

ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکسشن‌های مختلف گیاه دارویی *Trigonella foenum-graecum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای هدفمند ژنی

Investigation of genetic diversity in different accessions of medicinal plant *Trigonella foenum-graecum* collected from various geographical locations of Iran using gene targeted markers

مریم بهرامی راد^۱، شهاب خاقانی^۲، منصور امید^{۳*}، علیرضا اطمینان^۴، مهدی چنگیزی^۱

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

۲- استاد، ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده علوم نوین، واحد تهران پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

Bahramirad M¹, Khaghani Sh², Omid M^{3*}, Etminan A⁴, Changizi M¹

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

2- Professor, Genetics and Plant Breeding, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Professor, College of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources University of Tehran, Karaj, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳

چکیده

شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* یکی از گیاهان دارویی و معطر می‌باشد که منبعی غنی از دو ماده ارزشمند دیوسژنین و تریگونلین است. تجزیه تنوع ژنتیکی با استفاده از روش‌های قابل اعتماد، اطلاعات مفیدی برای برنامه‌های به‌نژادی گیاهان و همچنین حفاظت از ذخایر ژنتیکی فراهم می‌کند. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ شنبلیله با استفاده از دو نشانگر هدفمند ژنی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۷ آغازگر، شامل ۷ آغازگر SCoT و ۱۰ آغازگر CBDP به‌ترتیب ۷۸ و ۹۳ قطعه ژنومی را در اکسشن‌های مورد مطالعه تکثیر نمودند که از این تعداد، به‌ترتیب ۶۵ و ۷۸ باند چندشکلی نشان دادند. متوسط شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای آغازگرهای SCoT و CBDP به‌ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۲۹ به‌دست آمد که نشان‌دهنده برتری نسبی نشانگر SCoT نسبت به CBDP از لحاظ قدرت تفکیک بود. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر با الگوریتم UPGMA و بر مبنای ضریب فاصله Dice، ۴۰ نمونه مورد مطالعه را در چهار گروه اصلی دسته‌بندی نمود که این نتایج با نتایج تجزیه به مختصات اصلی همخوانی داشت. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بیانگر سهم بیشتر واریانس درون گروه‌ها در مقایسه با واریانس بین گروه‌ها بود. در بین پنج گروه جمعیتی مورد مطالعه، بیشترین مقدار شاخص‌های تنوع جمعیت نظیر تعداد ال مؤثر (۱/۵۴) شاخص شانون (۰/۴۶) و تنوع ژنی (۰/۳۱) مربوط به جمعیت IV بود که این نتایج بیانگر وجود تنوع بیشتر در این جمعیت در مقایسه با سایرین می‌باشد. این نتایج سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را در میان مواد ژنتیکی مورد مطالعه نشان داد که می‌توان از پتانسیل آن در برنامه‌های به‌نژادی استفاده نمود. علاوه بر این، یافته‌های این پژوهش مشخص نمود که SCoT و CBDP به‌عنوان نشانگرهای هدفمند ژنی، نشانگرهایی مناسب و قابل اعتماد جهت انگشت‌نگاری DNA و بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

تنوع

جمعیت

گیاه دارویی

نشانگر

مقدمه

بسیاری از گیاهانی که محصولشان در تهیه غذا و انواع خوراکی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، دارای متابولیت‌های ثانویه ارزشمندی هستند که به واسطه آن به‌عنوان گیاهان دارویی شناخته می‌شوند و دارای خواص درمانی می‌باشند. شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. یکی از گیاهان خانواده بقولات است که در کنار ارزش غذایی بالا به‌خاطر دارا بودن ترکیبات ارزشمندی مانند دیوسژنین و تریگونلین، و همچنین انواعی از آمینواسیدها مانند لیزین و تریپتوفان، موسیلاژ، روغن، آلکالوئید و فلاونوئید در گروه گیاهان دارویی ارزشمند طبقه‌بندی می‌شود (Mehrafarin et al. 2011). این گیاه از نظر ژنتیکی گیاهی خود گرده‌افشان، دیپلوئید با عدد کروموزومی $(2n=16)$ می‌باشد (Martin et al. 2011).

یکی از اهداف مهم در به‌نژادی این گیاه به‌عنوان یک گیاه دارویی، ایجاد واریته‌هایی با محتوای بالای دیوسژنین و تریگونلین می‌باشد که در این راستا مطالعاتی نیز در زمینه بهره‌گیری از پتانسیل روش‌های زیست‌فناورانه نظیر کشت بافت و مهندسی متابولیک انجام شده است (Mehrafarin et al. 2010).

یکی از پیش‌نیازهای هر برنامه اصلاحی آگاهی از تنوع ژنتیکی است. شناخت منابع ژنتیکی و در اختیار داشتن اطلاعات جامع در خصوص تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های گیاهی نقش بسیار مهمی در مدیریت منابع ژرم پلاسما و استفاده از آلل‌های مطلوب برای ایجاد ارقام مناسب بر اساس اهداف برنامه‌های به‌نژادی دارد (Mohammadi and Prasanna 2003).

فرسایش ژنتیکی تهدیدی جهانی برای تمامی گونه‌های گیاهی است. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد سیستم‌های نوین کشاورزی و برنامه‌های به‌نژادی در سراسر جهان منجر به از دست رفتن چیزی در حدود سه چهارم تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی اصلی و مهم شده است (Al-Maamari et al. 2020). ارزیابی تنوع ژنتیکی وسیله‌ای برای حفاظت از گونه‌های مختلف گیاهی و جلوگیری از ضعیف شدن خزانه ژنتیکی آنهاست و در برنامه‌های به‌نژادی جهت ورود ژن‌های مطلوب از ژرم پلاسما به درون پایه ژنتیکی بسیار مؤثر می‌باشد. ورود ژن‌های مطلوب به داخل

جمعیت‌ها می‌تواند کمیت و کیفیت محصولات را تحت تأثیر قرار دهد (Rao and Hodgkin 2002).

