

بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت در برخی از گونه‌های آژیلوپس با استفاده از نشانگرهای CBDP

Evaluation of genetic diversity and population structure analysis in some Aegilops species using CBDP markers

محمدرضا اسلام‌زاده حصاری^۱، وهرام رشیدی^۱، منصور امید^{۲*}، علیرضا اطمینان^۳، علیرضا احمدزاده^۴

۱- دانشجوی دکتری، استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۴- استادیار، گروه مهندسی فضای سبز، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

Esalmzadeh Hesari M¹, Rashidi V¹, Omid M^{2*}, Etmnan A³, Ahmadzadeh A⁴

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

2- Professors, College of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran

3- Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

4- Assistant Professor, Department of Landscap Engineering, shabestar Branch, Islamic Azad University, shabestar, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: momidi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۳)

چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۸۰ توده آژیلوپس بومی ایران با استفاده از آغازگرهای CBDP (CAAT-box derived polymorphism) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از ۱۲ آغازگر در مجموع ۹۴ قطعه تکثیر شد که تمامی قطعات چندشکل بودند. با توجه به میانگین شاخص‌های PIC، Rp و MI مشخص شد آغازگرهای استفاده شده کارایی لازم جهت بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها و ساختارهای ژنتیکی را دارا هستند. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد میزان تنوع بین گونه‌ها نسبت به درون گونه‌ها بیشتر است. براساس مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی مشخص شد بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، شاخص تنوع ژنی (He)، بیشترین میزان شاخص شانون (I) و درصد جایگاه‌های چندشکل (PPL) مربوط به گونه *Ae. triuncialis* بود. تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت تمامی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده را به ترتیب در سه گروه اصلی مطابق با ساختار ژنومی آن‌ها دسته‌بندی کردند. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده نشان داد تنوع ژنتیکی بالایی در توده‌های آژیلوپس ایران وجود دارد. با توجه به این که توده‌های وحشی دارای سازگاری بالایی با محیط خود هستند، این مجموعه می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنی با ارزش در برنامه‌های اصلاحی گندم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع آلی
ساختار جمعیت
گندم وحشی
نشانگر مولکولی

مقدمه

بهره‌برداری از گونه‌های خویشاوندی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Pour-Aboughadareh et al. 2018a). امروزه پیشرفت در ابزارهای مولکولی موجب ارزیابی دقیق‌تر و سریع تنوع ژنتیکی و همچنین بررسی روابط بین گونه‌ای شده است. یکی از مهم‌ترین این ابزارها نشانگرهای مولکولی که به‌عنوان مکان‌هایی روی کروموزوم‌ها با قابلیت کمک به محققین در تجزیه و مطالعه ژنوم موجودات دارای مزایایی همچون بیان مستقل از شرایط محیطی، داشتن توارث مندلی، برخورداری از میزان چندشکلی بالا، نماینده‌ای از کل ژنوم فرد بودن، کم هزینه بودن و غیره می‌باشند (Collard and Mackill 2008). نشانگرهای مولکولی در پنج دسته کلی شامل نشانگرهای مبتنی بر لکه‌گذاری، مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، مبتنی بر توالی‌های تکراری (مانند ماهواره، ماهوارک و ریزماهواره‌ها)، مبتنی بر mRNA و مبتنی بر توالی‌یابی و ریزآرایه‌ها گروه‌بندی می‌شوند (Varshney 2010). در دهه اخیر پیشرفت در بیوتکنولوژی و ابزارهای مولکولی منجر به توسعه چندین نشانگر مبتنی بر نواحی پروموتوری ژن‌های هدفمند شده است. از مهم‌ترین این سیستم‌ها می‌توان به نشانگرهای CBDP (CAAT-box derived polymorphism) اشاره کرد که توسط Singht et al. (2014) توسعه و معرفی شده است. این نشانگرها دارای توالی به طول ۱۸ نوکلئوتید می‌باشند که چندشکلی ناحیه جعبه CAAT را نشان می‌دهند و استفاده از سیستم‌های نشانگری مبتنی بر ژن هدف شده است. در رابطه با استفاده از این سیستم مولکولی گزارشات متعددی در گونه‌های گیاهی مختلف وجود دارد. به‌عنوان نمونه، Pour-Aboughadareh et al. (2019) در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های آزیلوپس ایران از دو سیستم نشانگری CBDP و SCoT (Start codon targeted polymorphism) استفاده نمودند و علاوه بر گزارش سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌های مختلف نشان دادند نشانگرهای CBDP به‌خوبی قادر به گروه‌بندی گونه‌های مختلف و نشان دادن رابطه فیلوژنتیکی بین گونه‌ها می‌باشند. در بررسی Etminan et al. (2019) تنوع ژنتیکی موجود در ۲۲۸ توده ژرم‌پلاسمی متعلق به دوازده گونه آزیلوپس و تریتیکوم ایران گزارش کردند نشانگرهای CBDP به‌نحو مطلوبی توانستند توده‌های مربوط به گونه بر اساس ساختار

