

Investigation of genetic diversity and study of population structure in *Aegilops* species with U genome by CBDP markers

Ali Sajjad Bokaei 

Post Graduated Ph.D. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. In addition, Researcher, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: as.bokaei@spii.ir

Omid Sofalian 

*Corresponding author. Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: sofalian@gmail.com

Behzad Sorkhilalehloo 

Assistant Professors, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: bsorkhi@gmail.com

Ali Asghari 

Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. E-mail address: a_asghari@uma.ac.ir

Alireza Pour-Aboughadareh 

Assistant Professors, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: a.poraboughadareh@gmail.com

Abstract

Objective

Aegilops species possessing the U genome are the most widely distributed species in the world. Considering the limitation in the genetic diversity in cultivated wheat, the use of wild relatives and other species of *Aegilops* can be provided a rich and diverse gene pool of new and ideal alleles for breeders. Therefore, the main goals of the present study were investigation of genetic diversity and population structure in *Aegilops* accessions collected from different regions of Iran using the CBDP markers.

Materials and methods

In this study, the genetic diversity among 77 *Aegilops* accessions collected from 18 provinces in Iran and belonging to five species including *Ae. biuncialis* (UUMM genome), *Ae. columnaris*

(UUMM genome) *Ae. Neglecta* (UUMM genome), *Ae. triuncialis* (UUCG genome), *Ae. umbellulata* (UU genome), was evaluated using 15 CBDP primers. The obtained molecular data were subjected to statistical analyses using GenAlEx ver. 6.502, DARwin ver. 6, and Structure ver. 2.3.4 softwares.

Results

A total of 189 polymorphic fragments were amplified using 15 used CBDP primers (95.27%). The PIC index ranged from 0.28 (CBDP15) to 0.42 (CBDP-2 CBDP-4) with an average of 0.35. The results of analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the highest proportion of genetic variance referred to within species (76%). Among all species, *Ae. triuncialis* showed the highest values of genetic parameters. The highest level of genetic similarity was found between *Ae. biuncialis* with *Ae. columnaris* (0.905) and *Ae. biuncialis* with *Ae. neglecta* (0.879). Although cluster analysis based on CBDP data classified all accessions into three main groups the grouping pattern was exactly in accordance with the genomic constitution of species. Moreover, the clustering pattern was confirmed by a principal coordinate's analysis (PCoA). The population structure analysis further confirmed the results obtained from the cluster analysis and PCoA, so all studied accessions were grouped based on their genomic structure, degree of genetic similarity, and geographic similarities.

Conclusions

Results of the present study showed a high usefulness of CBDP markers in evaluating the genetic diversity in the *Aegilops* germplasm. Therefore, it seems that this marker technique can be used in programs related to the preparation of genetic maps and molecular phylogenetic studies. Also, the existence of high genetic diversity among some Iranian *Aegilops* species can provides a significant prospect for breeders to use them in pre-breeding programs in wheat.

Keywords: *Aegilops*, population structure analysis, genetic diversity, molecular markers.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Bokaei AS, Sofalian O, Sorkhilalehloo B, Asghari A, Pour-Aboghadareh A (2024) Investigation of genetic diversity and study of population structure in *Aegilops* species with U genome by CBDP markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 69-90.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 69-90.

DOI: 10.22103/jab.2024.22506.1524

Received: January 19, 2024.

Received in revised form: March 17, 2024.

Accepted: March 18, 2024.


Published online: May 31, 2024.

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



© the authors

بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار جمعیت در گونه‌های آزیلوپس حاوی ژنوم U با استفاده از نشانگرهای CBDP

علی سجاد بکائی 


فارغ التحصیل دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. محقق،
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
رایانامه: as.bokaei@spii.ir

امید سفالیان 


*نویسنده مسئول: استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
رایانامه: sofalian@gmail.com

بهزاد سرخی لله لو 

استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه:
bsorkhi@gmail.com

علی اصغری 

استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. رایانامه:
a_asghari@uma.ac.ir

علیرضا پورابوقداره 

استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه:
a.poraboghadareh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸

چکیده

هدف: گونه‌های آزیلوپس حاوی ژنوم U دارای بیشترین پراکنش در سطح دنیا می‌باشند و با توجه به محدودیت تنوع ژنتیکی در
گندم‌های زراعی اصلاح شده، استفاده از این خوی‌شاوندان وحشی و سایر گونه‌های آزیلوپس می‌تواند به عنوان منبع ژنی غنی و
متنوع از آلل‌های جدید و ایده‌ال برای به‌نژادگران مورد استفاده قرار گیرد. از این‌رو، هدف این تحقیق ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی
روابط و ساختار جمعیت در گونه‌های آزیلوپس جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای CBDP بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۷۷ نمونه ژنتیکی وحشی اژیلوپس جمع‌آوری شده از ۱۸ استان ایران و متعلق به پنج گونه *Ae. biuncialis* (ژنوم UUMM)، *Ae. columnaris* (ژنوم UUMM)، *Ae. neglecta* (ژنوم UUMM)، *Ae. triuncialis* (ژنوم UUMM) و *Ae. umbellulata* (ژنوم UU) با استفاده از ۱۵ آغازگر CDBP مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از جمع‌آوری داده‌های مولکولی به دست آمده تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزارهای GenAlEx ver. 6.502، DARwin، Structure ver. 2.3.4 و ver. 6 انجام شد.

نتایج: با توجه به نتایج به دست آمده، ۱۵ آغازگر CDBP در مجموع ۱۸۹ قطعه چند شکل (۹۵/۲۷ درصد) تکثیر نمودند. شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در آغازگرهای مورد مطالعه، دارای دامنه تغییرات ۰/۲۸ (CDBP15) تا ۰/۴۲ (CDBP-2) و (CDBP-4) و با میانگین ۰/۳۵ بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بیشترین درصد واریانس ژنتیکی را درون گونه‌ها (۷۶ درصد) نشان داد. بررسی شاخص‌های ژنتیکی نشان داد گونه *Ae. triuncialis* از تنوع بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار بود. بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین *Ae. biuncialis* و *Ae. columnaris* (۰/۹۰۵) و *Ae. biuncialis* و *Ae. neglecta* (۰/۸۷۹) مشاهده گردید. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های به دست آمده منجر به تفکیک کلیه نمونه‌های ژنتیکی مورد بررسی در سه گروه اصلی شد. الگوی گروه‌بندی به وجود آمده دقیقاً منطبق با ساختار ژنومی گونه‌ها بود و نتایج گروه‌بندی تجزیه به مختصات اصلی، نتایج به دست آمده را تأیید نمود. در بررسی تجزیه ساختار جمعیت نیز مطابق با نتایج تجزیه خوشه‌ای و PCoA، نمونه‌های ژنتیکی بر اساس ساختار ژنومی، میزان تشابه ژنتیکی، و تشابهات جغرافیایی گروه‌بندی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر سودمندی بالای آغازگرهای CDBP در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های ژرم‌پلاسمی اژیلوپس بود. از این رو به نظر می‌رسد این نشانگرها قابلیت استفاده در برنامه‌های مرتبط با تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مطالعات مولکولی فیلوژنتیک را دارند. همچنین وجود تنوع ژنتیکی بالا در میان برخی از گونه‌های اژیلوپس ایران می‌تواند چشم‌انداز قابل توجهی را برای به‌نژادگران جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های پیش‌اصلاحی گندم فراهم آورد.

کلیدواژه‌ها: *Aegilops*، تجزیه ساختار جمعیت، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کائنی علی‌سجاد، سفالیان امید، سرخی لولو بهزاد، اصغری علی، پورابوقداره علیرضا (۱۴۰۳) بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار جمعیت در گونه‌های اژیلوپس حاوی ژنوم U با استفاده از نشانگرهای CDBP. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۲)، ۶۹-۹۰.