با توجه به این که شنبلیله در گروه محصولات کشاورزی فرعی قرار دارد و سطح زیر کشت آن در مقایسه با انواع گیاهان زراعی مهم نظیر غلات، حبوبات، دانه‌های روغنی و ... بسیار کمتر می‌باشد، مانند دیگر محصولات کشاورزی فرعی کمتر از نظر ذخایر ژنتیکی و ارزیابی پتانسیل ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته و در حقیقت دسترسی به ژرم پلاسما آن در بانک‌های ژن در سطح پایینی قرار دارد (Zahoor, 2007; Al-Maamari et al. 2020). ارزیابی ژرم پلاسما شنبلیله در برنامه‌های بلندمدت به‌نژادی می‌تواند بسیار اهمیت داشته باشد. بدون شک بررسی تنوع ژنتیکی این گونه گیاهی نه تنها با هدف حفاظت از ژرم پلاسما و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی، بلکه به‌منظور فراهم شدن اطلاعات لازم برای گزینش والدین مناسب در انجام تلاقی‌ها جهت ایجاد جمعیت‌های جدید با هدف اصلاح کمی و کیفی این گیاه و تولید واریته‌های تجاری ارزشمند آن می‌تواند بسیار مؤثر و مهم باشد (Al-Maamari et al. 2020).

امروزه نشانگرهای مولکولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ابزارهای ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسماهای گیاهی به‌شمار می‌روند. در سال‌های اخیر چندین سیستم نشانگری جدید معرفی شده‌اند که دسته‌ای از این نشانگرها تحت عنوان نشانگرهای هدفمند ژنی¹ نامیده می‌شوند. در این میان، نشانگرهای $^{\text{C}}\text{BDP}$ (Singh et al. 2014) و $^{\text{S}}\text{CoT}$ (Collard and Mackill, 2009) از جمله نشانگرهای پرکاربرد و موفق در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت می‌باشند. این نشانگرها براساس نواحی حفاظت شده چندشکلی مبتنی بر نقاط هدفمند ژنوم ایجاد می‌نمایند و از این نظر نسبت به نشانگرهای تصادفی و نیمه تصادفی مانند AFLP، JSSR، RAPD و ... برتری دارند (Etmnan et al. 2018a).

آغازگرهای $^{\text{C}}\text{BDP}$ متناسب با توالی‌های CAAT-box پروموتور ژن‌های گیاهان طراحی شده‌اند و طول آنها به اندازه‌ای است که

¹ Gene targeted marker

² CAAT-Box derived polymorphism

³ Start codon targeted

استفاده از نشانگرهای SCoT و ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های *T. foenum-graecum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران (Daneshmand et al. 2017)، بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف از دو گونه *T. foenum-* و *T. caerulea* (Dangi et al. 2004)، بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلفی از گونه *T. foenum-graecum* هند با استفاده از نشانگرهای RAPD (Dangi et al. 2004)، بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های شنبلیله بومی ایران با استفاده از نشانگرهای AFLP (Ahari et al. 2014)، استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD در مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف از دو گونه *T. foenum-* و *T. caerulea* (Dangi et al. 2004) *graecum* در شناسایی رقم و انگشت‌نگاری ملکولی گونه *T. foenum-* (Kumar et al. 2012) *graecum* اشاره کرد. هدف از این پژوهش، مطالعه تنوع ژنتیکی در اکسشن‌های مختلف متعلق به گونه *T. foenum-graecum*، با استفاده از نشانگرهای SCoT و CDBP و بررسی کارایی نشانگرهای هدفمند ژنی در برآورد چندشکلی و شناسایی میزان تنوع ژنتیکی در مطالعه حاضر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل تعداد ۴۰ اکسشن مختلف از گونه *T. foenum-graecum* جمع‌آوری شده از پنج منطقه جغرافیایی مختلف ایران بود که مشخصات محل جمع‌آوری و تعداد نمونه‌ها به تفکیک هر منطقه در جدول ۱ ارائه شده است. به منظور استخراج DNA ژنومی بذره‌های هریک از نمونه‌ها در گلدان کشت و تا زمان تولید گیاهچه در شرایط گلخانه‌ای نگهداری شد. پس از تولید گیاهچه، استخراج DNA مطابق دستورالعمل CTAB (Doyle and Doyle 1987) از بافت برگ انجام شد و سپس کیفیت DNA استخراج شده با استفاده الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد تایید قرار گرفت. به منظور تکثیر قطعات ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، از دو نوع آغازگر مختلف استفاده شد؛ آغازگرهای

ضمن فراهم نمودن امکان تکثیر اختصاصی با تکرارپذیری بالا، میزان قابل قبولی از چندشکلی را ایجاد می‌نمایند. نواحی هدف تکثیر این نشانگرها در ژنوم که جزو مناطق فعال ژنوم می‌باشد نیز زمینه به‌کارگیری اطلاعات حاصل از این نشانگرها را در مطالعات ساختار جمعیت و انواع نقشه‌یابی فراهم نموده است (Singh et al. 2014).

آغازگرهای SCoT نیز بر اساس توالی‌های توافقی مجاور کدون آغاز (ATG) طراحی شده‌اند. این آغازگرها نیز با طولی برابر ۱۸ نوکلئوتید مبتنی بر یک توالی حفاظت شده طراحی شده‌اند و حداقل در یک نوکلئوتید در انتهای ۳' با یکدیگر متفاوت می‌باشند. الگوهای بانندی حاصل از این آغازگرها نیز از تکرارپذیری بالا و میزان چندشکلی مناسبی در جمعیت‌های گیاهی برخوردار است (Collard and Mackill 2009).