گونه‌های خویشاوند گیاهان زراعی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ژنی برای اصلاح گیاهان و حفظ پایدار اکوسیستم زراعی محسوب می‌شوند. در واقع خویشاوندان وحشی، واحدی از طبقه‌بندی گیاهان است که به‌دلیل داشتن ارتباط ژنتیکی نسبتاً نزدیک با گیاهان زراعی به‌صورت غیر مستقیم و یا مستقیم در تکامل و بهبود آن‌ها نقش دارند و به‌طور کلی به یک یا دو خزانه ژنی و یا یک تا چهار گروه تاکسونومی تعلق دارند (Maxted et al. 2006). براساس گزارش (Maxted et al. 2009) در بین گیاهان زراعی، گندم دارای بیشترین تعداد گونه‌های خویشاوندی است به‌طوری در مقایسه با سایر گونه‌های گیاهی این تفاوت بسیار چشمگیر می‌باشد. از این‌رو با توجه به نقش و اهمیت گونه‌های وحشی داشتن اطلاعات کافی در خصوص نحوه پراکنش و میزان تنوع ژنتیکی درون این منابع ژرم‌پلاسمی ضروری است تا بتوان از آن‌ها استفاده مفید و اصلاح گیاهان زراعی به‌عمل آورد (Salimi et al. 2005). ایران یکی از مهم‌ترین مراکز اولیه توزیع و پراکنش گونه‌های وحشی گندم در خاورمیانه و جهان می‌باشد و بخش‌هایی از شمال غربی تا جنوبی کشور با قرارگیری در هلال حاصلخیز به‌عنوان کلیدی‌ترین مراکز تنوع برای این گونه‌ها به‌شمار می‌آیند (Van-Slagern 1994). علاوه براین، وجود چنین زیستگاه‌هایی سبب شده است تا ایران در زمره کشورهای دارای غنی‌ترین خزانه ژنی گندم شناخته شود. بین خویشاوندان وحشی گندم، جنس آزیلوپس یکی از مهم‌ترین خویشاوندان وحشی گندم‌های زراعی (*Triticum aestivum* L. و *T. turgidum* var. *durum*) می‌باشد و به‌واسطه اهدا ژنوم‌های D و B به این گونه‌ها نقش بسزایی در تکامل گندم دارند (Pour-Aboughadareh et al. 2018a). گونه‌های آزیلوپس در سه سطح دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید گروه‌بندی می‌شوند و از نظر ساختار ژنومی نیز دارای ژنوم‌های U، D، C، N، M، T و S/B می‌باشند (Van-Slageren 1944). براساس گزارشات موجود مشخص شده است تاکنون از تنوع ژنتیکی درون گونه‌های خویشاوند گندم به‌طور کامل استفاده نشده است. بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های ژرم‌پلاسمی و تعیین ساختارهای جمعیت همواره مورد توجه به‌نژادگران بوده و لذا حفاظت و

متعلق به سه گونه *Ae. tauschii*، *Ae. triuncialis* و *Ae. cylindrica* انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۸۰ توده آزیلوپس جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران بود (جدول ۱). پس از کشت بذور هر یک از ژنوتیپ‌ها در شرایط گلخانه و تولید گیاهچه، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان بر اساس روش CTAB انجام شد (Doyle and Doyle 1987). پس از استخراج DNA ژنومی کیفیت آن با استفاده الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت ۱۲ آغازگر CBDP بر اساس توالی‌های ارائه شده توسط Singht et al. (2014) سنتز و استفاده شد (جدول ۲).