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



© the authors

گندم مهمترین محصول غذایی جهان است که ۱۹ درصد کالری روزانه و ۲۱ درصد پروتئین مورد نیاز انسان را تأمین می‌کند (Tadesse et al. 2019). به‌نژادگران گندم برای تأمین نیازهای جمعیت انسانی برای مواد غذایی بیشتر و با کیفیت‌تر و در شرایط محیطی متفاوت دنیا نیازمند استفاده از منابع متنوع ژنتیکی می‌باشند (Pour-Aboghadareh et al. 2021). تغییرات آب و هوایی به عنوان نشانه‌ای برای از دست دادن تنوع زیستی در طول سه دهه گذشته در نظر گرفته شده است و این تهدیدی برای کشاورزی در سراسر جهان است. در این شرایط بهره‌برداری بیش از حد و انتخاب ارقام با ویژگی‌های خاص، منجر به کاهش تنوع ژنتیکی به‌ویژه در غلات شده است (Kumar et al. 2022). جنس *Aegilops* متعلق به خانواده Tritiaceae می‌باشد و بخش عمده‌ای از خزانه ژنی گندم را تشکیل می‌دهد. گونه‌های موجود در این جنس با دارا بودن تعداد زیادی از ژن‌های مهم، منبع با ارزشی برای مقاومت به بیماری‌ها و آفات به شمار می‌آیند (Kashkush et al. 2002). استفاده از گونه‌های این جنس از لحاظ وجود یک مجموعه ژرم‌پلاسم با تنوع بسیار وسیع، و همچنین به دلیل داشتن ویژگی‌هایی در ارتباط با سازگاری بلند مدت اهمیت بسزایی در برنامه‌های اصلاحی گندم دارند (Liu et al. 2003). جنس *Aegilops* دارای ۲۳ گونه بوده که تمامی آن‌ها در شش تیپ ژنومی متفاوت (M, N, C, U, S, D) و سه سطح پلوئیدی (دیپلوئید، تتراپلوئید، هگزاپلوئید) گروه‌بندی می‌شوند (Molnar et al. 2016). گونه‌های تتراپلوئید *Aegilops* حاوی ژنوم U، در ترکیب با دیگر ژنوم‌ها همچون C (*Ae. triuncialis*) S (*Ae. kotschy* و *Ae. peregrine*) و ژنوم M (*Ae. neglecta*، *Ae. biuncialis*، *Ae. columnaris*) به صورت یک زیر گروه متمایز می‌توانند به عنوان یک ژرم‌پلاسم ایده‌آل در نظر گرفته شوند (Morris and Sears 1967; Kihara 1963). علاوه بر این، منشاء *Ae. neglecta* و *Ae. columnaris* جای بحث دارد که شاید حامل ژنوم UUXX باشند (Dvorak 1998). ژنوم U در همه گونه‌های این خوشه مشابه یکدیگر بوده و از والد *Ae. umbellulata* نشأت می‌گیرند و ژنوم دوم در این گونه‌ها دستخوش تغییرات ژنتیکی می‌باشد (Kimber and Feldman 1987). *Ae. umbellulata* یکی از گونه‌های دیپلوئید وحشی گندم و در غرب آسیا پراکنده است و به عنوان دهنده ژنوم U و والد مادری در گونه‌های تتراپلوئید *Ae. biuncialis*، *Ae. columnaris*، *Ae. triaristata* و *Ae. neglecta* شناخته می‌شود (Tsunewaki 1996). در بین گونه‌های مختلف *Aegilops*، *Ae. triuncialis* بیشترین پراکنش را در جهان دارد (Van-Slageren 1994). با توجه به محدودیت تنوع ژنتیکی در گونه‌های زراعی اصلاح شده استفاده از خویشاوندان وحشی و گونه‌های بیگانه می‌تواند به عنوان منبع ژنی غنی و متنوع از آلل‌های جدید و ایده‌آل برای به‌نژادگران به کار برده شود (Prohens et al. 2017). تنوع به عنوان یکی از اساسی‌ترین برنامه‌های به‌نژادی در افزایش تولید و بهره‌وری محسوب می‌شود که مخاطرات پیشروی آن امکان تولید مجدد وارسته‌ها، ارقام و گونه‌های خویشاوند منقرض شده را با مشکلات فراوانی مواجه خواهد ساخت (Sazmosi et al. 2010). در جهان در حال تغییر، وجود تنوع ژنتیکی در بین و درون گونه‌های مختلف زیستی، برای بقا جمعیت‌های موجود در طبیعت و رشد آن‌ها ضروری می‌باشد

(Hoban et al. 2023). بررسی ساختار فیلوژنیک مولکولی و تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی می‌تواند به روشن شدن وضعیت طبقه‌بندی و روابط تکاملی بین گونه‌های زراعی و خویشاوندان وحشی آن‌ها کمک کند (Poczai et al. 2012). روش‌های مولکولی، راه‌کاری قابل اعتماد برای تبعیض گونه‌های گیاهی و بررسی تنوع آن‌ها می‌باشد و با توجه به وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون منابع ژرم پلاسمی خویشاوندان وحشی گندم، به نظر می‌رسد ارزیابی و توجه به این منابع ارزشمند طبیعی، مسیر تازه‌ای در بهره‌مندی از آنها در برنامه‌های به‌نژادی گندم ایجاد نماید (Etminan et al. 2018). نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ابزار مناسبی برای ارزیابی ساختار ژنتیکی و تجزیه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی می‌باشند. در بین این نشانگرها، نشانگرهای مبتنی بر PCR به علت دقت، هزینه کم و تنوع بالای نشانگری به منظور اهداف مختلف گسترش فراوانی یافته است (Poczai et al. 2013). نشانگر CBDP در سال‌های اخیر بر اساس نواحی مبتنی بر ژن توسعه یافته است. هزینه مناسب، تکرارپذیری بالا و چندشکلی قابل قبول، این نشانگر را به گزینه مناسبی برای انجام مطالعات مرتبط با تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و تهیه نقشه‌های ژنتیکی تبدیل نموده است (Singh et al. 2014). این آغازگرها بر اساس نقاط هدفمند و حفاظت شده ژنوم، چندشکلی قابل قبولی ایجاد می‌نمایند (Collard and Mackill 2009). چندشکلی ایجاد شده در سیستم نشانگری CBDP بر اساس نواحی حفاظت شده پروموتور ژن‌ها و با استفاده از یک آغازگر واحد می‌باشد. طول آغازگرهای CBDP به طور معمول ۱۸ نوکلئوتید است و هر آغازگر از سه بخش شامل توالی CAAT به عنوان هسته اصلی و ثابت، یک توالی ۱۰ تا ۱۱ نوکلئوتیدی پیش از این توالی حفاظت شده و دو تا سه نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' آغازگر تشکیل شده است. نشانگرهای CBDP از ناحیه ژنوم حاوی ژن مشتق می‌شوند و در نتیجه هر ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای CBDP ممکن است منعکس کننده تنوع عملکردی باشد. علاوه بر این، احتمال یافتن یک نشانگر مرتبط با یک صفت خاص که از مناطق ژنی حاصل شده‌اند بسیار بالا خواهد بود در حالی که در روش‌هایی همچون AFLP، RAPD و ISSR در مناطق خنثی ژنوم تکثیر می‌شوند و این مزیت نشانگر CBDP را نسبت به این روش‌ها نشان می‌دهد (Singh et al. 2014). در تحقیقی در مقایسه عملکرد نشانگرهای CDDP، SCoT و ISSR در مجموعه‌ای از نمونه‌های گندم نشان داده شد که انگشت‌نگاری توسط این سه نشانگر (CDDP، SCoT و ISSR) می‌تواند برای تشخیص پلی‌مورفیسم ژنوتیپ‌های گندم موثر باشند (Hamidi et al. 2014). در پژوهشی در جهت بررسی روابط تاکسونومیک و فیلوژنتیکی نمونه‌های وحشی و ارقام Emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) از پرایمرهای ipBS-retrotransposons استفاده گردید و سطح زیادی از تنوع را مشاهده و اعلام شد که این سیستم نشانگری می‌تواند به طور موثری در بررسی فیلوژنیک و تاکسونومیک مورد استفاده قرار گیرد (Arystanbekkyzy et al. 2019). همچنین تنوع ژنتیکی ۱۵۰ توده‌ی آزیلویس از مناطق مختلف اکوجغرافیایی آذربایجان توسط نشانگرهای DArTseq و SNP مورد بررسی قرار گرفت و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین توده‌ها مشاهده شد (Abbasov et al. 2020). در مطالعه‌ای دیگر، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ژرم پلاسم گندم، ۵۱ توده از دو جنس تریتیکوم و آزیلویس از منطقه کردستان عراق توسط آغازگر SCoT مورد

