

تجزیه ساختار جمعیت و بررسی تنوع ژنتیکی در کلکسیون محوری گونه

SSR با استفاده از نشانگرهای *Aegilops tauschii* Coss

Population genetic structure and investigation of genetic diversity in the core collection of *Aegilops tauschii* Coss. species using SSR markers

هدی مرادخانی^{۱*}، منصور امید^۱، محمدرضا بی همتا^۱، علی اکبر شاهنجات بوشهری^۱، علی اشرف مهربانی^۲

۱- به ترتیب دانشجوی دکترا، استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، کرج، ایران

۲- دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

Moradkhani H^{1*}, Omid M¹, Bihamta M¹, Shahnejat Booshehri¹ A, Mehrabi AA²

1- PhD Student, Professors, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Genetics, Faculty of Agricultural Science, Shahed University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hodamoradkhani12@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۲)

چکیده

جنس آژیلوپس (*Aegilops* spp.) به عنوان یکی از مهم ترین ذخایر ژنتیکی گندم به شمار می آید. در بین گونه های موجود در این جنس، گونه *Ae. tauschii* Coss نقش مهمی در تکامل گندم نان دارد و علاوه بر آن منبع غنی از ژن های مفید برای استفاده در برنامه های به نژادی مرتبط با بهبود تحمل به تنش های محیطی می باشد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی موجود در ۴۸ توده جمع آوری شده از نواحی ایران و ترکیه با استفاده از نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس الگوی باندهای مشاهده شده در مجموع ۷۲ قطعه در مجموعه نمونه های ارزیابی شده تکثیر شد که تمامی آن ها چندشکل بودند. متوسط شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و قدرت تمایز (Rp) به ترتیب برابر با ۰/۳۶، ۰/۶۶ و ۱/۸۹ بود. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) مشخص شد بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به بین جمعیت ها بود. بررسی پارامترهای تنوع ژنتیکی نشان داد بیشترین تعداد آلل های مؤثر (Ne)، شاخص اطلاعات شانون (I) و هتروزگوتی مورد انتظار (He) مربوط به توده های ایران بود. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه ای و تجزیه ساختار جمعیت مشخص شد الگوی توزیع نمونه ها در زیر گروه ها و زیر جمعیت ها از روند خاصی تبعیت نکرده که خود بیانگر سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما بررسی شده می باشد. به طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان اظهار داشت گونه *Ae. tauschii* می تواند به عنوان مرجعی برای یافتن آلل های مفید جهت استفاده و انتقال آن ها به ارقام اصلاحی مورد توجه قرار گیرند.

واژه های کلیدی

آژیلوپس

تنوع آلی

ذخایر ژنتیکی

ژرم پلاسما

مقدمه

گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* L. جز یکی از نخستین گیاهان تکامل یافته توسط بشر است که قدمت تکامل آن به حدود ۱۲۰۰۰ سال قبل بر می‌شود. بر اساس اسناد و شواهد موجود مشخص شده است این گیاه زراعی نخستین بار در بخش هلال حاصلخیز که مشتمل از مناطقی از کشورهای لبنان، ایران، سوریه، اسرائیل، اردن و ترکیه تکامل یافته است (Faris et al. 2014). با این حال بر اساس تازه‌ترین شواهد مشخص شده است که نواحی غربی ایران خواستگاه نخستین دورگ‌گیری بین گونه‌های وحشی گندم در جهان می‌باشد (Weide et al. 2013). با توجه به روند افزایش رشد جمعیت در جهان برآورد شده است تا سال ۲۰۵۰ نزدیک به یک میلیارد تن گندم برای تغذیه انسان‌ها نیاز بوده که رفع این نیاز منوط به اجرای پروژه‌ها و تحقیقات به‌نژادی مناسب است (Arzani and Ashraf 2016). منابع ژنتیکی گیاهی پایه امنیت غذایی و جزو یکی از ارزشمندترین ذخایر ملی هر کشور محسوب می‌شوند. ایجاد ارقام تجاری با ثبات عملکرد و کیفیت بالا به‌منظور دستیابی به امنیت غذایی وابسته به در اختیار داشتن خزانه ژنی غنی می‌باشد. از طرف دیگر محدود بودن تنوع ژنتیکی قابل استفاده در ارقام اصلاحی سازگار شده به شرایط کنونی سبب شده است تا استفاده از خویشاوندان وحشی به‌عنوان یک منبع ژنی غنی و متنوع از آل‌های ایده آل ابزار مناسبی برای به‌نژادگران گندم در نظر گرفته شوند. در واقع ارقام بومی و خویشاوندان وحشی آن‌ها، به دلیل سازگاری بالایی که به شرایط محیطی خود دارند، دارای مناسب‌ترین ژن‌ها بوده و از این‌رو می‌توانند تنوع ژنتیکی مورد نیاز به‌نژادگران را تأمین نمایند (Pour-Aboughadareh et al. 2017).

بررسی روند تکامل گندم نان و دوروم نشان می‌دهد که حدود ۳ میلیون سال پیش از نخستین تلاقی‌ها بین گونه‌های وحشی گندم تشکیل شده است (Peng et al. 2011). در بین ذخایر ژنتیکی گندم، دو جنس تریتیکوم و آریلوپس به‌عنوان مهم‌ترین ذخایر ژنتیکی آن به‌شمار می‌آیند. گونه‌های موجود در این دو جنس مهم‌ترین خویشاوندان گندم زراعی بوده و بخش اصلی مخزن ژنی این گیاه را شامل می‌شوند. ایران یکی از مراکز اصلی تنوع، توزیع و پراکنش گونه‌های خویشاوند وحشی گندم به‌ویژه گونه‌های