ژنومی آن‌ها در گروه‌های مجزایی از یکدیگر تفکیک کنند. در واقع این نتایج بیانگر این است که این سیستم نشانگری به خوبی قابل استفاده در بررسی روابط بین گونه‌ای بوده و می‌تواند در ترکیب با سایر نشانگرهای هم‌بارز مانند SSR در تهیه نقشه‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین (Tiwari et al. 2016) نیز کارایی چهار سیستم نشانگری RAPD، ISSR، SCoT و CBDP را تعیین تنوع ژنتیکی موجود در گونه *Andrographis paniculata* مقایسه کردند. این محققان اظهار داشتند نشانگرهای CBDP با دارا بودن بیشترین مقادیر اطلاعات چندشکلی و قدرت تمایز آغازگرها نسبت به سه سیستم نشانگری دیگر به خوبی قادر تعیین ساختار جمعیت و گروه‌بندی توده‌های ارزیابی شده بود. به طور کلی این تحقیق با هدف بررسی کارایی نشانگرهای CBDP در ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۸۰ توده آزیلوپس

جدول ۱- فهرست توده‌های متعلق به سه گونه آزیلوپس به همراه کد دسترسی بانک ژن آن‌ها

ردیف	گونه	کد بانک ژن	ردیف	گونه	کد بانک ژن	ردیف	گونه	کد بانک ژن
۱	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03000	۲۹	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00035	۵۷	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00141
۲	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03001	۳۰	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00137	۵۸	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00143
۳	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03002	۳۱	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00173	۵۹	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00144
۴	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03003	۳۲	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00194	۶۰	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00151
۵	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03004	۳۳	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00217	۶۱	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00157
۶	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03005	۳۴	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00240	۶۲	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00164
۷	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03006	۳۵	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00246	۶۳	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00193
۸	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03007	۳۶	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00387	۶۴	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00196
۹	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03008	۳۷	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00421	۶۵	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00198
۱۰	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03009	۳۸	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00035	۶۶	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00223
۱۱	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03010	۳۹	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00137	۶۷	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00224
۱۲	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03011	۴۰	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00173	۶۸	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00238
۱۳	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03012	۴۱	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00194	۶۹	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00245
۱۴	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03013	۴۲	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00217	۷۰	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00247
۱۵	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03014	۴۳	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00240	۷۱	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00249
۱۶	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03015	۴۴	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00246	۷۲	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00260
۱۷	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03016	۴۵	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00387	۷۳	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00261
۱۸	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03017	۴۶	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00205	۷۴	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00263
۱۹	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03018	۴۷	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00222	۷۵	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00269
۲۰	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03019	۴۸	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00275	۷۶	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00273
۲۱	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03020	۴۹	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00381	۷۷	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00274
۲۲	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03021	۵۰	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00382	۷۸	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00276
۲۳	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03022	۵۱	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-02076	۷۹	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00279
۲۴	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03023	۵۲	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00020	۸۰	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00289
۲۵	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03024	۵۳	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00039			
۲۶	<i>Ae. triuncialis</i>	IUGB-03025	۵۴	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00051			
۲۷	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00030	۵۵	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00080			
۲۸	<i>Ae. cylindrica</i>	IUGB-00032	۵۶	<i>Ae. tauschii</i>	IUGB-00108			

در نظر گرفته شد. سپس به منظور دستیابی به تعداد زیر جمعیت‌های واقعی از نرم‌افزار بر خط Structure Harvester (Earl and von Holdt 2012) استفاده شد.

