'	-10	محمود آباد به سمت نور	cer11	<i>C. demersum</i>

نشانگر SRAP، تعداد ۳ آغازگر (Li et al., 2015) که باندهای واضح‌تری ایجاد کرده بودند، انتخاب شدند. توالی آغازگرهای استفاده شده به همراه دمای مناسب هر کدام و برنامه مورد استفاده برای PCR نشانگرها، در جدول ۲ نشان داده شدند. برای هر دو نشانگر، هر میکروتیوب PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد و در جدول ۳ مقدار مواد شرح داده شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشانگرهای

SRAP و ISSR

در ابتدا برای استفاده از نشانگر مولکولی ISSR (Blair et al., 1999)، در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، گرادیان دمایی برای ۶ آغازگر انجام شد و پس از بررسی محصولات، تعداد ۶ آغازگر به تنهایی و یک جفت آغازگر (808 ISSR و 811 ISSR) که در محصول PCR، باندهای واضح و قابل شمارشی را تولید کرده بودند، انتخاب شدند. برای استفاده از

جدول ۲- ویژگی‌های آغازگرهای ISSR و SRAP استفاده شده

Table 2- Characteristics of used ISSR and SRAP primers

طول قطعه تکثیر شده (جفت باز)	برنامه PCR	Tm	توالی آغازگر (۳' → ۵')	نام آغازگر
200-1500	4 min at 95°C, 40 cycles at (1 min at 95°C, 1 min at 59°C, 2 min at 72°C) and finally extension step 10 min at 72°C.	50°C	GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR 810
180-1500		50°C	AGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR 807
200-1500		52°C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR 811
200-3000		50°C	GAGAGAGAGAGAGAGAA	ISSR 812
400-1500		38°C	GATAGATAGATAGATA	ISSR 872
300-1500		52°C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR 4
200-1500		52°C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR 808
200-3000	5 min at 94°C, 5 cycles at (1 min at 94°C, 1 min at 35°C, 1 min at 72°C) and 35 cycles at (1 min at 94°C, 1 min at 50°C, 5 min at 72°C).	54°C	TGAGTCCAAACCGGATA	Me 2
		50°C	GACTGCGTACGAATTTGA	Em 4
52°C		TGAGTCCAAACCGGAA	Me 5	
50°C		GACTGCGTACGAATTTGA	Em 4	
100-1500		50°C	TGAGTCCAAACCGGACA	Me 6
		49.90°C	GACTGCGTACGAATTTGC	Em 2

جدول ۳- مواد مورد نیاز برای انجام PCR

Table 3- Materials needed to perform PCR

مواد	حجم	غلظت
<i>Taq</i> DNA Polymerase Master Mix red (Amplicon)	12.5 μ l	2 X
Primer forward	0.5 μ l	0.1 μ M
Primer reverse	0.5 μ l	0.1 μ M
Template DNA	1 μ l	50 ng/ml
آب مقطر دو بار تقطیر استریل	10.5 μ l	-

نتایج و بحث

پژوهش‌های ریخت‌شناسی این گیاه به این شرح است که دارای وضعیت رویشی چند ساله علفی می‌باشد و ساقه این گیاهان دارای گره و میان‌گره متعدد می‌باشد و ساقه بیشتر در ۱/۳ فوقانی منشعب می‌شود. ارتفاع گیاه بین گونه‌ها متفاوت است که تحت تأثیر عواملی مانند سن گیاه و شرایط محیطی است و تقریباً ۹ تا ۵۰ سانتی‌متر است. در بررسی‌های انجام شده سطح ساقه صاف و بدون کرک است، سطح برگ هر دو گونه فاقد کرک و موم است. تقسیمات برگ بسته به نوع گونه دارای دو یا چند تقسیم دیکوتومی‌اند. در گونه *C. demersum* دارای ۱ یا ۲ بار تقسیم و در گونه *submersum C.* دارای ۳ یا ۴ بار تقسیم دیکوتومی‌اند. شکل برگ نازک، دراز، نوک تیز و چنگال مانند می‌باشد که به صورت رشته‌ای یا خطی هستند. در شکل‌های ۱ و ۲ تصویرهای این گیاه آورده شده است.