بررسی قرار داده شد و بر اساس گروه‌بندی‌های حاصله همه نمونه‌ها بر اساس ساختار ژنومی خود در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند و این گروه‌بندی با طبقه‌بندی گیاه‌شناسی نمونه‌ها منطبق بود (Ahmad 2023). در مطالعه‌ای به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۸۰ اکسشن آزیلوپس و بهره‌گیری از دو آغازگر SCoT و CDBP نتیجه گرفتند که این دو آغازگر کارایی خوبی در به تصویر کشیدن چندشکلی از خود نشان دادند و نشانگرهای CDBP یک الگوی واضح گروه‌بندی را ارائه نمودند از این رو نشانگرهای CDBP را به منظور تعیین ساختار جمعیت و برآورد تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی توصیه نمودند (Eslamzadeh-Hesari et al. 2023). در تحقیقی با هدف بررسی ۹۱ نمونه از سه گونه *T. aestivum*، *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* توسط آغازگرهای SCoT و CDBP اعلام شد که هر دو سیستم نشانگری سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون گروهی را نشان دادند (Ghobadi et al. 2021). آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های اجدادی و وحشی معیاری مناسب برای استفاده از آن‌ها در جهت شناسایی و انتقال ژن‌ها به منظور اصلاح گیاهان زراعی می‌باشد (Schneider and Molnar 2008). به علاوه، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در سال‌های اخیر جهت مطالعه منابع ژرم‌پلاسم بومی و حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Askari et al. 2010; Mohammadabadi 2017). میزان اطلاعات به‌دست‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Alinaghizadeh et al. 2007; Mohammadifar et al. 2018; Mohammadifar and Mohammadabadi 2014). همچنین، مطالعه گونه‌ها و نژادهای مختلف با استفاده از تکنیک‌های ملکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Mohammadabadi et al. 2017; Gholamhoseini et al. 2018). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی، گونه‌ها و نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی منابع ژنتیکی مختلف بسیار اهمیت دارد (Ghasemi et al. 2010; Gooki et al. 2019). تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغییر و مختلف می‌باشد (Askari et al. 2008; Mohammadifar and Mohammadabadi 2011). لذا، هدف این پژوهش بررسی سطح تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌های وحشی آزیلوپس بومی ایران دارای ژنوم U و تعیین روابط بین آن‌ها با استفاده از آغازگرهای CDBP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تعداد ۷۷ نمونه ژنتیکی آزیلوپس از گونه‌های *Ae. biuncialis* (UUMM)، *Ae. columnaris* (UUMM)، *Ae. neglecta* (UUMM)، *Ae. triuncialis* (UUCC) و *Ae. umbellulata* (UU) متعلق به ۱۸ استان ایران از بانک ژن گیاهی ملی ایران واقع در کرج تهیه شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. عملیات کاشت بذور و استقرار گیاهچه‌ها در محیط گلخانه بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران انجام شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان بر اساس دستورالعمل CTAB صورت گرفت (Doyle and Doyle 1987). کیفیت DNAهای استخراجی با

استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد. سپس غلظت DNA هر نمونه توسط دستگاه نانودراپ (Thermo-ND-) (1000) سنجیده و به میزان ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق سازی شد.

جدول ۱. فهرست نمونه‌های ژنتیکی اَیِلوپس مورد بررسی به همراه محل جمع‌آوری

Table1. Studied *Aegilops* accessions list and their origin

ردیف	گونه	کد	محل جمع‌آوری	ردیف	گونه	کد	محل جمع‌آوری
Row	Species	Gene bank code	Sampeling area	Row	Species	Gene bank code	Sampeling area
1	<i>Ae. biuncialis</i>	50074	Azar Gh	40	<i>Ae. triuncialis</i>	28061	Azar Sh
2	<i>Ae. biuncialis</i>	29766	Kermanshah	41	<i>Ae. triuncialis</i>	28804	Gilan
3	<i>Ae. biuncialis</i>	27737	Zanjan	42	<i>Ae. triuncialis</i>	29454	Gilan
4	<i>Ae. biuncialis</i>	29763	Kermanshah	43	<i>Ae. triuncialis</i>	29440	Mazandaran
5	<i>Ae. biuncialis</i>	28655	Azar Gh	44	<i>Ae. triuncialis</i>	28250	Markazi
6	<i>Ae. columnaris</i>	29854	Kordestan	45	<i>Ae. triuncialis</i>	28053	Khorasan R
7	<i>Ae. columnaris</i>	28301	Azar Gh	46	<i>Ae. triuncialis</i>	28023	Khorasan R
8	<i>Ae. columnaris</i>	27758	Azar Gh	47	<i>Ae. triuncialis</i>	27868	Khorasan R
9	<i>Ae. columnaris</i>	28297	Azar Gh	48	<i>Ae. umbellulata</i>	28162	Fars
10	<i>Ae. columnaris</i>	29413	Alborz	49	<i>Ae. umbellulata</i>	28515	Khozestan
11	<i>Ae. neglecta</i>	29798	Kermanshah	50	<i>Ae. umbellulata</i>	28113	Hamedan
12	<i>Ae. neglecta</i>	29878	Kordestan	51	<i>Ae. umbellulata</i>	28682	Lorestan
13	<i>Ae. neglecta</i>	28742	Azar Gh	52	<i>Ae. umbellulata</i>	28836	Kordestan
14	<i>Ae. neglecta</i>	28935	Azar Gh	53	<i>Ae. umbellulata</i>	29837	Hamedan
15	<i>Ae. neglecta</i>	28374	Kermanshah	54	<i>Ae. umbellulata</i>	29776	Kermanshah
16	<i>Ae. neglecta</i>	28956	Kermanshah	55	<i>Ae. umbellulata</i>	27759	Azar Gh
17	<i>Ae. neglecta</i>	28022	Lorestan	56	<i>Ae. umbellulata</i>	29985	Ghazvin
18	<i>Ae. triuncialis</i>	29129	Alborz	57	<i>Ae. umbellulata</i>	28630	Azar Sh
19	<i>Ae. triuncialis</i>	28641	Alborz	58	<i>Ae. umbellulata</i>	28632	Azar Sh
20	<i>Ae. triuncialis</i>	29183	Semnan	59	<i>Ae. umbellulata</i>	28335	Azar Gh
21	<i>Ae. triuncialis</i>	29389	Semnan	60	<i>Ae. umbellulata</i>	28894	Azar Gh
22	<i>Ae. triuncialis</i>	28244	Markazi	61	<i>Ae. umbellulata</i>	28298	Azar Gh
23	<i>Ae. triuncialis</i>	29135	Markazi	62	<i>Ae. umbellulata</i>	28300	Azar Gh
24	<i>Ae. triuncialis</i>	28814	Zanjan	63	<i>Ae. umbellulata</i>	28326	Azar Gh
25	<i>Ae. triuncialis</i>	27893	Zanjan	64	<i>Ae. umbellulata</i>	28163	Fars
26	<i>Ae. triuncialis</i>	28653	Ghazvin	65	<i>Ae. umbellulata</i>	28920	Azar Gh
27	<i>Ae. triuncialis</i>	28807	Ghazvin	66	<i>Ae. umbellulata</i>	28321	Azar Gh
28	<i>Ae. triuncialis</i>	28128	Golestan	67	<i>Ae. umbellulata</i>	28359	Kermanshah
29	<i>Ae. triuncialis</i>	28140	Golestan	68	<i>Ae. umbellulata</i>	28563	Kermanshah
30	<i>Ae. triuncialis</i>	28152	Fars	69	<i>Ae. umbellulata</i>	28408	Kermanshah
31	<i>Ae. triuncialis</i>	28156	Fars	70	<i>Ae. umbellulata</i>	28354	Kermanshah
32	<i>Ae. triuncialis</i>	28150	Fars	71	<i>Ae. umbellulata</i>	28355	Kermanshah
33	<i>Ae. triuncialis</i>	27929	Azar Gh	72	<i>Ae. umbellulata</i>	28346	Kermanshah
34	<i>Ae. triuncialis</i>	27937	Azar Sh	73	<i>Ae. umbellulata</i>	28223	Ilam
35	<i>Ae. triuncialis</i>	27949	Azar Gh	74	<i>Ae. umbellulata</i>	28467	Ilam
36	<i>Ae. triuncialis</i>	27757	Azar Gh	75	<i>Ae. umbellulata</i>	28222	Ilam
37	<i>Ae. triuncialis</i>	27922	Azar Gh	76	<i>Ae. umbellulata</i>	28468	Ilam
38	<i>Ae. triuncialis</i>	50075	Azar Gh	77	<i>Ae. umbellulata</i>	28203	Ilam
39	<i>Ae. triuncialis</i>	28091	Azar Sh				

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های مختلف از ۱۵ آغازگر CDBP استفاده شد (جدول ۲). پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده، اجزای واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر Master Mix 2X PCR، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر آغازگر (غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه و کلیه واکنش‌های تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad-T100) انجام شد. پروفایل دمایی طبق روش touchdown که هر واکنش شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۲ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۶-۴۴ درجه (در هر شش چرخه دو درجه افزایش دما ایجاد می‌شد)، توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و توسعه نهایی آغازگر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از اجرای واکنش‌های PCR، کلیه قطعات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و با استفاده از Safeview (شرکت پارس طوس) رنگ‌آمیزی شدند. سپس الگوی قطعات به دست آمده به داده‌های صفر (عدم قطعه تکثیر شده) و یک (قطعه تکثیر شده) تبدیل و ماتریس داده‌های ژنوتیپی تشکیل شد. به منظور بررسی کارایی آغازگرهای استفاده شده، برخی از شاخص‌های تعیین کننده کارایی نشانگر شامل تعداد قطعات تکثیر شده (NTF)، تعداد قطعات چندشکل (NPF)، درصد چند شکلی قطعات (PPB) اطلاعات چندشکلی (PIC)، قدرت تمایز (Rp) و شاخص نشانگر (MI) و بر اساس روابط ارائه شده توسط Powell (1996) محاسبه شدند.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای CDBP به همراه شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها

Table 2. Characteristics of CDBP markers and their genetic diversity features

شاخص نشانگری	قدرت تفکیک	محتوای اطلاعات چندشکلی	درصد چندشکلی قطعات	تعداد قطعات چندشکل	تعداد کل قطعات	دمای اتصال	توالی (۵'→۳')	آغازگر
MI	Rp	PIC	PPB	NPB	NTB	Ta(C°)	Sequence (5'→3')	Primer
5.12	22.13	0.37	87.5	14	16	44-56	TGAGCACGATCCAATAGC	CBDP-1
5.91	17.12	0.42	100	14	14	44-56	TGAGCACGATCCAATAAT	CBDP-2
3.92	14.18	0.36	91.66	11	12	44-56	TGAGCACGATCCAATACC	CBDP-3
5.82	17.48	0.42	100	14	14	44-56	TGAGCACGATCCAATAAG	CBDP-4
6.48	15.09	0.38	100	17	17	44-56	TGAGCACGATCCAATCTA	CBDP-5
2.97	9.92	0.30	100	10	10	44-56	TGAGCACGATCCAATCAG	CBDP-6
4.50	18.21	0.35	100	13	13	44-56	TGAGCACGATCCAATCGA	CBDP-7
4.51	16.39	0.35	100	13	13	44-56	TGAGCACGATCCAATCGG	CBDP-8
4.70	18.26	0.36	100	13	13	44-56	TGAGCACGATCCAATGAT	CBDP-9
2.86	10.21	0.29	90.9	10	11	44-56	TGAGCACGATCCAATGTT	CBDP-10
5.22	16.21	0.37	100	14	14	44-56	TGAGCACGATCCAATTGC	CBDP-11
5.31	18.91	0.38	100	14	14	44-56	TGAGCACGATCCAATATA	CBDP-12
3.86	13.48	0.32	92.31	12	13	44-56	TGAGCACGATCCAATGAG	CBDP-13
3.95	14.10	0.36	91.66	11	12	44-56	TGAGCACGATCCAATGCG	CBDP-14
2.55	16.00	0.28	75	9	12	44-56	TGAGCACGATCCAATTGA	CBDP-15
4.5	15.85	0.35	95.27	12.6	13.2		Mean	

تجزیه واریانس مولکولی با هدف تعیین سهم واریانس ژنتیکی بین و درون گونه‌ها انجام شد. علاوه بر این، جهت مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از گونه‌های *Ae. triuncialis*، *Ae. neglecta*، *Ae. columnaris*، *Ae. biuncialis* و *Ae. umbellulata* برخی از شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل شاخص شانون (I)، شاخص تنوع ژنی نی (H)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) و درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل (PPL) برآورد شدند. مقادیر ضرایب تشابه ژنتیکی در بین گونه‌ها محاسبه و به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌های ژنتیکی مورد ارزیابی تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد انجام شد. همچنین تجزیه ساختار جمعیت با مدل Bayesian و MCMC، Burnin و ۵۰۰۰۰ در مقادیر مختلف k از ۲ تا ۷ و در ۱۰ تکرار با هدف بررسی زیر گروه‌های نمونه‌های ژنتیکی مورد مطالعه و تعیین شاخص تثبیت (Fst) صورت پذیرفت. کلیه تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای GenAIEx ver. 6.502، DARwin ver. 6 و Structure ver. 2.3.4 انجام گردید.

نتایج و بحث

در بررسی چندشکلی و ارزیابی کارایی ۱۵ نشانگر CDBP استفاده شده در این تحقیق، ۱۹۸ قطعه تکثیری مشاهده گردید که از این تعداد ۱۸۹ قطعه چندشکل (۹۵/۲۷ درصد) بودند. تعداد کل قطعات تکثیر شده (NTP) از ۱۰ (CDBP-6) تا ۱۷ (CDBP-) (5) و با میانگین ۱۳/۲ متغیر بود. دامنه تغییرات درصد قطعات چند شکل (PPB) بین ۷۵ تا ۱۰۰ بود. تعداد قطعات چند شکل (NPB) با کمترین تعداد در نشانگر CDBP-15 با ۹ قطعه و بیشترین تعداد در نشانگر CDBP-5 با ۱۷ قطعه و با میانگین ۱۲/۶ در کل نشانگرها متغیر بود. اطلاع از میزان توانمندی سیستم‌های نشانگری در نشان دادن سطح چندشکلی موجود در نمونه‌های مورد بررسی، یکی از معیارهای اولیه جهت انتخاب نوع سیستم نشانگری در برنامه‌های مبتنی بر اصلاح مولکولی، مطالعه تنوع ژنتیکی و ارتباط بین جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. در این راستا پارامترهای محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، قدرت تفکیک (Rp) و شاخص نشانگری (MI) به منظور بررسی میزان کارایی آغازگرها محاسبه شد (جدول ۲). بر اساس نتایج بدست آمده متوسط میزان شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۳۵ بود که آغازگرهای CDBP-2 و CDBP-4 بیشترین (۰/۴۲) و آغازگر CDBP-15 کمترین (۰/۲۸) میزان PIC را نشان دادند. شاخص MI آغازگرها نیز دارای دامنه تغییراتی بین ۲/۵۵ (CDBP-5) و ۶/۴۸ (CDBP-5) را نشان داد. همچنین آغازگرهای CDBP-10 و CDBP-1 به ترتیب و با مقادیر ۱۰/۲۱ و ۲۰/۱۳ دارای کمترین و بیشترین قدرت تمایز (Rp) در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های مورد مطالعه بودند. در بین شاخص‌های مذکور دو پارامتر اطلاعات چندشکلی (PIC) و قدرت تفکیک (Rp) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. زیرا این دو شاخص توانایی یک سیستم نشانگری را در تعیین اثر بخشی و پتانسیل آغازگرهای به کار برده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی و قدرت تمایز نمونه‌ها را نشان می‌دهد (Powell et al. 1996) به عبارتی شاخص PIC احتمال تعیین پلی مورفیسم شکل گرفته توسط یک نشانگر در بین دو فرد

می‌باشد که به تعداد آل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها بستگی دارد. در کنار PIC دو شاخص Rp و MI در تعیین کارایی یک سیستم نشانگری می‌توانند مفید واقع شوند زیرا این دو شاخص به نحوی به قابلیت یک آغازگر در نشان دادن چندشکلی قطعات و به قطعه‌های قابل امتیازدهی اشاره دارند (Prevost & Wilkinson 1999). همچنین مقادیر بالای شاخص‌های Rp و MI نشان دهنده تکثیر تعداد بیشتر قطعات چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم می‌باشد (Milbourne et al. 1997). با استناد به نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌توان بیان داشت که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های ژنتیکی مورد بررسی در این آزمایش وجود داشت و سیستم نشانگری CBDP قابلیت بالایی در بررسی تنوع ژنتیکی از خود نشان دادند. در بررسی تنوع ژنتیکی ژرمپلاسم گندم توسط سه آغازگر SCoT، CBDP و SSR و بر اساس کارایی اطلاعات محتوای چند شکلی (PIC)، گزارش شده است که آغازگر CBDP از دو آغازگر SCoT و SSR قادر به ارائه اطلاعات سودمندتری است و آغازگر CBDP یک سیستم مولکولی کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی ژرمپلاسم گندم می‌باشد (Pour-Aboghadareh et al. 2022). همچنین در بررسی ۹۶ توده *T. durum* توسط دو سیستم نشانگری CBDP و ISSR و با بررسی شاخص‌های MI و PIC بیان شد که آغازگرهای CBDP نسبت به آغازگرهای ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی کارآمدتر هستند (Shaygan et al. 2021). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی ۱۵ آغازگر CBDP نشان داد که میزان واریانس درون گروهی ۷۶ درصد و میزان واریانس بین گروهی ۲۴ درصد بود. بر این اساس می‌توان اظهار داشت آغازگرهای CBDP تنوع ژنتیکی بالایی را در درون و بین ژرمپلاسم گندم نشان می‌دهند. این یافته بیانگر این است که تمامی نمونه‌های ژنتیکی مربوط به هر گونه دارای زمینه ژنتیکی متنوعی بوده و از آنجایی که همه نمونه‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف جمع‌آوری شده‌اند، از این رو سطح بالایی تنوع ژنتیکی در میان نمونه‌های ژنتیکی موجود در هر گونه را می‌توان به سازگاری طولانی مدت آن‌ها به محل جمع‌آوری نشان نسبت داد (Bokaei et al. 2023). همچنین سازگاری گیاهان با محل رویشگاه‌هایشان بر اساس عوامل تکاملی همچون مهاجرت، انتخاب طبیعی، جهش و غیره می‌تواند یکنواختی ژنتیکی نمونه‌ها را تغییر دهد و به تبع آن تنوع ژنتیکی در بین جوامع آن‌ها افزایش یابد (Dumolin-Lapegue et al. 1997).

