

بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های *Aegilops* و *Aegilops crassa*

cylandrica با استفاده از نشانگرهای SCoT

Assessment of genetic diversity among *Aegilops crassa* and *Aegilops cylandrica* species using SCoT markers

علی سجادی بکائی^۱، امید سفالیان^{۲*}، بهزاد سرخی‌شاه‌لو^۳، علی اصغری^۲، علیرضا پورابوقداره^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Bokaei AS¹, Sofalian O^{*2}, Sorkhilalehlo B³, Asghari A², Pour-Aboughadareh AR³

1- PhD Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2- Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3- Assistant Professors, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۳)

چکیده

گونه‌های متعلق به جنس آژیلوپس به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ذخایر ژنتیکی گندم محسوب می‌شوند. این منابع ژرم‌پلاسمی به‌واسطه پتانسیل‌های اصلاحی خود همواره منبع ژنی غنی برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی گندم محسوب می‌شوند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در ۶۰ توده آژیلوپس متعلق به دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. cylandrica* با استفاده از نشانگرهای SCoT مورد بررسی قرار گرفت. بررسی الگوی بانندی به‌دست آمده از آغازگرهای استفاده شده نشان داد در مجموع ۱۷۱ قطعه در توده‌های مورد بررسی تکثیر یافت که ۱۵۶ قطعه چندشکل بودند. متوسط شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC)، قدرت تمایز (Rp) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب ۰/۳۰، ۱۶/۲۷ و ۳/۱۸ برآورد شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به درون گونه‌ها بود (۷۹٪ در مقابل ۲۱٪). بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی نیز نشان داد بیشترین میزان تنوع ژنتیکی مربوط به گونه *Ae. crassa* بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه ژنتیکی جاکارد نشان داد کلیه توده‌ها در دو گروه اصلی مجزا شدند، به‌طوری که الگوی گروه‌بندی منطبق با ساختار ژنومی توده‌ها بود. علاوه بر این، نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز تأیید کننده گروه‌بندی به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای بود. به‌طور کلی این نتایج می‌تواند بیانگر قابلیت نشانگرهای SCoT در تمایز توده‌های ژرم‌پلاسمی بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها باشد. از این‌رو، استفاده از این سیستم نشانگری در دیگر مطالعات ژنتیکی قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آژیلوپس

تجزیه واریانس مولکولی

تنوع ژنتیکی

نشانگرهای مبتنی بر ژن

مطالعه الگوی تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین پایه‌های هر برنامه به‌نژادی در نظر گرفته شده است. زیرا آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی در منابع ژرم‌پلاسمی سبب خواهد شد تا ظرفیت‌های ژنتیکی مرتبط با اهداف اصلاحی مهم برای هر گونه گیاهی شناسایی شوند (Mohammadi and Prasanna 2003). در این رابطه، نشانگرهای مولکولی ابزار مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی فراهم آورده‌اند و گزارش‌های متنوعی از کاربرد انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR در ارزیابی ژرم‌پلاسم گندم در اختیار است (Moustafavi et al. 2015; Etminan et al. 2016; Hamidi et al. 2014; Moradkhani et al. 2015). در سال‌های اخیر پیشرفت در ابزارهای مولکولی منجر به توسعه برخی از نشانگری مبتنی بر مناطق شناخته شده ژنوم یا برخی از ژن‌ها فراهم شده است که به‌عنوان نشانگرهای کارکردی (Anderson and Lubberstedt 2003; Gupta et al. 2008; Varshney et al. 2007) و نشانگرهای مبتنی بر بیان ژن (West et al. 2006) خوانده می‌شوند. نشانگر SCoT به‌عنوان یکی از نشانگرهای نوظهور مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، جزو نشانگرهای وابسته به ژن (کدون آغاز: ATG) می‌باشند. این نشانگرها بر اساس نواحی کوتاه حفاظت‌شده اطراف رمز آغاز ATG در ژن‌های گیاهی طراحی شده است. در این سیستم نشانگری از یک آغازگر ۱۸ نوکلئوتیدی استفاده می‌شود و آشکارسازی چندشکلی توالی بین رمزهای آغاز (ATG) در ژن‌های گیاهی را ممکن می‌کند. نشانگرهای SCoT از چندشکلی و تکرارپذیری بالایی برخوردار هستند و در طراحی آغازگرهای این نشانگر به اطلاع از توالی نوکلئوتیدی ژنوم نیاز نیست (Collard and Mackill 2009).

در بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار جمعیت در گونه‌های جنس آزیلوپس از طیف وسیعی از نشانگرهای مولکولی استفاده شده است. به‌عنوان مثال، (Saeidi et al. 2006) در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌هایی از گونه *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران از نشانگرهای SSR استفاده کردند و براساس نتایج آن‌ها سطح بالایی از تنوع ژنتیکی مشاهده شد به‌طوری که متوسط میزان چندشکلی نیز بالا (۰/۶۵) بود.