برای بررسی محصول PCR از ژل ۲ درصد آگارز استفاده شد. برای مقایسه اندازه قطعات روی ژل از خط کش ژنی (Ladder) ۱۰۰ جفت نوکلئوتیدی استفاده شد. برای انجام الکتروفورز، ولتاژ دستگاه ۸۰ ولت و زمان ۶۰ الی ۹۰ دقیقه تعیین شد. برای آنالیز داده‌ها و تحلیل آماری جمعیت‌ها، باندهای ایجاد شده با نشانگر ۱۰۰ جفت نوکلئوتیدی مقایسه و اندازه‌گیری شدند و افراد براساس حضور باند (۱) و عدم حضور باند (۰) نمره‌دهی شدند. با نرم‌افزار NTSYSpc (version 2.1; Rohlf, 1998) و ضریب تشابه Jaccard و Nei آنالیز خوشه‌ای انجام شد و دو دندروگرام به دست آمد. از نرم‌افزار GenAlex (version 6.5, Peakall and Smouse, 2006) برای آنالیز مؤلفه اصلی و به دست آوردن شاخصه‌های تنوع ژنتیکی و از نرم‌افزار STRUCTURE (Earl & VonHoldt, 2012) برای بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده شد.



شکل ۱- تصویر آرایش چرخه‌ای برگ‌ها و گره در ساقه

Figure 1- Picture of the cyclic arrangement of leaves and nodes in the stem

خاری است (Dinarvand et al., 2022). در این تحقیق از گیاهان موجود در هرباریوم و نیز تعدادی گیاه جمع‌آوری شده استفاده شد، اما همه نمونه‌ها دارای میوه نبودند که بتوان از این صفت برای تشخیص گونه‌ها استفاده کرد، البته در بررسی شکل و تعداد انشعاب برگ‌ها هم به دلیل ظریف بودن گیاه احتمال خطا وجود دارد. بنابراین تعداد انشعابات برگ صفتی با ارزش برای تفکیک گونه‌های *Ceratophyllum* می‌باشد.

برای پژوهش مولکولی و بررسی تنوع در گیاه *Ceratophyllum* از نشانگر مولکولی ISSR و SRAP برای ۲۹ جمعیت مورد مطالعه که شامل ۵۰ فرد هست، استفاده شد. درصد پلی مورفیسم برای تمامی آغازگرها، ۱۰۰٪ بود.

جدول ۸ اطلاعات مرتبط با شاخص‌های تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. N بیانگر اندازه جمعیت، Na تعداد آلل‌های جمعیت، Ne تعداد آلل‌های موثر جمعیت، I شاخص تنوع شانون، He هتروزیگوسیتی مورد انتظار (شاخص نی) و P درصد پلی مورفیسم ژن‌های جمعیت‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

شکل ۲- تصویر نمونه هرباریومی گیاه *Ceratophyllum*Figure 2- Herbarium specimen image of *Ceratophyllum*

در پژوهش‌های انجام شده در این تحقیق در حوزه اکوسیستم‌های آبی ایران دو گونه برای جنس *Ceratophyllum* یافت شد. گونه‌های این جنس شباهت‌های ریخت‌شناسی زیادی با برخی گونه‌های *Myriophyllum* L. دارند. همان‌طور که در کتاب فلور ایران آمده است دو گونه این گیاه شبیه به یکدیگر هستند با این تفاوت که گونه *C. submersum* دارای برگ‌های ظریف‌تر و اغلب با بیش از سه شاخه، در انتها اغلب با بیش از ۴ بریدگی با دندان‌های پراکنده و فندقه‌ها بدون زائده

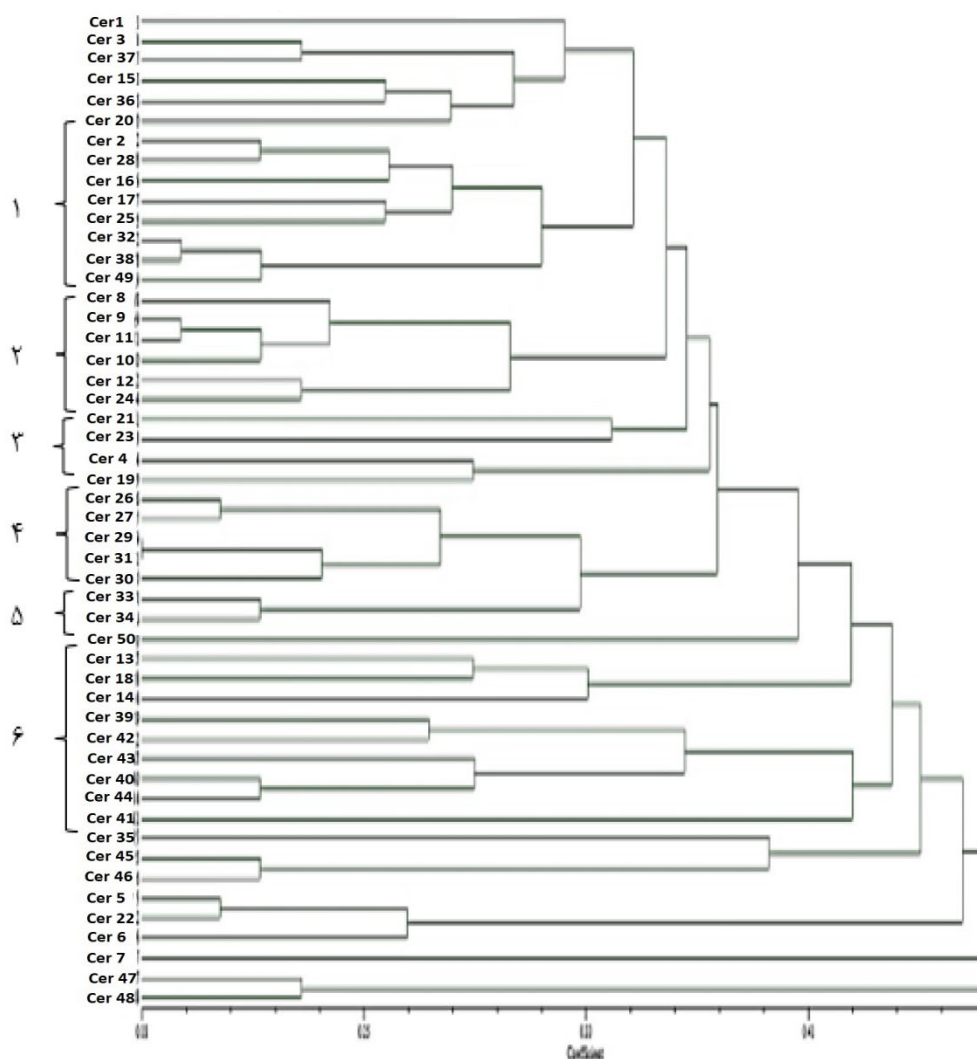
جدول ۸- شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جمعیت‌های *Ceratophyllum*Table 8- Genetic diversity indices for *Ceratophyllum* populations

