

تنوع ملکولی جایگاه‌های ریزماهواره‌ای و تجزیه ساختار جمعیت در توده‌های وحشی و بومی گندم نان و ماکارونی

Microsatellite-based molecular diversity and population structure analysis in wild and native bread and durum wheat accessions

مهدی محمدی شیخلری^۱، صدیقه فابریکی اورنگ^{۲*}، علیرضا پورابوقداره^۳، جعفر احمدی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

۲-دانشیار، گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

۳- استادیار، بخش غلات مؤسسه اصلاح و تبیه نهال و بذر، کرج، ایران

۴- استاد، گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران

Mohammadi Shekhlar M¹, Fabriki-Ourang S^{2*}, Pour-aboughadareh A³, Ahmadi J⁴

1- MSc Student in Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Associate Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

3- Assistant Professor, Cereals Department in seed and plant improvement institute, Karaj, Iran

4- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ourang@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۶)

چکیده

گندم یکی از سه غذای اصلی جمعیت جهان محسوب می‌شود و گام اولیه برای موفقیت در برنامه‌های اصلاحی آن، شناسایی و برآورد تنوع ژنتیکی در خوبشاوندان وحشی و بومی این گیاه می‌باشد. استفاده از آغازگرهای ریزماهواره، روشی دقیق و ساده برای شناسایی تنوع و قرابت ژنتیکی ارقام و خوبشاوندان وحشی و بومی گندم است. براین اساس، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط فیلوجنیکی مایین ۶۹ توده نواحی مختلف ایران متعلق به چهار گونه ریزماهواره‌ای صورت گرفت. برای این منظور از ۲۳ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد و در مجموع ۵۷ آلل چندشکل با میانگین ۳/۱۶۶ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تکثیر شد. فاصله ژنتیکی بین توده‌های گونه‌ها با نشانگرهای مورد بررسی، دارای دامنه تغیرات بین ۰/۰۸ تا ۰/۸۸۵ تا ۰/۰۸ می‌باشد. کمترین میزان آن، بین توده‌های *T. boeticum* و *T. urartu* با استفاده از نشانگرهای *T. aestivum* و *T. boeticum* مشاهده شد. بیشترین میزان تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب برابر ۰/۰۱۸۸ و ۰/۰۱۲ به جمعیت *T. urartu* تعلق داشت. دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌های با الگوریتم Neighbour joining، توده‌ها را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد و در گروه‌بندی حاصل تمامی توده‌های *T. aestivum* در یک گروه قرار گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) از طریق نمایش دو بعدی تکنیک توده‌ها براساس دو مولفه اول، گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوش‌های را تایید نمود. با تجزیه ساختار جمعیت ۶۹ توده مورد مطالعه در سه زیر جمعیت قرار گرفتند به طوری که توده‌های دو گونه *T. urartu* و *T. boeticum* با بیشترین شباهت و اختلاط ژنتیکی در یک زیر جمعیت واقع شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره‌ای، علاوه بر قابلیت اتصال و تکثیر در هر چهار گونه، از قدرت تمایز خوبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های مورد مطالعه برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی

گندم نان

تنوع ژنتیکی

خوبشاوندان وحشی

میکروساتلایت

مقدمه

گیاهان نشانگرها ایده‌آلی برای دامنه‌ی وسیعی از مطالعات از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گرینش به کمک نشانگر، مطالعه ژنتیک جمیعت، انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌نامه و مشخص کردن میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسمها می‌باشد (Mohamadi et al. 2014).

MicroRNA (miRNA)، یک RNA تک رشته‌ای غیر کدکننده است که به طور گسترده رشد، نمو و پاسخ‌های مرتبط با تنش‌های غیرزیستی را از طریق تنظیم ژن‌های هدف در سطح رونویسی و پس از رونویسی کنترل می‌کند (Chen et al. 2017). miRNA بالغ معمولاً ۲۱ تا ۲۴ نوکلوتید طول دارند و به نواحی ۳'UTR و ۵'UTR mRNA‌ها متصل می‌شوند. از آنجایی که توالی این RNA‌ها غیر کدشونده بسیار حفاظت شده است این توالی‌ها گزینه بسیار مناسبی جهت طراحی آغازگرهای SSR می‌باشد. با این استراتژی نه تنها از پتانسیل چند شکلی بالای SSR بلکه از حفاظت شدگی بالای miRNA در گونه‌ها و حتی جنس‌های مختلف گیاهان جهت بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات اصلاحی می‌توان بهره برد (Ramachandran et al. 2020).

دریکوند و همکاران، ۹۰ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ۴۰ آغازگر SSR بررسی کردند که در مجموع ۸۰ آلل شناسایی شد و میزان اطلاعات چند شکلی از ۰/۱۲ - ۰/۸ متغیر بود (Darikvand et al. 2013). در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم گندم (*T. aestivum*) با استفاده از ۱۴ جفت آغازگر SSR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که ریزماهواره‌ها سطح بالایی از چندشکلی را در این مطالعه نشان دادند و در مجموع ۴۵۸ آلل تکثیر شد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی بین ارقام گندم با میانگین فاصله ژنتیکی ۱۶ تا ۶۷ درصد گزارش شد (Zeb et al. 2009). Singh و همکاران بهمنظور بررسی نشانگرها SSR مبتنی بر ژن‌های پاسخگو به شوری در گندم، ۶۵ نشانگر SSR مبتنی بر ژن کاندید انتخاب کردند و نتایج حاصل نشان داد که نشانگرها SSR برای آشکارسازی تنوع در بین توده‌های گندم با پاسخ‌های متفاوت به تنش شوری بسیار مفید بودند (Singh et al. 2018). این تحقیق نیز با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط فیلوزنیکی در بین توده‌هایی از گونه‌های *Triticum aestivum*, *Triticum urartu*, *T. durum*, *boeoticum* نشانگرها ریزماهواره انجام شد. نتایج به دست آمده می‌تواند