گندم (*Triticum aestivum* L.) به‌عنوان مهم‌ترین غله و گیاه زراعی دنیا شناخته شده است. این گیاه در محدوده وسیعی از شرایط اقلیمی و مناطق جغرافیایی تولید می‌شود و به‌دلیل تطابق زیاد با شرایط آب و هوایی مختلف، دامنه پراکندگی آن بیش از هر گونه دیگر گیاهی است. این گیاه زراعی با تولید جهانی بیش از ۷۰۰ میلیون تن، ۲۰٪ نیاز روزانه به پروتئین و کالری ۵/۴ میلیارد نفر از مردم جهان را تامین می‌کند (Arzani and Ashraf 2016a). توسعه تغییر در اقلیم جهانی، فرسایش ژنتیکی و چالش تولید کشاورزی پایدار نیاز به بهره‌برداری از ذخائر توارثی به‌ویژه خویشاوندان وحشی را بدیهی ساخته است (Arzani and Ashraf 2016b). با توجه به محدودیت تنوع ژنتیکی قابل استفاده در گونه‌های زراعی اصلاح شده برای سازگاری به تغییرات اقلیمی و بنابراین شانس ضعیف دستیابی به تنوع آلی جدید در این ذخایر، استفاده از خویشاوندان وحشی و گونه‌های بیگانه می‌تواند یک منبع ژنی غنی و متنوع از آل‌های جدید و ایده‌آل را برای به‌نژادگران فراهم آورد (Pour-Aboughadareh et al. 2021). جنس آزیلوپس به‌عنوان مهم‌ترین ژرم‌پلاسم گندم شناخته می‌شود. گونه‌های موجود در این جنس شامل مهم‌ترین خویشاوندان گندم زراعی بوده و بخش اصلی مخزن ژنی این گیاه را شامل می‌شوند. گونه‌های آزیلوپس بر اساس ساختار ژنومی خود در ۵ دسته کلی شامل *Aegilops* با ساختار ژنومی U، *Cylindropyrum* با ساختار ژنومی C و DC، *Vertebrata* با ساختار ترکیبی از ژنوم D و سایر ژنوم‌ها، *Comopyrum* با ساختار ژنومی M و N و در نهایت *Sitopsis* با ساختار ژنومی S گروه‌بندی می‌شوند (Kimber and Feldman 1987). بر اساس تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که گونه‌های وحشی برخوردار از ژنوم D دارای پتانسیل بالایی جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی گندم هستند. علاوه‌براین، بسیاری از خصوصیات زراعی و کیفی گندم زراعی نشأت گرفته از ژنوم D می‌باشد. از این‌رو بررسی تنوع ژنتیکی و غربال این منابع ژرم‌پلاسمی از نظر صفات مطلوب زراعی می‌تواند چشم‌انداز جدیدی را در استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی فراهم کند.

نشان داد که نشانگرهای SCoT قابلیت بالایی در تمایز ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام مختلف داشت. همچنین مشخص شد با توجه به کم بودن تعداد قطعات تکثیری میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) در نشانگرهای SCoT به مراتب بیشتر از نشانگرهای ISSR و CDDP است. به‌طور کلی نتایج حاصل از مطالعه این محققان نشان داد که نشانگرهای SCoT می‌توانند در ترکیب با سایر نشانگرها مانند ISSR به‌خوبی در تجزیه‌های ژنتیکی و بررسی روابط صفات به کار گرفته شوند. علاوه بر این، Hajibarat et al. (2015) در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در ارقام بومی نخود ایران از نشانگرهای SCoT، SSR و CDDP استفاده نمودند. این محققان گزارش کردند که اگرچه میزان متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در نشانگرهای SCoT (۰/۴۵) کمتر از نشانگرهای SSR (۰/۴۷) بود با این وجود، الگوی گروه‌بندی ارقام مورد بررسی با استفاده از نشانگرهای SCoT نسبت SSR از Etminan et al. (2016) نیز نشانگرهای SCoT در مقایسه با نشانگرهای ISSR به‌صورت مطلوب‌تری قادر به گروه‌بندی ارقام مختلف بودند به‌طوری که گروه‌بندی به‌دست آمده با استفاده از نشانگرهای SCoT مطابق با ساختار ژنتیکی و منشأ ارقام مورد مطالعه بود. با توجه به اهمیت خویشاوندان وحشی گندم به‌ویژه گونه‌های آزیلوپس این پژوهش با هدف مقایسه سطوح تنوع ژنتیکی موجود در دو گونه *Ae. crassa* (با ساختار ژنومی DDMM) و *Ae. cylindrica* (با ساختار ژنومی DDCC) با استفاده از نشانگرهای SCoT انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۶۰ توده آزیلوپس از گونه‌های *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* بود که بذور آن‌ها از بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه و مشخصات آن در جدول ۱ ذکر شده است. پس از کشت بذور و استقرار گیاهچه‌ها در محیط گلخانه، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان بر اساس دستورالعمل CTAB صورت گرفت (Doyle and Doyle 1987). کیفیت DNAهای استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار

(Naghavi et al. 2010) در بررسی ساختار جمعیت گونه‌های *T. aestivum* و *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش کردند که میزان هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، تنوع ژنتیکی (He) و شاخص شانون (I) در توده‌های نمونه‌برداری شده از نواحی شمالی ایران نسبت به سایر مناطق بیشتر بوده و میزان تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های *T. aestivum* به مراتب بسیار کمتر از تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های وحشی *Ae. tauschii* است. علاوه بر این، این محققان اظهار داشتند که وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گلستان، مازندران نسبت به نمونه‌های مربوط به استان‌های اردبیل، قزوین و سمنان نشان می‌دهد که این مناطق می‌توانند منبع بالقوه‌ای از پتانسیل‌های اصلاحی مفید را برای اصلاح گندم فراهم آوردند. در مطالعه Tahernezhad et al. (2010) از نشانگرهای SSR در بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های مختلف *Ae. tauschii* استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از ۱۹ نشانگر SSR در مجموع ۲۰۸ آلل شناسایی شد و 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. به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های وحشی گندم (2018) Pour-Aboughadareh et al. از نشانگرهای SCoT استفاده کردند. با توجه به نتایج این مطالعه میزان چندشکلی بالایی در گونه‌های مورد بررسی گزارش شد. علاوه بر این، مشخص شد نشانگرهای SCoT قابلیت بالایی در تفکیک نمونه‌ها بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها دارند. همچنین Etminan et al. (2019) با استفاده از نشانگرهای CBDP ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی موجود در مجموعه‌ای از گونه‌های خویشاوندی گندم را مورد بررسی قرار دادند و سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون هر یک از گونه‌های آزیلوپس گزارش کردند.

به‌منظور نشان دادن کارایی نشانگرهای SCoT در مقایسه با دیگر نشانگرها در تجزیه تنوع ژنتیکی، Hamidi et al. (2014) مطالعه‌ای را بر روی ۴۰ رقم بومی گندم با استفاده از نشانگرهای ISSR، CDDP و SCoT انجام دادند. نتایج حاصل از این تحقیق

واکنش شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۵۰ ثانیه در دمای بهینه‌سازی شده برای آغازگر استفاده شده و توسعه آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و توسعه نهایی آغازگر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

گرفت. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های مختلف از ۱۵ آغازگر SCoT استفاده شد (جدول ۲). پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده، اجزای واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (2x)، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر آغازگر (غلظت ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه و کلیه واکنش‌های تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Biorad-T100) انجام شد. پروفایل دمایی هر

جدول ۱- مشخصات توده‌های وحشی گندم متعلق به گونه‌های *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa*

| شماره | توده | محل جمع‌آوری | شماره | توده | محل جمع‌آوری |
|-------|-------------------|----------------|-------|-----------------------|----------------|
| ۱ | <i>Ae. crassa</i> | خراسان | ۳۱ | <i>Ae. cylindrica</i> | اصفهان |
| ۲ | <i>Ae. crassa</i> | لرستان | ۳۲ | <i>Ae. cylindrica</i> | اصفهان |
| ۳ | <i>Ae. crassa</i> | هرمزگان | ۳۳ | <i>Ae. cylindrica</i> | اصفهان |
| ۴ | <i>Ae. crassa</i> | فارس | ۳۴ | <i>Ae. cylindrica</i> | گلستان |
| ۵ | <i>Ae. crassa</i> | فارس | ۳۵ | <i>Ae. cylindrica</i> | گلستان |
| ۶ | <i>Ae. crassa</i> | زنجان | ۳۶ | <i>Ae. cylindrica</i> | خراسان |
| ۷ | <i>Ae. crassa</i> | زنجان | ۳۷ | <i>Ae. cylindrica</i> | خراسان |
| ۸ | <i>Ae. crassa</i> | زنجان | ۳۸ | <i>Ae. cylindrica</i> | خراسان |
| ۹ | <i>Ae. crassa</i> | زنجان | ۳۹ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان غربی |
| ۱۰ | <i>Ae. crassa</i> | همدان | ۴۰ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان غربی |
| ۱۱ | <i>Ae. crassa</i> | همدان | ۴۱ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان غربی |
| ۱۲ | <i>Ae. crassa</i> | همدان | ۴۲ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان غربی |
| ۱۳ | <i>Ae. crassa</i> | مرکزی | ۴۳ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان شرقی |
| ۱۴ | <i>Ae. crassa</i> | مرکزی | ۴۴ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان شرقی |
| ۱۵ | <i>Ae. crassa</i> | مرکزی | ۴۵ | <i>Ae. cylindrica</i> | آذربایجان شرقی |
| ۱۶ | <i>Ae. crassa</i> | کرمانشاه | ۴۶ | <i>Ae. cylindrica</i> | زنجان |
| ۱۷ | <i>Ae. crassa</i> | کرمانشاه | ۴۷ | <i>Ae. cylindrica</i> | زنجان |
| ۱۸ | <i>Ae. crassa</i> | کرمانشاه | ۴۸ | <i>Ae. cylindrica</i> | زنجان |
| ۱۹ | <i>Ae. crassa</i> | فارس | ۴۹ | <i>Ae. cylindrica</i> | کردستان |
| ۲۰ | <i>Ae. crassa</i> | فارس | ۵۰ | <i>Ae. cylindrica</i> | کردستان |
| ۲۱ | <i>Ae. crassa</i> | ایلام | ۵۱ | <i>Ae. cylindrica</i> | همدان |
| ۲۲ | <i>Ae. crassa</i> | ایلام | ۵۲ | <i>Ae. cylindrica</i> | همدان |
| ۲۳ | <i>Ae. crassa</i> | ایلام | ۵۳ | <i>Ae. cylindrica</i> | همدان |
| ۲۴ | <i>Ae. crassa</i> | ایلام | ۵۴ | <i>Ae. cylindrica</i> | تهران |
| ۲۵ | <i>Ae. crassa</i> | ایلام | ۵۵ | <i>Ae. cylindrica</i> | تهران |
| ۲۶ | <i>Ae. crassa</i> | آذربایجان غربی | ۵۶ | <i>Ae. cylindrica</i> | تهران |
| ۲۷ | <i>Ae. crassa</i> | آذربایجان غربی | ۵۷ | <i>Ae. cylindrica</i> | کرمانشاه |
| ۲۸ | <i>Ae. crassa</i> | آذربایجان غربی | ۵۸ | <i>Ae. cylindrica</i> | کرمانشاه |
| ۲۹ | <i>Ae. crassa</i> | آذربایجان غربی | ۵۹ | <i>Ae. cylindrica</i> | کرمانشاه |
| ۳۰ | <i>Ae. crassa</i> | آذربایجان غربی | ۶۰ | <i>Ae. cylindrica</i> | کرمانشاه |