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های خویشاوندی گندم برای هر یک از گونه‌ها برخی از پارامترهای تنوع ژنتیکی مانند تعداد آل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آل‌های موثر (Ne)، شاخص اطلاعات شانون (I)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و درصد چند شکلی مکان‌های ژنی (PPL) محاسبه و نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده است. تعداد آل‌های مشاهده شده (Na) با میانگین ۱/۶۱ و با دامنه تغییرات ۱/۳۳ تا ۱/۸۱ و شاخص تعداد آل موثر (Ne) با متوسط ۱/۴۶ کمترین مقدار را در گونه *Ae. columnaris* و بیشترین میزان را در گونه *Ae. triuncialis* نشان داد. بررسی شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) با میانگین ۰/۲۶، شاخص شانون (I) با متوسط میزان ۰/۳۹ و شاخص درصد چندشکلی (PPL) با میانگین ۶۹/۸۰ نشان داد که با توجه به پارامترهای ژنتیکی برآورد شده در این آزمایش گونه‌های *Ae. triuncialis* دارای بیشترین میزان تنوع ژنتیکی در بین سایر گونه‌ها بود. در

مطالعه‌ای دیگر در بررسی گونه‌های مختلف آزیلوپس توسط نشانگر CBDP بیشترین مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی در گونه *Ae. triuncialis* مشاهده شد (Eslamzadeh-Hessari et al. 2023). بالا بودن سطح تنوع ژنتیکی در گونه *Ae. triuncialis* را می‌توان به پراکنش گسترده‌ی این گونه در مناطق مختلف دنیا نسبت داد (Van-Slageren 1994). گونه‌های شناسایی شده از ژرم‌پلاسما گندم با سطوح بالای تنوع ژنتیکی، می‌توانند به عنوان منبعی در دسترس برای اصلاح گندم زراعی به کار برده شوند (Ahmad 2023). که با توجه به سطح بالای تنوع ژنتیکی و ژن‌های ارزشمند مقاومت به تنش‌های زیستی و محیطی در گونه *Ae. triuncialis* (Xing et al. 1993; Aghaee-Sarbarzeh et al. 2001; Arora et al. 2021)، ضرورت بهره‌مندی بیشتر از این گونه در برنامه‌های پیش‌اصلاحی گندم توصیه می‌گردد.

جدول ۳. مقادیر پارامترهای ژنتیکی برآورد شده در گونه‌های آزیلوپس توسط نشانگرهای CBDP

Table 3. Genetic diversity parameters of *Aegilops* species exhibited CBDP markers

گونه	تعداد نمونه	ژنوم	تعداد آل‌های مشاهده شده	تعداد آل‌های موثر	شاخص تنوع ژنتیکی نی	شاخص تنوع ژنتیکی شانون	درصد مکان‌های چند شکل
	Number of accessions	Genome	Number of observed alleles	Number of effective alleles	Nie genetic diversity index	Shannon genetic diversity index	Percentage of polymorphic loci
			Na	Ne	H	I	PPL
<i>Ae. biuncialis</i>	5	UUMM	1.51	1.41	0.23	0.34	61.62
<i>Ae. columnaris</i>	5	UUMM	1.33	1.32	0.18	0.27	50.51
<i>Ae. neglecta</i>	7	UUMM	1.62	1.48	0.27	0.39	69.70
<i>Ae. triuncialis</i>	30	UUCG	1.81	1.57	0.33	0.48	85.35
<i>Ae. umbellulata</i>	30	UU	1.77	1.53	0.3	0.44	81.82
Mean			1.61	1.46	0.26	0.39	69.80

مقادیر ضرایب تشابه ژنتیکی نیز در این پژوهش دارای دامنه تغییراتی بین ۰/۷۸۹ تا ۰/۹۰۵ بود که بیشترین میزان تشابه بین *Ae. biuncialis* با *Ae. columnaris* (۰/۹۰۵) و *Ae. biuncialis* و *Ae. neglecta* (۰/۸۷۹) مشاهده گردید (جدول ۴) که این نتیجه احتمالاً به دلیل وجود ژنوم مشترک UUMM در این گونه‌ها می‌باشد. به طور کلی سطح ضرایب تشابه در بین گونه‌های مطالعه شده در این تحقیق از مقادیر بالایی برخوردار بودند که این موضوع احتمالاً به دلیل وجود ژنوم مشترک U در بین گونه‌های مورد بررسی بود. مطابق با نتایج بدست آمده در این تحقیق، پژوهشی در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های آزیلوپس جمع‌آوری شده از مناطق مختلف یونان توسط دو نشانگر ISSR و RAPD، بیشترین میزان تشابه ژنتیکی را در بین گونه‌های *Ae. biuncialis* و *Ae. neglecta* گزارش نموده و اظهار داشتند با توجه به اینکه هیچ مرز مورفولوژیکی مشخصی در بین گونه‌های آزیلوپس حاوی

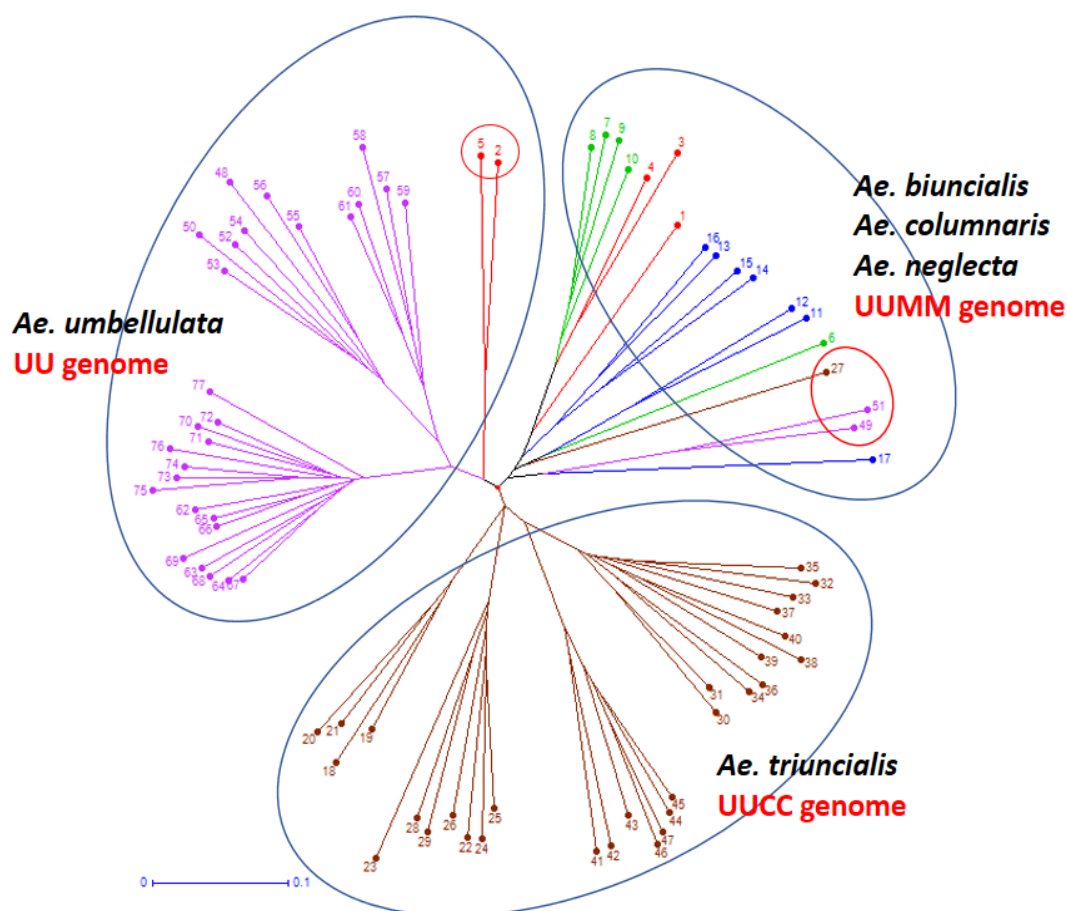
ژنوم U وجود ندارد لذا بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی در سطح DNA جهت تفکیک و بررسی این گونه‌ها توصیه می‌شود (Thomas and Bebeli 2010).