%P	uHe	He	I	Ne	Na	N	نام مخفف	جمعیت
28.42	0.157	0.118	0.172	1.201	0.705	2.000	cer10,cer21	ازباران
30.53	0.169	0.126	0.185	1.216	0.695	2.000	cer38,cer39	اژیه
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.305	1.000	cer6	اصفهان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.326	1.000	cer23	امیرکلاهی
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.284	1.000	cer3	آبادان
17.89	0.099	0.074	0.108	1.127	0.547	2.000	cer26,cer27	بابل
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.221	1.000	cer32	باغ بهادران
36.84	0.203	0.153	0.223	1.261	0.821	2.000	cer35, cer44	برسیان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.232	1.000	cer5	بروجن
38.95	0.169	0.141	0.211	1.233	0.895	3.000	cer17,cer18,cer20	بندر انزلی
15.79	0.087	0.065	0.095	1.112	0.442	2.000	cer29,cer31	تالاب نیلوفرآبی
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.326	1.000	cer41	تبریز
46.32	0.183	0.160	0.242	1.271	1.000	4.000	cer28, cer30,cer45,cer46	تجن
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.305	1.000	cer9	تنکابن
30.53	0.169	0.126	0.185	1.216	0.705	2.000	cer2, cer4	چشمه برم
42.11	0.206	0.172	0.250	1.307	0.947	3.000	cer47,cer48,cer49	چغاخور
27.37	0.151	0.113	0.166	1.194	0.684	2.000	cer36,cer40	چم آسمان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.347	1.000	cer50	چم حیدر
18.95	0.105	0.078	0.115	1.134	0.600	2.000	cer33,cer34	حسن آباد
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.263	1.000	cer14	دلیرجان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	cer37	زیار
51.58	0.202	0.177	0.268	1.293	1.147	4.000	cer7,cer8,cer15,cer24	سفیدرود
40.00	0.221	0.166	0.242	1.283	0.884	2.000	cer19,cer22	سیاه رود
32.63	0.180	0.135	0.197	1.231	0.768	2.000	cer4, cer25	شیراز.اصفهان
28.42	0.157	0.118	0.172	1.201	0.716	2.000	cer12, cer13	کانی برزان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.284	1.000	cer16	کرمان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.337	1.000	cer1	گندمان
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.284	1.000	cer11	محمودآباد
0.00	0.000	0.000	0.000	1.000	0.253	1.000	cer42	یزدآباد

شده است. در هر دو دندروگرام تقریباً نمونه‌های شمال کشور و منطقه مرکزی کشور (اصفهان) تفکیک شده است اما طبق این دندروگرام‌ها نوعی ارتباط و پیوستگی ژنتیکی بین نمونه‌های شمال کشور و مرکز کشور دیده می‌شود.

