

Evaluation of genetic relationships of *Aegilops* species with targeted region amplified polymorphism (TRAP) markers

Hamid Karimi

M.Sc. Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: hamid.karimi126@gmail.com

Sedigheh Fabriki Ourang

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Tel: 09195382099, Email: ourang@eng.ikiu.ac.ir, s.ourang910@gmail.com

Ali Ashraf Mehrabi

Research associate, Department of Biotechnology, Research Institute of Forest and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Email: alia.mehrabi@yahoo.com

Abstract

Objective

The aim of this study was to determine the relationships and genetic diversity between and within wild species of *Aegilops* using EST-derived TRAP molecular markers.

Materials and Methods

In this study, genetic diversity and relationships among eight wild species of *Aegilops* collected from 14 provinces of Iran were evaluated using 24 TRAP primer combinations.

Results

The mean of PIC for studied primers was 0.95 and the lowest and highest values of this index were related to TRAP20 (0.92) and TRAP10 (0.97), respectively. Also, the mean of MI was 10.77 and the lowest and highest values were related to TRAP3 (6.95) and TRAP17 (17.34), respectively. The molecular analysis of variance showed 60% variance between species and 40% variance within species. Estimated genetic parameters showed that the highest levels of Na (1.07), Ne (1.26), I (0.23) and uHe (0.16) belonged to *Ae. truncialis* and the maximum Nei gene diversity

(0.14) was related to *Ae. truncialis*, *Ae. umbelulata* and *Ae. neglecta*. Minimum values of Nei gene diversity (0.09), Shannon index (0.14), No. of effective alleles (1.16) and No. of observed alleles (0.79) was observed for *Ae. crassa*. The least genetic similarity was observed between *Ae. crassa* with *Ae. cylandrica* and *Ae. umbelulata* and the most similarity between *Ae. truncialis* and *Ae. umbelulata*. Being in the same group of *Ae. umbelulata* and *Ae. truncialis* with cluster analysis and PCOA confirmed the high genetic similarity of these species.

Conclusions

The results showed high genetic diversity among and within species. Molecular analysis of variance revealed higher genetic diversity between species, indicating low gene flow and F_{st} , as well as a high genetic differentiation between species.

Keywords: *Aegilops*, Genetic diversity, TRAP, Wild species, Wheat.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Karimi H, Fabriki Ourang S, Mehrabi AA (2022) Evaluation of genetic relationships of *Aegilops* species with targeted region amplified polymorphism (TRAP) markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (2), 67-84.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (2), 67-84.

DOI: 10.22103/jab.2022.17493.1314

Received: March 11, 2022.

Received in revised form: April 18, 2022.

Accepted: April 19, 2022.

Published online: May 5, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors

ارزیابی روابط ژنتیکی گونه‌های آزیلوپس با استفاده نشانگرهای چندشکلی نواحی هدفمند (TRAP)

حمید کریمی

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ع)، قزوین، ایران. رایانامه:

hamid.karimi126@gmail.com

صدیقه فابریکی اورنگ 

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ع)، قزوین، ایران. رایانامه:

s.ourang910@gmail.com, ourang@eng.ikiu.ac.ir

علی اشرف مهرابی

دانشیار پژوهش، بخش زیست فناوری، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران،

ایران. رایانامه: alia.mehrabi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

چکیده

هدف: هدف این تحقیق تعیین روابط و سطح تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌های وحشی آزیلوپس با استفاده از نشانگرهای ملکولی TRAP که مبتنی بر نواحی EST هستند، می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌های وحشی آزیلوپس جمع‌آوری شده از ۱۴ استان ایران متشکل از هشت گونه *Aegilops* با استفاده از ۲۴ ترکیب آغازگرهای TRAP مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: میانگین PIC آغازگرهای مورد مطالعه برابر ۰/۹۵ و کمترین و بیشترین میزان این شاخص به ترتیب مربوط به آغازگرهای TRAP20 (۰/۹۲) و TRAP10 (۰/۹۷) بود. همچنین میانگین شاخص نشانگری (MI) برابر ۱۰/۷۷ و کمترین و بیشترین میزان این شاخص به ترتیب مربوط به آغازگرهای TRAP3 (۶/۹۵) و TRAP17 (۱۷/۳۴) بود. نتایج تجزیه واریانس ملکولی، واریانس بین گونه‌ها را ۶۰ و واریانس درون گونه‌ها را ۴۰ درصد نشان داد. پارامترهای ژنتیکی برآورد شده نشان داد که بیشترین میزان Na (۱/۰۷)، Ne (۱/۲۶)، I (۰/۲۳) و uHe (۰/۱۶) مربوط به گونه *Ae. truncialis* و حداکثر شاخص تنوع ژنی نی (۰/۱۴) مربوط

به گونه‌های *Ae. neglecta* و *Ae. umbelulata*، *Ae. truncialis*، *Ae. crassa*، *Ae. cylandrica* و *Ae. umbelulata* تشابه ژنتیکی بین *Ae. crassa* با گونه‌های *Ae. cylandrica* و *Ae. umbelulata* و بیشترین تشابه بین *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* مشاهده شد. فرار گرفتن *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* در یک گروه در تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی و با فاصله زیاد از سایر گونه‌ها شباهت ژنتیکی بالای این دو گونه را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق تنوع ژنتیکی بالایی را در بین و درون گونه‌ها نشان داد. تجزیه واریانس ملکولی تنوع ژنتیکی بالاتر در بین گونه‌ها را مشخص کرد که این نتیجه نمایانگر جریان ژنی و شاخص تثبیت (Fst) پایین در بین گونه‌ها و نیز تأیید کننده تمایز ژنتیکی بالا در بین گونه‌ها بود.