گندم غذایی پایه و اصلی اغلب مردم جهان است و همه روزه مقدار زیادی از کالاری و پروتئین‌های مورد نیاز بشر را تامین می‌کند (Kafi et al. 2018). خویشاوندان وحشی گندم دارای سازگاری بالایی به تنش‌های حاصل از تغییر شرایط آب و هوایی بوده و منبع ژنتیکی مهمی برای بهبود صفات کمی و کیفی مختلف محسوب می‌شوند و می‌توانند به عنوان ژرم پلاسم مفید در برنامه‌های بهنژادی گندم مورد استفاده قرار گیرد (Ahmadi and Pour-Aboughadareh 2018). آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی و برآورده آن در ژرم پلاسم گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، گام اولیه در برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد. (Rahmani et al. 2019). بررسی‌های متعدد بیانگر این واقعیت است که هنوز از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای گندم به طور کامل استفاده نشده است، بنابراین به نظر می‌رسد که فارغ از تسلط بر فناوری‌های مدرن، موفقیت در بهبود ژنتیکی، متکی به استفاده از تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های اهلی و وحشی وابسته به آن‌هاست (Pour-Aboughadareh et al. 2016). بررسی تنوع مولکولی با استفاده از صفات مورفوژوژیک و یا نشانگرها فتوتیپی می‌باشد، تحت تأثیر عوامل محیطی بوده و در نتیجه چندان قابل اعتماد نمی‌باشد. نشانگرها مولکولی به مخصوص نشانگرها مبتنی بر DNA، به متخصصین و بهنژادگران کمک کرده تا بتوانند مشکلات برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر دورگ‌گیری Ebrahimi et al. (2011). بنابراین، جایگزین مناسبی برای نشانگرها مورفوژوژیکی به حساب می‌آیند و با استفاده از آن‌ها تشخیص ژن، کروموزوم و تنوع ژنی به راحتی امکان‌پذیر می‌باشد. از بین نشانگرها مبتنی بر DNA، ریزماهواره‌ها به دلیل چندشکلی بالا کاربرد بیشتری برای مطالعات تنوع ژنتیکی نسبت به سایر نشانگرها پیدا کرده‌اند (Rahmani et al. 2019). ریزماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSR) و با تکرارهای کوتاه پشت سر هم، بخشی از DNA تکراری بوده که در نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده توزیع شده‌اند (Yao et al. 2007). نشانگرها حاضر به دلیل سطوح بالای چند شکلی، توارث پذیری، همباز بودن و فراوانی در

مطالعات مورد بررسی قرار گرفته و توالی‌های نابالغ، توالی‌های بالادست و پایین دست آن‌ها به منظور طراحی آغازگرهای SSR از سایت Mirbase.org استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر و با استفاده از ۲۳ جفت آغازگر mir-SSR صورت گرفت (جدول ۲). برای مشاهده الگوهای باندی، از الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد و ژل پلی‌اکریل آمید با ولتاژ ۴۰۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه استفاده شد. قطعات تکثیری در نهایت با استفاده از نور UV و دستگاه Gel Doc آشکارسازی شدند. رنگ آمیزی ژلهای پلی‌اکریل آمید با استفاده از محلول نیترات نقره ۰/۲ درصد انجام شد. برای ظاهرسازی باندهای حاصل، مقدار ۲۵۰ میلی لیتر از محلول کربنات سدیم سرد با ۵۰۰ میکرولیتر تیوسولفات سدیم ۲ درصد و ۵۰۰ میکرولیتر فرمآلدهید ۳٪ درصد ترکیب و محلول به سینی حاوی ژل اضافه شد. پس از اینکه باندها به شکل مطلوبی روی ژل نمایان شدند، مقدار ۱۵۰ میلی لیتر محلول استیک اسید ۶/۵ درصد به محلول ظاهرسازی اضافه شد. در نهایت، به منظور تثبیت باندهای ظاهر شده، ژلهای پلی‌اکریل آمید به مدت ۱۰ دقیقه با آب مقطر سرد شستشو شدند تا به pH خشی برستند.

بستر مناسبی را برای تحقیقات بعدی در جهت اصلاح و ارتقاء خصوصیات گندم فراهم کند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۶۹ توده وحشی و بومی گندم متعلق به چهار گونه *T. durum*, *T. urartu*, *T. boeticum* و *T. aestivum* مورد بررسی قرار گرفت. بذور هر یک از توده‌های مذکور مربوط به مناطق مختلف کشور از بانک ژن دانشگاه ایلام تهیه شدند (جدول ۱). استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه گیاهچه‌ای بر اساس روش CTAB^۱ اصلاح شده و مطابق با دستورالعمل Doyle and DNA (1987) انجام شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت استخراج شده از دو روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد (شکل ۱) و اسپکتروفوتومتر استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققان طراحی شدند (Yao et al. 2007; Eren et al. 2015; Bai et al. 2018). بدین صورت که توالی‌های RNA Microها در این

^۱ Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide;CTAB

جدول ۱- کد و محل جمع‌آوری ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum*

<i>T. urartu</i>	<i>T. durum</i>	<i>T. boeticum</i>	<i>T. aestivum</i>
کد توده	محل جمع‌آوری	کد توده	محل جمع‌آوری
جاده اسلام آباد، گردند	گلپایگان	مهاباد	۱
۵۳		۱۸	
سقز- جاده مریوان	خرمشهر	قروه	۲
۵۴		۱۹	گند کاووس
مریوان	اهواز	سبید دشت	۳
۵۵		۲۰	قزوین
مریوان	اربیل	طلقان	۴
۵۶		۲۱	اصفهان- شهر رضا
جاده اسلام آباد	پاسوج	پاوه	۵
۵۷		۲۲	سقز
مریوان	سنندج	طلقان	۶
۵۸		۲۳	خوی
سی سخت	سنندج	خلخال	۷
۵۹		۲۴	زنجان
فرخن شهر	گرگان	اشنویه	۸
۶۰		۲۵	مهاباد
سنقر	مشهد	اسلام آباد	۹
بیستون	مشهد	۲۶	کامیاران
۶۱			
شهرکرد	گچساران	سرخون	۱۰
۶۲		۲۷	ارومیه
جاده سنقر - کرمانشاه	مهران- صالح آباد	مشهد	۱۱
۶۴		۲۸	ایذه
کرمانشاه	پلدختر	سقز	۱۲
۶۵		۲۹	مهران- صالح آباد
جاده سنقر- مریوان	پلدختر	اهر- کاپیر	۱۳
۶۶		۳۰	بروجرد
آذربایجان غربی	سرپل ذهاب	فیروزآباد	۱۴
۶۷		۳۱	شیروان- چرداول
کرمانشاه	قصرشیرین	خوزستان	۱۵
۶۸		۳۲	پلدختر
مریوان	ایلام	شهر کرد	۱۶
۶۹		۳۴	قصر شیرین
	قصرشیرین	۵۲	قصر شیرین