جدول ۲- توالی آغازگرهای SCoT استفاده شده در بررسی حاضر به همراه اطلاعات مربوط به شاخص‌های تعیین کننده کارایی نشانگر

| شماره | آغازگر | توالی | دمای اتصال | TAF | NPF | PIC | Rp | MI |
|---------|---------|--------------------|------------|-------|-------|------|-------|------|
| ۱ | SCoT-1 | CAACAATGGCTACCACCA | ۵۹ | ۱۰ | ۹ | ۰/۳۰ | ۱۵/۰۷ | ۲/۷۰ |
| ۲ | SCoT-2 | CAACAATGGCTACCACC | ۶۰ | ۱۳ | ۱۱ | ۰/۳۳ | ۱۸/۸۳ | ۳/۶۱ |
| ۳ | SCoT-3 | CAACAATGGCTACCACCG | ۶۰ | ۱۴ | ۱۴ | ۰/۳۶ | ۱۷/۷۷ | ۵/۰۵ |
| ۴ | SCoT-6 | CAACAATGGCTACCACGC | ۶۰ | ۱۴ | ۱۳ | ۰/۳۲ | ۲۰/۸۰ | ۴/۲۰ |
| ۵ | SCoT-7 | CAACAATGGCTACCACGG | ۵۸/۵ | ۱۲ | ۱۲ | ۰/۳۰ | ۱۷/۷۷ | ۳/۵۸ |
| ۶ | SCoT-9 | CAACAATGGCTACCAGCA | ۵۴ | ۱۱ | ۱۱ | ۰/۲۵ | ۱۴/۱۰ | ۲/۷۶ |
| ۷ | SCoT-10 | CAACAATGGCTACCAGCC | ۴۹ | ۶ | ۵ | ۰/۲۹ | ۸/۹۰ | ۱/۴۳ |
| ۸ | SCoT-12 | ACGACATGGCGACCAACG | ۵۹ | ۱۲ | ۱۱ | ۰/۲۹ | ۱۶/۵۳ | ۳/۱۸ |
| ۹ | SCoT-13 | ACGACATGGCGACCATCG | ۵۸ | ۱۲ | ۱۱ | ۰/۲۶ | ۱۸/۵۳ | ۲/۸۱ |
| ۱۰ | SCoT-14 | ACGACATGGCGACCACGC | ۵۸ | ۱۲ | ۹ | ۰/۲۶ | ۱۷/۵۰ | ۲/۳۳ |
| ۱۱ | SCoT-16 | ACCATGGCTACCACCGAC | ۵۸ | ۱۲ | ۱۱ | ۰/۲۸ | ۱۷/۴۷ | ۳/۰۷ |
| ۱۲ | SCoT-17 | ACCATGGCTACCACCGAG | ۵۶ | ۸ | ۶ | ۰/۳۷ | ۱۰/۲۳ | ۲/۱۹ |
| ۱۳ | SCoT-18 | ACCATGGCTACCACCGCC | ۶۴ | ۱۱ | ۱۱ | ۰/۳۷ | ۱۵/۶۰ | ۴/۰۵ |
| ۱۴ | SCoT-25 | ACCATGGCTACCACCGGG | ۵۹ | ۱۱ | ۱۱ | ۰/۳۵ | ۱۳/۸۳ | ۳/۸۷ |
| ۱۵ | SCoT-31 | CCATGGCTACCACCGCT | ۵۹ | ۱۳ | ۱۱ | ۰/۲۵ | ۲۱/۱۷ | ۲/۸۰ |
| میانگین | | | | ۱۱/۴۰ | ۱۰/۴۰ | ۰/۳۰ | ۱۶/۲۷ | ۳/۱۸ |

TAF, NPF, PIC, Rp و MI به ترتیب نشان دهنده تعداد کل قطعات تکثیر شده، تعداد قطعات چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکل، قدرت تمایز و شاخص نشانگر

گرفت. کلیه تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای GenAIEx ver. 6.5 و MEGA ver. 5.1 انجام شدند.