کلیدواژه‌ها: آزیلوپس، تنوع ژنتیکی، گندم، گونه‌های وحشی، TRAP.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کریمی حمید، فابریکی اورنگ صدیقه، مهربابی علی‌اشرف (۱۴۰۱) ارزیابی روابط ژنتیکی گونه‌های آزیلوپس با استفاده نشانگرهای چندشکلی نواحی هدفمند (TRAP). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۲)، ۶۷-۸۴.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

گندم یکی از سه غله مهم دنیا به همراه برنج و ذرت محسوب می‌شود و به دلیل ویژگی منحصر به فرد، یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی جهان است و نسبت به سایر غلات در درجه اول اهمیت قرار دارد. خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی دربرگیرنده منابع ژنی با ارزشی برای صفات کمی و کیفی گیاهان زراعی می‌باشند (Tanksley et al. 1997). جنس *Aegilops* از خانواده Tritiaceae است که این جنس بخش عمده‌ای از خزانه ژنی گندم را تشکیل می‌دهد و دارای سه سطح پلوئیدی دیپلوئید، تتراپلوئید و دو گونه هگزاپلوئید است که از خویشاوندان گندم زراعی محسوب می‌شوند و با دارا بودن تعداد زیادی از ژن‌های مهم، منبع با ارزشی برای مقاومت به بیماری‌ها و آفات به‌شمار می‌روند (Kashkush et al. 2002; Schneider et al. 2008). طبق بررسی‌های مختلف انجام شده مراکز اولیه پراکنش جنس *Aegilops* هلال حاصل خیز بوده است (Kimber and Feldman 1987). تمام گونه‌های موجود در این جنس یکساله و علفی بوده و اغلب خودبارور هستند. گونه‌های *Ae. speltoides*، *Ae. Caudate*، *Ae. tauschii*

اعضای *Ae. neglecta* و *Ae. crassa* *Ae. comosa* ، *Ae. cylindrica* ، *Ae. triuncialis* ، *Ae. umbellulata* ، اصلی و مهم داخل این جنس هستند (Kilian et al. 2011). ژنوم گونه *Ae. speltoides* بسیار شبیه ژنوم B گندم است و مطالعات ملکولی نشان داده است که این گونه می‌تواند به عنوان بخشنده ژنوم B گندم مورد استفاده قرار گیرد (Eilam et al. 2007). *Ae. triuncialis* از تلاقی بین گونه‌های *Ae. umbellulata* (با ژنوم UU) و *Ae. caudata* (با ژنوم CC)، *Ae. cylindrica* از تلاقی گونه‌های *Ae. caudata* (CC) و *Ae. tauschii* (DD) و *Ae. neglecta* از تلاقی بین گونه‌های *Ae. comosa* (MM) و *Ae. umbellulata* (UU) به‌وجود آمده است (Slageren et al. 1994). گونه *Ae. crassa* نیز از تلاقی بین گونه‌های *Ae. comosa* (MM) و *Ae. tauschii* (DD) به‌وجود آمده است (Wang et al. 1997).

اهمیت ارزیابی تنوع ژنتیکی، بدان دلیل است که در کشاورزی نوین استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است که باعث کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود، یکنواختی ژنتیکی در گیاهان نامطلوب بوده و باعث آسیب‌پذیری ژنتیکی گیاهان در برابر آفات، بیماری‌ها و عوامل محیطی می‌شود، بدین سبب به‌منظور حفظ و بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان از نشانگرهای ملکولی استفاده می‌شود (Salem et al. 2008). در دهه‌های گذشته با توجه به گسترش نشانگرهای ملکولی و پایگاه داده‌های ژنتیک گیاهی، مطالعات تنوع ژنتیکی، ساخت نقشه‌های ژنتیکی و ردیابی‌های ژنی در گیاهان آسان شده است. در بین نشانگرهای ملکولی، نشانگرهای مبتنی بر PCR به‌علت دقت، هزینه کم و تنوع بالای نشانگری به‌منظور اهداف مختلف گسترش بیشتری یافته است. براساس تحقیقات انجام شده از نشانگرهای DNA تکثیر شده تصادفی (AAD¹) در مطالعات خیلی زیادی به علت سادگی و ارزان بودن این روش استفاده شده است، ولی از نشانگرهای هدفمند شده برای انگشت‌نگاری با وجود اهمیت بالای این نشانگرها در مطالعات کمتری به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط بین جمعیت‌های گیاهی استفاده شده است (Poczai et al. 2013). از سویی دیگر، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در سال‌های اخیر جهت مطالعه موجودات بومی و حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Askari et al. 2010). میزان اطلاعات به‌دست‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Mohammadabadi et al. 2018). همچنین، مطالعه توده‌ها و نژادهای مختلف با استفاده از تکنیک‌های ملکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2016). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی توده‌ها و نژادهای مختلف بسیار اهمیت دارد (Ghasemi et al. 2010) تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغییر و مختلف می‌باشد (Mohammadifar et al. 2011).

یکی از این سیستم‌های نشانگری، نشانگرهای چندشکلی تکثیر شده نواحی هدف (TRAP²) می‌باشند. برای طراحی آغازگرهای نشانگر TRAP نیاز به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم بوده و آغازگرها ۱۶ تا ۲۰ نوکلئوتید طول دارند. این نشانگرها دارای

¹-Arbitrarily amplified DNA markers; AAD

²-Targeted region amplified polymorphism; TRAP

آغازگرهای ثابت و اختیاری هستند که ساختار آغازگرها در این نشانگر مشابه آغازگرهای چند شکلی تکثیرشده مرتبط با توالی (SRAP^۱) است. آغازگرهای ثابت شامل سه قسمت توالی پرکننده که نوکلئوتیدها، هسته و سه نوکلئوتید انتخابی است. که در هسته آغازگرهای ثابت توالی‌های مبتنی بر EST از بخش‌های بیان شونده ژن که به صورت محافظت شده و بخش‌های عملکردی ژن را در بر می‌گیرد، قرار می‌گیرد. آغازگرهای اختیاری در TRAP بیشتر تمایل به اتصال به نواحی اگزونی در طول تکثیر PCR دارند. حذف و اضافه‌ها در این نواحی مطمئناً توزیع‌های مختلفی از محصولات تکثیر شده را تولید خواهد کرد. قطعات تکثیر شده توسط نشانگرهای TRAP اکثراً اختصاصی بوده و دارای اندازه ۵۰ تا ۹۰۰ جفت‌باز است که در ژل اکریل‌آمید جداسازی می‌شوند. این نشانگرها از نوع غالب بوده و دارای چندشکلی، فراوانی و تکرارپذیری بالایی هستند که این خصوصیات، نشانگرهای TRAP را برای نقشه‌یابی و بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی مناسب می‌کند (Poczail et al. 2013).