تلفیق داده‌های نشانگرهای ISSR و SRAP

نتایج حاصل از آنالیز خوشه‌ای با استفاده از داده‌های نشانگرهای ISSR و SRAP در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. دندروگرام به روش UPGMA و با ضریب تشابه Jaccard و Nei رسم



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌ها با استفاده از ضریب تشابه Jaccard

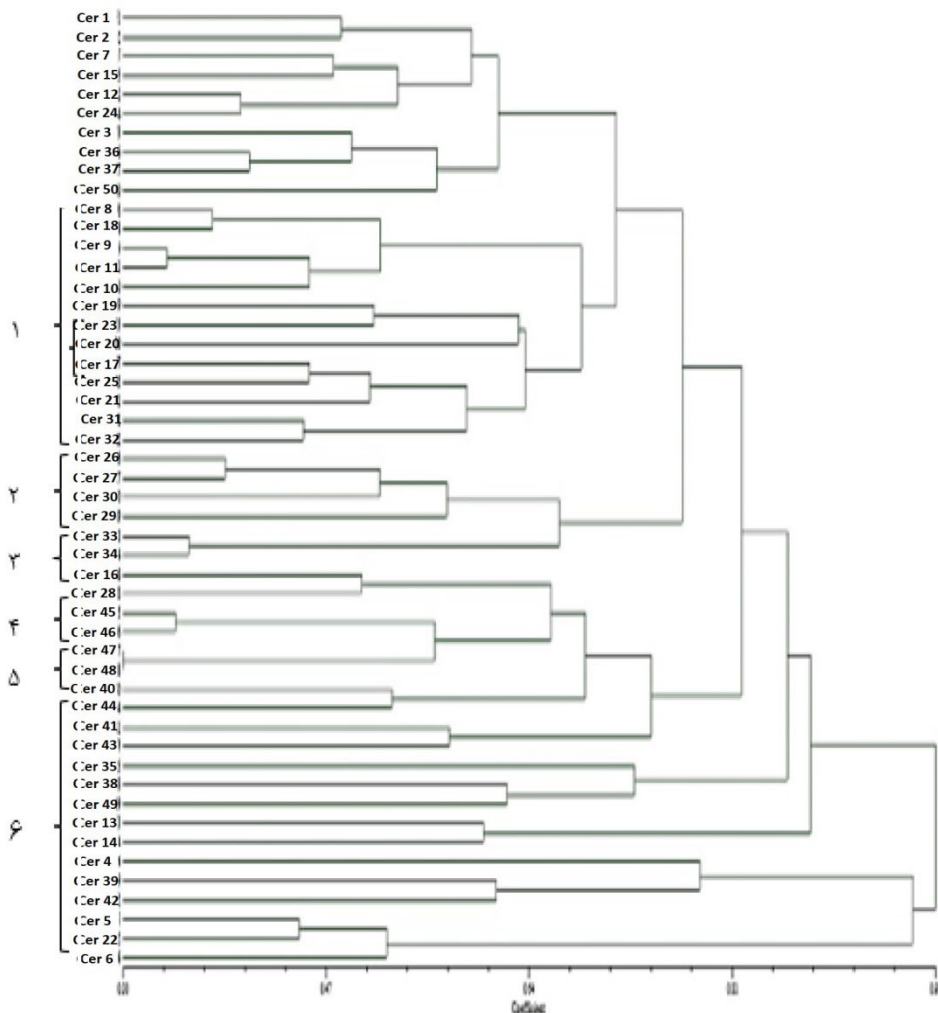
Figure 3- Dendrogram obtained from data analysis using Jaccard similarity coefficient

(مازندران)، مرکز کشور (اصفهان) و جنوب کشور نوعی جدایی را نشان می‌دهند، اما از سوی دیگر به دلیل ارتباط از طریق رفت و آمد و وسایل و تجهیزات از طریق انسان و نیز از طریق پرندگان آبی نوعی ارتباط و پیوستگی ژنتیکی را نشان می‌دهند. Khodadoost et al. (2017) در مطالعه تنوع ژنتیکی گیاه *Malus Orientalis* Uglitz. سطح بالایی از تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب جنگلی شمال ایران را گزارش کردند. در رابطه با گونه‌های *C. submersum* و *C. demersum* که در

با توجه به دندروگرام‌های حاصل از آنالیز خوشه‌ای مشاهده می‌شود که جمعیت‌های مختلف کاملاً تفکیک نشدند و در نمونه‌های مورد مطالعه براساس مکان‌های مختلف، تنوع ژنتیکی نشان می‌دهند که می‌توان آن را به دوری و مجاورت جمعیت‌ها تفسیر نمود. در بررسی تنوع ژنتیکی *Prunus avium* توسط Atapour et al., 2022، تفکیک بعضی از جمعیت‌ها بیشتر و بعضی نیز به علت تبادل ژنتیکی کمتر بود. ولی به نظر می‌رسد این خزانه‌های ژنی که عمدتاً در شمال کشور

بستان آباد و دریاچه قوری گل دیده شده است (Dinarvand, 2017). بنابراین به نظر می‌رسد *C. demersum* از لحاظ اکولوژیکی گونه‌ای سازگارتر با عوامل مختلف محیطی مانند ارتفاع آب زیستگاه‌ها، میزان مواد محلول، وجود گونه‌های رقیب، شرایط دمایی آب و محیط باشد و گونه *C. submersum* به دلیل فراهم نبودن شرایط مناسب زیست تنها در نیچ‌های آبی اکولوژیکی محدودی در کشور وجود دارد.