نتایج و بحث

تعیین کارایی آغازگرهای استفاده شده: با استفاده از ۱۲ آغازگر استفاده شده در این پژوهش در مجموع تعداد ۹۴ قطعه تکثیر شد که تمامی آن‌ها چندشکل بودند. میانگین تعداد قطعات چندشکل به ازای هر آغازگر برابر با $7/83$ بود (جدول ۲). آغازگرهای CBDP-5 و CBDP-6 با تکثیر پنج قطعه و در مقابل آغازگر CBDP-11 با ۱۴ قطعه دارای بیشترین تعداد قطعات چندشکل بودند. یکی از شاخص‌های مهم در تعیین کارایی یک سیستم نشانگری، شاخص PIC می‌باشد. در واقع این شاخص توانمندی آغازگرهای استفاده شده را از لحاظ تفکیک افراد مورد ارزیابی نشان می‌دهد (Powell et al. 1996). شاخص PIC دارای میانگین $0/44$ و دامنه تغییراتی بین $0/35$ (مربوط به آغازگر CBDP-11) و $0/48$ (مربوط به آغازگر CBDP-3) داشت. شاخص MI بین $2/45$ و $6/78$ با میانگین $3/82$ متغیر بود و آغازگرهای CBDP-6 و CBDP-11 به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار این شاخص را به خود اختصاص دادند. علاوه بر شاخص‌های ذکر شده، شاخص Rp نیز توانایی یک سیستم نشانگری را در ایجاد باندهای قابل امتیازدهی تعیین می‌کند (Prevost and Wilkinson 1999). دو آغازگر CBDP-11 و CBDP-5 به ترتیب کمترین ($0/07$) و بیشترین ($16/47$) مقدار شاخص Rp را تعیین کردند به طوری که میانگین این شاخص $8/60$ به دست آمد. با توجه به اطلاعات به دست آمده مشخص شد آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق کارایی لازم جهت انجام سایر تجزیه‌های ژنتیکی را دارند و نتایج به دست آمده در این زمینه با یافته‌های برخی از محققان همچون Pour- (2019) و Etminan et al. (2019)، Tiwari et al. (2016) و Aboughadareh et al. مطابقت داشت.

برآورد تنوع ژنتیکی بین و دورن گونه‌ای: نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد ۵۲ درصد از کل واریانس ژنتیکی مربوط به واریانس بین گونه‌ای می‌باشد و در مقابل سهم تنوع

پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرها، واکنش PCR با استفاده دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad-T100) انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰ میکرولیتر PCR master Mix (2X) بود. کلیه واکنش‌های تکثیر در برنامه دمایی هر واکنش شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام واکنش تکثیر، محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با Safeview انجام و عکس‌برداری از آن‌ها صورت گرفت. پس از امتیازدهی الگوها، مقادیر محتوای چندشکلی (PIC: polymorphism information content)، قدرت تمایز (Rp: resolving power) و شاخص نشانگر (MI: marker index) به ترتیب با استفاده از فرمول‌های ارائه شده توسط (Anderson et al. 1993)، (Prevost and Wilkinson 2007) و (Varshney et al. 2007) برای هر آغازگر محاسبه شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I)، شاخص تنوع ژنی نی (He) و درصد مکان‌های ژنی برای هر گونه با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx انجام شد (Peakall and Smouse 2006). مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله جاکارد محاسبه و به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار DARwin صورت گرفت. تجزیه ساختار جمعیت در توده‌های ارزیابی شده نیز با استفاده از نرم STRUCTURE صورت گرفت. در این تجزیه جهت یافتن زیر جمعیت‌های واقعی تجزیه بر پایه مدل بی‌بین (Bayesian) انجام و به تعداد ۱۰ مرتبه تکرار شد. تعداد شاخص‌های burn-in و شاخص Markov Chain Monte Carlo (MCMC) در هر تکرار به تعداد مساوی و ۵۰۰۰۰

(2019) مطابقت نداشت. این محققان با استفاده از نشانگرهای CBDP و SCoT نشان دادند میزان تنوع ژنتیکی درون گونه‌های *Ae. cylindrica* و *Ae. tauschii* بیشتر از *Ae. triuncialis* است. در واقع یکی از مهم‌ترین دلایل وجود تفاوت در مقادیر پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده برای هر گونه را می‌توان به تفاوت در تعداد نمونه‌های ارزیابی شده نسبت داد. به‌طور کلی بالا بودن پارامترهای ژنتیکی در گونه *Ae. triuncialis* و *Ae. cylindrica* بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین توده‌های موجود در این گونه است.

