

انگشت‌نگاری گونه‌های جنس آژیلوپس (*Ageilops*) با نشانگرهای مبتنی بر ژن‌های هدفمند و نواحی حفاظت شده CoRAP

صدیقه فابریکی اورنگ^{۱*}، حمید کریمی^۲، جعفر احمدی^۳ و علی اشرف مهرابی^۴

*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

پست الکترونیک: ourang@eng.ikiu.ac.ir

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

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

۴- دانشیار، بخش تحقیقات زیست فناوری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۰

چکیده

گونه‌های جنس آژیلوپس (*Ageilops*) از گرامینه‌های مرتعی و یکی از مهمترین اجداد گندم و منبع غنی از ژن‌های تحمل به تنش-هاست. بدین منظور انگشت‌نگاری روابط ژنتیکی توده‌های متعلق به هشت گونه *Ageilops* با استفاده از نشانگرهای مولکولی CoRAP مبتنی بر ژن‌های هدفمند مورد مطالعه قرار گرفت. در طراحی آغازگرهای ثابت از شش ژن عامل تحمل تنش‌های غیرزیستی *CAT*، *MnSoD*، *SoS1*، *miR398*، *miR160b* و *miR169gR* استفاده شد. کمترین و بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی به ترتیب مربوط به آغازگرهای CoRAP2 و CoRAP10 با مقادیر ۰/۹۲ و ۰/۹۶ بود. شاخص نشانگری در بین نشانگرهای مورد بررسی از ۶/۸۹ در آغازگر CoRAP7 تا ۱۳/۴۹ در آغازگر CoRAP9 متغیر بود. بین گونه‌ها جریان زنی (Nm) پایین و بعکس میزان تمایز (Gst) بالایی مشاهده شد. همچنین مقدار شاخص Fst برابر با ۰/۴۵ نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز شده‌اند. با توجه به بالا بودن شاخص‌های تعداد آلل مؤثر و تنوع ژنتیکی Nei، دو گونه *Ae. caudata* و *Ae. cylantrica* تنوع درون گونه‌ای بالایی در بین گونه‌های مورد بررسی نشان دادند. بیشترین تشابه بین دو گونه *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* و بین دو گونه *Ae. neglecta* و *Ae. cylantrica* مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای به‌طور مناسبی گونه‌ها را در گروه‌های مجزا تفکیک و تجزیه به مختصات اصلی نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد. با تجزیه ساختار جمعیت، نحوه جریان زنی و اختلاط ژنتیکی بین گونه‌ها مشخص شد که در تطابق با نتایج تجزیه خوشه‌ای و نمودار دویعدی PCoA بود.

واژه‌های کلیدی: گرامینه‌های مرتعی، تنوع ژنتیکی، گندم وحشی، نشانگر هدفمند، ژن‌های مقاومت.

مقدمه

اینکه بازدهی برنامه‌های اصلاحی را کاهش می‌دهد، باعث ایجاد یکنواختی ژنتیکی در مزارع و آسیب‌پذیری شدید محصولات کشاورزی در برابر آفات، بیماری‌ها و تنش‌های

تنوع ژنتیکی بسیاری از محصولات از جمله گندم در طول دهه‌های گذشته کاهش یافته است. کاهش تنوع علاوه بر

هستند. نشانگرهای مبتنی بر RNA^۱ حاصل تکثیر در نواحی رونویسی شده ژنوم بوده که بیشتر عملکردی هستند و از نواحی رونویسی شده یا بیان شده ژنوم مشتق شده‌اند. آغازگرهای آنها به‌طور مستقیم از RNA، یا با استفاده از cDNA و یا توالی‌های مبتنی بر نواحی EST^۲ طراحی می‌شوند (Zhu et al., 2008). همچنین RNAهای کوچک غیر کدکننده درون هسته‌ای با طول ۲۴-۲۰ نوکلئوتید در ژنوم‌های یوکاریوتی وجود دارند که نقش‌های مهم تنظیم ژن‌ها را بازی می‌کنند و منبع عالی برای توسعه نشانگرهای مولکولی و طراحی آغازگرها برای واکنش-های PCR و انگشت‌نگاری را فراهم می‌کنند. نشانگرهای مبتنی بر چندشکلی حاصل از RNA کوچک داخلی^۳ می‌تواند برای نقشه‌یابی ژنوم و ژنوتایپینگ استفاده شود (Zhu et al., 2008). همچنین نشانگرهای cDNA-AFLP، cDNA-RFLP و نشانگرهای EST-SSR نیز به عنوان نشانگرهای مبتنی بر RNA می‌توانند برای انگشت‌نگاری استفاده شوند (Kantety et al., 2013; Poczail et al., 2002). نشانگرهای هدفمند شده برای انگشت‌نگاری^۴ (TFM) از نواحی هدفمند ژنومی مانند پروموتور ژن‌ها و کدون شروع و با توجه به ویژگی‌های مشترک ژنوم گیاهی طراحی و الگوهای بانندی از جایگاه‌های ناشناس اما هدفمند بدون در نظر گرفتن عملکرد هر ژن تولید می‌شوند. البته نشانگرهای TFM در هریک از ویژگی‌های مهم مانند فراوانی ژنومی، شناسایی سطح چندشکلی، قابلیت تکثیر و هزینه با هم متفاوت هستند (Finnegan et al., 1989). نشانگرهای چندشکل تکثیری نواحی حفاظت‌شده^۵ (CoRAP) به‌عنوان نشانگرهای هدفمند شده برای انگشت‌نگاری نیز مبتنی بر استفاده از یک آغازگر ثابت هدفمند (با استفاده از cDNA و یا توالی‌های مبتنی بر نواحی EST یا RNAهای کوچک غیر کدکننده درون هسته‌ای) و یک آغازگر اختیاری است.