ایران وجود دارند به نظر می‌رسد گونه *C. demersum* دارای خزانه ژنتیکی وسیع تری در زیستگاه‌های آبی کشور است به طوری که در اکثر زیستگاه‌ها وجود دارد و گونه *C. submersum* تنها در منطقه‌ای در شمال کشور (ازباران، امیرکلاهی و بندر انزلی) در نمونه برداری‌ها مشاهده شده‌اند. همان‌طور که در کتاب فلور ایران ذکر شده گونه‌ی *C. submersum* متعلق به مناطق خزری و ایرانی تورانی است و در مناطق تالاب انزلی و تبریز به



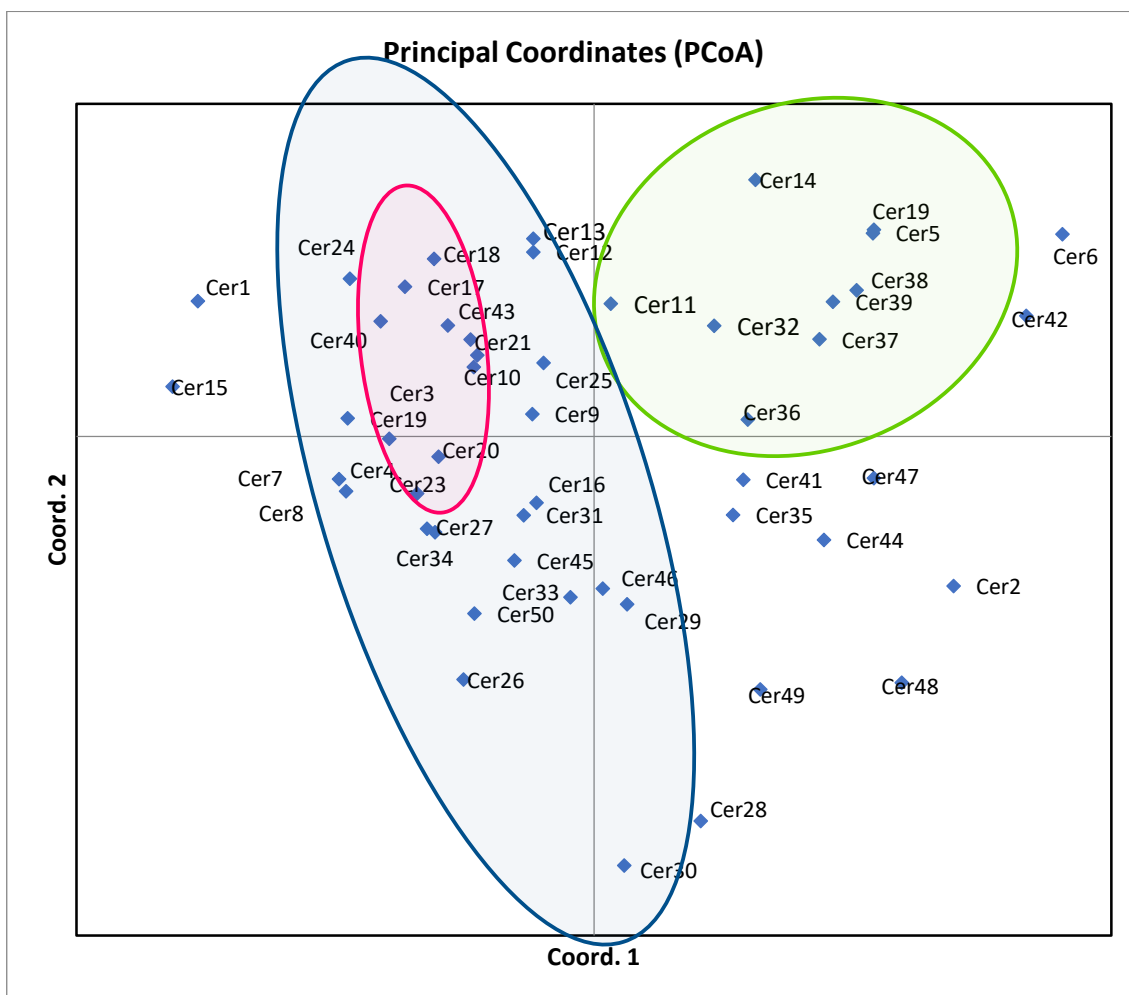
شکل ۴- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌ها با استفاده از ضریب تشابه Nei

Figure 4- Dendrogram obtained from data analysis using Nei similarity coefficient

بیشترین تنوع ژنی در نواحی شمال و مرکز ایران گزارش شد (Ghasemi et al., 2016).