جدول ۴. ضرایب تشابه ژنتیکی بین گونه‌های آزیلوپس بر اساس نشانگرهای CDBP

Table 4. Coefficients of genetic similarity among *Aegilops* species based on CDBP markers

<i>Ae. umbellulata</i>	<i>Ae. triuncialis</i>	<i>Ae. neglecta</i>	<i>Ae. columnaris</i>	<i>Ae. biuncialis</i>	
				1	<i>Ae. biuncialis</i>
			1	0.905	<i>Ae. columnaris</i>
		1	0.863	0.879	<i>Ae. neglecta</i>
	1	0.856	0.813	0.866	<i>Ae. triuncialis</i>
1	0.859	0.835	0.789	0.862	<i>Ae. umbellulata</i>

به منظور بررسی دقیق‌تر روابط بین گونه‌های ارزیابی شده، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم Neighbor joining و ضریب فاصله جاکارد انجام شد و بر اساس گروه‌بندی صورت گرفته گونه‌های مختلف در این آزمایش در سه گروه قرار گرفتند (شکل ۱). نمونه‌های ژنتیکی مورد بررسی در این گروه‌بندی بر اساس ساختار ژنومی خود از یکدیگر تفکیک شدند. به نحوی که ۲۹ نمونه *Ae. triuncialis* با ژنوم UUCC در یک خوشه، ۲۸ نمونه دیپلوئید *Ae. umbellulata* با ژنوم UU در خوشه دوم و نمونه‌های مربوط به *Ae. neglecta*، *Ae. columnaris* و سه نمونه *Ae. biuncialis* با ژنوم UUMM در خوشه سوم گروه‌بندی شدند. همچنین دو نمونه از *Ae. biuncialis* در خوشه دوم و در کنار *Ae. umbellulata* و یک نمونه از *Ae. triuncialis* و دو نمونه از *Ae. umbellulata* در گروه سوم و در کنار نمونه‌های ژنتیکی با ژنوم UUMM قرار گرفتند که این موضوع احتمالاً به دلیل قرابت بالای این نمونه‌ها بر اساس مشابهت‌های ژنومی و به‌خصوص ژنوم مشترک U در بین آن‌ها می‌باشد. در تحقیقی با مطالعه برخی گونه‌های ژرمپلاسم گندم توسط آغازگرهای CDBP و SCoT گزارش شد که گروه‌بندی نمونه‌ها منطبق بر ساختار ژنومی آن‌ها بوده است و این آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیک در ژرمپلاسم گندم بسیار کارآمد می‌باشند و این دو سیستم نشانگری برای تشخیص سطوح چند شکلی DNA و مطالعه روابط ژنتیکی، تکنیک‌های مورد اطمینانی می‌باشند (Ghobadi et al. 2021). همچنین در این تحقیق و در گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای در زیر شاخه‌های نزدیک به هم مشاهده می‌شود که حتی گروه‌بندی نمونه‌های ژنتیکی مورد بررسی بر اساس شرایط جغرافیایی و منطقه‌ای نمونه‌ها صورت گرفته است، به نحوی که نمونه‌های *Ae. umbellulata* از دو استان ایلام و کرمانشاه در کنار یکدیگر قرار گرفتند و نمونه‌های ژنتیکی *Ae. triuncialis* از دو استان آذربایجان شرقی و غربی در یک زیر گروه جای دارند. منطبق با این نتایج در بررسی انجام شده بر روی توده‌های گونه *Ae. triuncialis* ایران توسط سه آغازگر ISSR، SCoT و CDBP، گروه‌بندی توده‌ها منطبق با شرایط جغرافیایی آن‌ها نشان داده شد (Khodae et al. 2021).

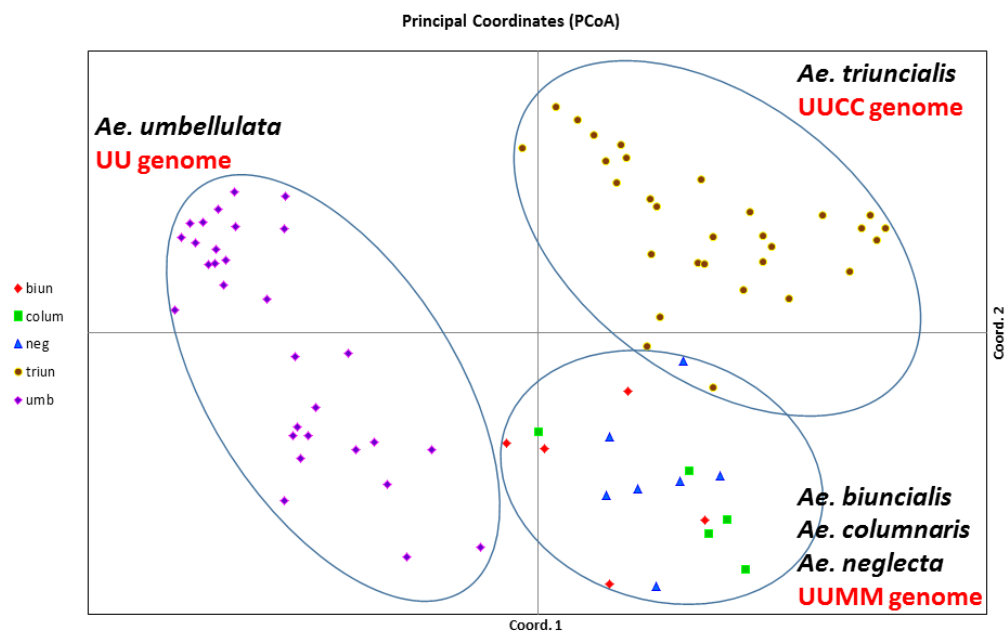


شکل ۱. تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های ژنتیکی آژیلوپس با استفاده از آغازگرهای CBDP بر اساس ضرایب جاکار و روش Neighbor-Joining

Figure 1. Cluster analysis for *Aegilops* accessions using CBDP markers through the Neighbor-Joining method and Jaccard's coefficients

در تجزیه PCoA سه مؤلفه نخست به ترتیب ۱۹/۱۱، ۱۱/۳۱ و ۹/۴۰ درصد و در مجموع ۳۹/۸۴ درصد از کل تغییرات ژنتیکی موجود در گونه‌های مورد بررسی را توجیه نمود. بر اساس دو مؤلفه اول نخست، پراکنش دو بعدی نمونه‌های ژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفت. گروه‌بندی تجزیه PCoA در این آزمایش (شکل ۲)، نتایج ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای را مورد تأیید قرار داد به نحوی که سه گروه ژنومی UU، UUMM و UUCC به وضوح از یکدیگر متمایز شدند و پراکنش نمونه‌ها دقیقاً منطبق بر ساختار ژنومی آن‌ها بود. نتایج پژوهشی در بررسی گونه‌های مختلف آژیلوپس توسط نشانگر CBDP نشان داد که تجزیه خوشه‌ای همه نمونه‌های ژنتیکی مورد ارزیابی را در سه گروه تقسیم بندی نمود و این گروه‌بندی بر اساس آغازگرهای CBDP به طور مشخصی روابط فیلوژنتیکی را در برخی از گونه‌های آژیلوپس نشان داد و نتایج PCoA نیز این گروه‌بندی را مورد تأیید قرار داد

(Eslamzadeh-Hessari et al. 2023). همچنین در ارزیابی روابط ژنتیکی بین سطوح مختلف پلوئیدی در گونه‌های دو جنس تریتیکوم و آزیلوپس توسط نشانگر SCoT بیان شد که نتایج تجزیه خوشه‌ای با تجزیه PCoA منطبق بوده و گروه‌بندی توده‌ها با خصوصیات گیاه‌شناسی آن‌ها مطابقت داشته است (Ahmad 2023).

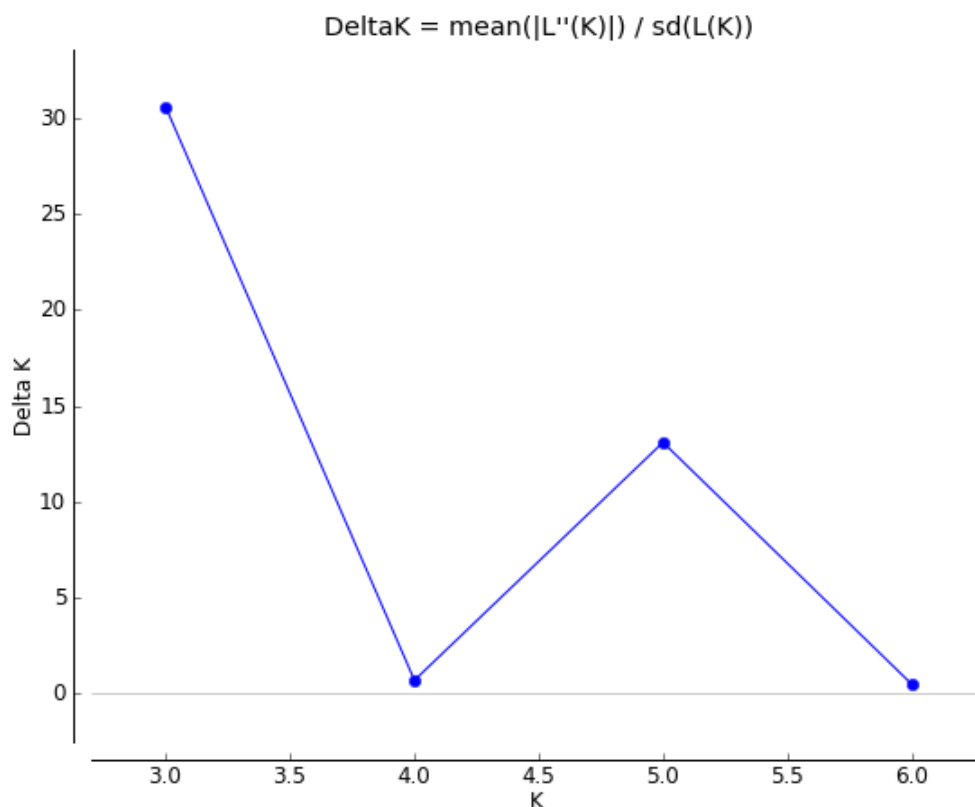


شکل ۲. نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نمونه‌های ژنتیکی آزیلوپس با استفاده از نشانگرهای CBDP