محیطی نیز می‌شود، از این‌رو محققان در پی منابع ژنتیکی جدیدی هستند تا بر این مشکلات غلبه کنند (Metakovsky and Baboev, 1992). امروزه بیشتر گونه‌های وحشی به فراوانی در طبیعت و مراتع وجود دارند، ولی امکان استفاده از این گیاهان به علت تخریب اکوسیستم‌ها به شدت محدود شده است. البته بسیاری از رویشگاه‌های طبیعی گیاهان در اثر پیدایش کشاورزی نوین و توسعه مناطق شهری و صنعتی تخریب و یا از بین رفته‌اند، به‌طوری‌که این رویشگاه‌ها از بهره‌برداری‌های بیش از حد و فرسایش خاک آسیب‌های جدی و غیرقابل برگشت می‌بینند. خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی یک منبع مفید بالقوه و باارزش هستند که مورد توجه به‌زادگران بوده و حتی برخی معتقدند که موفقیت‌های آینده اصلاح نباتات در استفاده از منابع ژنتیکی وحشی نهفته است (Asgari-Zakaria, 2016). آگاهی از تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌ها معیاری مناسب برای استفاده از آنها در شناسایی و انتقال ژن‌ها در بهبود گیاهان زراعی می‌باشد (Schneider et al., 2008). جنس *Aegilops* از مهمترین گرامینه‌های مرتعی خویشاوندان گندم و دارای مناسب‌ترین ژن‌های مقاوم به تنش‌های زنده و غیر زنده است (Saeidi et al., 2006). جنس *Aegilops* بخش عمده‌ای از خزانه ژنی گندم را تشکیل می‌دهد (Kashkush et al., 2002). مانند *Ae. tauschii* که بخشنده ژنوم D به گندم نان است و به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان منبع ژن‌های مقاومت در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفته است (Gororo et al., 2002). ژنوم جنس *Aegilops* از نظر سطح پلوئیدی شامل دیپلوئیدها ($2n=2x=14$) با ۱۱ گونه مانند گونه‌های *Ae. caudata*، *Ae. tauschii*، *Ae. speltoides*، *Ae. umbellulata* و پلی‌پلوئیدها با ۱۲ گونه است که خود به دو قسمت تتراپلوئید ($2n=4x=28$) (*Ae. neglecta*، *Ae. crassa*، *Ae. triuncialis*) و هگزاپلوئید ($2n=6x=42$) (*Ae. crassa*، *Ae. neglecta*) تقسیم می‌شود.

پاسخ‌های زیستی سلول‌های گیاهی به بعضی عوامل تنش-زا، پدیده مهمی هستند، زیرا این فرایندها وابسته به بیان ژن

۱- RNA-based markers; RBMs

۲- Expressed sequence tag; EST

۳- Inter small RNA polymorphism; iSNAP

۴- Targeted fingerprinting markers; TFMs

۵- Conserved region amplification polymorphism; CoRAP

A بود.

در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ جمعیت از گونه *Aegilops crassa* با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR، روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی نتوانست جمعیت‌ها را به‌طور کامل از هم تفکیک کند و عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای این جمعیت‌ها بود (Khoramifard et al., 2017). الگوی بیان miRNA159، miRNA160 و miRNA398 به همراه ژن هدف (CSD) miRNA398 در شش گونه متعلق به جنس‌های تریتیکوم و آزیلوپس در شرایط تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که سه گونه *T. urartu*، *T. durum* و *Ae. tauschii* به دلیل برتری از لحاظ miRNA های عامل ایجاد تحمل می‌توانند انتخاب مناسبی برای غنی‌سازی ژرم‌پلاسما گندم نان و اصلاح برای تحمل تنش خشکی باشند (Shahidi et al., 2019). در تحقیقی دیگر، از نشانگرهای CoRAP برای انگشت‌نگاری ۱۱ گونه از جنس *salvia* جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران استفاده شد. نتایج نشان داد که این نشانگرها توانستند به‌طور کامل گونه‌ها را از یکدیگر تفکیک کنند. همچنین تجزیه واریانس مولکولی تنوع بین گونه‌ای بالایی را نشان داد که بیانگر قدرت بالای تفکیک این نشانگرها در بین گونه‌های گیاهی بود (Fabriki-Ourang et al., 2018).

هدف از اجرای این تحقیق، انگشت‌نگاری روابط خویشاوندی و نیز بررسی تنوع و اختلاط ژنتیکی بین گونه‌های *Ageilops* با استفاده از نشانگرهای مولکولی CoRAP مبتنی بر ژن‌های هدفمند بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی

در این تحقیق ۱۱۱ توده وحشی *Ageilops* جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف ایران (تهیه شده از بانک ژن غلات دانشگاه ایلام متشکل از هشت گونه، جدول ۱) مطالعه شد. بذر توده‌های تمام گونه‌ها در گلدان‌های جداگانه کشت و نمونه‌های برگ‌ی در مرحله ۵-۶ برگ‌ی در

طراحی آغازگرهای نشانگر CoRAP نیاز به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم وجود دارد. ساختار آغازگرهای اختیاری در نشانگرهای CoRAP مشابه نشانگرهای SRAP^۱ است، با این تفاوت که در هسته آغازگرهای اختیاری نشانگرهای CoRAP، موتیف CACGC که معمولاً در نواحی اینترونی پیدا شده است وجود دارد؛ البته توالی این هسته بهره‌برداری از توالی‌های اینترون حفاظت شده را در ژنوتیپ‌های گیاهی فراهم می‌کند. مزیت CoRAP نسبت به سایر نشانگرها این است که آغازگرهای ثابت از نواحی EST مشتق شده‌اند و دارای میل اتصال به جایگاه‌های ویژه روی توالی‌های اگزونی هستند. آغازگرهای اختیاری در CoRAP بیشتر میل اتصال به اینترونی را دارند و حذف و اضافه‌ها در این نواحی مطمئناً توزیع‌های مختلفی از محصولات تکثیر شده را تولید خواهد کرد (Poczail et al., 2013).