فاصله ژنتیکی میان گونه‌های *Triticum* نیز براساس شاخص نی محاسبه شد. توده‌های مورد مطالعه به کمک ماتریس تشابه نی و براساس روش Neighbor-joining، با استفاده از نرم‌افزار MEGA گروه‌بندی شدند. همچنین به منظور ارزیابی و تایید آنالیزهای حاصل از تجزیه کلاستر، تجزیه به مختصات اصلی^۸ (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار Gen ALEX ver.6.503 (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار Gen ALEX (زیر جمعیت‌های واقعی) با تجزیه ساختار جمعیت، تعداد K (زیر جمعیت‌های واقعی) با استفاده از نرم‌افزار تحت وب STRUCTURE HARVESTER استفاده از نرم‌افزار烧成器 تحت وب به دست آمد. تجزیه ساختار جمعیت بر اساس آغازگرهای اختصاصی استفاده شده با روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 انجام شد. در این تجزیه ۱۰ تکرار مستقل با شرایط Burn-in = 100000 و MCMC = 100000 در نظر گرفته شد.

⁸ Principal coordinate analysis

برای امتیازدهی باندها از یک برای وجود قطعات تکثیر شده و صفر برای عدم وجود باند استفاده شد. جهت تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ها و تجزیه واریانس مولکولی^۱ (AMOVA) از نرم‌افزار Gen ALEX ver.6.503 استفاده گردید. مقایسه و بررسی میزان تنوع ژنتیکی در گونه‌های وحشی و خویشاوند با استفاده از پارامترهای تنوع ژنی نی^۲ (He)، تنوع شanon^۳ (I)، تعداد آلل‌های مشاهده شده^۴ (Na)، تعداد آلل مؤثر^۵ (Ne)، درصد مکان‌های چندشکل^۶ (PPL) و همچنین هتروزیگوستی مورد مشاهده^۷ (uHe) به کمک نرم‌افزار POPGENE انجام شد. ضریب تشابه و

¹ Analysis of molecular variance analysis; (AMOVA)

² Nei's gene diversity; (He)

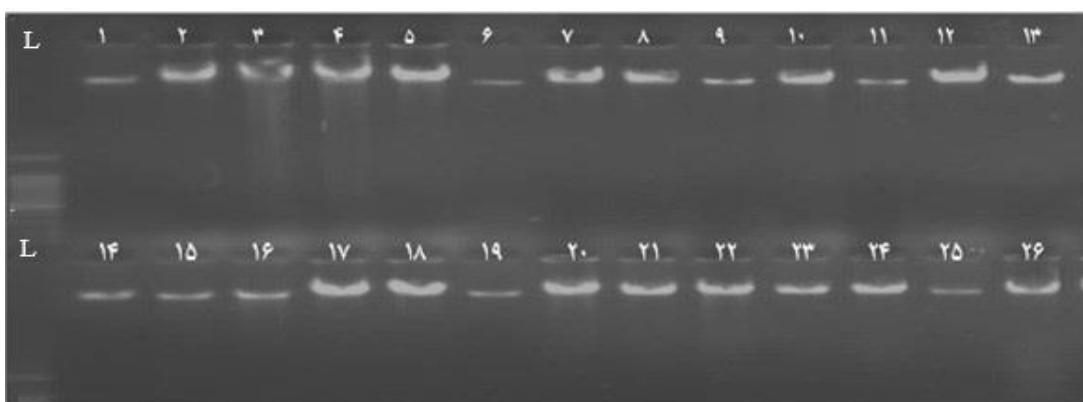
³ Shannon's information index; (I)

⁴ Observed number of alleles; (Na)

⁵ Effective number of alleles; (Ne)

⁶ Percentage of polymorphic loci; (PPL)

⁷ Unbiased expected heterozygosity; (uHe)



شکل ۱- کیفیت DNA ژنومی استخراج شده برای تعدادی از توده‌های *Triticum* روی ژل آگارز یک درصد.

L شاخص استاندارد (سینا ژن ۱۰۰ bp)

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ریزماهواره طراحی شده و دمای بهینه اتصال آنها

ردیف	نام آغازگر	موتیف	توالی رفت (۵'-۳')	توالی برگشت (۳'-۵')	دمای اتصال (°C)
۱	Mir160-b	(CCT) ₃	ACGGACCGAGGACAACCGGA	TGCCTGGCTCCCTGTATGCCA	63
۲	Mir160-b2	(GGT) ₃	GACTGCGTACGAATTCA	CTCCTGTATGCCACTCCATC	63
۳	Mir169g	(TTA) ₃	GACTGCGTACGAATTCA	GGCTGCGAAGAAATGAATAA	63
۴	(GGGG) _n	(AAGA) ₃	GACTGCGTACGAATTGAC	TATAGCTGTGTTCTCAGGTCG	59
۵	Mir399	(TTAT) ₃	TCTTGCCACTCCTGTTCC	CCGGAGAGCGATAAAATACC	63
۶	P2	(TGGG) ₃	GACACGGAGATGGAGGTTG	GGTGGATTTGATTGGTGG	59
۷	Mir396a-1	(TAC) ₄	TCTGCTTCGCTAGATCGCT	AACATGGCAGGGAGCATAA	60
۸	Mir164c-1	(GCCG) ₄	TATCCAGGTGGTGGAAATGG	GCGTTGAAGCAAAACTGGT	60
۹	Mir1134-1	(TTC) ₄	GAGCGAACCGAAACAAAGA	AGCGATGAAAAGCCAACAG	57
۱۰	Mir1134-2	(TCC) ₄	CTGTTGGCTTTCATCGCT	GAGGACGACAGTCGGCTA	62
۱۱	Mir396a-2	(TAG) ₄	TACGGTGGGTGTCTACAA	TGAATTGCCCCGTGGTTAT	60
۱۲	P8	(GTAG) ₃	TCTACTCCTCGCTGCTGCT	TGCTCGGTGGGTGTCTTAC	62