تحقیقات بسیار اندکی با استفاده از نشانگرهای TRAP در گندم انجام گرفته است. در تحقیقی، شناسایی ارتباط اجزاء عملکرد تحت تنش خشکی در گندم نان با استفاده از نشانگرهای TRAP و SRAP انجام شد. همه مکان‌های صفات کمی (QTL) اثر افزایشی بر روی صفات ژنومی نشان دادند و با توجه به این ارتباط بیان کردند که این نشانگرها می‌توانند برای بهنژادی گندم در مقابل تنش خشکی مفید باشند (Moustafa et al. 2014). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵۱ رقم باقلا جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جهان از نشانگرهای TRAP استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده درصد چندشکلی نسبتاً بالایی با میانگین برابر ۵۰/۳ درصد را نشان دادند، همچنین تجزیه خوشه‌ای توانست بین تنوع ژنتیکی و منشاء جغرافیایی ارتباط برقرار کند (Kown et al. 2010). همچنین در مطالعه‌ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷۷ اینبرد لاین آفتابگردان از نشانگر TRAP استفاده گردید. تجزیه خوشه‌ای گونه‌ها را به دو گروه اصلی آجیلی و روغنی تقسیم کرد و نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی معنی‌داری بین اینبرد لاین‌ها وجود دارد (Yue et al. 2009). در پژوهشی Singh et al. (2017) برای بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین ۲۵ گونه نیشکر از ۱۸ آغازگر TRAP استفاده کردند و با توجه به نتایجی که بدست آوردند اذعان داشتند، این نشانگرها برای برنامه‌های بهنژادی و دورگ‌گیری بسیار مفید هستند. در مطالعه‌ای دیگر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیب نیشکر از آغازگرهای TRAP طراحی شده براساس ژن‌های ساکارز و مقاوم به سرما استفاده شد و گزارش نمودند که با وجود میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی پایین ۰/۲۴ برای آغازگرها، تجزیه خوشه‌ای توانست گونه‌ها را از هم متمایز کند. با توجه به نتایج آزمایش، این محققین اظهار کردند که نشانگرهای TRAP برای مطالعه تنوع ژنتیکی سایر ژرم‌پلاسماهای گیاهی می‌تواند مفید باشد (Alwala et al. 2006).

^۱- Sequence-related amplified polymorphism; SRAP

آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرمپلاسم‌های اجدادی و وحشی معیاری مناسب و لازم برای استفاده از آن‌ها در شناسایی و انتقال ژن‌ها در بهبود گیاهان زراعی می‌باشد (Schneider et al. 2008). در این راستا تعیین روابط و سطح تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌های وحشی آزیلوپس با استفاده از نشانگرهای ملکولی TRAP که مبتنی بر نواحی EST هستند، هدف این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی: در این تحقیق تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌های وحشی آزیلوپس جمع‌آوری شده از ۱۴ استان (لرستان، ایلام، فارس، آذربایجان شرقی، کرمانشاه، چهارمحال بختیاری، اردبیل، زنجان، گیلان، خوزستان، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران، گلستان، کردستان) ایران (تهیه شده از بانک ژن غلات دانشگاه ایلام) متشکل از هشت گونه *Aegilops caudata* (۸ توده)، *Aegilops crassa* (۱۴ توده)، *Aegilops cylandrica* (۱۹ توده)، *Aegilops neglecta* (۱۱ توده)، *Aegilops speltoides* (۶ توده)، *Aegilops tauschii* (۲۰ توده)، *Aegilops triuncialis* (۱۶ توده)، *Aegilops umbelulata* (۱۷ توده) در مجموع ۱۱۱ توده مورد مطالعه قرار گرفت. بذر توده‌های تمام گونه‌ها در گلدان‌های جداگانه کشت و نمونه‌های برگ‌ی در مرحله ۶-۵ برگ‌ی از برگ‌های جوان در مقادیر ۰/۲ گرم تهیه و جهت نگهداری به دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

استخراج و تعیین کمیت و کیفیت DNA: برای استخراج DNA از بافت برگ‌ی از روش Doyle and Doyle

(1987) با دستورالعمل CTAB تغییر یافته استفاده شد. تعیین کیفیت و کمیت DNA به ترتیب با استفاده از دو روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری با نانودراپ (مدل THERMO; 2000C) انجام شد. غلظت DNA هر نمونه برحسب نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه و سپس رقیق سازی به ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای یکسان نمودن غلظت‌ها انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای TRAP: اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط Master mix (شرکت Amplicon انگلیس) (حاوی Taq DNA polymerase، dNTPها، $MgCl_2$ ، بافر PCR)، یک میکرولیتر (۰/۴ میکرولیتر) آغازگر ثابت، یک میکرولیتر (۰/۴ میکرولیتر) آغازگر اختیاری، یک میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) DNA و ۹/۵ میکرولیتر H_2O تهیه شدند. برای انجام این واکنش از ۲۴ ترکیب (۳ آغازگر اختیاری در ۸ آغازگر ثابت) آغازگری TRAP سنتز شده شرکت پیشگام استفاده شد (جدول ۲). پس از تهیه مخلوط‌های واکنش روی یخ، بلافاصله به دستگاه ترموسایکر (مدل Techne. TC-5000 انگلیس) منتقل شدند و از برنامه چرخه دمایی ارائه شده در جدول (۱) استفاده گردید. جهت بررسی محصولات حاصل از PCR از ژل پلی‌اکریل‌آمید (ژل بالا و پایین به ترتیب ۵ و ۱۰ درصد) و برای رنگ آمیزی با نقره از روش تغییر یافته Blum (۱۹۸۷) استفاده شد.

جدول ۱. برنامه چرخه‌های دمایی PCR برای آغازگرهای TRAP

Table 1. PCR temperature cycles program for TRAP primers

مراحل Steps	تعداد چرخه No. of cycle	زمان (ثانیه) Time (s)	حرارت (درجه سانتیگراد) Temperature (°C)
واسرشت‌سازی Denaturation	1	180	94
واسرشت‌سازی Denaturation		45	94
اتصال آغازگر Annealing	5	50	36-38
بسط Extention		70	72
واسرشت‌سازی Denaturation		50	94
اتصال آغازگر Annealing	35	50	53-55
بسط Extention		90	72
بسط نهایی Final extention	1	600	72

تجزیه و تحلیل داده‌ها: قطعات تکثیر شده براساس وجود باند (۱) و عدم وجود باند (۰) امتیازدهی شدند. محتوای چندشکلی