از نشانگرهای CDBP در مطالعات گوناگون تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت‌های زراعی و وحشی گونه‌های گیاهی مختلف استفاده شده که از آن جمله می‌توان به تجزیه تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلف جوجوبا (Heikrujam et al. 2015)، ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما گندم دوروم (Heidari et al. 2017)، بررسی تنوع و روابط بین گونه‌ای در دوازده گونه مختلف از ژرم پلاسما وحشی و زراعی *Aegilops sp.* و *Triticum sp.* شامل ۲۲۸ ژنوتیپ مختلف (Etmnan et al. 2019)، اشاره نمود.

کاربرد موفقیت‌آمیز نشانگرهای SCoT نیز در ارزیابی تنوع ژنتیکی و مطالعه روابط بین گونه‌ای در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت لاین‌های اصلاحی و واریته‌های بومی در ژرم پلاسما گلرنگ (Talebi et al. 2018)، بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف گیاه دارویی مریم گلی (Etmnan et al. 2018a)، ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های وحشی و زراعی از دو جنس آزیلوپس و تریتیوم (Pour-Aboughadareh et al. 2018)، مطالعه تنوع ژنتیکی در اکسشن‌های مختلف *T. foenum-graecum* (Daneshmand et al. 2017) و بسیاری دیگر گزارش شده است.

گزارش‌های مختلفی مبنی بر استفاده از نشانگرهای ملکولی مختلف برای بررسی تنوع ژنتیکی و انگشت‌نگاری DNA در ژرم‌پلاسما *Trigonella sp.* وجود دارد که از آن جمله می‌توان به

محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و برای رنگ‌آمیزی ژل‌های الکتروفورزی از Safeview استفاده شد. پس از ثبت تصاویر الگوهای باندهای، امتیازدهی باندها به صورت صفر و یک (به ترتیب برای عدم وجود باند و وجود باند) انجام شد.

به منظور بررسی کارایی آغازگرها در تمایز بین ژنوتیپ‌ها، میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگر^۱ (MI) برای هر آغازگر محاسبه شد. معیار PIC برای هر نشانگر از رابطه $1 - \sum p_i^2$ به دست آمد و شاخص نشانگر از حاصل ضرب تعداد باندهای چندشکل در مقدار PIC محاسبه شد. جهت برآورد مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها از ضریب فاصله Dice استفاده شد و به منظور گروه‌بندی نمونه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام شد. به منظور انجام تجزیه‌های آماری نظیر تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و برآورد فواصل ژنتیکی و همچنین رسم دندروگرام، نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی و ... از نرم‌افزارهای DARwin ver. 6 (Perrier et al. 2003) و MEGA ver. 5.1 (Tamura et al. 2011) استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل تنوع درون و بین جمعیت‌ها، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) و همچنین برآورد پارامترهای ژنتیکی شامل درصد لوکوس‌های چندشکل (PPL)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسی (He)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx- ver 6.5 (Peakall and Smouse 2006) انجام شد.

نتایج و بحث

آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در مجموع تعداد ۱۷۱ باند را در ۴۰ ژنوتیپ مورد بررسی، تکثیر نمودند که از این تعداد ۱۴۳ باند چندشکلی نشان دادند به طوری که از این ۱۴۳ باند چندشکل سهم آغازگرهای CBDP و SCoT به ترتیب ۷۸ و ۶۵ باند بود. با توجه به استفاده از ۱۰ آغازگر CBDP در مقابل ۷ آغازگر SCoT، به طور متوسط آغازگرهای SCoT تعداد باند

CBDP از بین توالی‌های ارائه شده توسط Singh et al. (2014) و آغازگرهای SCoT نیز براساس توالی‌های معرفی شده توسط Collard and Mackill (2009) انتخاب شدند.

از بین آغازگرهای منتخب مورد استفاده، ۱۰ آغازگر CBDP و ۷ آغازگر SCoT الگوهای باندهای قابل امتیازدهی ایجاد نمودند و تجزیه و تحلیل آماری بر مبنای این تعداد آغازگر انجام شد.

جدول ۱- کد اکسشن‌های مورد بررسی و مشخصات گروه بندی آن‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی محل جمع آوری

محدوده جغرافیایی	استان	کد اکسشن	اندازه نمونه	گروه
مرکز	اصفهان یزد	۱،۲،۳،۴،۵ ۶،۷،۸،۹،۱۰	۱۰	I
غرب	کرمانشاه کردستان	۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵ ۱۶،۱۷،۱۸،۱۹	۹	II
جنوب	کهگیلویه و بویراحمد خوزستان	۲۰،۲۱،۲۲ ۲۳،۲۴،۲۵،۲۶	۷	III
شمال شرق	سمنان خراسان رضوی	۲۷،۲۸،۲۹ ۳۰،۳۱،۳۲،۳۳	۷	IV
جنوب شرق	سیستان و بلوچستان کرمان	۳۴،۳۵،۳۶ ۳۷،۳۸،۳۹،۴۰	۷	V

ترکیب اجزای واکنش به صورت ۱۰ میکرولیتر Master Mix شرکت سیناکلون، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی رقیق شده، ۲ میکرولیتر پرایمر (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه استریل تنظیم شد و واکنش‌های تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad مدل T-100 با برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بهینه‌شده برای هریک از آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه و پلیمریزاسیون (توسعه رشته) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه تا ۲ دقیقه (به ترتیب برای آغازگرهای SCoT و CBDP) و در نهایت یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

¹ Polymorphism information content

² Marker index

یک آغازگر را بین دو نمونه نشان می‌دهد (Powell et al. 1996). به عبارت دیگر شاخص PIC احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر بین دو فرد می‌باشد که به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است. شاخص نشانگر نیز که از حاصلضرب PIC در تعداد باندهای چندشکل تکثیر شده توسط یک آغازگر به دست می‌آید شاخص دیگری است که می‌تواند به خوبی در ارزیابی قدرت تفکیک آغازگرها مورد استفاده قرارگیرد.