۱۳	Mir5069a	(AATT) ₃	TGTGTGCGATTTGATTGG	GCGGGTGAGTTGGATCTTA	۵۹
۱۴	Mir164c-2	(CATG) ₃	GGCTAGTGTGCGCTCGAT	CGGTCTGCTTCCAAAACAC	۶۲
۱۵	Mir395b	(TAGC) ₃	AGCAGCCGACTATGTGCTC	ACTGTTGATTGCCACCCAG	۶۱
۱۶	Mir159	(CTAG) ₃	GGCCAAACAGGATACGCTA	CCAGGACGAATTGCATCA	۵۹
۱۷	Mir1120c	(TA) ₆	CCGGTACTAAATGTTGGGG	TCCTACCAACAGAGCGCAT	۶۲
۱۸	P14	(CCAC) ₃	CGAACATAGAACATGGACGG	CCTCGTTGCGTCAATCTT	۵۹
۱۹	Mir319b	(ATTC) ₃	AACTTGCTCCTCGTGTGC	CACCCTTCAGTCCAACCAC	۶۲
۲۰	Mir164d	(GATG) ₃	TTCTCCAGCATGGCTTCTC	TTGGAATAAATGGGCCTTG	-
۲۱	Mir156k-1	(GCA) ₄	CCGTTTGGGTGGGATATT	TGGTTTGGAGCAGAGGAG	۵۷
۲۲	Mir156k-2	(AAAAT) ₃	TCTCCGACTTACCATGCC	AGTGTACCGGCAGCATCTC	۶۲
۲۳	Mir160f	(TCCT) ₆	TTGGCATTGAGGGAGTCAT	TAAGGATAAGCCGTCGCAG	۵۷

تمامی نمونه‌ها ۱/۱۴۵ به دست آمد که جمعیت *T. urartu* با میزان ۱/۲۱۶ و جمعیت *T. aestivum* با میزان ۱/۰۴۷ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلل مؤثر را دارا بودند. از اختلاف بین تعداد آلل کل و آلل موثر، آلل‌های نادر حاصل می‌شوند که در تفکیک و تمایز افراد نقش بهسزایی دارند. با ترکیب نشانگرهایی با آلل‌های نادر بالا می‌توان ژنتوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک را به طور مؤثر تفکیک نمود (Ribeiro et al. 2004).

امینی و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی ۲۵ ژنتوتیپ گندم با استفاده از ۴۵ آغازگر ریزماهواره مرتبط با QTL‌های دخیل در تحمل به شوری، تعداد ۲ تا ۷ آلل با میانگین ۳/۵۲ آلل را در هر جایگاه ریزماهواره تکثیر کردند. محققان دیگری به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گندمهای اینکورن، ۲۰ نشانگر ریزماهواره را مورد استفاده قرار دادند که در مجموع ۸۶ آلل چندشکل حاصل شد که تعداد آلل‌ها در مکان‌های چندشکل بین ۲ تا ۹ آلل با میانگین ۴/۱ متغیر بود (Kharestani et al. 2013).

میانگین شاخص شانون برای کل جمعیت‌های مورد مطالعه، ۰/۱۳۲ به دست آمد که بیشترین مقدار مربوط به *T. urartu* با مقدار ۰/۱۸۸ و کمترین مقدار مربوط به *T. aestivum* با مقدار ۰/۰۳۷ بود. در مطالعه وحدانی کیا و همکاران مقدار شاخص شانون برای نشانگرهای SSR و ISSR به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۳۴ برآورد شد (Vahdanikia et al. 2021). میزان هتروزیگوستی نشانگرها در این مطالعه از ۰/۰۲۶ تا ۰/۱۲۸ با میانگین ۰/۰۸۸ متفاوت بود. کمترین میزان هتروزیگوستی مربوط به *T. aestivum* و *T. urartu* بیشترین میزان هتروزیگوستی مربوط به نشانگرها ارتباط مستقیم میان هتروزیگوستی و شاخص شانون است. هتروزیگوستی مورد انتظار یکی از معیارهای مهم ارزیابی تنوع آللی نشانگرها و میزان اطلاعات نشانگری بوده و

نتایج و بحث

جهت تکثیر قطعات اختصاصی، بهینه‌سازی شرایط PCR برای اجزاء مختلف و مواد واکنش، مانند DNA الگو، MgCl₂ و دمای اتصال آغازگر اجرا شد. از میان ۲۳ آغازگر طراحی شده، آغازگر mir164d هیچ‌گونه قطعه‌ای تکثیر نکرد و آغازگر mir396a-1 با توالی تکراری (TAC)₄ نیز تنها قادر به تکثیر یک قطعه بود. بهمنظور مقایسه میزان تنوع موجود در هر یک از گونه‌ها، برخی از پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص اطلاعات شانون، تنوع ژنی نی و درصد چند شکلی مکان‌های ژنی درون جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳). تنوع ژنی نی میزان هتروزیگوستی را بیان می‌کند و مقدار آن از صفر تا ۰/۵ متغیر می‌باشد که به تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها بستگی دارد. هر اندازه تنوع ژنی جمعیتی به ۰/۵ نزدیک‌تر باشد هتروزیگوستی در آن جمعیت افزایش می‌یابد (Nei 1973). میانگین تنوع ژنی نی در این مطالعه برابر ۰/۰۸ بود که کمترین میزان مربوط به جمعیت *T. aestivum* با مقدار ۰/۰۲ و بیشترین میزان مربوط به جمعیت *T. urartu* به مقدار ۰/۱۲ می‌باشد. وحدانی کیا و همکاران نیز در ارزیابی ۵۲ ژنتوتیپ گندم با استفاده از دو نشانگر SSR و ۱۰ نشانگر ISSR از معیار تنوع ژنی نی استفاده کردند که مقدار آن از ۰/۲۲ تا ۰/۴۴ برابر نشانگرهای SSR و ISSR متغیر بود (Vahdanikia et al. 2021). در پژوهش حاضر در کل ۵۷ آلل با میانگین ۳/۱۶۶ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تکثیر شد که دامنه‌ی ۱ تا ۸ آللی را برای هر جایگاه دارا بودند. تعداد آلل مشاهده شده برای جمعیت‌های مورد بررسی از ۰/۷۳۷ تا ۱/۰ با میانگین ۰/۹۱۲ متغیر بود. کمترین میزان آلل متعلق به جمعیت *T. aestivum* و بیشترین آن متعلق به جمعیت *T. durum* بود. میانگین تعداد آلل مؤثر نیز برای

شکلی نشان داد که بیشترین میزان چند شکلی در جمعیت *T. urartu* و کمترین میزان در جمعیت *T. aestivum* وجود دارد (جدول ۵). میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه قدرت تمایز نشانگرها بوده و معیاری برای تنوع آللی در هر مکان است.