نتایج و بحث

از مجموع ۱۵ آغازگر SCoT استفاده شده، کلیه آغازگرها دارای تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی بودند و خلاصه‌ای از نتایج حاصل از تکثیر نشانگرها در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس آغازگرهای استفاده شده در کل ۱۷۱ قطعه تکثیر یافت که از بین آن‌ها ۱۵۶ قطعه (۹۱/۲۲ درصد) چندشکل بودند. تعداد کل قطعات تکثیری (TAF) از شش (مربوط به آغازگر SCoT-10) تا ۱۴ قطعه (مربوط به آغازگر SCoT-3 و SCoT-6) با میانگین ۱۱/۴۰ قطعه متغیر بود. تعداد قطعات تکثیر شده چندشکل نیز دارای دامنه تغییرات ۱۴ - ۵ با میانگین ۱۰/۴۰ بود و کمترین و بیشترین تعداد قطعات چندشکل مربوط به آغازگرهای SCoT-10 و SCoT-3 بود. به منظور بررسی میزان چندشکلی آغازگرهای مورد استفاده از پارامترهای قدرت تفکیک یا تمایز (Rp)، شاخص نشانگری (MI) و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) استفاده شد. متوسط شاخص PIC ۰/۳۰ برآورد شد و آغازگر SCoT-10 با مقدار ۰/۲۵ و آغازگرهای SCoT-17 و SCoT-18 با مقادیر

پس از اجرای واکنش‌های PCR، کلیه قطعات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و با استفاده از Safeview رنگ‌آمیزی صورت گرفت. سپس الگوهای باندها به دست آمده به داده‌های صفر (عدم قطعه تکثیر شده) و یک (قطعه تکثیر شده) تبدیل و ماتریس داده‌های ژنوتیپی تشکیل داده شد. به منظور بررسی کارایی آغازگرهای استفاده شده، برخی از شاخص‌های تعیین کننده کارایی نشانگر شامل تعداد قطعات تکثیر شده (NPF)، تعداد قطعات چندشکل (NPF)، اطلاعات چندشکلی (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و قدرت تمایز (Rp) محاسبه شد. تجزیه واریانس مولکولی با هدف تعیین سهم واریانس ژنتیکی بین و درون گونه‌ها انجام شد. علاوه بر این، جهت مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از گونه‌های *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* برخی از شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل شاخص شانون (I)، شاخص تنوع ژنی نی (H)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) و درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل (PPL) برآورد شد. به منظور گروه‌بندی توده‌های مورد ارزیابی نیز تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد صورت

Aboughadareh et al. نشانگرهای SCoT نسبت به CDBP تعداد قطعات تکثیری بیشتری تولید کردند. علاوه بر این، این محققان اظهار داشتند متوسط کلیه شاخص‌های تعیین کننده سودمندی در نشانگرهای SCoT نسبت به CDBP بیشتر بود. با این وجود، Pour-Aboughadareh et al. (2022) در بررسی تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای متشکل از ۱۰۰ توده وحشی گندم با استفاده از دو سیستم نشانگری SCoT و CDBP نشان دادند متوسط مقادیر شاخص‌های تعیین کننده سودمندی نشانگرها برای آغازگرهای CDBP بیشتر از SCoT بود که در این رابطه با نتایج به دست آمده از این پژوهش مطابقت نداشت.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بر اساس داده‌های به دست آمده از آغازگرهای SCoT برای دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود میزان واریانس درون گونه‌ای برآورد شده (۷۹ درصد) بیشتر از واریانس بین گونه‌ای (۲۱ درصد) بود. بررسی نتایج به دست آمده از شاخص‌های تنوع ژنتیکی به تفکیک هر گونه نشان داد تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) با میانگین ۱/۸۲ بین ۱/۸۰ و ۱/۸۳ آلل متغیر بود و دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* دارای مقادیر یکسانی از نظر این شاخص بودند. از نظر تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) گونه *Ae. crassa* نسبت به *Ae. cylindrica* دارای مقدار بالاتری بود (به ترتیب ۱/۶۰ و ۱/۵۳) و متوسط این شاخص ۱/۵۶ برآورد شد. متوسط شاخص‌های شانون (I) و تنوع ژنی نی (H) نیز به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۳۲ برآورد شد و از نظر هر دو شاخص بیشترین مقدار مربوط به گونه *Ae. crassa* بود.

۰/۳۷ به ترتیب دارای کمترین و بیشترین مقادیر PIC بودند. شاخص Rp نیز دارای دامنه تغییرات گسترده‌ای (۲۱/۱۷ - ۸/۹۰) بود و آغازگرهای SCoT-10 و SCoT-31 به ترتیب از کمترین و بیشترین قدرت تمایز برخوردار بودند. روند تغییرات شاخص MI در آغازگرهای استفاده شده متنوع بود و این شاخص با میانگین ۳/۱۸ دارای دامنه تغییراتی بین ۱/۴۳ (SCoT-10) و ۵/۰۵ (SCoT-3) بود.