نتایج حاصل از آنالیز مولفه اصلی در شکل ۵ نشان داده شده است که این نتایج تقریباً در تطابق با آنالیز خوشه‌ای است و نوعی ارتباط و پیوستگی بین افراد را نشان می‌دهد. محدوده سبز رنگ نشان دهنده جمعیت اصفهان، محدوده آبی رنگ نشان دهنده جمعیت‌های شمال کشور و محدوده صورتی، گونه‌های *C. submersum* شمال کشور را نشان می‌دهد.

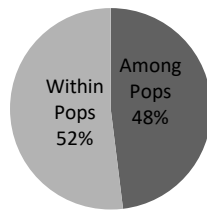
جنس *Ceratophyllum* با داشتن تولید مثل غیرجنسی و جوانه‌های زمختی به نام توریون که در پائیز تولید شده و در ته آب غوطه‌ورند و در اثر سرمای زمستان از بین خواهند رفت، ولی در بهار به محض گرم شدن آب دوباره سبز شده، با تولید ساقه‌های تازه می‌تواند جمعیت‌ها و یا کلونی‌های توده‌ای زیادی را تولید کند (Lokker et al., 1994). در پژوهش بر اساس نشانگر SRAP، سطوح زیادی از تنوع کلونی و تنوع ژنتیکی را در درون جمعیت‌های این گونه نشان داد و همچنین



شکل ۵- دیاگرام حاصل از داده‌ها برای جمعیت‌های مختلف *Ceratophyllum* با روش آنالیز مؤلفه اصلی PCoA

Figure 5- Diagram of data for different populations of *Ceratophyllum* using PCoA principal component analysis method.

Percentages of Molecular Variance



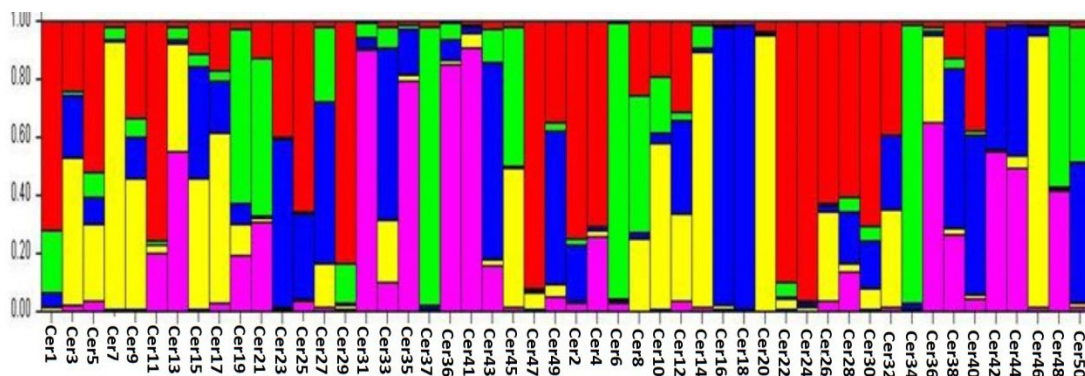
شکل ۶- نتایج آنالیز AMOVA برای جمعیت های *Ceratophyllum* مورد مطالعه

Figure 6- AMOVA analysis results for studied *Ceratophyllum* populations

تحلیل مولکولی روابط درون گونه‌ای *Ceratophyllum* از طریق آنالیز STRUCTURE در شکل ۷ نشان داده شده است که ۵ گروه ژنتیکی را نشان داده است و ارتباط بین افراد جمعیت‌های مختلف را بیان می‌کند که خزانه ژنی مشابهی دارند.

تحلیل واریانس مولکولی AMOVA بر اساس تلفیق نشانگرهای ISSR و SRAP انجام شد. نتایج حاصل از این آنالیز نشان دهنده ۵۲ درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و ۴۸ درصد تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد. شکل ۶ بیانگر این است که تنوع درون جمعیتی بیشتر است. در سایر پژوهش‌های مربوط به تنوع ژنتیکی (Khodadoost et al., 2017, Mofid Bojnoordi et al., و Latifi et al., 2018) نیز تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بیشتری نشان داده شده است که این امر نشان‌دهنده تبادل ژنتیکی بالای میان جمعیت‌ها است.