احتمال متفاوت بودن دو آلل تصادفی در دو فرد را نشان می‌دهد (Haliloglu et al. 2023) در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی ۹۹ لاین و ۴۹ رقم گندم با استفاده از نشانگرهای SSR بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین مقدار هتروزیگوستی و میانگین هتروزیگوستی به ترتیب برابر ۰/۸۹ و ۰/۴۳ بود (Rahmani et al. 2019). نتایج حاصل از درصد جایگاه‌های چند

جدول ۳- پارامترهای ژنتیکی برای ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum* با نشانگرهای ریزماهواره

PPL%	uHe	He	I	Ne	Na	ژنوم	تعداد توده	گونه
۷/۰۲	۰/۰۲۶	۰/۰۲۵	۰/۰۳۷	۱/۰۴۷	۰/۷۳۷	AABBDD	۱۷	<i>T. aestivum</i>
۳۸/۶۰	۰/۱۲۶	۰/۱۲۲	۰/۱۸۴	۱/۲۰۷	۰/۹۳۰	A ^b A ^b	۱۷	<i>T. boeticum</i>
۲۹/۸۲	۰/۰۷۴	۰/۰۷۲	۰/۱۱۸	۱/۱۰۹	۱/۰۰۰	AABB	۱۸	<i>T. durum</i>
۴۰/۳۵	۰/۱۲۸	۰/۱۲۴	۰/۱۸۸	۱/۲۱۶	۰/۹۸۲	A ^u A ^u	۱۷	<i>T. urartu</i>
۲۸/۹۵	۰/۰۸۸	۰/۰۸۶	۰/۱۳۲	۱/۱۴۵	۰/۹۱۲	میانگین	۶۹	

PPL و uHe، He، I، Ne، Na به ترتیب نشان‌دهنده تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون، شاخص تنوع ژنتیکی نی، شاخص هتروزیگوستی مورد انتظار و درصد چندشکلی آلل‌ها

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی برای ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum* با نشانگرهای ریزماهواره

منبع تغییرات	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	درصد واریانس برآورده شده	واریانس برآورده شده	درصد واریانس
بین گونه‌ها	۳	۵۰۷۳۶۶	۱۶۹/۱۲۲	۹/۶۲۹	۹/۶۲۹	۷۶
درون گونه‌ها	۶۵	۱۹۸۹۹۷	۳/۰۶۱	۳/۰۶۱	۳/۰۶۱	۲۴
کل	۶۸	۷۰۷۳۶۲		۱۲/۶۹۰		۱۰۰

جدول ۵- ضرایب فاصله ژنتیکی (پایین قطر اصلی) و تشابه ژنتیکی (بالای قطر اصلی) بین جمعیت‌های مورد مطالعه

	<i>T. aestivum</i>	<i>T. boeticum</i>	<i>T. durum</i>	<i>T. urartu</i>
<i>T. aestivum</i>	***	۰/۴۲۵	۰/۶۳۰	۰/۴۷۴
<i>T. boeticum</i>	۰/۸۵۵	***	۰/۶۴۱	۰/۹۲۳
<i>T. durum</i>	۰/۴۶۳	۰/۴۴۵	**	۰/۷۰۳
<i>T. urartu</i>	۰/۷۴۶	۰/۰۸۰	۰/۳۵۳	**

جمعیت‌ها توجیه نمود. اختلاف سه برابری سهم تنوع بین گونه‌ای نسبت به تنوع درون گونه‌ای بیانگر اختلاف معنی‌دار بین جمعیت‌ها (گونه‌ها) و صحت تفکیک توده‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد. در این راستا سفالیان و همکاران نیز در بررسی خود تنوع میان توده‌های گندم بومی ایران را بالا گزارش کردند و بیان داشتند که نشانگرهای ریزماهواره در تشخیص تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بسیار کارآمد است و روابط

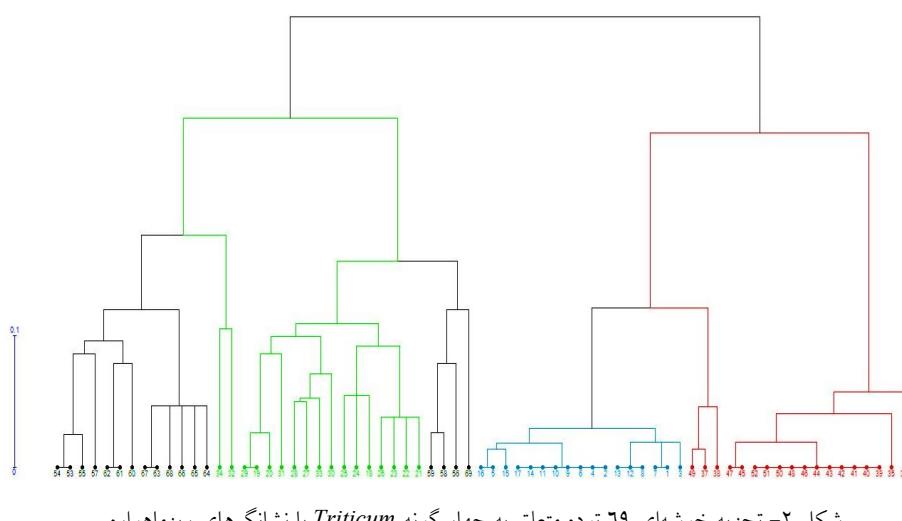
تجزیه واریانس مولکولی یکی از بهترین روش‌های آماری جهت بررسی ساختار جمعیت‌ها و گروه‌ها بر اساس داده‌های مولکولی می‌باشد. در این مطالعه توده‌های موجود در یک گونه به عنوان یک جمعیت مجزا در نظر گرفته شدند. برای تحلیل اختلافات ژنتیکی میان و درون جمعیت‌ها، از تجزیه‌ی واریانس مولکولی استفاده شد (جدول ۴) و نتایج نشان داد که ۲۴ درصد از سهم کل تنوع ژنتیکی را واریانس درون جمعیت‌ها و ۷۶ درصد را واریانس بین