اطلاعات $(PIC^1=1-\sum Pi^2)$ و شاخص نشانگری $(MI^2= PIC \times EMR, EMR= N_p (N_p / N)^4)$ به منظور بررسی کارایی نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه محاسبه گردید، در این فرمول‌ها Pi - فراوانی آلل و N_p و N به ترتیب تعداد باندهای چندشکل و تعداد کل باندهای حاصل از یک آغازگر است (Powell et al. 1996). پارامترهای بررسی خویشاوندی شاخص تعداد آلل مشاهده شده (Na^3) ، تعداد آلل موثر (Ne^4) ، تنوع شانون (I^5) ، تنوع ژنی نی (He^6) ، هتروزیگوسیتی مورد مشاهده (uHe^7) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx ver 6.501 و شاخص‌های تخمین جریان ژنی تمایز بین جمعیت (Gst^8) ، جریان ژنی (Nm^9) و هتروزیگوسیتی کل (Ht^{10}) با استفاده از نرم افزار POPGENE 32 محاسبه گردید. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ها، تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) انجام شد. ماتریس فاصله ژنتیکی محاسبه و دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA به منظور گروه‌بندی توده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc 2 رسم شد. در تایید تجزیه خوشه‌ای، نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx ver 6.501 رسم گردید.

¹- Polymorphism information content; PIC

²- Marker index; MI

³-Observed number of alleles; Na

⁴-Effective number of alleles; Ne

⁵-Shannon's information index; I

⁶-Nei's gene diversity; He

⁷-Unbiased Expected Heterozygosity; uHe

⁸-Inter-population differentiation; Gst

⁹-Gene flow; Nm

¹⁰-Total Heterozygosity; Ht

نتایج و بحث

بررسی چند شکلی و کارایی نشانگرهای TRAP: از مجموع ۲۴ ترکیب آغازگری TRAP بررسی شده در این مطالعه، ۲۳ آغازگر دارای تکثیر مناسب بوده و امتیازدهی شدند. نمونه‌ای از الگوی باندی آغازگرهای TRAP در شکل (۱) نشان داده شده است. در مجموع ۸۰۴ قطعه با طول متفاوت امتیازدهی شد که از بین آن‌ها ۷۹۵ قطعه دارای چند شکلی بودند و متوسط قطعات تکثیر شده ۳۴/۹۱ قطعه برای هر آغازگر بود. میانگین PIC برابر ۰/۹۵ و کمترین و بیشترین میزان این شاخص به ترتیب مربوط به آغازگرهای TRAP20 (۰/۹۲) و TRAP10 (۰/۹۷) بود. همچنین میانگین شاخص نشانگری (MI) برابر ۱۰/۷۷ و کمترین و بیشترین میزان این شاخص به ترتیب مربوط به آغازگرهای TRAP3 (۶/۹۵) و TRAP17 (۱۷/۳۴) بود (جدول ۲).

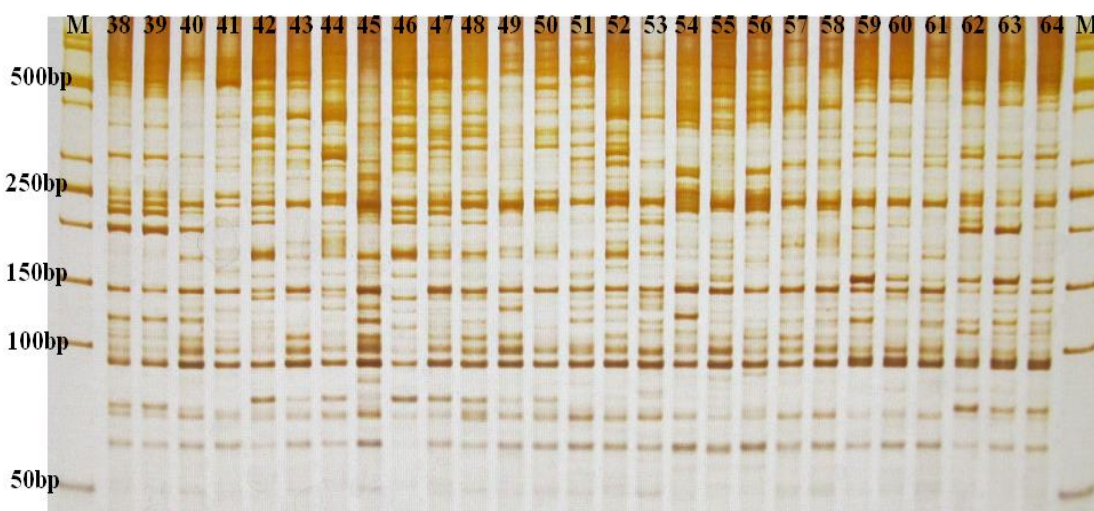
جدول ۲. مشخصات و ترکیب آغازگرهای TRAP و شاخص‌های محاسبه شده برای آنها

Table 2. Characteristics and composition of TRAP primers and calculated indices for them