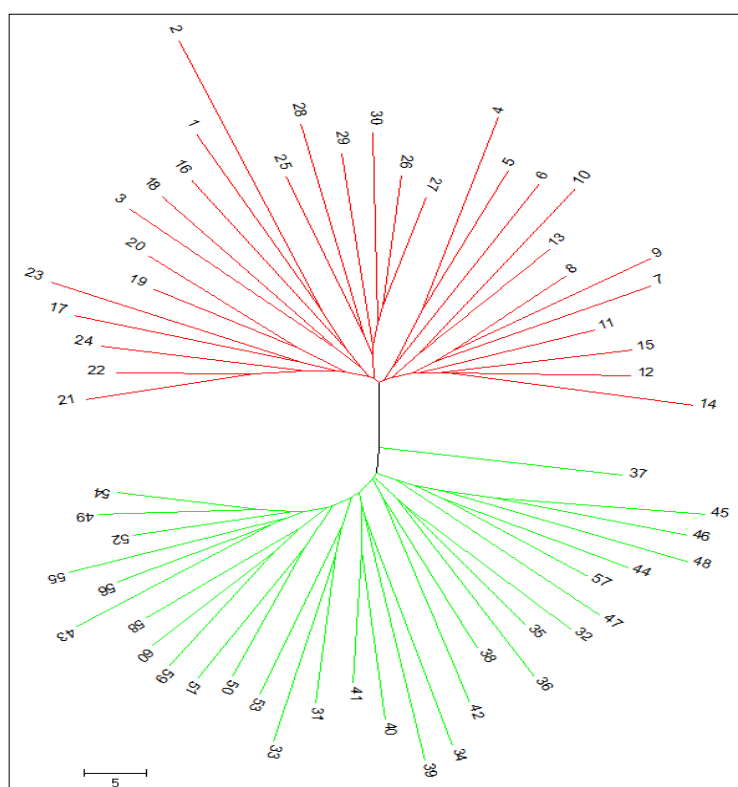
در بین شاخص‌های تعیین کننده کارایی نشانگرهای مولکولی، PIC و MI اهمیت فراوانی دارند. پیش از این، Milbourne et al. (1997) گزارش کردند مقادیر بالای شاخص‌های Rp و MI نشان دهنده تکثیر تعداد بیشتری قطعات چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم است. علاوه بر این، شاخص Rp نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تعیین کننده سودمندی نشانگرهای مولکولی بیانگر توانایی یک آغازگر در تمایز افراد مورد بررسی می‌باشد. این شاخص نیز با تعداد آلل‌های مشاهده در الگوی بانندی رابطه مستقیمی دارد (Prevost and Wilkinson, 1999). همان‌گونه که در این پژوهش مشخص شد آغازگرهای SCoT کارایی مناسبی جهت تشخیص چندشکلی موجود در نمونه‌های مورد ارزیابی دارند. پیش از این در برخی از مطالعات انجام شده با استفاده از انواعی از نشانگرهای مولکولی به قابلیت بالای آغازگرهای SCoT در تشخیص چندشکلی موجود در جمعیت‌های گیاهی اشاره شده است. به عنوان نمونه، در مطالعه انجام شده توسط Qaderi et al. (2019) نشانگرهای SCoT نسبت به ISSR از کارایی بالاتری در ارائه چندشکلی نمونه‌های خشخاش وحشی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران نسبت به نشانگرهای ISSR داشتند. همچنین در مطالعه Pour-

جدول ۳- مقادیر برآورده شده پارامترهای ژنتیکی در دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* بر اساس آغازگرهای SCoT

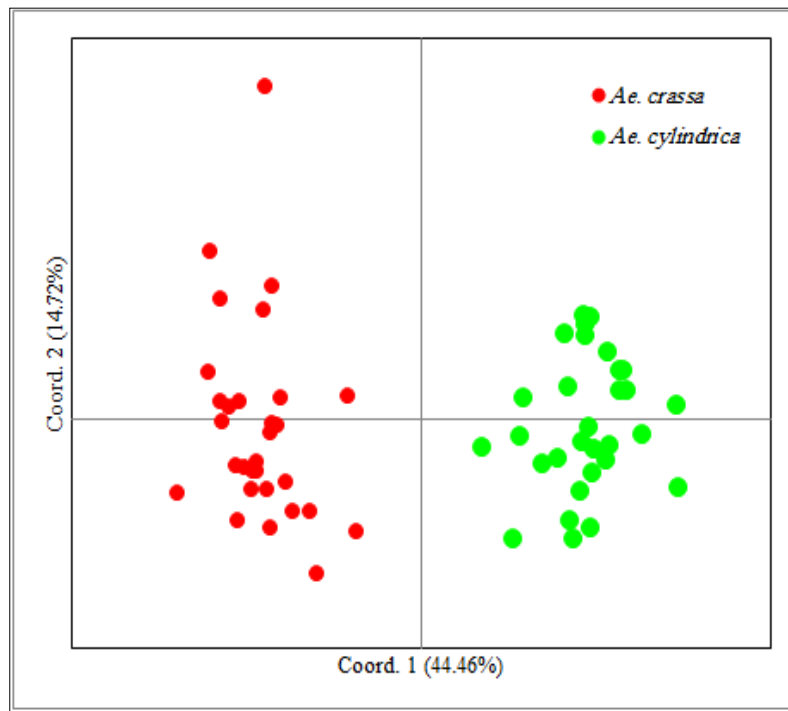
| <i>Ae. crassa</i> (n = 30) | <i>Ae. cylindrica</i> (n = 30) | پارامتر ژنتیکی |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| ۱/۸۳ ± ۰/۰۳ | ۱/۸۰ ± ۰/۰۳ | تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) |
| ۱/۶۰ ± ۰/۰۲ | ۱/۵۳ ± ۰/۰۲ | تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) |
| ۰/۴۹ ± ۰/۰۲ | ۰/۴۵ ± ۰/۰۲ | شاخص اطلاعات شانون (I) |
| ۰/۳۴ ± ۰/۰۱ | ۰/۳۱ ± ۰/۰۱ | شاخص تنوع ژنی نی (H) |
| ۸۳/۶۳ | ۸۰/۱۲ | درصد چندشکلی مکان‌های ژنی (PPL) |
| | ٪ ۲۱ | واریانس ژنتیکی بین گونه‌ها |
| | ٪ ۷۹ | واریانس ژنتیکی درون گونه‌ها |