در مطالعه‌ای که برای بررسی روابط بین یک آلوتتراپلوئید مصنوعی و بین والدین آن شامل *Ae. sharonensis* و *T. monococcum* با استفاده از ۳۷ آغازگر cDNA-AFLP انجام شد، آلوتتراپلوئید اصلاح شده قطعات بانندی کمتری نسبت به والدین خود تولید کرد (Kashkush et al., 2002). در مطالعه‌ای دیگر برای نقشه‌یابی ژنوم گندم از نشانگرهای cDNA-RFLP استفاده شد و نتایج نو ترکیبی بالایی را بر روی کروموزوم 3B گندم نشان داد. همچنین گزارش شد که این نشانگرها در شناسایی ژن‌های بیان شده نو ترکیب روی کروموزوم داخل ژنوم گندم مفید بوده است (Akhunov et al., 2003). در تحقیقی Pan و همکاران (۲۰۰۹) ۱۵ توده گندم اینکورن را با استفاده از ۲۵ آغازگر EST-SSR برای انگشت‌نگاری روابط خویشاوندی مورد بررسی قرار دادند که آغازگرها تنوع بالایی را در بین توده‌های مورد بررسی نشان دادند. همچنین متوسط میزان اطلاعات چندشکلی را ۰/۵۳ گزارش کردند که میزان اطلاعات چندشکلی ریزماهوره‌های ژنوم B بالاتر از ژنوم

۱- Sequence-related amplified polymorphism; SRAP

زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط Master mix (شرکت Amplicon) (حاوی Taq DNA polymerase، dNTPها، MgCl₂، بافر PCR)، یک میکرولیتر آغازگر ثابت (۰/۴ μM)، یک میکرولیتر آغازگر اختیاری (۰/۴ μM)، یک میکرولیتر DNA (۵۰ ng) و ۹/۵ میکرولیتر H₂O در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شدند. پس از تهیه مخلوط واکنش روی یخ و انتقال تیوپ‌ها به دستگاه PCR از برنامه و چرخه دمایی واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۵ دقیقه و بعد ۴۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی با دمای ۹۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۶-۵۳ °C با توجه به دمای اتصال هر آغازگر به مدت ۶۰ ثانیه و بسط رشته در دمای ۷۲ °C به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ °C برای بسط نهایی استفاده گردید. برای بررسی محصول حاصل از PCR از ژل پلی‌اکریل‌آمید و برای رنگ‌آمیزی نقره ژل‌ها از روش Blum (۱۹۸۷) تغییر یافته استفاده شد.

مقادیر ۰/۲ گرم تهیه و برای نگهداری به دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

روش استخراج و تعیین کمیت و کیفیت DNA برای استخراج DNA از بافت برگگی از روش Doyle و Doyle (۱۹۸۷) با دستورالعمل تغییر یافته استفاده شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA با دو روش الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتری با نانودراپ (مدل THERMO;2000C) انجام شد. غلظت DNA هر نمونه سنجش و برحسب ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق‌سازی شد.

آغازگرهای CoRAP و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در این تحقیق از ۱۲ ترکیب آغازگری CoRAP سنتز شده توسط شرکت پیشگام استفاده شد (جدول ۲). آغازگرهای اختیاری مطابق با روش (Poczail et al., 2013) و آغازگرهای ثابت از روی توالی ژن‌های هدف با نرم‌افزارهای Oligo7 و Primer3 طراحی شدند. اجزای واکنش

جدول ۱- مشخصات و محل جمع‌آوری گونه‌های وحشی *Aegilops* مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Characteristics and collection location of *Aegilops* wild species used in this research

نام علمی گونه Species scientific name	استان محل جمع‌آوری Province of collection	ژنوم Genome	تعداد توده Accession No.
<i>Aegilops caudata</i>	Ilam, Lorestan	CC	8
<i>Aegilops crassa</i>	East Azerbaijan, Ilam, Lorestan, Fars, Chaharmahal and Bakhtiari, Kermanshah	DDMM	14
<i>Aegilops cylandrica</i>	Ardabil, Chaharmahal and Bakhtiari, East Azerbaijan, Fars, Gilan, Ilam, Kermanshah, Khuzestan, Kurdistan, Lorestan, Zanjan	DDCC	19
<i>Aegilops neglecta</i>	Ardabil, East Azerbaijan, Fars, Ilam, Kermanshah	UUMM	11
<i>Aegilops speltoides</i>	Ilam, Kermanshah	SS	6
<i>Aegilops tauschii</i>	Ardabil, Gilan, Golestan, Mazandaran, Zanjan	DD	20
<i>Aegilops triuncialis</i>	Ardabil, Chaharmahal and Bakhtiari, East Azerbaijan, Ilam, Kermanshah, Khuzestan, Kurdistan, Lorestan, Zanjan	UUCC	16
<i>Aegilops umbelulata</i>	East Azerbaijan, Fars, Gilan, Ilam, Kermanshah, Khuzestan	UU	17

مقابله با تنش‌های اکسیداتیو نقش اساسی دارد. تحت تنش بیان miR398 کاهش می‌یابد که منجر به افزایش انباشت

خصوصیات ژن‌های استفاده شده برای آغازگرهای ثابت miR398 یکی از میکرو RNAهای تنظیمی است که در

مختصات اصلی^۹ (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار GenALEX V6.50 (Peakall and Smouse 2006) محاسبه گردید. شاخص‌های تمایز بین جمعیت^{۱۰} (GsT)، جریان ژنی^{۱۱} (Nm) و هتروزیگوسیتی کل^{۱۲} (Ht) با استفاده از نرم‌افزار POPGENE 32 محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه دایس و به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام گردید. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 انجام شد.

نتایج

بررسی چندشکلی و کارایی نشانگرهای CoRAP از مجموع ۱۲ آغازگر ترکیبی CoRAP بررسی شده در این تحقیق، تمام ۱۲ آغازگر CoRAP دارای تکثیر مناسب بوده و امتیازدهی شدند که نتایج تجزیه آنها در جدول ۲ و نمونه‌ای از الگوی باندهای آغازگرهای CoRAP در شکل ۱ نشان داده شده است. از کل ۴۲۶ قطعه با طول متفاوت امتیازدهی شده، تعداد ۴۲۲ قطعه چندشکل بودند. میانگین تعداد قطعات تکثیر شده ۳۵/۵ قطعه به ازای هر آغازگر و درصد قطعات چندشکل از ۹۶ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. کمترین درصد چندشکلی باندها (۹۶ درصد) مربوط به آغازگر CoRAP2 بود. کمترین و بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) به ترتیب مربوط به آغازگرهای CoRAP2 و CoRAP10 با مقادیر ۰/۹۲ و ۰/۹۶ با میانگین برابر ۰/۹۵ بود. شاخص نشانگری (MI) در بین نشانگرهای مورد بررسی از ۶/۸۹ در آغازگر CoRAP7 تا ۱۳/۴۹ در آغازگر CoRAP9 با میانگین برابر ۹/۸۵ متغیر بود (جدول ۲).