نام آغازگر Primer name	ترکیب آغازگر Primer composition	توالی آغازگر اختیاری (5'→3')	توالی آغازگر ثابت (5'→3')	شاخص چند شکلی MI	درصد چندشکلی اطلاعات PIC	تعداد باند چندشکل NPB	تعداد کل باند TAB
TRAP1	M1+Mir398	GACTGCGTACGAATTCAC	TATAGCTGTGTTCTCAGGTCG	15.85	0.96	100	28
TRAP2	M1+Mir160b2f	GACTGCGTACGAATTCAC	CTCCCTGTATGCCACTCATC	16.97	0.95	100	25
TRAP3	M1+Mir169gR	GACTGCGTACGAATTCAC	GGCTGCGAAGAAATGAATAA	6.95	0.94	96.77	30
TRAP4	M1+Sos1.1R	GACTGCGTACGAATTCAC	TCATCTTCTCCTACCGCCCTGC	8.53	0.93	100	21
TRAP5	M1+MnSoD.f	GACTGCGTACGAATTCAC	CAGAGGGTGCTGCTTACAA	10.51	0.95	100	37
TRAP6	M1+Catalase	GACTGCGTACGAATTCAC	TGTACTACTCGGACGACAAG	12.53	0.95	100	30
TRAP7	M2+Mir398	GACTGCGTACGAATTGAC	TATAGCTGTGTTCTCAGGTCG	11.79	0.95	100	25
TRAP8	M2+Mir160b2f	GACTGCGTACGAATTGAC	CTCCCTGTATGCCACTCATC	8.69	0.94	100	29
TRAP9	M2+Mir169gR	GACTGCGTACGAATTGAC	GGCTGCGAAGAAATGAATAA	8.59	0.95	100	37
TRAP10	M2+Sos1.1R	GACTGCGTACGAATTGAC	TCATCTTCTCCTACCGCCCTGC	9.65	0.97	100	49
TRAP11	M2+MnSoD.f	GACTGCGTACGAATTGAC	CAGAGGGTGCTGCTTACAA	9.82	0.95	97.56	40
TRAP12	M2+ Catalase	GACTGCGTACGAATTGAC	TGTACTACTCGGACGACAAG	10.40	0.94	100	26
TRAP13	em2+Mir398.f	GACTGCGTACGCACGCTGC	TATAGCTGTGTTCTCAGGTCG	10.55	0.95	100	38
TRAP14	em2+Mir160b2f	GACTGCGTACGCACGCTGC	CTCCCTGTATGCCACTCATC	9.93	0.94	100	34
TRAP15	em2+Mir169gR	GACTGCGTACGCACGCTGC	GGCTGCGAAGAAATGAATAA	10.51	0.95	100	38
TRAP16	em2+Sos1.1R	GACTGCGTACGCACGCTGC	TCATCTTCTCCTACCGCCCTGC	14.71	0.96	100	46
TRAP17	em2+MnSoD.f	GACTGCGTACGCACGCTGC	CAGAGGGTGCTGCTTACAA	17.34	0.96	97.95	48
TRAP18	em2+ Catalase	GACTGCGTACGCACGCTGC	TGTACTACTCGGACGACAAG	12.88	0.96	98.18	54
TRAP19	M3+Mir160b2f	GACTGCGTACGCACGCGAC	TATAGCTGTGTTCTCAGGTCG	5.85	0.93	0.96	24
TRAP20	M3+Mir169gR	GACTGCGTACGCACGCGAC	CTCCCTGTATGCCACTCATC	5.94	0.92	100	28
TRAP21	M3+Sos1.1R	GACTGCGTACGCACGCGAC	GGCTGCGAAGAAATGAATAA	11.65	0.96	95.45	42
TRAP22	M3+MnSoD.f	GACTGCGTACGCACGCGAC	TCATCTTCTCCTACCGCCCTGC	5.53	0.96	96.15	25
TRAP23	M3+ Catalase	GACTGCGTACGCACGCGAC	CAGAGGGTGCTGCTTACAA	12.46	0.96	100	41
میانگین				10.77	0.95	99.04	34.9 1

شاخص محتوای چندشکلی اطلاعات نشان دهنده قابلیت سیستم نشانگری در تعیین اثر بخشی و پتانسیل آغازگرهای استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی و قدرت تمایز نمونه‌های مورد بررسی است (Powell et al. 1996). به عبارت دیگر شاخص PIC احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر، بین دو فرد می‌باشد که به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است (Prevost et al. 1999). در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ نیشکر با ۱۸ آغازگر TRAP شاخص PIC را از ۰/۲۸

تا ۰/۸۰ در بین آغازگرها گزارش کرده‌اند (Singh et al. 2017). در ارزیابی روابط فیلوژنتیکی ۶۴ ژنوتیپ نیشکر با استفاده از ۱۶ آغازگر TRAP، میانگین PIC را ۰/۲۸ و میزان چندشکلی را از ۳۱/۹۶ تا ۶۶/۱۴ درصد گزارش کردند (Suman et al. 2012). همچنین در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ نیشکر با ۱۸ نشانگر ترکیبی TRAP، با وجود محتوای چندشکلی پایین، تجزیه خوشه‌ای توانست گونه‌ها را کاملاً از یکدیگر متمایز کند (Alwala et al. 2006). با مقایسه نتایج این تحقیق با گزارشات قبلی، میانگین PIC برابر ۰/۹۵ در این مطالعه کارائی و قدرت نشانگرهای TRAP را در آژیلوپس نشان می‌دهد.



شکل ۱. الگوی بانندی تکثیر شده توسط ترکیب آغازگری M2+mir169gR در برخی از توده‌های آژیلوپس با استفاده از ژل اکریل آمید. M: نشانگر اندازه ملکولی 50bp (Sinaclon)

Figure 1. Banding pattern amplified by M2+mir169gR primers composition in some *Aegilops* accessions using acrylamide gel. M: 50bp ladder (Sinaclon)

تجزیه واریانس ملکولی و پارامترهای ژنتیکی در جمعیت: نتایج تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) با نشانگرهای TRAP، واریانس بین گروهی را ۶۰ درصد و واریانس درون گروهی را ۴۰ درصد نشان داد (جدول ۳) و بیانگر این نتیجه است که تفاوت‌های موجود در بین گونه‌ها بیشتر از تنوع بین توده‌های درون گونه‌های آژیلوپس مورد مطالعه می‌باشد. با تخمین جریان ژنی بین گونه‌های آژیلوپس با استفاده از نشانگر TRAP، میزان جریان ژنی (Nm) معادل ۰/۴۴ و شاخص تمایز بین افراد (Gst) برابر ۰/۵۲ محاسبه شد. همچنین میزان شاخص هتروزایگوسیتی کل (Ht) برابر ۰/۲۸، مقدار شاخص تثبیت (F_{st}^1) برابر ۰/۵۳ و مقدار شاخص هتروزایگوسیتی درون توده‌ای (H_s^2) برابر با ۰/۱۳ بدست آمد. با کاهش مقدار F_{st} مقدار Nm افزایش می‌یابد، به

¹-Fixation index; F_{st}

²-Heterozygosity within populations; H_s

طوری که اگر $Nm < 1$ باشد تمایز بین افراد بیشتر و اگر $Nm > 1$ باشد تمایز افراد اندک است (Wright et al. 1951). همچنین میزان جریان ژنی بالا می‌تواند دلیلی بر وجود منشاء مشترک بین ژنوتیپ‌ها باشد (Basirnia et al. 2016).