نشانگرهای مولکولی می‌تواند به تعداد آغازگرهای استفاده شده و حتی تعداد نمونه‌های مورد بررسی در هر گونه باشد. به‌منظور توصیف دقیق‌تر روابط بین توده‌های *Ae.* و *Ae. crassa* با *cylandrica* ارزیابی شده، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس تشابه ژنتیکی جاکارد و به روش Neighbor-joining انجام شد. با توجه به دندروگرام به‌دست آمده مشخص شد کلیه توده‌ها در دو گروه اصلی (GI و GII) گروه‌بندی شدند و روند گروه‌بندی بر اساس ساختار ژنومی گونه‌ها بود. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تمامی توده‌های مربوط گونه *Ae. crassa* در گروه نخست و توده‌های مربوط به گونه *Ae. cylandrica* در گروه دوم قرار گرفتند.

درصد جایگاه‌های ژنی چندشکل نیز دارای میانگین ۸۱/۸۷ درصد بود و بیشترین مقدار مربوط به جمعیت‌های *Ae. crassa* بود. از این رو با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد سطح تنوع ژنتیکی در گونه *Ae. crassa* نسبت به *Ae. cylandrica* بیشتر بود. مطابق با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش Etminan et al. (2019) نیز سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های *Ae. crassa* نسبت به *Ae. cylandrica* با استفاده از نشانگرهای CBDP گزارش کردند. با این حال، نتایج مطالعه Ghobadi et al. (2021) و Pour-Aboughadareh et al. (2022) نشان داد سطح تنوع ژنتیکی در گونه *Ae. cylandrica* نسبت به *Ae. crassa* بیشتر بود. به‌طور کلی عدم تطابق بالا بین نتایج به‌دست آمده از این مطالعه با سایر مطالعات صورت گرفته با استفاده از نشانگرهای SCoT و دیگر



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای توده‌های ارزیابی شده *Ae. crassa* و *Ae. cylandrica* با استفاده از نشانگرهای SCoT. اعداد مشاهده شده در دندروگرام بیانگر شماره توده‌های موجود در جدول ۱ می‌باشند.



شکل ۲- بای پلات ترسیم شده بر اساس دو مؤلفه نخست حاصل از تجزیه PCoA با استفاده از داده‌های به دست آمده از نشانگرهای SCoT

شده توسط Etmnan et al. (2016) نیز گزارش شده است که نشانگرهای SCoT به دلیل ماهیت آن‌ها که مبتنی بر جایگاه هدف هستند به خوبی توانستند که گونه‌های مختلف مریم گلی را از یکدیگر متمایز کنند. علاوه بر این، در مطالعه انجام شده توسط Pour-Aboughadareh et al. (2017) مشخص شد نشانگرهای SCoT به خوبی قادر به تمایز گونه‌های مختلف جنس تریتیوم از یکدیگر بودند و این محققان اظهار داشتند این نشانگرها می‌توانند در شناسایی روابط فیلوژنتیکی در گونه‌های ژرم پلاسمی ایفای نقش کنند.

نتیجه‌گیری کلی

ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی موجود در ذخایر ژنتیکی یکی از گام‌های اولیه در برنامه‌های به‌نژادی گندم محسوب می‌شود و اطلاع از سطح تنوع موجود در ژرم پلاسم‌ها و خزانه‌های ژنتیکی می‌تواند جهت تشخیص تکرارها در بانک‌های ژنی، غنی‌سازی ذخایر ژنتیکی از طریق انتقال ژن‌های مطلوب و شناسایی ژن‌های مناسب به کار رود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در ۶۰ توده وحشی متعلق به دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* با