درون گونه‌ای ۴۸ درصد بود (جدول ۳). بر این اساس می‌توان اظهار داشت آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش به‌خوبی قادر بودند اختلافات بین گونه‌ای توده‌های ارزیابی شده در سطح ژنوم را آشکار کنند. در واقع وجود تفاوت در ساختار ژنومی گونه‌های مورد مطالعه تایید کننده نتایج به‌دست آمده از این تجزیه خواهد بود. پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده برای هر یک از گونه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود گونه *Ae. triuncialis* نسبت به گونه‌های *Ae. tauschii* و *Ae. cylindrica* از نظر پارامترهای Na ، Ne ، I ، He و PPL دارای بیشترین مقادیر بود. با این حال، این نتایج با نتایج به‌دست آمده از مطالعه (2019) Pour-Aboughadareh et al. و Etmnan et al.

جدول ۲- شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای CBDP استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های آزیلوپس

آغازگر	توالی	TAB	NPB	PPB	PIC	Rp	MI
CBDP1	TGAGCACGATCCAATAGC	۸	۸	۱۰۰	۰/۳۹	۷/۵۵	۳/۹۸
CBDP2	TGAGCACGATCCAATAAT	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۰	۸/۷۲	۴/۴۹
CBDP3	TGAGCACGATCCAATACC	۷	۷	۱۰۰	۰/۳۵	۷	۳/۴۶
CBDP4	TGAGCACGATCCAATAAG	۶	۶	۱۰۰	۰/۴۱	۵/۹۲	۲/۹۹
CBDP5	TGAGCACGATCCAATCTA	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۰	۵/۰۷	۲/۴۹
CBDP6	TGAGCACGATCCAATCGA	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۵	۵/۶۴	۲/۴۵
CBDP7	TGAGCACGATCCAATGAT	۷	۷	۱۰۰	۰/۴۶	۸/۶۲	۳/۳۱
CBDP8	TGAGCACGATCCAATGTT	۷	۷	۱۰۰	۰/۴۷	۶/۷۷	۳/۴۹
CBDP9	TGAGCACGATCCAATATA	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۸	۱۰/۲	۴/۴۲
CBDP10	TGAGCACGATCCAATGAG	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۶	۱۱/۳۹	۴/۱۸
CBDP11	TGAGCACGATCCAATGCG	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۴۸	۱۶/۴۷	۶/۷۸
CBDP12	TGAGCACGATCCAATTGA	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۷	۹/۸۷	۳/۷۸
میانگین		۷/۸۳	۷/۸۳	۱۰۰	۰/۴۳	۱۰۰	۳/۸۲

Ta: دمای اتصال آغازگر، TAB: تعداد کل قطعات تک‌نیری، NPB: تعداد قطعات تک‌نیری چندشکل، PPB: درصد چندشکلی، PIC: محتوای اطلاعات چندشکل، Rp: قدرت تمایز، و MI: شاخص نشانگر

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) گونه‌های آزیلوپس بر اساس نشانگرهای CBDP

منبع تغییرات	بین گونه‌ای	درون گونه‌ای
df	۲	۷۷
SS	۵۴۵/۸۵	۷۴۱/۵۸
MS	۲۷۲/۹۲	۹/۶۳
Est. Var	۱۰/۱۸	۹/۶۳
Var	٪۵۱	٪۴۹

SS: مجموع مربعات، MS: میانگین مربعات، Est. var: واریانس تخمین زده شده، Var: واریانس کل