تجزیه واریانس مولکولی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۳) نشان داد که واریانس بین جمعیت‌ها ۵۴ درصد و بیشتر از

RNAهای CSD1 و CSD2 می‌شود و در نتیجه باعث کاهش انباشت رادیکال‌های سوپراکسید آزاد در سلول‌های گیاهی می‌گردد (Bej and Basak, 2014). این miR160b در گیاهان RNA در مقابله با تنش‌های گرمایی و اشعه UV در گیاهان نقش دارد و در مطالعات زیادی مانند برنج افزایش بیان را در مقابله با این تنش‌ها نشان داد (Bej and Basak, 2014). این miR169gR در مقابله با تنش‌های زیادی از جمله تنش‌های خشکی و شوری نقش دارد و در برخی از گیاهان مانند برنج افزایش بیان نشان داده‌است (Bej and Basak, 2014). این ژن *SoS1* مهم‌ترین نقش را در تحمل به شوری گیاه دارد و کدکننده یک آنتی‌پورتر پروتون/سدیم واقع در غشای پلاسمایی است. *SoS1* به‌عنوان واسطه در خروج یون سدیم و توزیع دوباره این یون در سراسر گیاه نقش دارد (Quintero et al., 2002). ژن‌های *CAT* و *MnSoD* در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، SOD رادیکال سوپراکسید را به H_2O_2 تبدیل می‌کند و پراکسید هیدروژن توسط *CAT* و پراکسیداز حذف و به اکسیژن مولکولی تبدیل می‌شود. *MnSoD* یکی از ایزوفرم‌های SOD است که در این سیستم نقش دارد (Gratao, et al., 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

از محتوای چند شکلی اطلاعات^۱ (PIC) و شاخص نشانگری^۲ (MI) برای بررسی کارایی نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه استفاده شد (Powell et al., 1996). پارامترهای بررسی خویشاوندی تعداد آلل مشاهده شده^۳ (Na)، تعداد آلل مؤثر^۴ (Ne)، شاخص شانون^۵ (I)، تنوع ژنی^۶ (He)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده^۷ (uHe) و همچنین تجزیه واریانس مولکولی^۸ (AMOVA) و تجزیه به

۱- Polymorphism Information Content; PIC

۲- Marker Index; MI

۳- Observed number of alleles; Na

۴- Effective number of alleles; Ne

۵- Shannon's information index; I

۶- Nei's gene diversity; He

۷- Unbiased expected heterozygosity; uHe

۸- Analysis of Molecular Variance; AMOVA

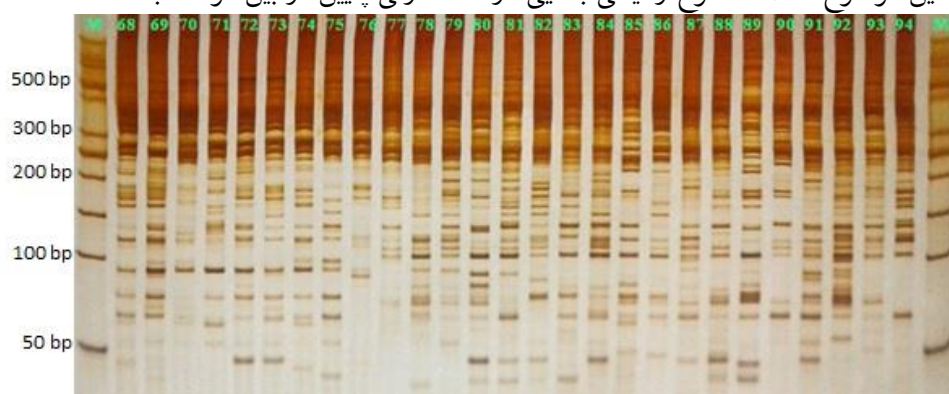
۹- Principal Coordinates Analysis; PCoA

۱۰- Inter-population differentiation; GsT

۱۱- Gene flow; Nm

۱۲- Total Heterozygosity; Ht

واریانس درون جمعیت‌ها بود. این واریانس بالای بین جمعیتی بیانگر این موضوع است که تنوع ژنتیکی بالایی در بین گونه‌ها وجود دارد و شاید این نتیجه تأییدکننده جریان ژنی پایین در بین گونه‌ها باشد.



شکل ۱- الگوی باندی آغازگر ترکیبی A1+Mir169gR در برخی از توده‌های *Ageilops* با استفاده از ژل اکریل‌آمید

Figure 1. Band pattern of A1+Mir169gR combined primer in some *Ageilops* accessions using acrylamide gel

جدول ۲- مشخصات و ترکیب آغازگرهای CoRAP و شاخص‌های محاسبه شده برای آنها

Table 2. Characteristics and composition of CoRAP primers and calculated indices for them