نتایج حاصل از آزمون Mantel حاکی از عدم ارتباط بین فاصله ژنی و فاصله جغرافیایی است ($P=0/320$ و $R=0/019$) که با توجه به اینکه در درخت و تحلیل مولفه اصلی شاهد عدم تفکیک زیاد جمعیت‌ها بودیم، منطقی به نظر می‌رسد.



شکل ۷- نتیجه حاصل از آنالیز STRUCTURE برای گونه‌های *Ceratophyllum* مورد مطالعه (نتیجه این تحلیل، نشان‌دهنده تعداد پنج گروه ژنتیکی شامل آبی: گروه ۱، سبز: گروه ۲، قرمز: گروه ۳، زرد: گروه ۴، صورتی: گروه ۵ برای کل افراد ۲۹ جمعیت است).

Figure 7- The result of the STRUCTURE analysis for the studied species of *Ceratophyllum* (The result of this analysis shows five genetic groups including blue: group 1, green: group 2, red: group 3, yellow: group 4, pink: group 5 for all individuals of 29 population).

گیاه تکثیر پیدا می‌کنند (Loveless & Hamrick, 1984). بنابراین بدیهی است، پلی‌مورفیسم قابل

با توجه به اینکه گونه‌های این جنس در شرایط مساعد محیطی بیشتر از طریق جوانه‌ها و قطعات

References

- Abbasi, S., & Afsharzadeh, S. (2016). An efficient and simple CTAB based method for total genomic DNA isolation from low amounts of aquatic plants leaves with a high level of secondary metabolites. *Progress in Biological Science*, 95-106. <https://doi.org/10.22059/pbs.2016.59012>.
- Abbasi, S., Afsharzadeh, S., Saeidi, H., & Triest, L. (2016). Strong genetic differentiation of submerged plant populations across mountain ranges: Evidence from *Potamogeton pectinatus* in Iran. *PLoS One*, 11(8), e0161889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161889>.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27, 617-631. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0507-z>.
- Aghajani, J. (2016). Biosynthesis of bioactive silver nanoparticles from aquatic plant *Ceratophyllum demersum*. MA Thesis, Lahijan Islamic University [In Persian].
- APG, IV. (2016). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APGIV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- Asadi, Sh., & Imanpour, J. (2014). Comparison of the purification capability of the aquatic plant *Ceratopyllum demersum* with media in closed aquaculture systems. MA Thesis, Gilan University [In Persian].
- Atapour, Y., Ghanbari, A., Estaji, A., & Haghjooyan, R. (2022). Evaluation of genetic diversity of twenty-eight Sweet Cherry Genotypes by morphological traits and SCoT markers in the northwest of Iran. *Journal of Genetic Resources*, 8(2), 138-146. <https://doi.org/10.22080/jgr.2022.22815.1293>.
- توجهی در جمعیت‌های گونه‌های این جنس مشاهده نشود. میانگین پلی‌مورفیسم در جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۶/۷۷٪ است.
- با توجه به اینکه، *Ceratophyllum* نسبت به گیاه آبرزی *Potamogeton* L. پیشرفته‌تر است (Byng & Christenhusz, 2018)، سازگاری بیشتری نسبت به شرایط محیطی ایران از خود نشان می‌دهد که این امر تنوع درون جمعیت‌ها را بر خلاف جمعیت‌های *Potamogeton* (Abbasi et al., 2016) افزایش داده است. همین طور اثبات شده که در شرایط اکولوژیکی سخت و غیر پایدار مثل خشکسالی که به تازگی در ایران زیاد است، تولیدمثل جنسی زیادتر می‌شود و تنوع درون جمعیت‌ها افزایش نشان دادند. شرح فوق با نتیجه حاصل از آنالیز AMOVA در این مطالعه که نشان دهنده تنوع درون جمعیتی بیشتری نسبت تنوع بین جمعیتی است، تطابق دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به تحلیل‌های انجام شده می‌توان گفت که خزانه ژنی جمعیت *Ceratophyllum* در ایران تا حدودی مخدوش شده است و بین جمعیت‌های مختلف ارتباط و تشابه ژنی وجود دارد و تنها بعضی از جمعیت‌های شمال کشور یکنواخت‌تر هستند. همان طور که بیان شد عوامل مختلفی می‌تواند در ایجاد چنین شرایطی موثر باشد که تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالایی در جمعیت‌های این مطالعه نشان داده شده است.

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان برای انجام این پژوهش سپاسگزارند.