۶۹ در گروه دوم، توده‌های ۱۶، ۱۷، ۱۵، ۵، ۲۳، ۲۶، ۱۸، ۲۴، ۲۵، ۳۰، ۳۳، ۵۶، ۵۸، ۲۱، ۱۱، ۱۴، ۶، ۹، ۱۰، ۲، ۴ در گروه ۸، ۳۷، ۴۹، ۳، ۴۶، ۴۴، ۴۳، ۴۲، ۴۱، ۳۵، ۳۹، ۴۰ در گروه ۵۲، ۵۰، ۵۱، ۴۸، ۴۶، ۴۴، ۴۳، ۴۲، ۴۱، ۳۶ در گروه چهارم قرار گرفتند. در گروه اول، توده‌هایی از مناطق جغرافیایی مختلف شامل اصفهان، خوزستان، گلستان، خراسان رضوی، و آیلام قرار داشت که نشان می‌دهد نمونه‌هایی که از لحاظ جغرافیایی دور از هم هستند نزوماً از لحاظ ژنتیکی از هم دور نمی‌باشند. در گروه‌بندی حاصل، توده‌هایی از جمعیت *T. durum* در کنار توده‌هایی از جمعیت *T. boeoticum* قرار گرفتند که نشان دهنده قرابت بالای این دو گونه می‌باشد. کلیه‌ی توده‌های گونه *T. durum* به جز توده‌های ۳۷، ۳۸ در یک گروه قرار داشتند. همچنین تمام توده‌های *T. aestivum* باهم و در یک گروه دسته‌بندی شدند (شکل ۲). در پژوهشی مشابه تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنتوتیپ گندم (*T. aestivum*) با استفاده از ۱۰ نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفت و از تجزیه خوشهای برای تقسیم‌بندی ژنتوتیپ‌ها استفاده شد که ژنتوتیپ‌ها در سه گروه مجزا قرار گرفتند (Nazari and Abdolshahi 2014).

Sofalian et al. (2008) ژنتیکی بین جمعیت‌ها را منعکس می‌کنند.

برآورده فاصله‌ی ژنتیکی شاخصی مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی است. در این مطالعه فاصله‌ی ژنتیکی ۶۹ توده گندم با استفاده از روش Neighbor joining و براساس داده‌های حاصل از امتیازدهی باندها برآورده شد. فاصله‌ی ژنتیکی بین توده‌ها دارای دامنه تغییراتی بین ۰/۰۸ تا ۰/۸۸ میزان آن، بین جمعیت‌های *T. urartu* و *T. boeoticum* و بیشترین میزان آن نیز بین جمعیت‌های *T. boeoticum* و *T. aestivum* مشاهده شد (جدول ۵). افزایش دامنه فاصله ژنتیکی بیانگر کارایی مناسب این نشانگر جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد.

دسته‌بندی ژنتوتیپ‌ها و واریته‌های مختلف، به‌منظور پی‌بردن به فاصله ژنتیکی و استفاده از تنوع موجود در برنامه‌های بهنژادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rahmani et al. 2019). برای گروه‌بندی ژنتوتیپ‌ها براساس داده‌های ریزماهواره از تجزیه خوشهای با استفاده از الگوریتم Neighbor-joining استفاده شد. در دندروگرام حاصل، جمعیت‌ها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند. توده‌های ۵۴، ۵۳، ۶۱، ۶۲، ۵۷، ۵۵، ۶۰، ۶۳، ۶۷، ۶۸، ۶۶، ۶۱، ۲۰، ۲۹، ۳۲، ۳۴، ۳۱، ۲۰، ۱۹، ۲۸، ۲۷ در گروه اول، توده‌های ۶۴



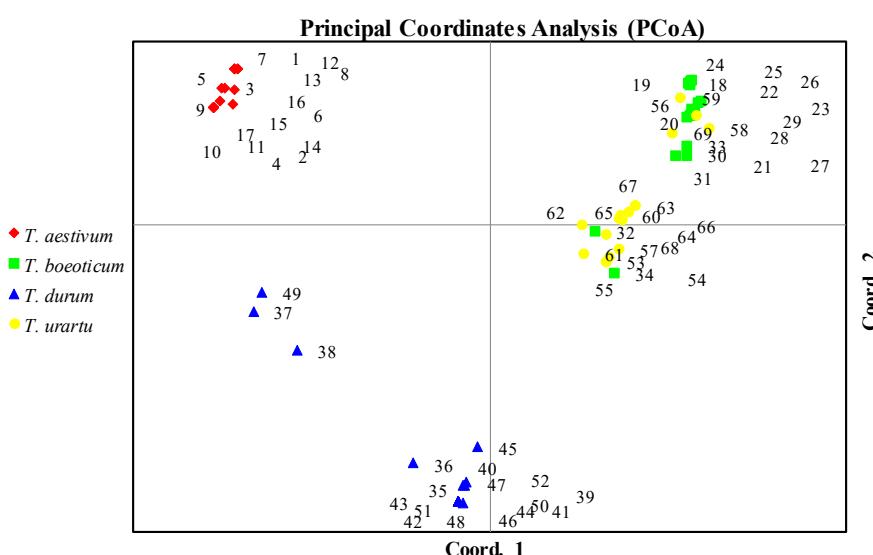
شکل ۲- تجزیه خوشهای ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum* با نشانگرهای ریزماهواره

مؤلفه اول مجموعاً ۶۹/۷۵ درصد از تغییرات را توجیه کردند که از این میزان، مؤلفه اول و دوم به ترتیب ۴۸/۹۵ و ۲۰/۸۰ درصد از تغییرات را تبیین نمودند. با زیاد شدن همبستگی متغیرهای اولیه،