نام آغازگر	ترکیب آغازگر	توالی آغازگر ثابت (5'→3')	توالی آغازگر اختیاری (5'→3')	تعداد	تعداد	درصد	محتوای	شاخص
				کل	باند‌ها	چند	شکلی	
Primer name	Primer composition	Fixed primer sequence	Arbitrary primer sequence	TA	شکل	باند‌ها	اطلاعات	MI
				B	NPB	PPB	PIC	
CoRAP1	A1+Mir398	TATAGCTGTGTTCTCAGGTC	GACTGCGTACGCACGCTG	38	37	97.36	0.95	11.98
CoRAP2	A1+Mir160b	CTCCTGTATGCCACTCATC	GACTGCGTACGCACGCTG	25	25	96	0.92	6.94
CoRAP3	A1+Mir169g	GGCTGCGAAGAAATGAATA	GACTGCGTACGCACGCTG	36	36	100	0.95	9.13
CoRAP4	A1+Sos1.1R	TCATCTTCTCCTACCGCCCTG	GACTGCGTACGCACGCTG	28	28	100	0.94	9.13
CoRAP5	A1+MnSoD.f	CAGAGGGTGCTGTTTACAA	GACTGCGTACGCACGCTG	40	40	100	0.95	10.44
CoRAP6	A1+Catalase	TGTACTACTCGGACGACAAG	GACTGCGTACGCACGCTG	36	36	100	0.95	11.72
CoRAP7	A2+Mir398	TATAGCTGTGTTCTCAGGTC	GACTGCGTACGCACGCAA	38	37	97.36	0.94	6.89
CoRAP8	A2+Mir160b	CTCCTGTATGCCACTCATC	GACTGCGTACGCACGCAA	38	38	100	0.95	12.23
CoRAP9	A2+Mir169g	GGCTGCGAAGAAATGAATA	GACTGCGTACGCACGCAA	36	36	100	0.95	13.49
CoRAP10	A2+Sos1.1R	TCATCTTCTCCTACCGCCCTG	GACTGCGTACGCACGCAA	46	46	100	0.96	10.17
CoRAP11	A2+MnSoD.f	CAGAGGGTGCTGTTTACAA	GACTGCGTACGCACGCAA	38	37	97.36	0.95	8.07
CoRAP12	A2+Catalase	TGTACTACTCGGACGACAAG	GACTGCGTACGCACGCAA	27	27	100	0.93	8.03
Mean				35.5	35.16	99.06	0.95	9.85

TAB: total amplified bands, NPB: number of polymorphic bands, PPB: percentage of polymorphic bands, PIC: polymorphism information content, MI: marker index.

این نتیجه نمایانگر این موضوع است که با کاهش جریان ژنی، میزان تمایز بین جمعیت افزایش می‌یابد. همچنین با کاهش جریان ژنی میزان تنوع بین جمعیت افزایش می‌یابد. در این مطالعه مقدار شاخص *Fst* با استفاده از نشانگرهای CoRAP برابر ۰/۴۵ بود که نشان می‌دهد جمعیت‌های مورد

بررسی ساختار جمعیت *Ageilops*

شاخص‌های تخمین جریان ژنی بین گونه‌های *Ageilops* مورد بررسی در جدول (۴) نشان داده شده است. نتایج، جریان ژنی (Nm) پایینی برابر ۰/۴۷ را نشان داد و در مقابل میزان شاخص تمایز بین جمعیت (Gst) ۰/۵۶ بود.

مطالعه کاملاً از هم متمایز شده‌اند.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی گونه‌های *Aegilops* براساس نشانگرهای CoRAPTable 3. Analysis of molecular variance for *Aegilops* species using CoRAP markers

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد واریانس
SOV	df	SS	MS	Estimated variance	Variance%
بین جمعیت‌ها	7	3571.65	510.23	35.21	53.64
Between Population					
درون جمعیت‌ها	103	3086.38	29.96	29.96	46.36
Within Population					
کل	110	6658.03			100
Total					

جدول ۴- شاخص‌های تخمین جریان ژنی براساس نشانگرهای CoRAP در گونه‌های *Aegilops*Table 4: Indices of gene flow prediction using CoRAP markers in *Aegilops* species

Gst	Hs	Ht	Nm	Fst
0.56	0.13	0.24	0.47	0.45

Gst, Hs, Ht, Nm و Fst به ترتیب نمایانگر تمایز بین جمعیت، هتروزیگوسیتی درون جمعیت، هتروزیگوسیتی کل، جریان ژنی و شاخص تنبیت می‌باشد.

جدول ۵- پارامترهای برآورد شده تنوع ژنتیکی در گونه‌های *Aegilops* با استفاده از نشانگر CoRAPTable 5. Genetic diversity estimated parameters in *Aegilops* species using CoRAP markers

گونه	تعداد توده	ژنوم	هتروزیگوسیتی	تنوع ژنی	تنوع ژنی	تعداد آلل	تعداد آلل
Species	Number of accessions	Genome	مورد انتظار uHe	نی H	شانون I	مؤثر Ne	مشاهده شده Na
<i>Ae. caudata</i>	8	C	0.16	0.15	0.22	1.25	1.00
<i>Ae. crassa</i>	14	DM	0.12	0.11	0.18	1.19	0.93
<i>Ae. cylindrica</i>	19	DC	0.15	0.15	0.23	1.25	1.08
<i>Ae. neglecta</i>	11	UM	0.12	0.11	0.17	1.20	0.80
<i>Ae. speltoides</i>	6	S	0.13	0.12	0.19	1.21	0.89
<i>Ae. tauschii</i>	20	D	0.13	0.12	0.20	1.21	1.01
<i>Ae. triuncialis</i>	16	UC	0.14	0.14	0.21	1.23	1.04
<i>Ae. umbelulata</i>	17	U	0.11	0.11	0.17	1.19	0.88
Mean	111		0.133	0.126	0.196	1.21	0.95

Na: observed number of alleles, Ne: number of effective alleles, I: Shannon's information index, He: Nei's gene diversity, uHe: Unbiased Heterozygosity

به ترتیب مربوط به گونه‌های *Ae. caudata* و *Ae. neglecta*، *Ae. cylindrica* با میزان ۰/۱۵ و *Ae. crassa*، *Ae. umbelulata* و *Ae. neglecta* با مقدار ۰/۱۱ بود. شاخص تنوع شانون (I) دارای متوسط ۰/۲۰ با دامنه‌ای از ۰/۱۷ برای گونه‌های *Ae. neglecta* و *Ae. umbelulata* و ۰/۲۳ برای گونه *Ae. cylindrica* متغیر بود. با توجه به بالا بودن