- Blair, M. W., Panaud O., & McCouch, S. R. (1999). Inter simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and finger printing in rice (*Oryza sativa L.*). *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 780-792.
<https://doi.org/10.1007/s001220051135>.
- Byng, J. W., & Christenhusz, M. M. (2018). Introducing The Global Flora, a global series of botany. *The Global Flora: A practical flora to vascular plant species of the world, 1*.
- Carr, G. M., Duthie, H. C., & Taylor, W. D. (1997). Models of aquatic plant productivity: a review of the factors that influence growth. *Aquatic Botany*, 59(3-4), 195-215.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(97\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(97)00071-5).
- Dinarvand, M. (2017). Families of Aquatic Plants. In: Assadi, M., Massoumi, A. A. (eds), *Flora of Iran*. Tehran: Research Institute of Forest and Rangelands. No. 101-123: 3-130 [In Persian].
- Dinarvand, M., Assadi, M., & Abbasi, S. (2022). A taxonomic revision on aquatic vascular plants in Iran. *Rostaniha*, 23(2), 1-50.
<https://doi.org/10.22092/bot.j.iran.2022.358319.1302>.
- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). Structures Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Eftekhari, Z., Sharifi, N., Norastehnia, A., & Masoudian, Z. (2020). Assessing the risk of industrial dyes on life of aquatic plant *Ceratophyllum demersum*. *Journal of Aquatic Ecology*, 10(3), 52-60 [In Persian].
<https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Ghasemi, M., Abbasi, S., & Afsharzadeh, S. (2016). Investigation of the genus *Ceratophyllum L.* based on morphological, anatomical and molecular characteristics in Iran. *21st National Congress and 9th International Congress of Biology of Iran*, Semnan [In Persian].
- Khodadoost, A., Yousefzadeh, H., Amirchakhmaghi, N., Abdollahi, H., & Hoseinzadeh, A. (2017). Genetic diversity of *Malus orientalis* in hyrcanian forest using ISSR-PCR markers. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(4), 359-369.
<https://doi.org/10.1001.1.23832738.1395.29.4.2.0>.
- Latifi, E., Yousefi, M., & Haerinasab, M. (2018). Study of genetic diversity in some populations of *Cordia myxa L.* in Iran by using CDDP molecular marker. *Iranian Journal of Plant Biology*, 9(4), 39-54 [In Persian].
<https://doi.org/10.22108/ijpb.2018.105760.1046>.
- Li, P., Zhan, X., Que, Q., Qu, W., Liu, M., Ouyang, K., ... & Chen, X. (2015). Genetic diversity and population structure of *Toona ciliata* Roem. based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Forests*, 6(4), 1094-1106.
<https://doi.org/10.3390/f6041094>.
- Lokker, C., Susko, D., Lovett-Doust, L., & Lovett-Doust, J. (1994). Population genetic structure of *Vallisneria americana*, a dioecious clonal macrophyte. *American Journal of Botany*, 81(8), 1004-1012.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1994.tb15588.x>.
- Loveless, M. D., & Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15(1), 65-95.
<https://doi.org/10.1146/annurev.es.15.11>

- 0184.000433.
- Moshtaghi, N., Bagheri, A., & Sharifi, A. (2013). Plant biotechnology. Mashhad: University Jihad of Mashhad [In Persian].
- Mofid Bojnoordi, M., Fatemi, S. M., & Aghdasi, M. (2022). The morphological and genetic variation of a species of Lettuce (*Lactuca undulata* Ledeb.): Geographically widespread but locally endangered. *Journal of Genetic Resources*, 8(1), 57-68. <https://doi.org/10.22080/jgr.2021.22300.1281>.
- Peakall, R., & Smouse P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>.
- Robarts, D. W., & Wolfe, A. D. (2014). Sequence-related amplified polymorphisms (SRAP) markers: a potential resource for studies in plant molecular biology. *Applications in Plant Sciences*, 2(7), 1-13. <https://doi.org/10.3732/apps.1400017>.
- Rohlf, F. J. (1998). *NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1*. Setauket, NY, USA: Exeter Publishing.
- Szalontai, B., Stranczinger, S., Mesterhazy, A., Scribailo, R. W., Les, D. H., Efremov, A. N., ... & Csiky, J. (2018). Molecular phylogenetic analysis of *Ceratophyllum* L. taxa: a new perspective. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(2), 161-172. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy057>.
- Troyer, A., Openshaw, S., & Knittle, K. (1988). Measurement of genetic diversity among popular commercial corn hybrids. *Crop Science*, 28(3), 481-485. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800030010x>.
- Wang, X., Zhao, F., Hu, Z., Critchley, A. T., Morrell, S. L., & Duan, D. (2008). Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *Chondrus crispus* populations from North Atlantic. *Aquatic Botany*, 88(2), 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.10.001>.
- Wilkins, J. S. (2009). *Species: a history of the idea* (Vol. 1). University of California Press.
- Zare-rashnoodi, N., Erfani-Moghadam, J., & Fazeli, A. (2017). Evaluation of some walnut genotypes in the west of Iran using fruit characteristics and RAPD marker. *Iranian Journal of Plant Biology*, 9(3), 1-18 [In Persian]. <https://doi.org/10.22108/ijpb.2017.100338>.