چندشکل بیشتری (۹/۳) باند به ازای هر آغازگر) را در مقایسه با آغازگرهای CBDP (۷/۸) باند به ازای هر آغازگر) تکثیر کردند. همچنین بیشترین تعداد باند چندشکل مربوط به SCoT-5 با ۱۲ باند بود (جدول ۲).

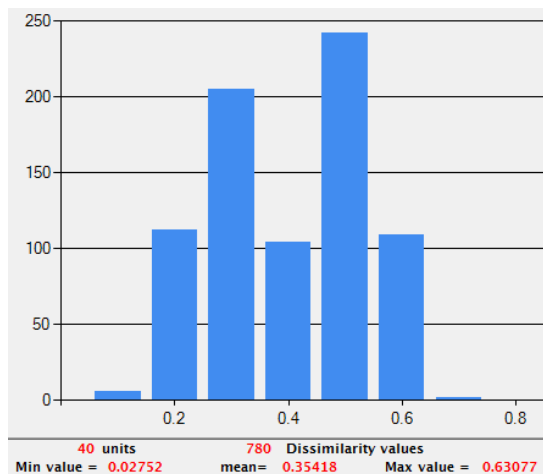
شاخص محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) در بین انواع شاخص‌هایی که بیانگر کارایی یک نشانگر می‌باشند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این شاخص به تعداد آلل‌ها و فراوانی آن‌ها وابسته بوده و احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی اکسشن‌های *T. Foenum-graecum* به همراه شاخص‌های آگاهی‌بخش برآورد شده

	آغازگر	توالی آغازگر	TB	PB	PP%	PIC	MI
1	CDBP-1	TGAGCACGATCCAAT AGC	۱۲	۱۱	۹۱	۰/۳۵	۳/۸۵
2	CDBP-2	TGAGCACGATCCAATAAT	۸	۷	۸۷	۰/۲۰	۱/۴۰
3	CDBP-3	TGAGCACGATCCAAT ACC	۱۱	۹	۸۲	۰/۲۵	۲/۲۵
4	CDBP-4	TGAGCACGATCCAAT AAG	۹	۸	۸۹	۰/۳۲	۲/۵۶
5	CDBP-5	TGAGCACGATCCAAT CTA	۷	۵	۷۱	۰/۳۳	۱/۶۵
6	CDBP-6	TGAGCACGATCCAAT CAG	۱۰	۹	۹۰	۰/۳۳	۲/۹۷
7	CDBP-7	TGAGCACGATCCAAT CGA	۸	۵	۶۲	۰/۲۶	۱/۳۰
8	CDBP-8	TGAGCACGATCCAAT CGG	۱۰	۹	۹۰	۰/۳۳	۲/۹۷
9	CDBP-9	TGAGCACGATCCAAT GAT	۸	۷	۸۷	۰/۲۲	۱/۵۴
10	CDBP-10	TGAGCACGATCCAAT GTT	۱۰	۸	۸۰	۰/۳۶	۲/۸۸
		میانگین	۹/۳	۷/۸	۸۳	۰/۲۹	۲/۳۳
11	SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCA	۱۲	۱۰	۸۳	۰/۳۶	۳/۶۰
12	SCoT-2	CAACAATGGCTACCACCC	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰/۳۴	۳/۸۴
13	SCoT-3	CAACAATGGCTACCACCG	۱۱	۸	۷۳	۰/۴۲	۳/۳۶
14	SCoT-4	CAACAATGGCTACCACCT	۱۰	۷	۷۰	۰/۴۷	۳/۲۹
15	SCoT-5	CAACAATGGCTACCACGA	۱۴	۱۲	۸۵	۰/۳۶	۴/۳۲
16	SCoT-6	CAACAATGGCTACCACGC	۱۰	۸	۸۰	۰/۳۳	۲/۶۴
17	SCoT-7	CAACAATGGCTACCACGG	۱۰	۹	۹۰	۰/۲۹	۲/۶۱
		میانگین	۱۱/۱	۹/۳	۸۳	۰/۳۷	۳/۳۶

TB، PIC، PP، PB و MI به ترتیب بیانگر تعداد کل باند، تعداد باند چندشکل، درصد چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکل و شاخص نشانگر می‌باشند.

متعلق به استان کرمان) مشاهده شد. توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی برآورد شده بر اساس ضرایب مورد استفاده دایس در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی برآورد شده بین افراد بر اساس ضریب عدم تشابه دایس در مطالعه تنوع ژنتیکی اکسشن‌های شبلیله با استفاده از نشانگرهای SCoT و CBDP