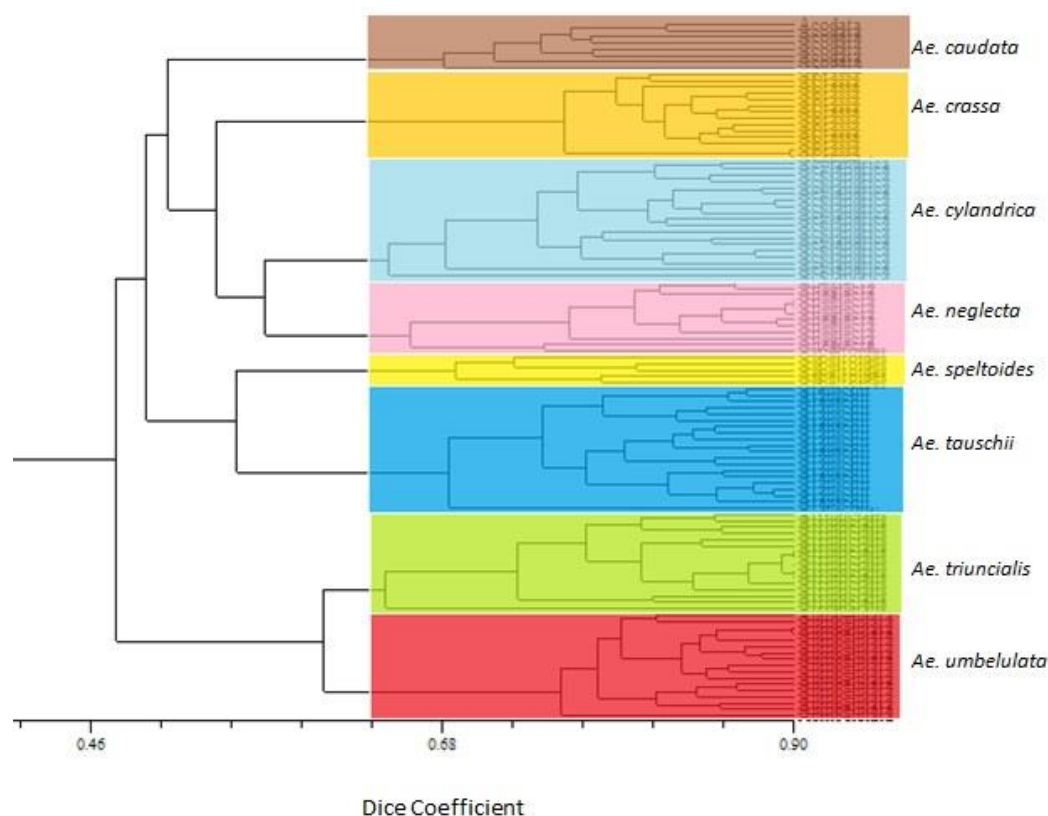
با استفاده از پارامترهای تخمین تنوع ژنتیکی (جدول ۵)، متوسط تعداد آلل مشاهده شده (Na) برابر ۰/۹۶ با دامنه متغیر ۰/۸۰ تا ۱/۰۸ به ترتیب متعلق به گونه‌های *Ae. neglecta* و *Ae. cylindrica* بود. از نظر شاخص تنوع ژنتیکی Nei (H) به عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی، بیشترین و کمترین مقدار این شاخص

neglecta در گروه چهارم قرار گرفت. در گروه پنجم و ششم به ترتیب کل توده‌های مرتبط با *Ae. cylandrica* و *Ae. crassa* جای گرفت و در گروه هفتم توده‌های دو گونه مرتبط با *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* ولی در دو زیرگروه جداگانه قرار گرفتند. بر اساس ضرایب تشابه ژنتیکی، بالاترین تشابه بین دو توده گونه *Ae. speltooides* جمع‌آوری شده از ایلام و نیز بین دو توده گونه *Ae. cylandrica* جمع‌آوری شده از کرمانشاه و ایلام و کمترین شباهت ژنتیکی متعلق به یک توده از گونه *Ae. crassa* و یک توده از گونه *Ae. umbelulata* به- ترتیب جمع‌آوری شده از لرستان و ایلام بود. در سطح گونه‌ای بیشترین تشابه بین دو گونه *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* و نیز بین دو گونه *Ae. neglecta* و *Ae. cylandrica* و کمترین تشابه ژنتیکی بین دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. umbelulata* مشاهده شد.

شاخص‌های تعداد آلل مؤثر و تنوع ژنتیکی Nei در دو گونه *Ae. caudata* و *Ae. cylandrica* می‌توان گفت که این دو گونه دارای تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بالایی در بین گونه‌های مورد بررسی هستند. در مقابل دو گونه *Ae. neglecta* و *Ae. umbelulata* کمترین تنوع درون گونه‌ای را با توجه به میزان پارامترهای تنوع ژنتیکی داشتند (جدول ۵).

گروه‌بندی و بررسی روابط ژنتیکی بین گونه‌های *Aegilops*

دندروگرام گروه‌بندی گونه‌های مورد مطالعه (شکل ۲) برای ۱۱۱ توده وحشی آژیلوپس، توده‌ها را به هفت گروه اصلی تقسیم کرد. گروه اول شامل تمام توده‌های مربوط به گونه *Ae. caudata* و گروه دوم مربوط تمام توده‌های گونه *Ae. tuaschii* بود. در گروه سوم تمام توده‌های متعلق به گونه *Ae. Speltooides* به‌جز یک توده قرار گرفتند که این توده به‌همراه تمام توده‌های گونه *Ae.*