Figure 2. Biplot of principal coordinate analysis (PCoA) for Aegilops accessions using CBDP markers

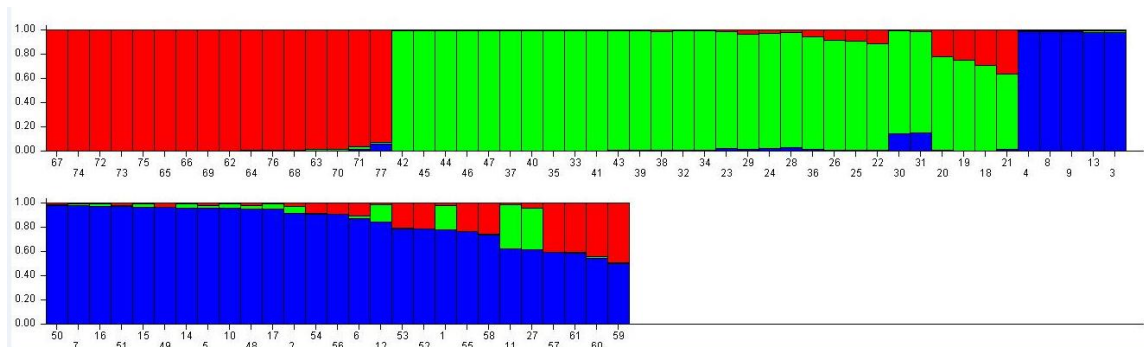
تجزیه ساختار جمعیت با نرم افزار Structure امکان شکستن جمعیت به زیر جمعیت‌ها با ساختارهای مختلف را امکان‌پذیر می‌کند (Pritchard et al. 2000). نتایج بدست آمده از این تجزیه نشان داد کلیه نمونه‌های ژنتیکی مورد بررسی در سه گروه از یکدیگر متمایز شدند و به عبارت دیگر مقدار k در حالت بهینه برابر سه برآورد شد (شکل ۳) شاخص تثبیت (F_{st}) نیز با دامنه تغییرات ۰/۱ تا ۰/۵۶ و با میانگین ۰/۳۱ بود. در واقع به دلیل وجود ژنوم مشترک U در کلیه نمونه‌ها و بالا بودن جریان ژنی در بین گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق، پائین بودن شاخص F_{st} دور از انتظار نیست زیرا در اکثر مطالعات، والد ژنوم U برای سایر گونه‌های حاوی این ژنوم را گونه *Ae. umbellulata* دانسته اند (Tsunewaki 1996). مقادیر کم F_{st} در واقع نشانه میزان بالای جریان ژنی در بین افراد و جمعیت‌های مورد مطالعه است (Abdollahi-Mandoulakani et al. 2016). با بررسی الگوی گروه‌بندی تجزیه ساختار جمعیت در این تحقیق (شکل ۴) مشاهده شد که نمونه‌های ژنتیکی در اغلب موارد بر اساس ساختار ژنومی، میزان تشابه ژنتیکی، و تشابهات جغرافیایی در گروه‌بندی‌ها قرار گرفتند. در زیر جمعیت اول نمونه‌هایی از *Ae. umbellulata* جمع‌آوری

شده از استان‌های غربی کشور همچون کرمانشاه، ایلام و آذربایجان غربی قرار گرفتند. کلیه نمونه‌های ژنتیکی *Ae. triuncialis* با ژنوم UUCC به جز یک نمونه در زیر گروه دوم قرار گرفتند. در زیر جمعیت سوم با ۳۲ عضو، کلیه نمونه‌های ژنتیکی *Ae. columnaris biuncialis* با ژنوم UUMM، ۱۴ نمونه *Ae. neglecta* و یک نمونه *Ae. umbellulata* و یک نمونه *Ae. triuncialis* را در خود داشت. نتیجه حاصل از تجزیه ساختار جمعیت در این تحقیق، نتایج بدست آمده از گروه‌بندی‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ایی و PCoA را مورد تأیید قرار داد. مطابق با این نتایج در بررسی خصوصیات ژنتیکی خویشاوندان وحشی گندم توسط آغازگر CBDP به وسیله تجزیه ساختار جمعیت بیان شد که نتایج آنالیز ساختار جمعیت با نتایج تجزیه خوشه‌ای و PCoA منطبق بوده و گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها صورت گرفت و آغازگر CBDP به صورت جداگانه و یا در ترکیب با دیگر نشانگرهای DNA برای ارزیابی‌های دقیق آنالیزهای ژنتیکی مانند شناسایی ژنوتیپ، تهیه نقشه‌های پیوستگی و تهیه نقشه QTL توصیه گردید (Etminan et al. 2019).



شکل ۳. برآورد میزان Delta K در تجزیه ساختار جمعیت گونه‌های ازیلوپس

Figure 3. Estimation of Delta K in population structure analysis of *Aegilops* species



شکل ۴. نمودار Q-Multiple Plot گونه‌های آژیلوپس با استفاده از آغازگرهای CBDP

Figure 4. Q-Multiple Plot of *Aegilops* species using CBDP markers

نتیجه‌گیری: تمرکز بر به‌کارگیری استراتژی‌های جدید برای مواجهه با شرایط نامطلوب ایجاد شده به‌واسطه تغییرات

اقلیمی در جهان همچون تنش‌های کم آبی، گرما، شوری و آفات و بیماری‌ها بر محصولات زراعی تاثیر به‌سزایی دارد و ایجاد وابسته‌های مقاوم و پرمحصول در چنین شرایطی یکی از راه‌های برون‌رفت از بحران‌های پیش‌رو می‌باشد (Prohens et al. 2017). خویشاوندان وحشی گندم به‌طور فزاینده‌ای در سیستم‌های کشاورزی جهان اهمیت پیدا کرده‌اند. و مهمترین منابع ژنی برای اصلاح‌نباتات به‌شمار می‌آیند زیرا حاوی ژن‌های مفیدی برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها، خشکی، شوری، و حتی بهبود عملکرد و نیز سازگاری به تنش‌های حاصل از تغییرات شرایط آب و هوایی هستند. از این‌رو، ارزیابی تنوع ژنتیکی و نیز دسته‌بندی منابع ژرم‌پلاسما از نظر درجه خویشاوندی، تهیه بانک اطلاعاتی و تهیه نقشه‌های فیلوژنتیکی در بین گونه‌ها، زمینه را برای بازنگری پتانسیل هر یک از خویشاوندان وحشی در جهت استفاده از این منابع را در برنامه‌های به‌نژادی آسان‌تر می‌نماید (Pour-Aboghadareh et al. 2021). نتایج حاصل از این پژوهش با تأیید وجود تنوع ژنتیکی بالا در میان برخی از گونه‌های آژیلوپس ایران، محققان را بر آن خواهد داشت تا در برنامه‌های پیش‌اصلاحی گندم از منابع و ژرم‌پلاسما غنی موجود در کشور بهره‌مندی لازم را داشته باشند. همچنین نتایج این تحقیق، توان بالای نشانگرهای CBDP در بررسی تنوع ژنتیکی موجود، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مطالعات مولکولی فیلوژنتیک و بررسی ساختار جمعیت را به خوبی نشان داد.

سپاس‌گزاری: از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و بانک ژن گیاهی ملی ایران به خاطر همکاری در اجرای

پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

عبداللهی مندولکانی بابک، عزیزی حیدر، پیری یاسر و همکاران (۱۳۹۵) تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک در یونجه زراعی با استفاده از نشانگرهای مولکولی. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. ۸ (۱۹)، ۵۲-۶۰.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمد رضا، سفلی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن β TGF β ۳ بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۲۵-۱۳۶.