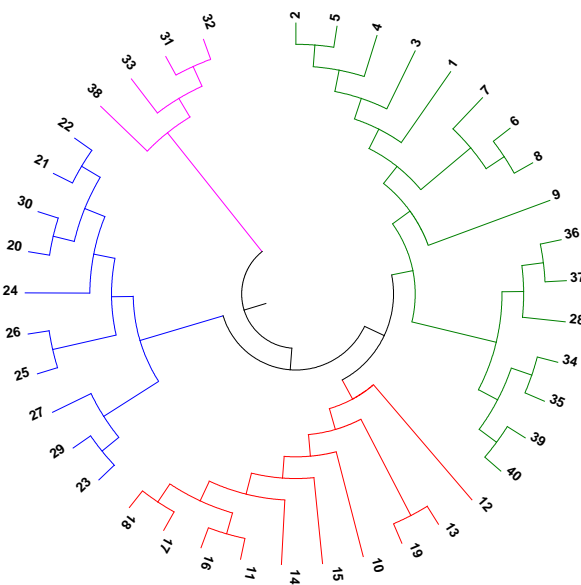
تجزیه کلاستر بر اساس الگوریتم UPGMA و بر مبنای ماتریس فاصله دایس ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در چهار گروه اصلی دسته‌بندی کرد (شکل ۲). در این دسته‌بندی، ژنوتیپ‌های مربوط به نواحی مرکزی و جنوب شرق به‌طور عمده در یک گروه قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های منطقه غرب نیز با اندکی اختلاط از ژنوتیپ‌های مناطق دیگر کلاستر جداگانه‌ای تشکیل دادند. کلاستر سوم مخلوطی از ژنوتیپ‌های مناطق شمال شرق و جنوبی (عمدتاً ژنوتیپ‌های سمنان و خوزستان) بود که برخلاف دو کلاستر دیگر از نظر جغرافیایی دارای فاصله زیادی با یکدیگر بودند. گروه چهارم نیز متشکل از ژنوتیپ‌های منطقه شمال شرق بود. با توجه به نتایج حاصل اگرچه تا حدودی دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها منطبق با موقعیت جغرافیایی محل جمع‌آوری آن‌ها بود اما براساس این نتایج نمی‌توان گروه‌بندی افراد بر اساس داده‌های مولکولی را کاملاً منطبق بر پراکنش جغرافیایی آن‌ها تلقی نمود. به عبارت دیگر در پاره‌ای از موارد مشاهده شد که دو اکسشن مربوط به یک ناحیه جغرافیایی با فاصله مکانی اندک در دسته‌بندی اکسشن‌ها بر اساس داده‌های مولکولی در دو گروه کاملاً جدا از هم قرار گرفتند.

میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکل برای آغازگرهای CBDP و SCoT به ترتیب برابر ۰/۲۹ و ۰/۳۷ به دست آمد که با توجه به حداکثر مقدار این شاخص در نشانگرهای غالب (۰/۵) مقادیر به دست آمده حاکی از کارایی خوب هر دو نشانگر و البته برتری نشانگر SCoT نسبت به CBDP بود. مقادیر PIC برای آغازگرهای CBDP در دامنه‌ای بین ۰/۲۰ برای CBDP-2 تا ۰/۳۶ برای CBDP-10 و برای آغازگرهای SCoT در دامنه‌ای بین ۰/۲۹ برای CBDP-7 تا ۰/۴۷ برای CBDP-4 متغیر بود. بدین ترتیب بیشترین و کمترین مقدار PIC به ترتیب مربوط به آغازگرهای SCoT و CBDP بود. نتایج حاصل از برآورد شاخص MI نیز تأییدکننده این نتایج در خصوص قدرت تفکیک آغازگرهای مورد استفاده بود؛ به گونه‌ای که متوسط شاخص نشانگر (MI) در آغازگرهای CBDP برابر ۲/۳۳ با دامنه تغییر ۱/۳۰ تا ۳/۸۵ به ترتیب برای آغازگرهای CBDP-7 و CBDP-1 و در آغازگرهای SCoT برابر ۳/۳۶ با دامنه تغییر ۲/۶۱ تا ۴/۳۲ به ترتیب برای آغازگرهای SCoT-7 و SCoT-5 بود (جدول ۲). به طور کلی این نتایج نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده از کارایی قابل‌قبولی برخوردار بوده و می‌توان از این آغازگرها برای سایر مطالعات تنوع ژنتیکی استفاده کرد. کارایی نشانگرهای مورد اشاره در مطالعات تنوع ژنتیکی در گیاهان دیگر مانند گندم دوروم (Shaygan et al. 2021)، ژرم پلاسما زراعی و وحشی گندم (Etminan et al. 2018b)، گل محمدی (Asadi and Shooshtari, 2021)، گونه‌های مختلف آزیلوپس (Pour-Aboughadareh et al. 2020) نیز گزارش شده است.

به‌منظور برآورد فواصل ژنتیکی از دو ضریب فاصله جاکارد و دایس استفاده شد که با توجه به بررسی ضریب تشابه کوفتیک بیشتر برای ضریب دایس، این ضریب مبنای محاسبات قرار گرفت. متوسط میزان فاصله ژنتیکی بین اکسشن‌ها برابر ۰/۳۵ به دست آمد که بیانگر فاصله نسبتاً اندک و در نتیجه درجه تشابه بالا بین اکسشن‌ها بود. بر اساس ضریب فاصله دایس میزان فاصله ژنتیکی بین اکسشن‌ها از ۰/۰۳ تا ۰/۶۳ متغیر بود. بیشترین میزان فاصله ژنتیکی (۰/۶۳) بین اکسشن شماره ۲۴ (مربوط به استان خوزستان) با اکسشن شماره ۳۲ (از استان خراسان) و کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۳) بین اکسشن‌های شماره ۳۹ و ۴۰ (هر دو

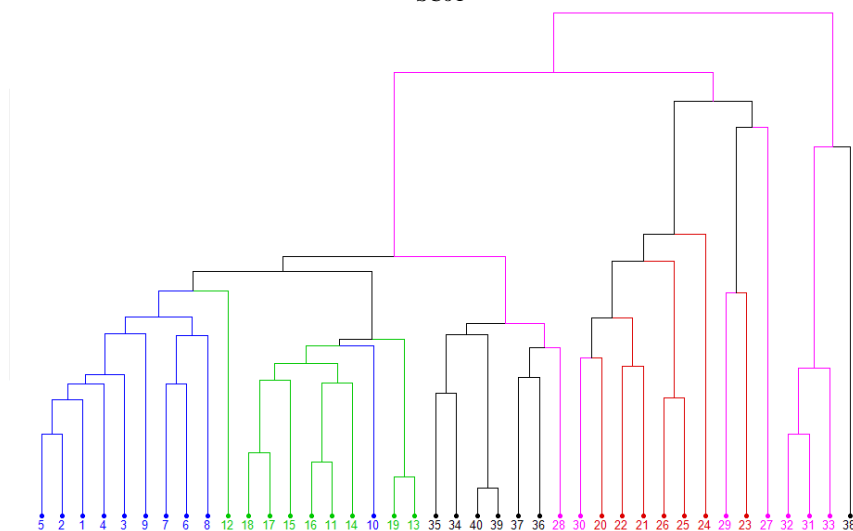
بررسی تنوع ژنتیکی در *Daucus carota* (Bradeen et al. 2002)، اشاره نمود. لازم به ذکر است اینگونه گروه‌بندی‌ها ممکن است در نتیجه زمینه ژنتیکی منحصربه‌فرد این اکسشن‌ها و در نتیجه دارا بودن ویژگی‌های خاص در توالی ژنوم باشد. از سوی دیگر قرار گرفتن اکسشن‌های متعلق به دو ناحیه جغرافیایی دور از یکدیگر در یک گروه بر اساس تجزیه داده‌های مولکولی می‌تواند به عواملی همچون جابجائی ژرم پلاسم، تعداد ناکافی آغازگرها و پوشش ژنومی ناکافی آن‌ها و یا پراکنش بسیار وسیع یک گیاه در محدوده جغرافیایی مورد مطالعه مربوط باشد.