واجد ژنوم D و A به‌شمار می‌آید به نحوی که برخی از نواحی شمال، شمال غرب، غرب و جنوب غربی کشور به‌عنوان منشأ اصلی این گونه‌ها معرفی شده‌اند (Etminan et al. 2019). با توجه به گزارشات موجود مشخص شده است که گونه‌های وحشی برخورداری از ژنوم D دارای پتانسیل بالایی جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی گندم هستند. علاوه بر این بسیاری از خصوصیات زراعی و کیفی گندم زراعی نشأت گرفته از ژنوم D می‌باشد (Etminan et al. 2019). والد دهنده ژنوم D به گندم نان گونه *Aegilops tauschii* Coss. می‌باشد. این گونه دیپلوئید بوده و دارای ساختار کروموزومی $2n=2x=14$ با ساختار ژنومی DD می‌باشد. گونه *Ae. tauschii* به‌واسطه ژنوم خود به‌عنوان اصلی‌ترین خویشاوند وحشی گندم نان شناخته شده است. از نقطه نظر گیاه‌شناسی، گیاهی یکساله بوده که دارای ساقه‌های نازک و برگ‌ها کوچک و نوک تیز می‌باشد و به‌طور متوسط دارای سنبله‌هایی به طول ۱۱ - ۹ سانتی‌متر می‌باشد. شکل خاص سنبله‌های این گونه سبب شده است تا از دیگر گونه‌های وحشی گندم به‌خوبی متمایز شود. این گونه خود دارای دو زیر گونه *Ae. tauschii* subspecies *tauschii* و *sterangulata* می‌باشد. سواحل دریای خزر و آذربایجان به‌عنوان عمده‌ترین مراکز توزیع این گونه شناخته شده‌اند. دامنه‌ها، سراسیمه‌ها، علفزارها، حاشیه‌ها، نواحی جنگلی مرطوب و حتی درون مزارع گندم زراعی به‌عنوان اصلی‌ترین رویشگاه‌های این گونه محسوب می‌شوند. در مناطق کم باران با میانگین بارش سالانه ۳۵۰ - ۱۵۰ میلی‌متر این گونه به‌خوبی رشد نموده و سبب شده است تا آن نیز به‌عنوان یکی از گونه‌های برخورداری از ژن‌های متحمل به خشکی در نظر گرفته شود. این گونه دارای پراکندگی گسترده‌ای است به‌طوری که می‌توان عنوان کرد تنها گونه موجود در جنس آریلوپس است که از مرکز تکامل به نواحی شرقی گسترش یافته است. همچنین در مرکز چین پراکنش وسیعی از آن مشاهده شده است (Kilian et al. 2009).

یکی از اساسی‌ترین پایه‌های هر برنامه به‌نژادی مطالعه الگوی تنوع ژنتیکی موجود در منابع ژرم‌پلاسمی آن می‌باشد. در واقع آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی موجود در منابع ژرم‌پلاسمی سبب خواهد شد تا ظرفیت‌های ژنتیکی مرتبط با اهداف اصلاحی مختلف برای

(2019) نیز بیانگر وجود سطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های *Ae. tauschii* بود. این محققان ۷۱۳ نشانگر SNP معنی‌دار در بین جمعیت‌های ارزیابی شده گزارش دادند. همچنین Bokaei et al. (2023) در ارزیابی مجموعه‌ای از گونه‌های وحشی گندم از نشانگرهای CDBP^۲ استفاده کردند و نتایج آن‌ها نشان داد گونه *Ae. tauschii* نسبت به سایر گونه دارای میزان تنوع ژنتیکی بالاتری می‌باشد. با توجه به اهمیت خویشاوندان وحشی گندم و به‌ویژه گونه *Ae. tauschii* این پژوهش با هدف بررسی و مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های *Ae. tauschii* مربوط به نواحی مختلف ایران و ترکیه با استفاده از نشانگرهای SSR انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۴۸ توده *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران (۲۶ نمونه) و ترکیه (۲۲ نمونه) مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها از بانک ژن گیاهی دانشگاه ایلام تهیه و فهرست و کد دسترسی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. به‌منظور استخراج DNA ژنومی تعداد ۱۰ بذر از هر یک از توده‌های مورد بررسی در گلدان کشت شد و نمونه‌های برگ‌ی آن‌ها در مرحله دو برگ‌ی به صورت بالک برداشت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی بر اساس روش CTAB^۳ صورت گرفت (Doyle and Doyle 1987). کیفیت DNA هر نمونه نیز با استفاده از الکتروفورز DNA استخراجی بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مشخص شد. به‌منظور فراهم آوردن اطلاعات ژنوتیپی در مجموع از ۴۰ جفت آغازگر SSR مربوط به ژنوم D گندم استفاده شد که توالی آن‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش PCR عبارت از ۱۰ میکرولیتر Master mix، ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده، ۲ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای رفت و برگشتی بود.