همچنین نتایج به دست آمده از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز تأیید کننده گروه‌بندی به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای بود. در تجزیه PCoA دو مؤلفه نخست به ترتیب با ۴۴/۴۶ و ۱۴/۷۲ درصد مجموعاً ۵۹/۱۸ درصد از کل تغییرات ژنتیکی موجود در توده‌های مورد بررسی را توجیه نمودند. بر اساس بای پلات ترسیم شده مبتنی بر دو مؤلفه نخست تمامی توده‌ها در دو گروه کاملاً مجزا از یکدیگر متمایز شدند (شکل ۲). در واقع این نتایج به خوبی بیانگر قابلیت بالای نشانگرهای SCoT در تفکیک توده‌های بررسی شده بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها می‌باشد که این نتیجه خود دلالت بر پتانسیل این نشانگرها در مطالعات فیلوژنتیکی دارد. پیش از این در بسیاری از مطالعات به قابلیت نشانگرهای SCoT در تفکیک گونه‌ها و حتی توده‌های مربوط به یک گونه اشاره شده است. در مطالعه (Qaderi et al. 2019) مشخص شد نشانگرهای SCoT توانایی بالاتری نسبت به نشانگرهای ISSR در تفکیک توده‌های خشک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران دارند به طوری که در الگوی گروه‌بندی به دست آمده با استفاده از نشانگرهای SCoT توده‌های مربوط به نواحی مختلف به خوبی از یکدیگر متمایز شدند. در بررسی انجام

گونه می‌باشد. علاوه بر این، با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) مشخص شد نشانگرهای SCoT دارای قابلیت بالایی در نشان دادن چندشکلی موجود در گونه‌های ژرم‌پلاسمی بوده و می‌توانند به عنوان ابزار مولکولی سودمندی در مطالعات ژنتیکی و بررسی روابط فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند.

استفاده از ۱۵ آغازگر SCoT مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در مجموعه مورد ارزیابی بود. با توجه به مقادیر پارامترهای ژنتیکی برآورد شده مشخص شد توده‌های مربوط به *Ae. crassa* نسبت به *Ae. cylindrica* دارای میزان تنوع بالاتری بودند که این نتیجه بیانگر توجه هرچه بیشتر به این گونه و انجام مطالعات بیشتر در جهت شناسایی ژن‌ها و یا آلل‌های مفید در جمعیت مربوط به این

منابع

Anderson JR, Lubberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8:554-560.

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

Arzani A, Ashraf M (2016b) Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 35:146-189.

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 Report* 27:86-93.

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

Etmnan 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 -An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 153:398-405.

Etmnan A, Pour-Aboughadareh A, Mohammadi R, Ahmadi-Rad A, Noori A, Mahdavian Z, Moradi Z (2016) Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 30:1075-1081.

Ghobadi G, Etmnan A, Mehrabi AM, Shooshtari L (2021) Molecular diversity analysis in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) and two *Aegilops* species (*Aegilops crassa* and *Aegilops cylindrica*) using CBDDP and SCoT markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19:1-11.

Gupta PK, Rustgi S, Mir PR (2008) Array-based high throughput DNA markers for crop improvement. *Heredity* 101:5-18.

Hajibarat Z, Saidi A, Hajibarat Z, Talebi R (2015) Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) and Conserved DNA-Derived Polymorphism

(CDDP). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 21:365-373.

Hamidi H, Talebi R, Keshavarz F (2014) Comparative efficiency of functional genebased markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA derived Polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications* 42:558-567.

Kimber G, Feldman M (1987) Wild wheat: An introduction. Special Report No. 353, University of Missouri, Columbia.

Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding* 3:127-136.

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, Etmnan 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* 71:82-95.

Mousavifard SS, Saeidi H, Rahiminejad MR, Shamsadini M (2015) Molecular analysis of diversity of diploid *Triticum* species in Iran using ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 62:387-394.

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.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etmnan A, Moghaddam M (2017) Assessment of genetic diversity among Iranian *Triticum* germplasm using agro-morphological traits and start codon targeted (SCoT) markers. *Cereal Research Communications* 45:574-586.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etmnan 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 Biosystems -An*

International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology 152:694-703.

Pour-Aboughadareh A, Etminan A, Shoostari L, Maleki-Tabrizi N (2019) Comparative Assessment of SCoT and CBDP Markers for Investigation of Genetic Diversity Existing in Different *Aegilops* Species. *Agricultural Biotechnology Journal* 11:153-174. (In Persian)

Pour-Aboughadareh A, Kianersi F, Poczai P, Moradkhani H (2021) Potential of wild relatives of wheat: ideal genetic resources for future breeding programs. *Agronomy* 11:1656.

Pour-Aboughadareh A, Poczai P, Etminan A, Jadidi O, Kianersi F, Shoostari L (2022) An analysis of genetic variability and population structure in wheat germplasm using microsatellite and gene-based markers. *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.

Qaderi A, Omidi M, Pour-Aboughadareh A, Poczai P, Shaghghi S, Mehrafarin A, Nohooji M, Etminan A (2019) Molecular diversity and phytochemical variability in the

Iranian poppy (*Papaver bracteatum* Lindl.): A baseline for conservation and utilization in future breeding programmes. *Industrial Crop and Products* 130:237-247.

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

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.

Varshney RK, Mahender T, Aggrawal RK, Borner A (2007) Genomics-assisted crop improvement: Genomics Approaches and Platforms (Vol: I). Springer, Chapter 1.

West MAL, vanLeeuwen H, Kozil A, Kliebenstein DJ, Doerge RW, Clair DA, Michelmore RW (2006) Highdensity haplotyping with microarray-based expression and single feature polymorphism markers in *Arabidopsis*. *Genome Research* 16:787-795.