با این حال، بایستی مدنظر داشت که استفاده از خویشاوندان وحشی در برنامه‌های تلاقی ممکن است همیشه نتایج جالبی به دنبال نداشته باشد و به دلیل لینکاژ ژنی با برخی از ژن‌ها سبب بروز یک فنوتیپ نامطلوب شود بنابراین لازم است در این راستا مطالعات تکمیلی بر روی گونه‌های مختلف صورت گیرد. گروه‌بندی توده‌های آزیلوپس و تعیین ساختار جمعیت: فواصل ژنتیکی بین توده‌های بررسی شده بین ۰/۰۳ تا ۰/۹۶ با میانگین ۰/۵۲ متغیر بود. با توجه به ماتریس ضرایب بین توده‌ها مشخص کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به توده *Ae. triuncialis* و بیشترین آن مربوط به دو توده از گونه *Ae. tauschii* و *Ae. triuncialis* بود (ماتریس ضرایب فاصله ژنتیکی نشان داده نشده است). به منظور گروه‌بندی توده‌ها تجزیه خوشه‌ای به روش NJ انجام و دندورگرام به دست آمده از این تجزیه در شکل ۱-A نشان داده شده است. کلیه توده‌های ارزیابی شده در چهار گروه کلی قرار گرفتند. گروه اول شامل توده‌های *Ae. tauschii*، گروه دوم شامل کلیه توده‌های *Ae. cylindrica*، گروه سوم شامل کلیه توده‌های *Ae. tauschii*، گروه چهارم تنها سه توده از گونه *Ae. tauschii* بود. نتایج تجزیه ساختار جمعیت نیز نشان داد تعداد سه زیرجمعیت واقعی در مجموع ۸۰ توده بررسی شده وجود دارد (۳ K =). با توجه به الگوی به دست آمده از تفکیک توده‌ها مشخص شد که توده‌های مربوط به هر گونه در زیر جمعیت‌های کاملاً متمایز از هم تفکیک شدند (شکل ۱-B). بنابراین این نتیجه مؤید این است که آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق به خوبی قادر به گروه‌بندی توده‌ها بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها بوده‌اند. پیش از این (Pour-Aboughadareh et al. 2018a) نیز اظهار داشتند نشانگرهای مبتنی بر ژن‌های هدفمند نسبت به سایر نشانگرهای غالب مانند RAPD، ISSR و ... به خوبی می‌توانند نمونه‌های متعلق به گونه‌های مختلف را بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها گروه‌بندی کنند و در مطالعات فیلوژنیک به عنوان ابزارهای کارآمدی مورد استفاده قرار گیرند.

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین و درون گونه‌های آزیلوپس وجود دارد که نیاز است از این تنوع به عنوان یک فرصت برای به کارگیری خویشاوندان وحشی گندم در برنامه‌های اصلاحی و ایجاد جمعیت‌های پایه از آن‌ها

علاوه بر این وجود تنوع بالا درون گونه‌ای و یا به عبارتی تنوع آلی بالا در یک گونه می‌تواند شانس یافتن آل‌ها و ژن‌ها مطلوب را افزایش دهد (Pour-Aboughadareh et al. 2017). پیش از این در برخی از مطالعات انجام شده بر روی گونه‌های آزیلوپس و دیگر گونه‌های ژرم‌پلاسمی گندم مشخص شده است گونه‌های وحشی واجد ژنوم D نسبت به سایر گونه‌ها از پتانسیل اصلاحی بهتری برای بکارگیری در برنامه‌های مرتبط با افزایش تحمل به انواعی از تنش‌های غیر زنده مانند خشکی، شوری، سرما و ... را دارند. به عنوان نمونه در مطالعات صورت گرفته توسط (2018a,c) Ahmadi et al. گونه *Ae. cylindrica* نسبت به *Ae. tauschii* تحمل بیشتری نسبت به شرایط تنش شوری و خشکی نشان داد. علاوه بر این، گزارش شده است این گونه نسبت به سایر دیگر گونه‌های آزیلوپس نیز در شرایط تنش کم آبی به طور کارآمدتری توانسته است بیوماس و ساختار ریشه خود را حفظ کند (Ahmadi et al. 2018b). در مطالعه (Suneja et al. 2019) نیز به تحمل قابل توجهی در گونه‌های *Ae. tauschii* نسبت به *T. diccoides* نسبت به تنش خشکی اشاره شده است. گزارش شده است گونه *Ae. triuncialis* نسبت به سایر گونه‌های وحشی گندم وحشی و زراعی غلظت‌های بالای نمک را از طریق کنترل بیان ژن‌های دخیل در القای تحمل به تنش مانند *SOS* و *HTK* بهتر تحمل می‌کند (Ahmadi et al. 2020). از این رو به نظر می‌رسد استفاده از این منابع ژرم‌پلاسمی می‌تواند تاثیر به‌سزایی در بهبود صفات کیفی و افزایش تحمل به تنش‌های محیطی در ارقام گندم داشته باشد.