هر گونه گیاهی شناسایی شود (Mohammadi and Prasanna 2003). در این راستا نشانگرهای مولکولی ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی می‌باشند و گزارش‌های متنوعی از کاربرد انواع آن‌ها در ارزیابی ژرمپلاسم گندم در اختیار است. به‌عنوان مثال (2006) Saeidie et al. در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌هایی از گونه *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران از نشانگرهای SSR^۱ استفاده کردند و براساس نتایج خود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را گزارش نمودند. همچنین در این مطالعه میزان بالای از متوسط میزان چندشکلی (۰/۶۵) گزارش شده است. در بررسی (Tahernezhad et al. 2010) از نشانگرهای SSR در بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های مختلف *Ae. tauschii* استفاده شد و با استفاده از ۱۹ نشانگر SSR در مجموع ۲۰۸ آلل شناسایی شد که متوسط تعداد آلل برای هر لوکوس ۱۰/۹۴ بود. همچنین با توجه به ضرایب تشابه ژنتیکی و دندروگرام به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای نشان داده شد که سطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های بررسی شده وجود دارد و توده‌های مربوط به *Ae. tauschii* در سه زیر جمعیت تفکیک شدند. (Naghavi et al. 2010) ساختار جمعیت گونه‌های *T. aestivum* و *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند میزان تنوع ژنتیکی مشاهده شده در توده‌های متعلق به نواحی شمالی ایران نسبت به سایر مناطق بیشتر بوده و میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های وحشی *Ae. tauschii* به مراتب بسیار بیشتر از جمعیت‌های *T. aestivum* می‌باشد. علاوه بر این، این محققان اظهار داشتند جمعیت‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گلستان، مازندران دارای بیشترین تنوع ژنتیکی می‌باشند. لذا این مناطق می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای کاوش توده‌های برخوردار از پتانسیل‌های اصلاحی مفید برای به‌زادگران گندم فراهم آوردند. در مطالعه Moradkhani et al. (2015) تنوع ژنتیکی و مقایسه میزان آن در گونه‌های مختلف آزیلوپس صورت گرفت و مشخص شد میزان تنوع ژنتیکی در گونه *Ae. tauschii* و *Ae. crassa* بیشتر از سایر گونه‌ها بود. نتایج مطالعه Singh et al.

^۲ CAAT-box derived polymorphism

^۳ Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide

^۱ Simple sequence repeat

جدول ۱- لیست و کد دسترسی توده‌های ارزیابی شده در این پژوهش

ردیف	کد	منشاء	ردیف	کد	منشاء
۱	IUGB-51	ایران	۲۵	IUGB-279	ایران
۲	IUGB-180	ایران	۲۶	IUGB-222	ایران
۳	IUGB-145	ایران	۲۷	IUGB-95	ترکیه
۴	IUGB-97	ایران	۲۸	IUGB-94	ترکیه
۵	IUGB-6	ایران	۲۹	IUGB-131	ترکیه
۶	IUGB-17	ایران	۳۰	IUGB-96	ترکیه
۷	IUGB-1	ایران	۳۱	IUGB-253	ترکیه
۸	IUGB-196	ایران	۳۲	IUGB-137	ترکیه
۹	IUGB-50	ایران	۳۳	IUGB-119	ترکیه
۱۰	IUGB-36	ایران	۳۴	IUGB-135	ترکیه
۱۱	IUGB-32	ایران	۳۵	IUGB-96	ترکیه
۱۲	IUGB-2	ایران	۳۶	IUGB-125	ترکیه
۱۳	IUGB-31	ایران	۳۷	IUGB-138	ترکیه
۱۴	IUGB-205	ایران	۳۸	IUGB-124	ترکیه
۱۵	IUGB-209	ایران	۳۹	IUGB-137	ترکیه
۱۶	IUGB-226	ایران	۴۰	IUGB-95	ترکیه
۱۷	IUGB-245	ایران	۴۱	IUGB-248	ترکیه
۱۸	IUGB-144	ایران	۴۲	IUGB-129	ترکیه
۱۹	IUGB-223	ایران	۴۳	IUGB-94	ترکیه
۲۰	IUGB-15	ایران	۴۴	IUGB-123	ترکیه
۲۱	IUGB-166	ایران	۴۵	IUGB-126	ترکیه
۲۲	IUGB-257	ایران	۴۶	IUGB-95	ترکیه
۲۳	IUGB-216	ایران	۴۷	IUGB-255	ترکیه
۲۴	IUGB-214	ایران	۴۸	IUGB-251	ترکیه

جدول ۲- توالی آغازگرهای SSR استفاده شده در این پژوهش به همراه اطلاعات چندشکلی آنها

No.	آغازگر	توالی	NPB	PIC	Rp	MI
۱	barc 70	F GCGTGTGCTGCTTGTCTCGGTTC R CGCTATTTGCCGCCACCTCCATCA	۲	۰/۳۷	۱/۰۴	۰/۵۴
۲	barc 105	F CAGGAAGAAAAGGAAAGCATG R GCGGTGTGGCAATAATTACTTTTT	۲	۰/۴۲	۲/۷۹	۰/۸۴
۳	barc 130	F CGGCTAGTAGTTGGAGTGTG R ACCGCCTCTAGTTATTGCTCTC	۱	۰/۰۴	۳/۲۹	۰/۰۴
۴	barc 135	F ATC GCC ATC TCC TCT ACC A R GCG AAC CCA TGT GCT AAG T	۲	۰/۳۸	۲/۸۳	۰/۷۶
۵	barc 141	F GGCCCATGGATAATTTTGAATG R CAATTCGGCCAAAGAAGAAGTCA	۲	۰/۴۲	۱/۵۴	۰/۸۵
۶	barc 152	F CTCCTAAAATCGGGCAACCGCTTGTG R GCGTAATGATGGGAGTGGCTATAGGGCAGTT	۲	۰/۲۰	۰/۷۹	۰/۴۱