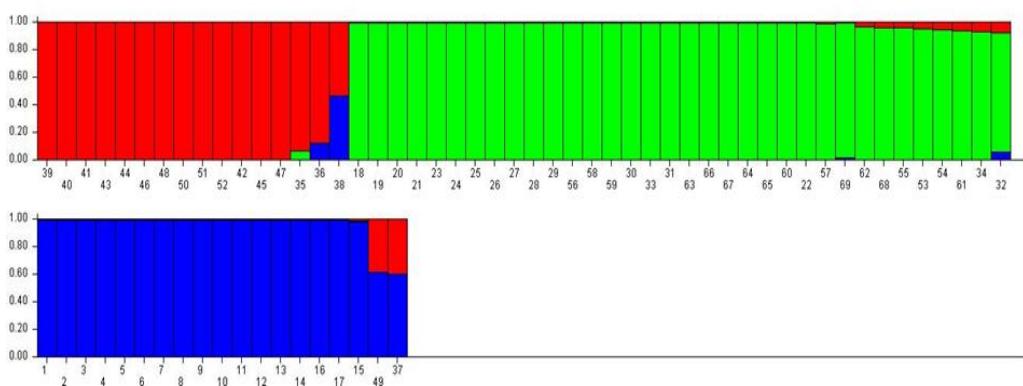
به‌منظور تعیین روابط ژنتیکی بین گونه‌ها و طبقه‌بندی آنها، تجزیه به مختصات اصلی (PCA) به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشهای صورت گرفت. در تجزیه به مختصات انجام گرفته، دو

۵۵، ۶۰، ۶۱، ۶۲، ۶۳، ۶۴، ۶۵، ۶۶، ۶۷، ۶۸ و در گروه پنجم توده‌های ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۹ قرار گرفتند (شکل ۳). توده‌های دو گروه آخر مربوط به دو گونه *T. boeoticum* و *T. urartu* بودند که با هم دسته‌بندی شدند. در این تحقیق تجزیه به مختصات اصلی توانست همانند تجزیه‌ی خوش‌های توده‌های *T. aestivum* را به طور مجزا در یک گروه قرار دهد. در پژوهشی مشابه از تجزیه به مختصات اصلی در گروه‌بندی ۹۹ لاین و ۴۹ رقم گندم با استفاده از نشانگرهای SSR استفاده شد که با توجه به گروه‌بندی صورت گرفته، ژنتیک‌ها در دو گروه اصلی دسته‌بندی شدند (Rahmani et al. 2019).

چند مولفه اول به میزان بیشتری در صد تغییرات موجود در نمایش ترسیمی دندروگرام را توجیه می‌کنند (Mohammadi et al. 2003). در مطالعه حاضر، نمودار دو بعدی حاصل از PCoA برای تفکیک توده‌ها بر اساس دو مؤلفه اول، گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوش‌های را تایید نمود. در نمودار دو بعدی حاصل از PCoA، توده‌ها در پنج گروه دسته‌بندی شدند. گروه اول شامل توده‌های ۱ تا ۱۷ بود که همگی متعلق به گونه *T. aestivum* می‌باشند. در گروه دوم توده‌های ۳۷، ۳۸، ۴۹ و در گروه سوم نیز توده‌های ۳۵، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۳، ۴۴، ۴۵، ۴۶، ۴۷، ۴۸، ۵۰، ۵۱، ۵۲ قرار گرفتند، تمام توده‌ها در این دو گروه متعلق به گونه *T. durum* می‌باشند. در گروه چهارم توده‌های ۳۲، ۳۴، ۵۳، ۵۴ شکل ۳- نتایج تجزیه به مختصات اصلی برای ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum* با نشانگرهای ریزماهواره



شکل ۳- نتایج تجزیه به مختصات اصلی برای ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum* با نشانگرهای ریزماهواره



شکل ۴- نتایج تجزیه ساختار جمعیت برای ۶۹ توده متعلق به چهار گونه *Triticum* با نشانگرهای ریزماهواره

امکان بررسی مناسب تنوع و مطالعه ساختار جمعیت‌ها را در سطح گونه و درون گونه امکان‌پذیر کرد. همچنین، تعداد زیاد آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره امکان بررسی تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها را نیز میسر نمود. از آنجایی که، گونه‌های *T.* *urartu* و *T. boeoticum* نسبت به دیگر گونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش مقادیر بالاتری از تنوع ژنی نی و شانون را دارا بودند، بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت نشانگرهای مورد بررسی برای این گونه‌ها متنوع‌تر بوده و گزینه مناسبی برای برنامه‌های بهنژادی محسوب می‌شوند. بر اساس هر سه روش گروه‌بندی، توده‌ها *T. durum*, ۳۷, ۳۸ و ۴۹ به صورت مجزا از دیگر توده‌های گونه *T. durum* دسته‌بندی شدند که نشان دهنده اختلاف ژنتیکی این توده‌ها نسبت به بقیه توده‌های این گونه می‌باشد، و بنابراین در صورت داشتن صفات مطلوب می‌توان از آن‌ها به عنوان والد با زمینه ژنتیکی متفاوت در برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری استفاده نمود. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این پژوهش از قدرت تمایز خوبی جهت تعیین تنوع ژنتیکی توده‌های گونه‌های گندم برخوردار می‌باشند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از استادی و مسئولان محترم دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) بابت حمایت‌های مالی و معنوی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

به منظور گروه‌بندی توده‌های مورد بررسی و یافتن تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها، تجزیه ساختار جمعیت بر اساس ماتریس داده‌ها صورت گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده، ۶۹ توده مورد مطالعه در ۳ زیر جمعیت قرار گرفتند. بررسی پراکنش توده‌ها (شکل ۴) نشان داد زیر جمعیت اول شامل توده‌های ۳۹, ۴۱, ۴۰, ۴۳, ۴۴, ۴۶, ۴۸, ۵۰, ۵۱, ۴۵, ۴۲, ۵۲, ۲۹, ۲۸, ۲۷, ۲۶, ۲۵, ۲۴, ۲۳, ۲۱, ۲۰, ۱۹, ۱۸, ۵۸, ۵۹, ۳۰, ۳۳, ۳۱, ۶۴, ۶۶, ۶۷, ۶۹, ۵۷, ۲۲, ۶۰, ۷۵, ۶۲, ۶۸, ۵۵, ۵۳, ۵۴, ۶۱, ۳۴ در زیر جمعیت دوم و توده‌های ۱ تا ۱۷, ۳۸, ۳۷ و ۴۹ در زیر جمعیت سوم قرار گرفتند (شکل ۴). در مقایسه، گروه‌بندی حاصل از تجزیه ساختار جمعیت، همخوانی بالایی با تجزیه خوش‌های و تجزیه به مختصات اصلی نشان داد. همچنین نتایج بدست آمده از سه گروه‌بندی با تجزیه‌های آماری مختلف نیز نشان دهنده عدم جدایش توده‌های گونه‌ها براساس منطقه جغرافیایی آن‌ها می‌باشد، بطوری که، در اکثر گروه‌بندی‌ها توده‌هایی از استان‌های اصفهان، خوزستان، اردبیل، کردستان در یک گروه حضور داشتند.