مشابه چنین نتایجی در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا با استفاده از نشانگرهای AFLP نیز گزارش شده است (Martins et al. 2006). گزارش‌های مشابه دیگری نیز در خصوص عدم انطباق گروه‌بندی افراد بر اساس داده‌های مولکولی با گروه‌بندی آن‌ها بر اساس مناطق جغرافیائی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه داروئی زیره ایرانی (*Bunium persicum*) با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP (Pezhmanmehr et al. 2009)، بررسی تنوع ژنتیکی *Matricaria chamomilla* با استفاده از نشانگرهای مولکولی و ویژگی‌های مورفولوژیک (Solouki et al. 2008) و



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۴۰ اکسشن *T. foenum-graecum* با استفاده از ضریب عدم تشابه دایس و الگوریتم UPGMA بر اساس داده‌های CDBP و

SCoT



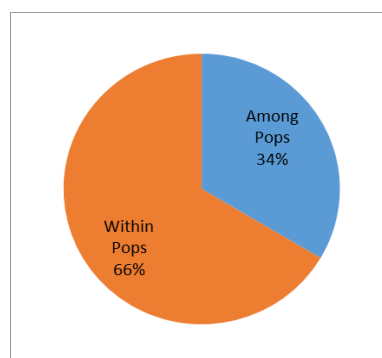
شکل ۳- نمایش ژنوتیپ‌های مربوط به هر منطقه جغرافیایی با رنگ متمایز از سایر مناطق در دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر تعداد ۴۰ ژنوتیپ *T. foenum-*

graecum از ۵ منطقه جغرافیایی با استفاده از ضریب فاصله دایس و الگوریتم UPGMA بر اساس داده‌های CDBP و SCoT

در بین پنج جمعیت مورد بررسی بیشترین و کمترین میزان مجموع مربعات (SS) درون گروهی نیز برابر ۱۷۰/۲ و ۹۲/۲ به دست آمد که به ترتیب مربوط به جمعیت ۳ (خوزستان و کهگیلویه و بویراحمد) و ۵ (سیستان و بلوچستان و کرمان) بود. مقدار بالاتر واریانس درون گروهی نسبت به بین گروهی حاکی از احتمال وجود آلل‌های جدید و منحصر به فرد در ژرم پلاسماست که جهت استفاده در برنامه‌های اصلاح جمعیت‌ها و تولید ارقام جدید می‌تواند مفید باشد. غلبه میزان تنوع درون گروهی به بین گروهی در تجزیه واریانس مولکولی داده‌های حاصل از بررسی تنوع در انواع ژرم پلاسما گیاهی به وسیله نشانگرهای RAPD, SCoT, SSR و ISSR در تحقیقات مختلفی گزارش‌های شده است (Thomas and Bebeli, 2010; Gholamian et al., 2019; Etmian et al., 2019).

به منظور آنالیز تکمیلی خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی، شاخص‌های ژنتیک جمعیت شامل تعداد آلل شناسایی شده (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، مقدار هتروزیگوسی (He)، شاخص شانون (I) و درصد لوکوس‌های چند شکل (%P) برای هر جمعیت محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس محاسبات انجام شده بیشترین و کمترین تعداد آلل‌های مؤثر بترتیب در جمعیت‌های IV و I مشاهده شد.

به منظور درک مناسب‌تر گروه‌بندی نمونه‌های مناطق جغرافیایی مختلف، در دندروگرام دیگری (شکل ۳) نمونه‌های مربوط به هر منطقه جغرافیایی با رنگ متمایز از سایر مناطق مشخص شده‌اند. نتایج حاصل تجزیه واریانس مولکولی که به منظور تعیین سهم واریانس‌های درون گروهی و بین گروهی و تفکیک واریانس مولکولی بین اکسشن‌ها به دو بخش درون و بین جمعیتی انجام شد نشان داد که ۳۴ درصد از واریانس کل مربوط به جزء بین گروهی و ۶۶ درصد مربوط به جزء درون گروهی می‌باشد (شکل ۴).