۷	barc 170	F	CGCTTGACTTTGAATGGCTGAACA	۲	۰/۳۷	۱/۷۱	۰/۷۵
		R	CGCCCACTTTTACCTAATCCTTTT				
۸	barc 175	F	GCGTAACAGAAGCGGAGAAAGC	۲	۰/۴۸	۱/۶۳	۰/۹۶
		R	GCGAATCATTTAGTGTTAGGTGGC				
۹	barc 178	F	GCGTATTAGCAAAACAGAAGTGA	۲	۰/۲۹	۱/۶۷	۰/۵۸
		R	GCGACTAGTACGAACACCACAAA				
۱۰	barc 186	F	GGAGTGTGAGATGATGTGGAAA	۲	۰/۳۰	۰/۷۹	۰/۶۰
		R	GCAGACGTCAGCAGCTCGAGAG				
۱۱	barc 204	F	CGCAGAAGAAAAACCTCGCAGAAAA	۱	۰/۴۱	۱/۶۳	۰/۴۱
		R	CGCAGTGTATCCAAATGGGCAAG				
۱۲	barc 205	F	GCGACAGTTGTAGCGGCAGTAGC	۲	۰/۳۲	۰/۸۸	۰/۶۳
		R	GAGCGTAGTAGAAGCAGAAGGAG				
۱۳	barc 54	F	GCGTTGGCTAATCATCGTTCCTTC	۳	۰/۴۷	۲/۴۲	۱/۴۱
		R	AGCACCCCTACCCAGCGTCAGTCAA				
۱۴	barc 59	F	GCG GAG TCT GCA AT	۲	۰/۴۸	۱/۹۶	۰/۹۶
		R	GCA TCC ACC TCC GCA GTC AGT				
۱۵	barc 66	F	GCGGCATTTCATTTTCAGATAGA	۲	۰/۳۳	۱/۱۳	۰/۶۵
		R	TGTGCCTGATTGTAGTAACGTATGT				
۱۶	barc 87	F	AGGCCTAGAGACTCAAAGCTG	۲	۰/۲۰	۲/۴۲	۰/۳۹
		R	GCGCTCTTCATCAACACATTCTC				
۱۷	barc 95	F	GGGGTGTGGTTGTTTGTAAAGG	۱	۰/۰۴	۳/۹۲	۰/۰۴
		R	TGCGAATTCTATATACGATCTTGA				
۱۸	cfa 2040	F	TCAAATGATTTCAGGTAACCCAC	۱	۰/۵۰	۳/۰۴	۰/۵۰
		R	TTCCTGATCCCACCAAACAT				
۱۹	cfa 2187	F	TAGCAAAGGGTGCATGTGAG	۱	۰/۵۰	۲/۰۴	۰/۵۰
		R	GCATGTTACGTCGCTGTTGT				
۲۰	cfd 51	F	GGAGGCTTCTCTATGGGAGG	۲	۰/۴۹	۱/۷۹	۰/۹۹
		R	TGCATCTTATCCTGTGCAGC				
۲۱	cfd 79	F	TCTGGTTCTTGGGAGGAAGA	۲	۰/۴۹	۱/۸۸	۰/۹۷
		R	CATCCAACAATTTGCCCAT				
۲۲	cfd 9	F	TTGCACGCACCTAAACTCTG	۲	۰/۴۷	۲/۳۸	۰/۹۴
		R	CAAGTGTGAGCGTCGG				
۲۳	gwm 272	F	GCAAGAAGCAACAGCAGTAAC	۲	۰/۴۴	۲	۰/۸۹
		R	CAGATGCTCTTCTCTGCTGG				
۲۴	gwm 314	F	AGGAGCTCCTCTGTGCCAC	۱	۰/۴۶	۲/۰۴	۰/۴۶
		R	TTCGGGACTCTCTTCCCTG				
۲۵	gwm 337	F	GACCAAGATATTCAAACCTGGCC	۲	۰/۳۰	۱/۷۵	۰/۵۹
		R	AGCTCAGCTTGCTTGGTACC				
۲۶	gwm 358	F	ATCATGTCGATCTCCTTGACG	۲	۰/۳۲	۰/۷۹	۰/۶۳
		R	TGCCATGCACATTAGCAGAT				
۲۷	gwm 382	F	GTCAGATAACGCCGTCCAAT	۲	۰/۴۴	۱/۳۳	۰/۸۹
		R	CTACGTGCACCACCATTTTG				
۲۸	gwm 533	F	AAGGCGAATCAAACGGAATA	۲	۰/۳۵	۰/۹۲	۰/۶۹
		R	GTTGCTTTAGGGGAAAAGC				
۲۹	wmc 285	F	TGTGGTTGTATTGCGGTATGG	۲	۰/۴۲	۱/۲۱	۰/۸۳
		R	TTGTGGTGCTGAGTTAGCTT				
۳۰	wmc 765	F	GGGATCAGACTGGGACTGGAG	۲	۰/۴۶	۱/۵۴	۰/۹۳
		R	GGGTTGGCTTGGCAGAGAA				

۳۱	wms 102	F	TCTCCCATCCAACGCCTC	۲	۰/۳۴	۲/۶۷	۰/۶۸
		R	TGT TGG TGG CTT GAC TAT TG				
۳۲	wms 113	F	ATTCGAGGTTAGGAGGAAGAGG	۲	۰/۳۲	۲/۵۰	۰/۶۴
		R	GAGGGTCGGCCTATAAGACC				
۳۳	wms 114	F	ACAAACAGAAAATCAAAAACCCG	۱	۰/۲۲	۲/۴۶	۰/۲۲
		R	ATCCATCGCCATTGGAGTG				
۳۴	wms 121	F	TCCTCTACAAACAAACACAC	۱	۰/۴۹	۲/۹۲	۰/۴۹
		R	CTCGCAACTAGAGGTGTATG				
۳۵	wms 16	F	GCTTGACTAGCTAGAGTATCATA	۲	۰/۳۹	۱/۰۸	۰/۷۷
		R	CAATCTTCAATTCTGTCGCACGG				
۳۶	wms 190	F	GTGCTTGCTGAGCTATGAGTC	۲	۰/۴۹	۲/۱۳	۰/۹۹
		R	GTGCCACGTGGTACCTTTG				
۳۷	wms 24	F	CACACAAGGCACCATTGC	۲	۰/۴۸	۲/۲۹	۰/۹۶
		R	CAATGGACATAGTTGTGTGCG				
۳۸	wms 37	F	ACTTCATTGTTGATCTTGTCATG	۱	۰/۲۲	۱/۵۴	۰/۲۲
		R	CGACGAATTCCAGCTAAAC				
۳۹	wms 52	F	CTATGAGGCGGAGGTTGAAG	۲	۰/۱۲	۰/۲۵	۰/۲۳
		R	TGCGGTGCTCTTCCATTT				
۴۰	wms 55	F	GCATCTGGTACACTAGCTGCC	۲	۰/۳۱	۲/۸۳	۰/۶۲
		R	TCATGGATGCATCACATCCT				
میانگین					۰/۳۶	۱/۸۹	۰/۶۶

NPB, PIC, MI و Rp به ترتیب بیانگر تعداد باندهای چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکل شاخص نشانگری و قدرت تمایز می باشند.