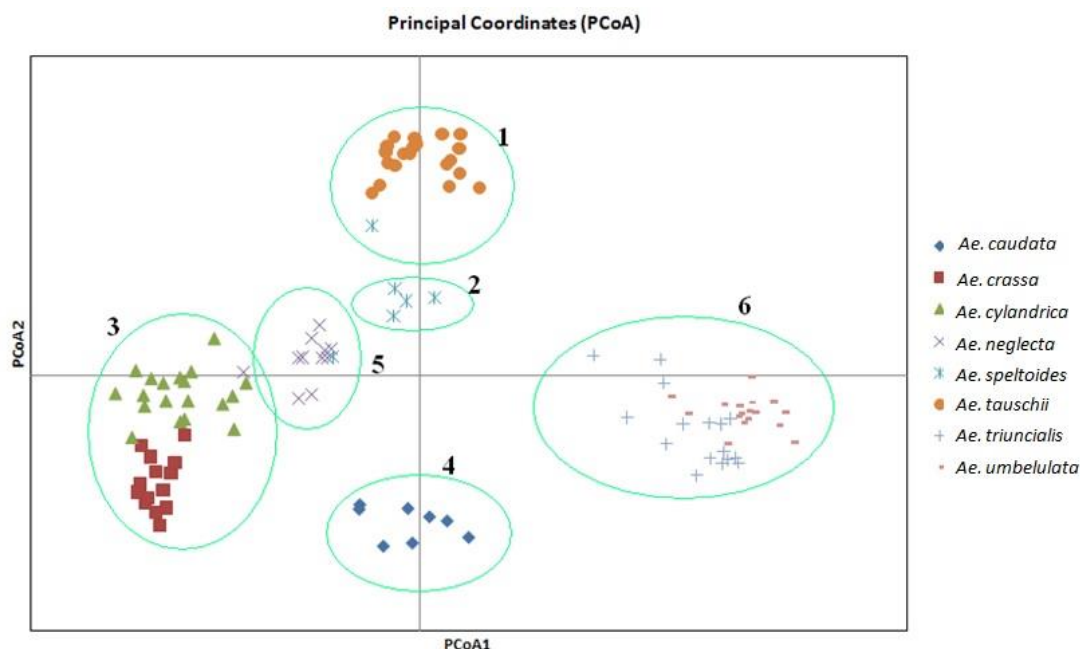


شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای توده‌های آژیلوپس با استفاده از نشانگرهای CoRAP
Figure 2. Cluster analysis for *Aegilops* accessions using CoRAP markers

تجزیه به مختصات اصلی در اینجا تنها با ۳۸/۷ درصد اطلاعات گروه‌بندی را انجام داده است. همچنین گروه‌بندی انجام شده به وسیله نمودار بای پلات (شکل ۳) همانند تجزیه خوشه‌ای انطباق خوبی با ساختار ژنومی آنها نشان داد. نظر به اینکه نمودار دوبعدی تجزیه به مختصات اصلی نسبت به تجزیه خوشه‌ای با استفاده از اطلاعات کمتری از ژنوم گروه-بندی مناسبی را انجام می‌دهد، این نتیجه می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق پراکنش مناسبی در طول ژنوم داشته و توانسته‌اند دامنه وسیعی از کل ژنوم را نمونه‌برداری کنند.

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نشانگرهای CoRAP

در تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای، دو مؤلفه اول به ترتیب ۲۳/۵۵ و ۱۵/۱۵ درصد از واریانس کل را تبیین کردند. نمودار پراکنش ترسیم شده با دو مؤلفه اول (شکل ۳) تا حدودی توانست گروه-بندی انجام شده را توسط تجزیه خوشه‌ای تأیید کند. تفاوت جزئی در گروه‌بندی انجام شده به وسیله دو روش می‌تواند بدان علت باشد که تجزیه خوشه‌ای با ۱۰۰ درصد اطلاعات نشانگری توده‌ها را گروه‌بندی می‌کند ولی نمودار پراکنش

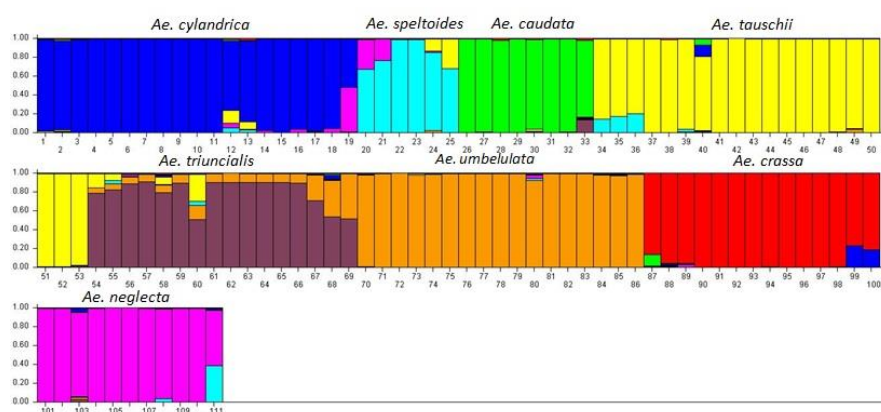


شکل ۳- تجزیه به مختصات اصلی توده‌های *Aegilops* براساس نشانگرهای CoRAP

Figure 3. Principal coordinate analysis (PCoA) for *Aegilops* accessions using CoRAP markers

ضریب عضویت هر توده در گروه‌های متفاوت قرار گرفت و ستون‌های با رنگ‌های ترکیبی متفاوت نشان‌دهنده جریان ژنی بین توده‌ها و گونه‌هاست. دو گونه *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* در کنار هم با رنگ متفاوت قرار گرفتند و جریان ژنی از سمت *Ae. umbelulata* به *Ae. truncialis* کاملاً مشهود بود.

تعیین ساختار جمعیت براساس نشانگرهای CoRAP تجزیه ساختار جمعیت براساس داده‌های حاصل از آغازگرهای CoRAP با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3.4 در حالت admixture با Burn-in = ۵۰۰۰ و MCMC = ۵۰۰۰ در K برابر ۸ انجام شد (شکل ۴). هر هشت گونه مورد مطالعه با رنگ‌های متفاوت با توجه به



شکل ۴- تجزیه ساختار مبتنی بر مدل Bayesian برای گونه‌های *Aegilops* با نشانگرهای CoRAP

Figure 4. The Bayesian model-based Structure analysis for *Aegilops* accessions using CoRAP markers