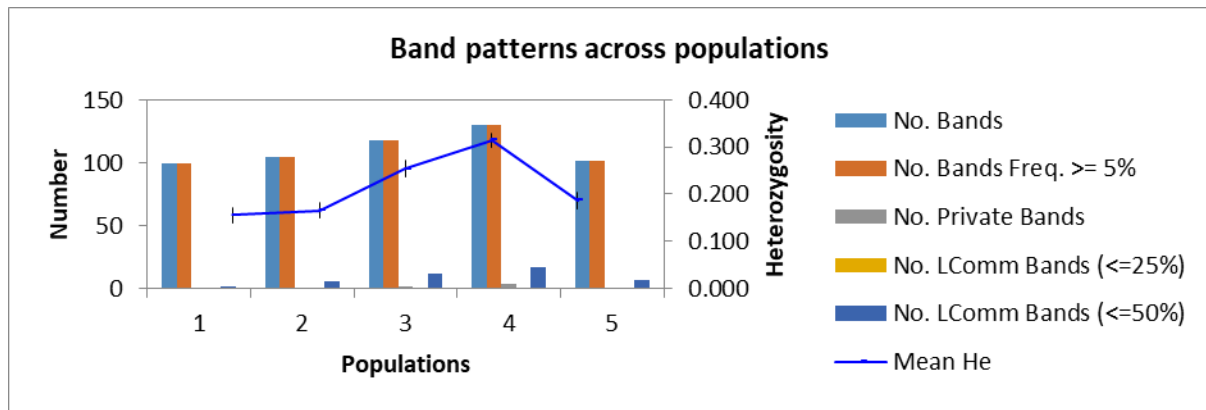


شکل ۴- نمودار دایره‌ای توزیع واریانس ژنتیکی بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی

جدول ۳- پارامترهای تنوع برآورد شده به تفکیک جمعیت‌های مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی *T. foenum-graecum* با استفاده از نشانگرهای SCoT و CBDP

کد جمعیت	اندازه جمعیت		Na	Ne	I	He	%P
I	۱۰	میانگین	۱/۱۶	۱/۲۶	۰/۲۳	۰/۱۵	۴۶/۸
		خطای استاندارد	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱۶	
II	۹	میانگین	۱/۲۰	۱/۲۸	۰/۲۴	۰/۱۶	۴۶/۸
		خطای استاندارد	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱۷	
III	۷	میانگین	۱/۴۹	۱/۴۴	۰/۳۷	۰/۲۵	۶۷/۱
		خطای استاندارد	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱۷	
IV	۷	میانگین	۱/۷۵	۱/۵۴	۰/۴۶	۰/۳۱	۸۴/۶
		خطای استاندارد	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱۵	
V	۷	میانگین	۱/۲۸	۱/۳۲	۰/۲۸	۰/۱۸	۵۷/۳
		خطای استاندارد	۰/۰۷	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱۷	

Na, Ne, I, He, %P به ترتیب تعداد آلل شناسایی شده، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، هتروزیگوسی و درصد لوکوس‌های چندشکل می‌باشند.



شکل ۵- الگوی توزیع باندها در جمعیت‌های مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی *T. foenum-graecum* با استفاده از نشانگرهای SCoT و CDBP

جدول ۴- توزیع فراوانی باندها و فراوانی باندهای اختصاصی در جمعیت‌های مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی *T. foenum-graecum* با استفاده از نشانگرهای

CBDP و SCoT

جمعیت	I	II	III	IV	V
تعداد باند	۹۹	۱۰۵	۱۱۸	۱۳۰	۱۰۱
تعداد باند با فراوانی بیشتر از ۵ درصد	۹۹	۱۰۵	۱۱۸	۱۳۰	۱۰۱
تعداد باندهای اختصاصی	۰	۰	۲	۴	۱
تعداد باند با فراوانی کمتر از ۲۵ درصد	۰	۰	۰	۰	۰
تعداد باند با فراوانی کمتر از ۵۰ درصد	۲	۶	۱۲	۱۷	۷

می‌باشد که این موضوع می‌تواند یکی از دلایل تنوع درون جمعیتی بالاتر در این گونه باشد. فراوانی باندهای اختصاصی در یک جمعیت نشان‌دهنده زمینه ژنتیکی خاص و منحصر به فرد آن جمعیت تلقی می‌شود. همچنین داده‌های جدول مورد اشاره نشان می‌دهد که تمامی باندهای تکثیر شده از فراوانی بیشتر از ۵ درصدی برخوردار می‌باشند و هیچ آل نادری در جمعیت‌ها مشاهده نمی‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی سطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی در گونه *T. foenum-graecum* به‌خصوص در اکسشن‌های مناطق شمال شرقی (نمونه‌های استان‌های سمنان و خراسان) را نشان داد که این موضوع می‌تواند به شرایط اقلیمی و توپوگرافیکی منطقه ارتباط داشته باشد. این نتایج همچنین نشان‌دهنده قابلیت و کارایی بالای نشانگرهای SCoT و CDBP جهت استفاده از آن‌ها در

با توجه به نتایج به دست آمده، در بررسی میزان تنوع درون جمعیت‌ها بر اساس شاخص شانون (I) نیز در بین ۵ گروه جمعیتی، جمعیت IV با مقدار ۰/۴۶ تنوع بیشتری را نشان داد. همچنین مقدار هتروزیگوسی نیز بیانگر وجود تنوع بیشتر درون جمعیت IV بود که مقدار آن برابر با ۰/۳۱ به دست آمد. در مطالعه دیگری بر روی اکسشن‌های مختلف *T. foenum-graecum* با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR نیز سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون گروه‌های جمعیتی این گونه گزارش شده است (Dangi et al. 2004).

شکل ۵ الگوی توزیع باندها در جمعیت‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد و اطلاعات مربوط به آن در جدول ۴ ارائه شده است. همان‌طور که از اطلاعات شکل ۵ و جدول ۴ مشخص است گروه‌های جمعیتی III، IV و V واجد آل‌های اختصاصی هستند لیکن جمعیت IV (نمونه‌های مربوط به نواحی شمال شرقی کشور) از تعداد آل‌های اختصاصی بیشتری (۴ آل) برخوردار

دادند. ضمن اینکه با توجه به اینکه این نشانگرها جزو گروه نشانگرهای هدفمند ژنی بوده و تنوع را بر اساس نواحی فعال ژنوم آشکار می‌کند و می‌توان از آنها به منظور اشیاع نقشه‌های ژنتیکی و تجزیه ارتباط نیز استفاده نمود.