اطلاعات چندشکلی (PIC^1)، شاخص نشانگری (MI^2) و قدرت تفکیک (Rp^3) برای هر یک از آغازگرهای استفاده شده محاسبه شد. به منظور تعیین واریانس ژنتیکی بین و درون گونه‌ها، تجزیه واریانس مولکولی ($AMOVA^4$) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEX (Peakall and Smouse, 2006) انجام شد. همچنین مقادیر پارامترهای مربوط به تنوع ژنتیکی برای هر یک از دو گروه جمعیت مطالعه شده محاسبه شد. گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver.5.1 صورت گرفت. ساختار جمعیت با هدف تعیین تعداد زیرجمعیت‌های موجود (K) با استفاده از نرم‌افزار Structure و روش آماری بیزین صورت گرفت (Pitchard et al. 2000). این تجزیه بر اساس ۱۰ تکرار مستقل برای هر زیر جمعیت احتمالی با مقادیر اولیه K در نظر گرفته شده (از ۱ تا ۱۰) اجرا شد. علاوه بر این برای هر دو

چرخه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر (بسته به دمای بهینه هر آغازگر) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای بهینه شده برای هر آغازگر، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، و توسعه نهایی آغازگر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام PCR، به‌منظور آشکارسازی قطعات تکثیر شده از ژل آگارز با غلظت ۲/۵ درصد و با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه در TAE 1x استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل‌های بارگذاری شده در محلول Safe view II انجام شد و پس از آن قطعات تکثیری تحت نور UV با استفاده از دستگاه Gel Documentation آشکارسازی شدند.

پس از آشکارسازی قطعات تکثیری به‌دست آمده از هر آغازگر وجود و عدم وجود قطعات تکثیری به‌ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی شدند. میزان کارایی آغازگرهای استفاده شده نیز از طریق برخی از پارامترهای تعیین کننده مانند شاخص محتوای

¹ Polymorphism information content

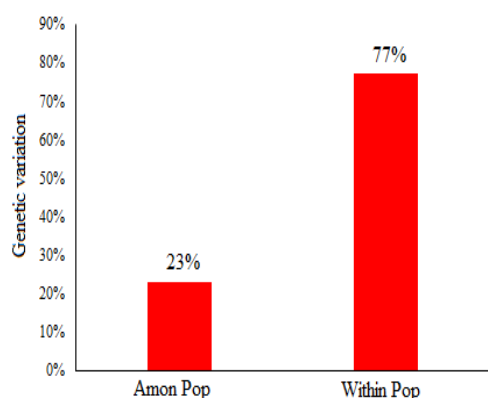
² Marker index

³ Resolving power

⁴ Analysis of molecular variance analysis (AMOVA)

توسط آغازگرهای SSR نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به درون گروه‌ها بود. با توجه به نتایج ارائه شده در شکل ۱ مشخص است که هر یک از جمعیت‌های *Ae. tauschii* مربوط به نواحی مختلف ایران و ترکیه از سطح بالایی از تنوع ژنتیکی برخوردار هستند که این نتیجه بیانگر غنای آللی این ژرم پلاسما جهت کشف تنوع آللی و یافتن ژن‌ها و آلل‌های جدید با اهداف اصلاحی خاص می‌باشد. به منظور مقایسه سطح تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از جمعیت‌های بررسی شده پارامترهای تنوع ژنتیکی محاسبه و نتایج آن در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۱- میزان واریانس ژنتیکی تخمین زده شده در بین و درون جمعیت‌های *Ae. tauschii* با استفاده از نشانگرهای SSR

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد بیشترین تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و درصد جایگاه‌های چند شکل (PPL) مربوط به جمعیت‌های ترکیه بود. با این حال بیشترین مقادیر تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I) و هتروزیگوتی مورد انتظار (He) مربوط به جمعیت‌های ایران بود. این نتیجه بیانگر متنوع بودن ژرم پلاسماهای ایران نسبت به ترکیه بوده که می‌تواند منبع ژنتیکی غنی برای به‌نژادگران گندم فراهم آورد. مطابق نتایج به دست آمده از این پژوهش، Pour-Aboughadareh et al. (2022) نیز سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌های *Ae. tauschii* نسبت به سایر گونه‌های وحشی گندم بومی ایران با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش دادند. همچنین

شاخص Burn-in و MCMC مقدار ۵۰۰۰۰ در نظر گرفت شد. سپس تعداد زیر جمعیت‌های واقعی (K) با استفاده از نرم‌افزار Structure Harvester تعیین شد (Evanno et al. 2005).