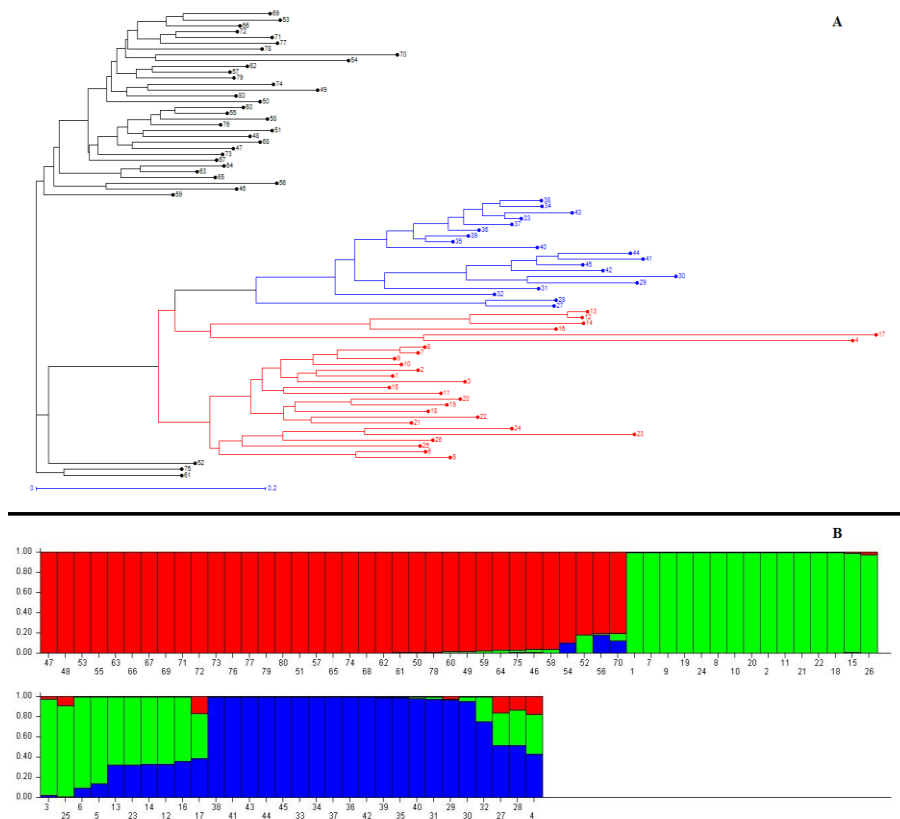
جدول ۴- پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده در گونه‌های مختلف آزیلوپس بر اساس آغازگرهای CBDP

گونه	Na	Ne	I	H	PPL
<i>Ae. triuncialis</i>	۱/۷۰	۱/۵۶	۰/۴۶	۰/۳۱	۷/۸۵/۱۱
<i>Ae. cylindrica</i>	۱/۵۱	۱/۳۸	۰/۳۳	۰/۲۲	۷/۶۷/۰۲
<i>Ae. tauschii</i>	۱/۶۳	۱/۳۲	۰/۳۰	۰/۲۰	۷/۶۵/۹۶
میانگین	۱/۶۱	۱/۴۱	۰/۳۶	۰/۲۴	۷/۷۲/۷۰

Na، Ne، I، H و PPL به ترتیب نشان‌دهنده تعداد آل‌های مشاهده شده، تعداد آل‌های مؤثر، شاخص شانون، شاخص تنوع ژنی، و درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل می‌باشند.

در مطالعات ژنتیکی و گروه‌بندی جمعیت‌های خویشاوندی گندم است. از این رو، استفاده از سیستم در سایر مطالعات تکمیلی مانند اشباع نقشه‌های ژنتیکی توصیه می‌شود.