جدول ۳. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) توده‌های آزیلوپس با استفاده از نشانگرهای TRAP

Table 3. Molecular Analysis of Variance of *Aegilops* accessions using TRAP markers

درصد واریانس	واریانس برآورد شده	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S.O.V)
Variance %	Estimated Variance	(MS)	(SS)	(df)	(S.O.V)
60	80.20	1148.17	8037.25	7	بین گونه‌ها (Among species)
40	54.26	54.26	5588.90	103	درون گونه‌ها (Within species)
100			13626.16	110	کل Total

پارامترهای ژنتیکی برآورد شده در توده‌های گندم آزیلوپس با استفاده از نشانگرهای TRAP (جدول ۴)، نشان داد که بیشترین میزان Na (۱/۰۷)، Ne (۱/۲۶)، I (۰/۲۳) و uHe (۰/۱۶) مربوط به گونه *Ae. truncialis* بود. حداکثر شاخص تنوع ژنی نی (۰/۱۴) مربوط به گونه‌های *Ae. truncialis*، *Ae. umbelulata* و *Ae. neglecta* و حداقل مقدار شاخص‌های تنوع ژنی نای (۰/۰۹)، تنوع شانون (۰/۱۴)، تعداد آل موثر (۱/۱۶) و تعداد آل مشاهده شده (۰/۷۹) برای گونه *Ae. crassa* مشاهده شد. این اعداد نشان دهنده بیشترین تنوع در گونه‌های *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* و حداقل تنوع در گونه *Ae. crassa* هستند. در توافق با این نتایج، پور ابوقداره و همکاران (Pouraboughadareh et al. 2018) نیز با استفاده از نشانگرهای SCoT بیشترین تنوع ژنتیکی را در گونه‌های *T. urum*، *T. boeoticum* و *Ae. cylandrica* و *Ae. umbelulata* مشاهده کردند.

گروه‌بندی و بررسی روابط ژنتیکی بین گونه‌های آزیلوپس با استفاده از نشانگرهای TRAP: ماتریس

تشابه و فاصله ژنتیکی نای بین گونه‌های مختلف آزیلوپس محاسبه شد که در جدول (۵) ارائه شده است. کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۷۵) مابین گونه *Ae. crassa* با گونه‌های *Ae. cylandrica* و *Ae. umbelulata* و بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸۹) بین گونه *Ae. triuncialis* و *Ae. umbelulata* مشاهده شد. این تشابه دور از انتظار نبود چرا که گونه *Ae. umbelulata* والد دهنده ژنوم U به گونه *Ae. triuncialis* می‌باشد (Van slageren 1994). جهت گروه‌بندی توده‌های گونه‌ها از روش UPGMA استفاده شد. براساس گروه‌بندی (شکل ۲) حاصل ۱۱۱ توده آزیلوپس، به هفت گروه اصلی تقسیم شدند. گروه اول شامل تمام توده‌های گونه *Ae. caudata*، گروه دوم تمام توده‌های متعلق به گونه *Ae. speltoides* و گروه سوم شامل تمام توده‌های متعلق به گونه *Ae. crassa* بود.

جدول ۴. برآورد پارامترهای ژنتیکی توده‌های اژیلوپس با استفاده از نشانگرهای TRAP

Table 4. Estimation of genetic parameters in *Aegilops* accessions using TRAP markers

Na	Ne	I	H	uHe	ژنوم	تعداد توده	گونه
					Genome	Variants	Specious
					No		
0.89	1.21	0.18	0.12	0.13	C	8	<i>Ae.Caudata</i>
0.79	1.16	0.14	0.09	0.09	DM	14	<i>Ae.crassa</i>
0.95	1.21	0.19	0.12	0.12	DC	19	<i>Ae.cylandrica</i>
1.04	1.25	0.22	0.14	0.15	UM	11	<i>Ae.neglecta</i>
0.90	1.23	0.20	0.13	0.14	S	6	<i>Ae.speltoides</i>
1.03	1.22	0.20	0.13	0.13	D	20	<i>Ae.tauschii</i>
1.07	1.26	0.23	0.15	0.16	UC	16	<i>Ae.triuncialis</i>
1.00	1.24	0.22	0.14	0.15	U	17	<i>Ae.umbelulata</i>
0.96	1.22	0.198	0.127	0.134	Mean میانگین	111	

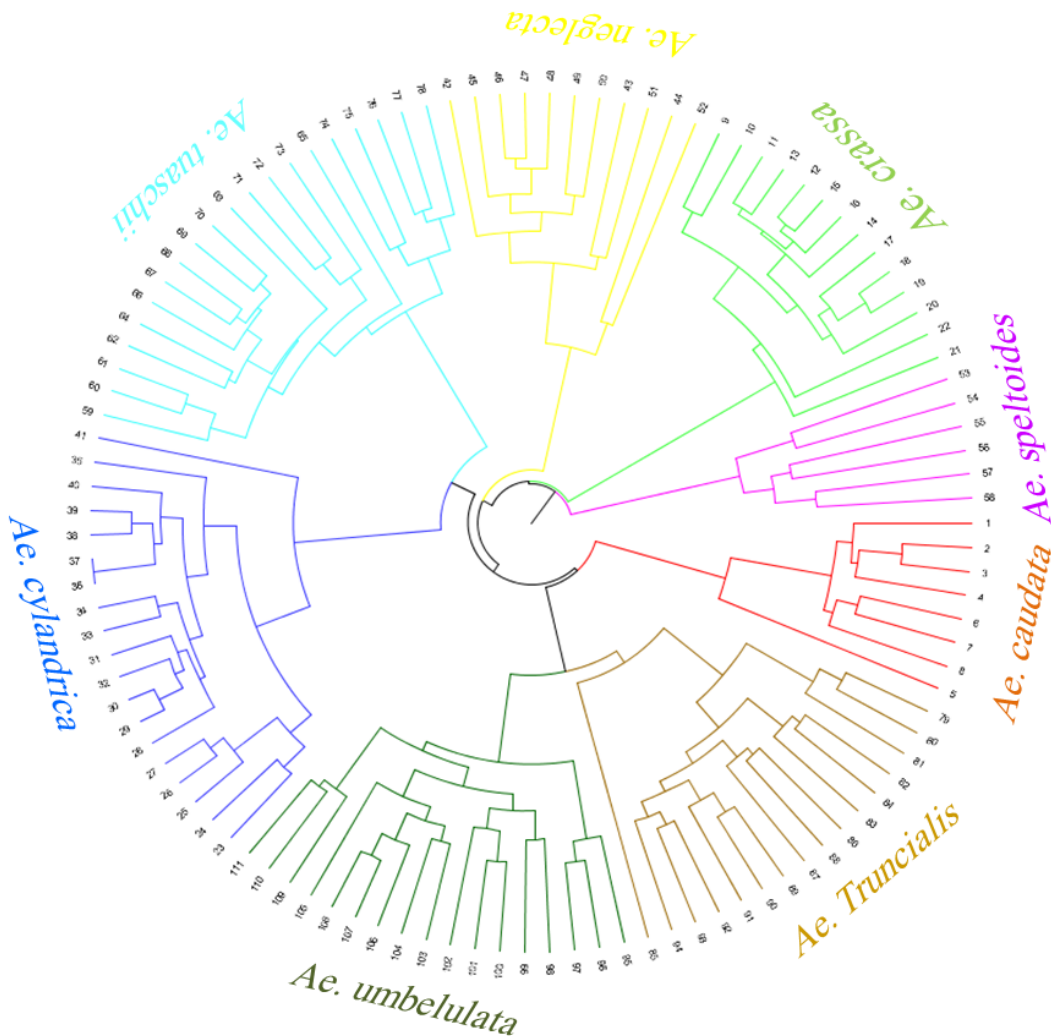
Na و Ne به ترتیب نمایانگر هتروزیگوسیتی مورد انتظار، تنوع ژنی نی، تنوع ژنی شانون، تعداد آلل تعداد آلل موثر و تعداد آلل مشاهده شده می‌باشد.