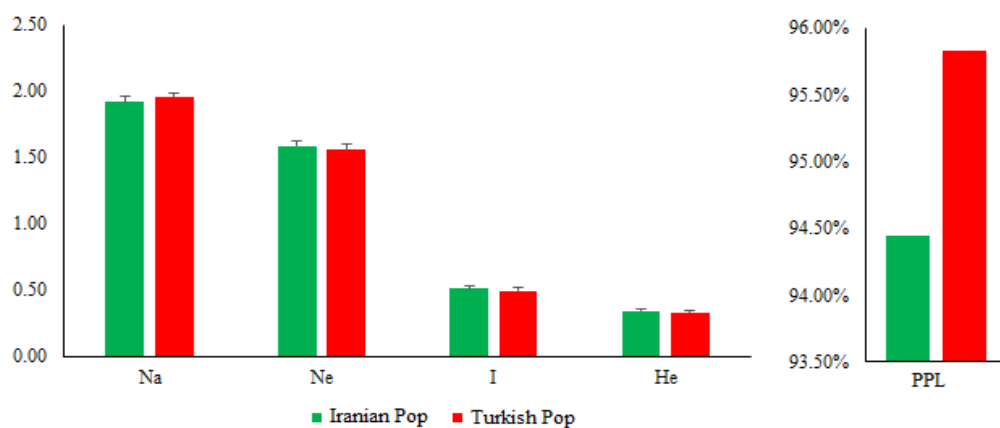
نتایج و بحث

از مجموع ۴۰ آغازگر SSR استفاده شده در این تحقیق، تمامی آغازگرها چند شکل و قادر به شناسایی ۷۲ باند در ۴۸ توده بررسی شده بودند. به منظور بررسی تعیین کارایی آغازگرهای استفاده شده شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، قدرت تمایز (Rp) و شاخص نشانگری (MI) محاسبه و و نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است. شاخص‌های PIC و Rp به تعداد آلل‌های مکان‌های ژنی نشانگر و فروانی نسبی آن‌ها در جمعیت مورد بررسی وابسته بوده و توانایی آن‌ها را در نشان دادن چندشکلی نشان می‌دهند (Farshadfar 1995). در بین آغازگرهای استفاده شده، تعداد نه آغازگر (شماره‌های ۳، ۱۱، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۴، ۳۳، ۳۴ و ۳۸) تنها یک باند نشان دادند. با این حال، آغازگر شماره ۱۳ دارای سه باند بود. سایر آغازگرها دو باند تکثیر شده نشان دادند. تعداد آلل‌های شناسایی شده توسط آغازگرهای مختلف می‌تواند ناشی از یکسانی در شمار توالی‌های تکراری و یا ساختار نوکلئوتیدی ژنوم باشد (Prevost and Wilkinson 1999). شاخص PIC با میانگین ۰/۳۶ دارای دامنه تغییراتی بین ۰/۰۴ (مربوط به آغازگر شماره ۳) و ۰/۵۰ (مربوط به آغازگرهای شماره ۱۸ و ۱۹) بود. دامنه تغییرات شاخص Rp بین ۰/۲۵ و ۳/۹۲ با میانگین ۱/۸۹ بود. کمترین و بیشترین مقادیر شاخص Rp به ترتیب مربوط به آغازگرهای شماره ۳۹ و ۳ بود. میانگین شاخص MI برابر ۰/۶۶ بود و آغازگرهای شماره ۳ و ۱۳ به ترتیب کمترین و بیشترین مقدار این شاخص را به خود اختصاص دادند. به طور کلی نتایج به دست آمده از این پژوهش در تطابق با نتایج گزارش شده توسط Pour-Aboughadareh et al. (2022) بود. این محققان نیز در ارزیابی جمعیت‌های گندم وحشی دارای ژنوم D سطح بالایی از چندشکلی را گزارش نموده و اظهار داشتند که وجود مقادیر پایین‌تر شاخص‌های تعیین کننده کارایی سیستم نشانگری همچون MI و Rp به دلیل تکثیر تعداد قطعات کمتری

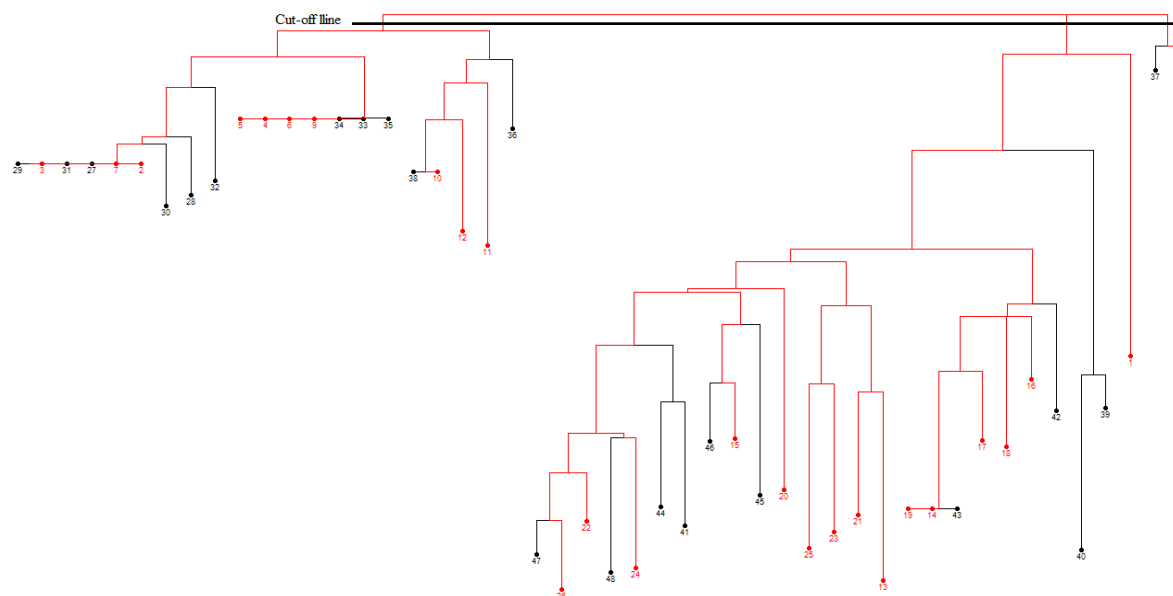
به شرایط تنش شوری در مراحل اولیه رشد خود نسبت به گندم نان دارند. همچنین در این مطالعه مشخص شد که توانایی بالای این گونه‌های بواسطه وجود مکانسیم‌های فیزیولوژیکی و توانایی بالای فتوسنتزی آن‌ها در شرایط تنش شوری است. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد قابلیت بالای گونه *Ae. tauschii* در مقابله با انواع شرایط تنش‌زای محیطی مرتبط با غنای آلی آن بوده که خود زمینه‌ساز انجام مطالعات گسترده و تکمیلی بر روی این گونه می‌باشد.