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

References

- Abbasov M, Sansaloni CP, Burgueño J, et al. (2020) Genetic diversity analysis using DArTseq and SNP markers in populations of *Aegilops* species from Azerbaijan. *Genet Resour Crop Evol* 67, 281-291.
- Abdollahi Mandoulakani B, Azizi H, Piri Y, et al. (2016) Association analysis for morphological traits in cultivated alfalfa using molecular markers. *Crop Breed* 8, 19 (In Persian).
- Aghae-Sarbarzeh M, Singh H, Dhaliwal HS (2001) A microsatellite marker linked to leaf rust resistance transferred from *Aegilops triuncialis* into hexaploid wheat. *Plant Breed* 120, 259-261.
- Ahmad NS (2023) Assessment of genetic relation for different ploidy levels of *aegilops* and *triticum* possessing different genome-bearing species using start codon target marker. *Genet Resour Crop Evol*. doi.org/10.21203/rs.3.rs-3171739/v1
- Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pakistan J Biol Sci* 10 (23), 4291-4294.
- Arora S, Kaur S, Dhillon GS, Singh R, et al. (2021) Introgression and genetic mapping of leaf rust and stripe rust resistance in *Aegilops triuncialis*. *J Genet* 100, 1-11.
- Arystanbekyzy M, Nadeem MA, Aktaş H, et al. (2019) Phylogenetic and taxonomic relationship of turkish wild and cultivated emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) revealed by IPBS-retrotransposons markers. *Intl J Agric Biol* 21, 155-163.
- 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 (In Persian).
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2008) Analysis Of The Genetic Structure Of Iranian Indigenous Raeni Cashmere Goat Populations Using Microsatellite Markers. *Biotechnology* 2 (3), 1-4.

- Bokaei AS, Sofalian O, Sorkhilalehloo B, et al. (2023) Deciphering the level of genetic diversity in some *aegilops* species using CAAT box-derived polymorphism (CBDP) and start codon target polymorphism (SCoT) markers. *Mol Biol Rep* 50 (7), 5791-5806.
- Collard BCY, Mackil DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating genotargeted markers in plants. *Plant Mol Biol Rep* 27, 86–93.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull* 19 (1), 11-15.
- Dumolin-Lapegue S, Demesure B, Fineschi S, et al. (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genet* 146 (4), 1475-1487.
- Dvorak J, Luo MC, Yang ZL, Zhang HB (1998) The structure of the *aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 97, 657-670.
- Eslamzadeh-Hesari MR, Omidi M, Rashidi V, et al. (2023) Investigation of molecular variability in some *aegilops* species using start codon targeted polymorphism (SCoT) and CAAT-box derived polymorphism (CBDP) markers. *Genetika* 55 (1), 19-32.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Mehrabi AA, et al. (2019) Molecular characterization of the wild relatives of wheat using CAAT-box derived polymorphism. *Plant Biosyst* 153 (3), 398-405.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Mohammadi R, et al. (2018) Applicability of CAAT- box-derived polymorphism (CBDP) markers for analysis of genetic diversity in durum wheat. *Cereal Res Commun* 46, 1-9.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic Appl Sci* 4 (12), 5758-5760.
- Ghobadi G, Etminan A, Mehrabi AM, Shooshtari L (2021) Molecular diversity analysis in hexaploid wheat (*triticum aestivum* L.) and two *aegilops* species (*aegilops crassa* and *aegilops cylindrica*) using CDBP and scot markers. *J Genetic Eng Biotechnol* 19, 1-11.
- Gholamhoseini F, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M (2018) Polymorphism of the growth hormone gene and its effect on production and reproduction traits in goat. *Iran J Appl Anim Sci* 8 (4), 653-659.
- Gooki FG, Mohammadabadi MR, Fozzi MA, Soflaei M (2019) Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. *Walailak J Sci Technol* 16 (7), 499-508.

- Hamidi H, Talebi R, Keshavarz F (2014). Comparative efficiency of functional gene based markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*triticum aestivum* L.). *Cereal Res Commun* 42, 558–567.
- Hoban S, Bruford MW, da Silva JM, et al. (2023) Genetic diversity goals and targets have improved, but remain insufficient for clear implementation of the post-2020 global biodiversity framework. *Conserv Genet* 24 (2), 181-191.
- Kashkush K, Feldman M, Levy AA (2002) Gene loss, silencing and activation in a newly synthesized wheat allotetraploid. *Genet* 160 (4), 1651-1659.
- Khodae L, Azizinezhad R, Etminan AR, Khosroshahi M (2021) Assessment of genetic diversity among iranian *aegilops triuncialis* accessions using ISSR, scot, and CBDP markers. *J Genet Eng Biotechnol* 19 (1), 1-9.
- Kihara H (1963) Interspecific relationships in *Triticum* and *Aegilops*. *Seiken Ziho*. 15, 1-12.
- Kumar A, Choudhary A, Kaur H, Mehta S (2022) A walk towards wild grasses to unlock the clandestine of gene pools for wheat improvement: a review. *Plant stress* 3, p100048.
- Liu Z, Yan Z, Wan Y, et al. (2003) Analysis of HMW glutenin subunits and their coding sequences in two diploid *Aegilops* species. *Theor Appl Genet* 106 (8), 1368-1378.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, et al. (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed* 3, 127-136.
- Mohammadabadi MR (2017) Inter-Simple Sequence Repeat loci Associations with Predicted Breeding Values of Body Weight in Kermani Sheep. *Genet 3rd Millennium* 14 (4), 4383-4390.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *J Res Develop* 5 (2), e154.
- Mohammadifar A, Faghieh Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agric Biotechnol J* 5 (4), 125-136 (In Persian).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2018) Melanocortin-3 receptor (MC3R) gene association with growth and egg production traits in fars indigenous chicken. *Malays Appl Biol* 47 (3), 85-90.
- 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).

- Molnar I, Vrana J, Buresova V, et al. (2016) Dissecting the U, M, S and C genomes of wild relatives of bread wheat (*Aegilops* spp.) into chromosomes and exploring their synteny with wheat. *Plant J* 88 (3), 452-467.
- Morris R, Sears ER, Qisenberry KS, Reitz LP (1967) The cytogenetics of wheat and its relatives. *Wheat and wheat improvement*. Madison Wisconsin; Am Society Agron Monogr 19-87.
- Poczai P, Varga I, Bell NE, Hyvonen J (2012) Genomics meets biodiversity: advances in molecular marker development and their applications in plant genetic diversity assessment, *The molecular basis of plant genetic diversity*, Prof Mahmut Caliskan (Ed), ISBN. 953-978.
- Poczai P, Varga I, Laos M, et al. (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9, 1-32..
- Pour-Aboughadareh A, Kianersi F, Poczai P, Moradkhani H (2021) Potential of wild relatives of wheat: ideal genetic resources for future breeding programs. *Agron* 11 (8), 1656.
- Pour-Aboughadareh A, Poczai P, Etminan A, et al. (2022) An analysis of genetic variability and population structure in wheat germplasm using microsatellite and gene-based markers. *Plants* 11 (9), 1205.
- 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 and appl Genet.* 98, 107-112.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 67 (1), 170-181.
- Prohens J, Gramazio P, Plazas M, et al. (2017) Introgressiomics: a new approach for using crop wild relatives in breeding for adaptation to climate change. *Euphytica* 213, 1-19.
- Przewieslik-Allen AM, Burrige AJ, Wilkinson PA, et al. (2019) Developing a high-throughput SNP-based marker system to facilitate the introgression of traits from *Aegilops* species into bread wheat (*triticum aestivum*). *Front Plant Sci* 9, 1993.
- Sazmosi C, Solmaz I, Sari N, Barsony C (2010) Morphological evaluation and comparison of Hungarian and Turkish melon (*cucumis melo* L.) germplasm. *Sci Hortic* 124, 170-182.
- Schneider A, Molnar I (2008) Utilisation of agilops (goat grass) species to widen genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163, 1-19.
- Shaygan N, Etminan A, Majidi Hervean I, et al. (2021) The study of genetic diversity in a minicore collection of durum wheat genotypes using agro-morphological traits and molecular markers. *Cereal Res Commun* 49, 141-147.

- Singh AK, Rana MK, Singh S, et al. (2014) CAAT box- derived polymorphism (CBDP): a novel promoter -targeted molecular marker for plants. J Plant Biochem Biotechnol 23, 175–183.
- Tadesse W, Sanchez-Garcia M, Gizaw Assefa S, et al. (2019) Genetic gains in wheat breeding and its role in feeding the world. Crop Breed Genet Genom 1(e190005), 1-28
- Thomas KG, Bebeli PJ (2010) Genetic diversity of Greek *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. Mol Phylogenet Evol 56 (3), 951-961.
- Tsunewaki K (1996) Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. Methods of genome analysis in plants. New York. CRC Press 271-299.
- Van Slageren MW (1994) Wild wheats; a monograph of *Aegilops* l. and amblyopyrum (jaub. & spach) eig (poaceae). Agricultural University Wageningen: the Netherlands; ICARDA: Aleppo, Syria. 512.
- Xing X, Monneveux P, Damania AB, Zarahieva M (1993) Evaluation for salt tolerance in genetic resources of *Triticum* and *Aegilops* species. FAO/IPGRI Plant Genet Resour 96, 11-16.