مطالعات تنوع ژنتیکی بود به طوری که تعداد ۱۷ آغازگر پوشش ژنومی نسبتاً مناسبی برای حصول نتایج قابل قبول ایجاد نمودند. بر اساس شاخص‌های کارایی نشانگرها به طور کلی نشانگرهای SCoT با توجه به درصد چندشکلی بیشتر و متوسط PIC و MI بالاتر در مقایسه با نشانگرهای CBDP کارایی بهتری را نشان

منابع

- Ahari DS, Hassandokht MR, Kashi AK, Amri A (2014) Evaluation of genetic diversity in Iranian fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) landraces using AFLP markers. Seed and Plant Improvement Journal 30:155-171. (In Farsi).
- Al-Maamari IT, Mumtaz Khan M, Al-Sadi AM, Iqbal Q, Al-Saady N (2020) Morphological characterization and genetic diversity of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) accessions in Oman Bulgarian Journal of Agricultural Science 26:375-383.
- Asadi A, Shooshtari L (2021) Assessment of somaclonal variation in micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) using molecular markers. Modern Genetics Journal 63:327-335. (In Farsi).
- Bradeen JM, Bach IC, Briard M, Le CV, Grzebelus D, Senalik DA, Simon PW (2002) Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild *Daucus* populations reveals a genetically nonstructured composition. Journal of the American Society for Horticultural Science 127:383-391.
- Collard BCY, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter 27:86-93.
- Daneshmand H, Etminan AR, Qaderi A (2017) Diversity evaluation of *Trigonella foenum-graecum* populations using DNA markers and phytochemical characteristics. Journal of Medicinal Plants 63:16.
- Dangi R, Lagu MD, Choudhary LB, Ranjekar P, Gupta VS (2004) Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenu-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biology 4:13.
- 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, Noori A, Ahmadi-Rad A, Shooshtari L, Mahdavian Z, Yousefiazar-Khanian M (2018a) Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. Biotechnology & Biotechnological Equipment 32:610-617.
- Etminan A, Mehrabi AA, Shooshtari L, Moradkhani H (2018b) Applicability of CBDP markers to study of genetic diversity among some of the cultivated wheat accessions and their ancestral species. Modern Genetics Journal 52:79-89. (In Farsi).
- 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 Biosystems 153:398-405.
- Heidari P, Etminan A, Azizinezhad R, Khosroshahli M (2017) Indian Journal of Genetics and Plant breeding 77:379-386.
- Heikrujam M, Kumar J, Agrawal V (2015) Genetic diversity analysis among male and female *Jajoba* genotypes employing gene targeted molecular markers, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT box derived polymorphism (CBDP) markers. Meta Gene 5:90-97.
- Gholamian F, Etminan A, Changizi M, Khaghani S, Gomarian M (2019) Assessment of genetic diversity in *Triticum urartu Thumanjan* ex *Gandilyan* accessions using start codon targeted polymorphism (SCoT) and CAATbox derived polymorphism (CBDP) markers. Biotechnology and Biotechnological equipment 33:1653-1662.
- Kumar V N, Srivastava A, Singh M K, Vyas S, Gupta K, Katudia K, Vaidya S, Chaudhary A and Ghosh S K (2012) Genetic diversity and identification of variety-specific AFLP markers in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). African Journal of Biotechnology 11:4323-9
- Maloo SR, Sharma R, Jain D, Choudhary S, Soan H (2020) Assessment of genetic diversity in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) genotypes using morphological and molecular markers. Indian Journal of Agricultural Sciences 90:25-30
- Martin E, Akan H, Ekici M and Aytac Z (2011) Karyotype analyses of ten sections of *Trigonella* (*Fabaceae*). Comp. Cytogenet 5:105-121.
- Martins SR, Vences FJ, Saenz de Miera LE, Barrosa MR, Carnide V (2006) RAPD analysis of genetic diversity among and within Portuguese landraces of common white bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of the American Society for Horticultural Science 108:133-142.
- Mehrafarin A, Qaderi A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H, Noormohammadi Gh, and Zand E (2010) Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Journal of Medicinal Plants 9:1-18.
- Mehrafarin A, Rezazadeh Sh, Naghdi Badi H, Noormohammadi, Zand E and Qaderi A (2011) A Review

on Biology, Cultivation and Biotechnology of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) as a Valuable Medicinal Plant and Multipurpose. *Journal of Medicinal Plants* 10:6-24.

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

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

Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (Eds.), *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, London, Plymouth, UK 43-76.

Pezhmanmehr M, Hassani ME, Jahansooz F, Najafi AA, Sefidkon F, Mardi M, Pirseiedi M (2009) Assessment of genetic diversity in some Iranian populations of *Bunium persicum* using RAPD and AFLP markers. *Iranian Journal of Biotechnology* 7:93-100.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M (2018) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some *Aegilops* and *Triticum* species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. *Plant Biosystem* 152:694-703.

Pour-Aboughadareh A, Etminan A, Shooshtari L, Maleki Tabrizi N (2020) Comparative Assessment of SCoT and CBDP Markers for Investigation of Genetic Diversity Existing in Different *Aegilops* Species. *Agricultural Biotechnology* 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.

Rao VR, Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:1-19.

Shaygan N, Etminan A, Majidi Hervean I, Azizinezhad R, Mohammadi R (2021) Evaluation of molecular diversity in breeding lines of durum wheat using SCoT markers. *Modern Genetics Journal* 16:151-160. (In Farsi).

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.

Solouki M, Mehdikhani H, Zeinali H, Emamjomeh AA (2008) Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 117:281-287.

Talebi R, Nosrati S, Etminan A, Naji AM (2018) Genetic diversity and population structure analysis of landrace and improved safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm using arbitrary functional gene-based molecular markers. *Biotechnology and Biotechnological equipment* 32:1183-1194.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution* 28:2731-2739.

Thomas KG, Bebeli PJ (2010) Genetic diversity of Greek *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:951-961.

Zahoor, A (2007) Country report on plant genetic resources for food and agriculture. *Pakistan Agricultural Research Council* 79.