به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌های ارزیابی شده تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor-joining و بر اساس ماتریس ضرایب فاصله انجام شد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد میانگین ضریب فاصله بین نمونه‌های مورد بررسی برابر $0/43$ بود و کمترین ($0/01$) و بیشترین مقدار ($0/80$) آن به ترتیب بین نمونه‌های شماره ۱ و ۲ از جمعیت ایران و نمونه‌های شماره ۴۷ و ۴۸ از جمعیت ترکیه مشاهده شد (جدول ضرایب فاصله ارائه نشده است). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۴۸ نمونه ارزیابی شده را در سه گروه اصلی تفکیک نمود. با توجه به الگوی توزیع نمونه‌ها در زیرگروه‌های به‌دست آمده مشخص شد روند توزیع نمونه‌ها به‌طور کامل منطبق با توزیع جغرافیایی نمی‌باشد. گروه اول شامل یک نمونه از جمعیت ایران و یک نمونه از جمعیت ترکیه بود. گروه دوم شامل ۱۵ نمونه از جمعیت ایران و ۱۰ نمونه از جمعیت ترکیه بود. ۱۰ نمونه ایرانی به‌همراه ۱۱ نمونه از جمعیت ترکیه گروه سوم را تشکیل دادند (شکل ۳).

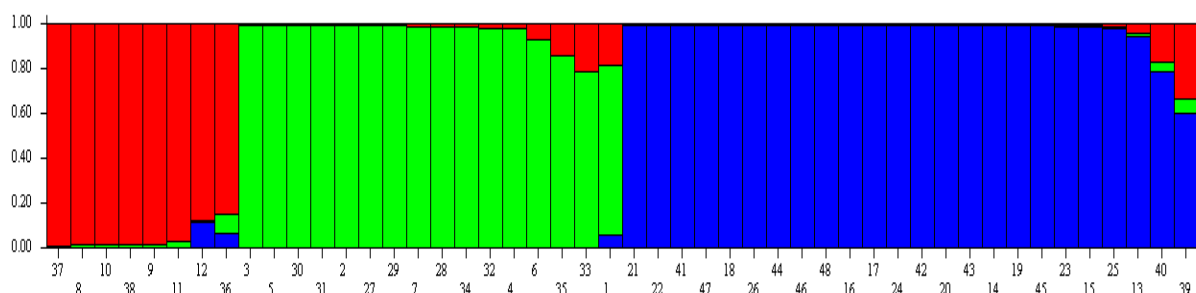
نتایج مطالعه Bokaie et al. (2023) نیز تأیید کننده یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش بود، به‌طوری که این محققان نیز بیشترین مقادیر پارامترهای تنوع ژنتیکی را با استفاده از نشانگرهای SCoT و CDBP در گونه *Ae. tauschii* گزارش کردند. بالا بودن سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌های ژرم‌پلاسمی شرایطی را برای به‌نژادگران فراهم می‌آورد تا بتوانند از تنوع مشاهده شده در برنامه‌های به‌نژادی خود استفاده نمایند. به عبارت دیگر هرچقدر میزان تنوع آلی در این مجموعه ژرم‌پلاسمی بالا باشد امکان یافتن آلل‌های جدید در آن مجموعه به مراتب بیشتر است که خود بیانگر یافتن پتانسیل اصلاحی جدید در بین افراد آن جمعیت می‌باشد. در رابطه با پتانسیل‌های اصلاحی گونه *Ae. tauschii* مطالعات گسترده‌ای انجام شده است و در بیشتر موارد مشخص شده است که این گونه حاوی ژن‌ها و آلل‌های مفیدی برای مقاومت به انواع تنش‌های محیطی می‌باشد. به‌عنوان نمونه، نتایج مطالعه Pour-Aboughadareh et al. (2022) نشان داد گونه *Ae. tauschii* بواسطه سیستم آنتی اکسیدانتی و سایر مکانسیم‌های فیزیولوژیکی خود نسبت به سایر گونه‌های خویشاوندی قابلیت بالایی در حفظ شرایط رشدی پایدار خود در شرایط تنش خشکی شدید دارد. نتایج پژوهش Hiarat and Khirana (2015) نیز بیانگر پتانسیل فیزیولوژیکی بالای *Ae. tauschii* نسبت به گونه *Ae. speltooides* در شرایط تنش گرمایی بود. همچنین در یک مطالعه انجام شده توسط Pour-Aboughadareh et al. (2024) نشان دادند گونه *Ae. tauschii* به همراه *Ae. crassa* تحمل بالایی



شکل ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده در جمعیت‌های *Ae. tauschii* ایران و ترکیه با استفاده از نشانگرهای SSR



شکل ۳- دندروگرام به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس فواصل ژنتیکی و روش Neighbor-joining. نمونه‌های مشخص شده به رنگ قرمز و مشکی به ترتیب معرف جمعیت‌های ایران و ترکیه می‌باشند.