استفاده نمود. علاوه بر این، با توجه به شاخص‌های تعیین کننده کارایی سیستم نشانگری مشخص شد آغازگرهای انتخاب شده در این تحقیق به خوبی سطح بالایی از چند شکلی را در بین توده‌های ارزیابی شده نشان داده‌اند که به نوبه خود بیانگر کارایی این سیستم



شکل ۱- دندروگرام به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگرهای CBDP با استفاده از ماتریس ضرایب فاصله ژنتیکی (A) و الگوی ساختار جمعیت برای ۸۰ توده اژیلوپس بررسی شده (B)

منابع

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki Ourang S, Khalili P, Pocza P (2020) Unraveling salinity stress responses in ancestral and neglected wheat species at early growth stage: A baseline for utilization in future wheat improvement programs. *Physiology and Molecular Biology Plants* 26: 537-549.

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki-Ourang S et al. (2018a) Screening wild progenitors of wheat for salinity stress at early stages of plant growth: insight into potential sources of variability for salinity adaptation in wheat. *Crop and Pasture Science* 69: 649-58.

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Fabriki-Ourang S, Mehrabi A-A, Siddique KHM (2018b) Screening wheat germplasm for seedling root architectural traits under contrasting water regimes: potential sources of variability

for drought adaptation. *Archives Agronomy and Soil Science* 64: 1351-1365.

Ahmadi J, Pour-Aboughadareh A, Ourang SF, Mehrabi AA, Siddique KHM (2018c) Wild relatives of wheat: *Aegilops-Triticum* accessions disclose differential antioxidative and physiological responses to water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 40: 90.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.

Collard BCY, Mackill D (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 557-572.

- Earl DA, vonHoldt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resource* 4: 359-361.
- Etmian A, Pour-Aboughadareh A, Mehrabi AA, Shooshtari L, Ahmadi-Rad A, Moradkhani H (2019) Molecular characterization of the wild relatives of wheat using CAAT-box derived polymorphism. *Plant Biosystem* 153: 398-405.
- Maxted N, Ford-Lloyd BV, Jury SL, Kell SP, Scholten MA (2006) Towards a definition of a crop wild relative. *Biodiversity and Conservation* 15: 2673-2685.
- Maxted N, Kell S (2009) CWR in crop improvement: To what extent are they used? *Crop Wild Relative Newsletter* 7: 7-8.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etmian A, Moghaddam M (2018a) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some *Aegilops* and *Triticum* species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. *Plant Biosystem* 152: 694-703.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etmian A, Moghaddam M (2018b) Assessment of agromorphological diversity existing in some of *Aegilops* species. *Cereal Research* 7: 533-549. (In Farsi).
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Moghaddam M, Etmian A (2017) Assessment of genetic diversity among Iranian *Triticum* germplasm using agromorphological traits and start codon targeted (SCoT) markers. *Cereal Research Communication* 45: 574-586.
- Pour-Aboughadareh A, Etmian A, Shooshtari L, Maleki-Tabrizi N (2019) Comparative assessment of SCoT and CBDP markers for investigation of genetic diversity existing in different *Aegilops* species. *Agricultural Biotechnology Journal* 11: 153-174. (In Farsi).
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 107-112.
- Salimi A, Ebrahimzadeh H, Taeb M (2005) Description of Iranian diploid wheat resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 351-361.
- Singh AK, Rana MK, Singh S, Kumar S, Kumar R, Singh R (2014) CAAT box-derived polymorphism (CBDP): a novel promoter-targeted molecular marker for plants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 23: 175-183.
- Suneja Y, Gupta AK, Bains NS (2019) Stress adaptive plasticity: *Aegilops tauschii* and *Triticum dicoccoides* as potential donors of drought associated morpho-physiological traits in Wheat. *Frontiers in Plant Science* 10: 211.
- Tiwari G, Singh R, Singh N, Choudhury DR, Paliwal R, Kumar A, Gupta V (2016) Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in Kalmegh [*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees]. *Industrial Crops and Products* 86: 1-11.
- van-Slageren MW (1994) Wild wheats. A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agricultural University pp. 512.
- Varshney RK (2010) *Molecular Techniques in Crop Improvement*, Springer, Chapter 4.
- Varshney RK, Chabane K, Hendre PS, Ramesh K, Aggarwal K, Graner A (2007) Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant Science* 173: 638-649.