جدول ۵. ضرایب تشابه ژنتیکی بین گونه‌های اژیلوپس بر اساس نشانگرهای TRAP

Table 5. Coefficients of genetic similarity among *Aegilops* species accessions based on TRAP markers

	<i>Ae. caudata</i>	<i>Ae. crassa</i>	<i>Ae. cylandrica</i>	<i>Ae. neglecta</i>	<i>Ae. speltoides</i>	<i>Ae. tauschii</i>	<i>Ae. triuncialis</i>	<i>Ae. umbelulata</i>
<i>Ae. caudata</i>	-	0.77	0.81	0.81	0.78	0.78	0.83	0.80
<i>Ae. crassa</i>		-	0.75	0.77	0.76	0.78	0.76	0.75
<i>Ae. cylandrica</i>			-	0.82	0.80	0.83	0.82	0.79
<i>Ae. neglecta</i>				-	0.80	0.80	0.82	0.81
<i>Ae. speltoides</i>					-	0.81	0.80	0.78
<i>Ae. tauschii</i>						-	0.83	0.79
<i>Ae. triuncialis</i>							-	0.89

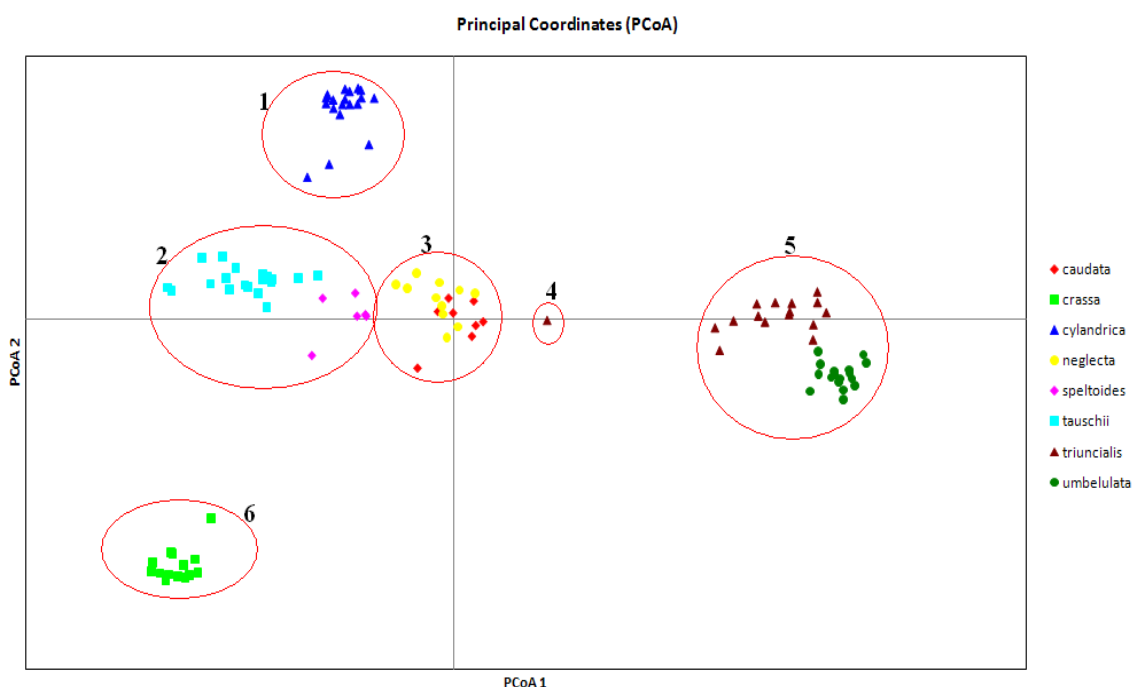
در گروه چهارم تمام توده‌های گونه *Ae. neglecta* و کل توده‌های گونه *Ae. tauschii* در گروه پنجم قرار گرفتند. در گروه ششم تمام توده‌های *Ae. cylindrica* و در گروه هفتم کلیه توده‌های دو گونه *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* قرار گرفتند که گروه هفتم به دو زیرگروه هر کدام متعلق به توده‌های یک گونه تفکیک شدند. گروه‌بندی توده‌های داخل هر گروه به زیر گروه‌ها اگر چه به‌طور کامل براساس ریشه جغرافیایی آن‌ها نبود اما شباهت‌های مبتنی بر جغرافیای گونه‌ها در داخل هر زیر گروه وجود داشت.



شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای برای توده‌های اَیْلُوپس با استفاده از نشانگرهای TRAP

Figure 2. Cluster analysis for *Aegilops* accessions using TRAP markers

قرار گرفتن *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* در یک گروه ولی در زیرگروه‌های جداگانه به علت داشتن ژنوم U مشترک، به همراه *Ae. caudata* که والد دهنده ژنوم C به گونه *Ae. truncialis* است در گروه جداگانه ولی در کنار این دو گونه دور از انتظار نبود. قرار گرفتن *Ae. speltoides* در یک گروه جداگانه و دور از سایر گونه‌ها با نتایج بدست آمده از مطالعات PourAboughadareh et al. (2018) نیز مطابقت داشت. همچنین مطالعات Thomas et al. (2010) بر روی *Aegilops* یونانی با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD این نتیجه را تایید کرد. از طرف دیگر قرار گرفتن *Ae. tauschii* و *Ae. cylandrica* در گروه‌های جداگانه ولی در خوشه یکسان می‌تواند به این علت باشد که *Ae. tauschii* والد دهنده ژنوم D به *Ae. cylandrica* می‌باشد (Slageren et al. 1994).