شکل ۴- الگوی گروه‌بندی به دست آمده برای تعیین تعداد زیر جمعیت‌های واقعی در نمونه‌های بررسی شده *Ae. tauschii* با استفاده از نشانگرهای SSR

کلی مشاهده الگوی نامنظم توزیع نمونه‌های ارزیابی شده در گروه‌بندی به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت نشان دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های ایران و ترکیه می‌باشد به طوری که نتایج به دست آمده از این پژوهش مطابق با سایر نتایج گزارش شده توسط دیگر محققان می‌باشد (Naghavi et al. 2010; Moradkhani et al. 2015; Etminan et al. 2019; Pour-Aboughadareh et al. 2022; Bokaei et al. 2023).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش نشانگرهای SSR استفاده شده کارایی لازم جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از ایران و ترکیه را

به منظور بررسی دقیق‌تر روند گروه‌بندی نمونه‌های بررسی شده از تجزیه ساختار جمعیت استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این تجزیه مشخص شد سه زیر جمعیت واقعی در جمعیت‌های مورد بررسی وجود داشت. زیر جمعیت اول شامل پنج نمونه از جمعیت ایران (نمونه‌های شماره ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲) و سه نمونه از جمعیت ترکیه (نمونه‌های شماره ۳۶، ۳۷ و ۳۸) بود. نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ از جمعیت ایران و نمونه‌های شماره ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳ و ۳۴ از جمعیت ترکیه زیر جمعیت دوم را تشکیل دادند. زیر جمعیت سوم نیز در برگیرنده نمونه‌های شماره ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵ و ۲۶ از جمعیت ایران و نمونه‌های شماره ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷ و ۴۸ از جمعیت ترکیه بود (شکل ۴). به طور

این گونه به نواحی شمالی کشور دور از انتظار نبود. به طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش می توان اظهار داشت تمرکز بر روی منبع ژرم پلاسمی کشور به ویژه گونه *Ae. tauschii* می تواند اطلاعات مفیدی در خصوص پتانسیل اصلاحی این گونه جهت استفاده از آن در برنامه های به نژادی فراهم آورد.

داشتند. علاوه بر این بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه تنوع ژنتیکی مشخص شد بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به درون جمعیت ها می باشد. از نظر مقایسه سطح تنوع ژنتیکی، جمعیت های مربوط به ایران نسبت به ترکیه سطح بالاتری از میزان تنوع ژنتیکی را نشان دادند که این نتیجه به دلیل بومی بودن

منابع

Arzani A, Ashraf M (2016) Cultivated ancient wheats (*Triticum* spp.): a potential source of health-beneficial food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16: 477-488.

Bokaei AS, Sofalian O, Sorkhilalehloo B, Asghari A, Pour-Aboughadareh A (2023) Deciphering the level of genetic diversity in some *aegilops* species using CAAT box-derived polymorphism (CBDP) and start codon target polymorphism (SCoT) markers. *Molecular Biology Reports* 50: 5791-5806.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

Etminan 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.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

Faris JD, Zhang Q, Chao S, Zhang , Xu S (2014) Analysis of agronomic and domestication traits in a durum $\times$ cultivated emmer wheat population using a high-density single nucleotide polymorphism-based linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 2333-2348.

Farshadfar A (1995) The application of quantitative genetics in plant breeding. Tagh Bostan Pulpation, 528p. (In Farsi).

Hairat S, Khurana P (2015) Evaluation of *Aegilops tauschii* and *Aegilops speltoides* for acquired thermotolerance: Implications in wheat breeding programmes. *Plant Physiology and Biochemistry* 95: 65-74.

Kilian B, Ozkan H, Pozzi C, Salamini F (2009) Genetics and genomics of the Triticeae. In *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* 7; Springer: Berlin, Germany.

Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.

Moradkhani H, Mehrabi AA, Etminan A, Pour-Aboughadareh A (2015) Molecular diversity and phylogeny of *Triticum-Aegilops* species possessing D

genome revealed by SSR and ISSR markers. *Plant Breeding and Seed Science* 71:81-95.

Naghavi MR, Hajikram M, Taleei AR, Aghaei MJ (2010) Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of *Aegilops tauschii* Coss. in northern Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:423-430.

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources* 6:288-295.

Peng JH, Sun D, Nevo E (2011) Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding* 28:281-301.

Pour-Aboughadareh A, Bocianowski J, Jamshidi B, Turkoglu A (2024) Physiological and molecular responses of wild relatives of wheat possessing the D genome to salinity stress. *Genetic Resources and Crop Evolution*. doi: 10.1007/s10722-024-02056-6

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M, Siddique KHM (2017) Physiological responses to drought stress in wild relatives of wheat: Implications for wheat improvement. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 106.

Pour-Aboughadareh A, Jadidi O, Shooshtari L, Pocza P, Mehrabi AA (2022) Association analysis of some biochemical traits in wild relatives of wheat under drought stress conditions. *Genes* 13:1491.

Pour-Aboughadareh A, Pocza P, Etminan A, Jadidi O, Kianersi F, Shooshtari L (2022) An analysis of genetic variability and population structure in wheat germplasm using microsatellite and gene-based marker. *Plants* 11:1205.

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.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Saeidi H, Rahiminejad MR, Vallian S, Heslop-Harrison JS (2006) Biodiversity of diploid D-genome *Aegilops tauschii* Coss. In Iran measured using microsatellites. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1477-1484.

Singh N, Wu S, Tiwari V, Sehgal S, Raupp J, Wilson D, Abbasov M, Gill B, Poland J (2019) Genomic analysis confirms population structure and identifies inter-lineage

hybrids in *Aegilops tauschii*. *Frontiers in Plant Science* 10:9.

Tahernezhad Z, Zamani MJ, Solouki M, Zahravi M, Imamjomeh AA, Jafaraghaei M, Bihamta MR (2010) Genetic diversity of Iranian *Aegilops tauschii* Coss. using microsatellite molecular markers and morphological traits. *Molecular Biology Reports* 37:3413-3420.

Weide A, Rieh S, Zeidi M, Conard NJ (2013) Using new morphological criteria to identify domesticated emmer wheat at the aceramic Neolithic site of Chogha Golan (Iran). *Journal of Archaeological Science* 57:109-118.