نتیجه‌گیری کلی

طرایحی نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر اساس توالی‌های حاصل از ناحیه micro RNA های مختلف صورت گرفت. به لحاظ حفاظت شدگی بالای این توالی‌ها، استفاده از آن‌ها به عنوان آغازگر، تکثیر توالی‌های تکراری مشخص را در هر ۴ گونه *Triticum* موجب شد. پتانسیل حاصل از این توالی‌ها

منابع

- Ahmadi J, Pour-Aboughadareh AR (2018) Expression pattern of anti-oxidant genes in wheat wild relatives under water Deficit stress. Modern Genetics Journal 3:351-361. (In Farsi)
- Amini A, Gazvini H, Amirmia R (2016) Study on salinity tolerance and allelic diversity of microsatellite markers associated with salinity in Iranian wheat genotypes. Crop Biotech 16: 75-89.
- Bai Q, Wang X, Chen X, Shi G, Liu Z, Guo C, Xiao K, (2018) Wheat miRNA TaemiR408 acts as an essential mediator in plant tolerance to Pi deprivation and salt stress via modulating stress-associated physiological processes. Frontiers in plant science 9: 1-17.

- Chen X Y, Yang Y, Yu X R, Xiong F (2017) Novel insights into miRNA regulation of storage protein biosynthesis during wheat caryopsis development under drought stress. Frontiers in Plant Science 8: 284883.
- Darikvand R, Bihamt MR, Najafian G, Ebrahimi A (2013) Investigation of genetic diversity among bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. Journal of Agricultural Science 1: 122-129.
- Ebrahimi A, Fatahi R, Zamani Z (2011) Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. Scientia Horticulturae 130: 146-151.

Eren H, Pekmezci MY, Okay SE, Turkas M, Inal B, Ilhan E, Atak M, Erayman M, Unver T (2015) Hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) root miRNome analysis in response to salt stress. Annals of Applied Biology 167:208-216.

Haliloglu K, Türkoğlu A, Öztürk A, Niedbala G, Niazian M, Wojciechowski T, Piekutowska M (2023) Genetic diversity and population structure in bread wheat germplasm from Turkey using iPBS-retrotransposon-based markers. Agronomy 13:255.

Kafi H, Navabpour S, Zaynali Nezhad KH, Pahlavani M H (2018) Evaluation of genetic diversity in Iranian and exotic wheat genotypes using SSR markers. Modern Genetics Journal 2:308-311. (In Farsi)

Kharestani H, Nasrolah Nejad AA, Qomi S, Mehrabi S (2013) Genetic diversity assessment of Einkorn wheat by using microsatellite markers. Electronic journal of crop production 2:1-15. (In Farsi)

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

Mohammadi M, Mirfakhraee SRG, Abbasi AR (2014) Genetic diversity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) as revealed by microsatellite markers and association analysis of physiological traits related to spring cold stress. Modern Genetics Journal 3:279-288. (In Farsi)

Nazari M, Abdolshahi R (2014) Evaluation of genetic diversity in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) using morpho-physiological traits and SSR markers. Agricultural Biotechnology Journal 6: 215-231. (In Farsi)

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proceedings of the National Academy of Sciences 70:3321-3323.

Pour-Aboughadareh AR, Moghaddam M, Alavikia SS, Mehrabi AA (2016) Assessing heritability of agromorphological characters and relationship between genetic diversity with geographical factors in Einkorn wild wheat populations collected from West and Northwest of Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 2:287-304.

International Journal of Agriculture and Biology 10:465-468.

Rahmani M, Rahimi M, AbdoliNasab M, Maleki M (2019). Evaluation of genetic diversity of different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties using molecular markers ISSR and RAPD. Iranian Journal of Biology 34:248-262.

Ramachandran S R, Mueth N A, Zheng P, Hulbert S H (2020) Analysis of miRNAs in two wheat cultivars infected with *Puccinia striiformis* f. sp. tritici. Frontiers in Plant Science 10:494589.

Ribeiro-Carvalho C, Guedes-Pinto H, Igrejas G, Stephenson P, Schwarzacher T, Heslop-Harrison J S (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace 'Barbela'. Annals of Botany 94:699-705.

Singh AK, Chaurasia S, Kumar S, Singh R, Kumari J, Yadav MC, Singh N, Gaba S, Jacob SR (2018) Identification, analysis and development of salt responsive candidate gene based SSR markers in wheat. BMC plant biology 18:1-15.

Sofalian O, Chaparzadeh N, Javanmard A and Hejazi MS (2008) Study the genetic diversity of wheat landraces from northwest of Iran based on ISSR molecular markers.

Vahdanikia FS, Samizadeh Lahiji H, Zahraei M, Mohsenzadeh Golnazani M (2021) Evaluating genetic diversity of some wheat genotypes using SSR and ISSR molecular markers. Cereal Research 11:43-54.

Wei Y M, Hou Y C, Yan Z H, Wu W, Zhang Z Q, Liu D C, Zheng Y L (2005) Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to Fusarium head blight. Journal of Applied Genetics 46:3-9.

Yao Y, Guo G, Ni Z, Sunkar R, Du J, Zhu JK, Sun Q (2007) Cloning and characterization of microRNAs from wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome biology 8:1-13.

Zeb B, Khan I, Ali S, Bacha S, Mumtaz S, Swati Z (2009) Study on genetic diversity in Pakistani wheat varieties using simple sequence repeat (SSR) markers. African Journal of Biotechnology 8:17-27.