شکل ۳. نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) توده‌های آژیلوپس با استفاده از نشانگرهای TRAP

Figure 3. Biplot of principal coordinate analysis (PCoA) for *Aegilops* accessions using TRAP markers

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با نشانگرهای TRAP: با توجه به نتایج بدست آمده از بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۳)، مولفه اول ۲۰/۶۴، مولفه دوم ۱۵/۵۰ و در مجموع ۳۶ درصد از تغییرات کل را توجیه کردند. این نتیجه نشان دهنده نمونه‌برداری گسترده نشانگر TRAP از کل ژنوم می‌باشد. الگوی پراکنش و گروه‌بندی توده‌ها و گونه‌ها در

نمودار دو بعدی ترسیم شده تا حدود زیادی نتایج گروه‌بندی بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد. در الگوی پراکنش حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۳) تقریباً همه توده های گونه‌ها در گروه‌های متمرکز در ربع اول و دوم واقع شدند، اما تمام توده‌های دو گونه *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* جدا از سایر گونه‌ها در ربع سوم و چهارم در کنار یکدیگر در یک گروه قرار گرفتند که این الگوی پراکنش با ساختار ژنومی آن‌ها مطابقت می‌کند.

نتیجه‌گیری: شاخص‌های ژنتیکی نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق تنوع ژنتیکی بالایی را در بین و درون گونه‌ها نشان داد، به طوری‌که نتایج تجزیه واریانس ملکولی تنوع ژنتیکی بالاتر در بین گونه‌ها را نشان داد که این نتیجه نمایانگر جریان ژنی و Fst پایین در بین گونه‌ها و نیز تاییدکننده تمایز ژنتیکی بالا در بین گونه‌ها بود. با توجه به تجزیه به مختصات اصلی نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق توزیع یکنواخت و مناسبی را در کل ژنوم داشته و توانستند از سراسر ژنوم تکثیر قطعه انجام دهند. قرار گرفتن *Ae. umbelulata* و *Ae. truncialis* در یک گروه ولی در زیرگروه‌های جداگانه در تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی و با فاصله زیاد از سایر گونه‌ها نشان دهنده شباهت ژنتیکی بالای این دو گونه می‌باشد.

سپاسگزاری: بدین وسیله از دانشگاه بین‌المللی امام خمینی^(۵) جهت تامین هزینه‌های مالی این تحقیق و دانشگاه ایلام بابت تهیه مواد گیاهی تشکر می‌گردد.

منابع

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از real time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۱۱-۱۲۲.

محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. مجله علوم دامی ایران ۴۲(۴)، ۳۳۷-۳۴۴.

References

Alwala S, Andru S, Jie AA, et al. (2006) Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Sci* 46, 448-455.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. *Modern Genet J* 5 (2), 49-56.

Basirnia A, Darvishzadeh R, Abdollahi Mandoulakani B (2016) Retrotransposon insertional polymorphism in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Biosyst- Int J Deal Aspect Plant Biol* 150(4), 641-652.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.

- Doyle JJ, Doyle JK (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin* 19, 11-15.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic & Appl Sci* 4 (12), 5758-5760.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA (2002) Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genetics* 160(4), 1651-1659.
- Kilian B, Mammen K, Millet E, et al. (2011) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Cereals*, Springer, Chapter 1.
- Kimber G, Feldman M (1987) *Wild wheat, an introduction*. College of Agriculture University of Missouri, Columbia. 142 pp.
- Kwon SJ, Hu J, Coyne CJ (2010) Genetic diversity and relationship among faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm entries as revealed by TRAP markers. *Plant Genet Res* 8(3), 204-213.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. *J Res Dev* 5 (2), e154.
- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani sheep using real time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (In Persian).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. *Iran J Anim Sci* 42 (4), 337-344 (In Persian).
- Moustafa KA, Saleh M, Al-Doss AA, et al. (2014) Identification of TRAP and SRAP markers linked with yield components under drought stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Omics* 7(4), 253.
- Poczai P, Hyvonen J, Taller J, et al. (2013) Phylogenetic analyses of Teleki grapevine rootstocks using three chloroplast DNA markers. *Plant Mol Biol Rep* 31(2), 371-386.
- Poczai P, Varga I, Laos M, et al. (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9(1), 6.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, et al. (2018) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some *Aegilops* and *Triticum* species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. *Plant Biosyst-International J Deal Aspect Plant Biol* 152(4), 694-703.
- Powell W, Morgante M, Andre C, et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2, 225-238.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98, 107-112.

- Salem KFM, El-zanaty AM, Esmail RM (2008) Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatellite markers. *World J Agric Sci* 4, 538-544.
- Schneider A, Molnar I (2008) Utililisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163, 1-19.
- Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M (2016) Typing of clostridium perfringens isolated from broiler chickens using multiplex PCR. *Genet 3rd Millennium* 14 (4), 4368-4374.
- Singh RB, Singh B, Singh RK (2017) Study of genetic diversity of sugarcane (*Saccharum*) species and commercial varieties through TRAP molecular markers. *Indian J Plant Physiol* 22(3), 332-338.
- Suman A, Ali K, Arro J, et al. (2012) Molecular diversity among members of the Saccharum complex assessed using TRAP markers based on lignin-related genes. *BioEnergy Res* 5(1), 197-205.
- Tanksley SD, McCouch SR (1997) Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277, 1063-1066.
- Thomas KG, Bebeli PJ (2010) Genetic diversity of Greece *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. *Mol Phylogent Evol* 56, 951-961
- Van Slageren MW (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (jaub. And Spach) Eig (*poaceae*). Wageningen Agricultural University. Wageningen, the Netherland, pp: 94-107.
- Wang G, Miyashita NT, Tsunewaki K (1997) Plasmon analyses of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCR) analyses of organellar DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (14), 570-577.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15, 323-354.
- Yue B, Cai X, Vick BA, Hu J (2009) Genetic diversity and relationships among 177 public sunflower inbred lines assessed by TRAP markers. *Crop Sci* 49(4), 1242-1249.