بحث

ها باشد. در مطالعه‌ای که Moradkhani و همکاران (۲۰۱۵) برای بررسی روابط فیلوژنتیکی برخی از گونه‌های گندم *Aegilops* و *Triticum* با استفاده از نشانگرهای ISSR و SSR انجام دادند، میزان تنوع درون گروهی را بیشتر از تنوع بین گروهی گزارش کردند. همچنین Naghavi و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی تنوع ژنتیکی گندم *Aegilops* با استفاده از نشانگرهای SSR، تنوع بالایی را در بین گونه‌های مورد بررسی مشاهده کردند. میزان پایین جریان ژنی (Nm) و مقدار بالاتر شاخص تمایز بین جمعیت (Gst) در بین گونه‌های *Aegilops* مشاهده شد که بیانگر کاهش جریان ژنی و افزایش میزان تنوع بین جمعیت می‌باشد. در ارتباط با این موضوع، در ارزیابی روابط فیلوژنتیکی ۱۸۰ توده گندم آزیلوپس و تربیتیکوم با استفاده از نشانگرهای SCoT، جریان ژنی را در بین گونه‌های *Aegilops* برابر با ۰/۸۷، تمایز بین جمعیت را ۰/۳۶ و میزان تنوع بین جمعیت را ۳۷ درصد گزارش کردند (Pouraboughadareh *et al.*, 2018). در مطالعه‌ای دیگر، در بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم با نشانگرهای ISSR و SCoT، میزان شاخص‌های Gst، Nm و تنوع ژنتیکی بین جمعیت را به ترتیب با استفاده از نشانگرهای ISSR ۰/۰۷، ۶/۵۱ و ۱۰ درصد و با استفاده از نشانگرهای SCoT به ترتیب ۰/۰۵، ۹/۵۳ و ۷ درصد گزارش کرده‌اند (Etminan *et al.*, 2016). در مطالعه دیگری میزان تنوع ژنتیکی کل (Ht) ۰/۲۴ و مقدار تنوع ژنتیکی درون (Hs) را ۰/۱۳ در بین گونه‌های مورد

نتایج این آزمایش نشان داد که آغازگرهای استفاده شده و به‌طور کلی نشانگرهای CoRAP قدرت تفکیک و تمایز مناسب و بالایی در بین گونه‌های *Aegilops* وحشی داشتند. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی بالا در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. همچنین مقدار بالای محتوای چندشکلی نشان‌دهنده این است که برخی از نشانگرها برای تمایز بین ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Struss and plieske, 1998). آغازگرهایی که PIC بزرگتر از ۰/۷۵ داشته باشند دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند، آغازگرهایی که مقادیر PIC آنها بین ۰/۲۵ و ۰/۷۵ باشد سودمند هستند و آغازگرهایی که PIC کمتر از ۰/۲۵ دارند، حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند (Landjeva *et al.*, 2006). در مقایسه با مقدار PIC بسیار بالا در این تحقیق، در مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۵ اکوتیپ *Salvia* با ۱۲ آغازگر ترکیبی CoRAP میانگین PIC برای نشانگرها ۰/۳۷ با میانگین درصد چندشکلی ۲۸/۸۹ گزارش شده است (Fabriki-Ourang *et al.*, 2018). با تجزیه واریانس مولکولی میزان واریانس بالایی بین جمعیتی مشاهده شده بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین گونه‌های *Aegilops* بود و می‌تواند بیانگر جریان ژنی پایین در بین گونه-

و *Ae. umbelulata* در یک گروه، در زیرگروه‌های جداگانه و همچنین قرار گرفتن *Ae. caudata* در یک گروه جدا ولی در کنار این دو گونه می‌تواند به این علت باشد که *Ae. truncialis* از تلاقی بین دو گونه *Ae. umbelulata* به‌عنوان والد دهنده ژنوم U و *Ae. caudata* به‌عنوان والد دهنده ژنوم C به‌وجود آمده‌اند (Van slageren *et al.*, 1994). یورابوقداره و همکاران (PourAboughadareh *et al.*, 2018) نیز شباهت بالایی را بین دو گونه *Ae. umbelulata* و *Ae. truncialis* مشاهده کردند و ارتباط بین این دو گونه را مرتبط با ژنوم U مشترک آنها بیان کرده‌اند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر که بر روی این گونه‌ها با استفاده از نشانگر CDBP انجام شد، این دو گونه را در یک گروه قرار داد ولی نتوانست به‌طور کامل توده‌های این دو گونه را از هم جدا کند (Etmnan *et al.*, 2018). در بررسی دیگری که با نشانگرهای RAPD بر روی گندم‌های وحشی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ترکیه انجام شد، دو گونه *Ae. umbelulata* و *Ae. truncialis* با شباهت زیادی در کنار هم قرار گرفتند (Cenkci *et al.*, 2008). در بررسی دیگری، با استفاده از نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی گندم‌های *Aegilops* جمع‌آوری شده از نواحی شمال‌غرب ایران مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج آنها نیز این دو گونه را در کنار یکدیگر قرار داد (Baranduzi *et al.*, 2013). این نتایج نشان‌دهنده شباهت بالای ژنتیکی بین این دو گونه است. قرار گرفتن توده ۵۳ گونه *Ae. speltooides* جمع‌آوری شده از کرمانشاه در کنار توده ۵۲ گونه *Ae. neglecta* جمع‌آوری شده از کرمانشاه در گروه چهارم می‌تواند به علت شباهت‌های جغرافیایی و جریان‌ات ژنی بوده باشد.

نتایج تجزیه به مختصات اصلی به‌طور مناسبی توانست نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای را تأیید کند و تفاوت جزئی در گروه‌بندی می‌تواند بدان علت باشد که تجزیه خوشه‌ای با صددرصد اطلاعات نشانگری توده‌ها را گروه‌بندی می‌کند ولی نمودار پراکنش تجزیه به مختصات اصلی تنها با اطلاعات درصد پائین دو مؤلفه اول گروه‌بندی را انجام داده است. در مطالعه یورابوقداره و همکاران نیز نمودار بدست آمده از تجزیه به مختصات اصلی با گروه‌بندی انجام شده با تجزیه خوشه‌ای

بررسی گزارش کردند که بیانگر تنوع پایین در درون گونه‌ها بود (Alwala *et al.*, 2006). البته، شاخص Fst همبستگی ژن-های افراد مختلف در یک جمعیت و دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در جمعیت‌ها نشان می‌دهد. زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملاً مشابه باشند مقدار این شاخص برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی کاملاً متفاوت هستند این مقدار برابر یک می‌شود (Weir *et al.*, 1996). همچنین شاخص Fst برای تمایز بین جمعیت‌ها نیز به‌کار می‌رود. در این مطالعه مقدار شاخص Fst نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه کاملاً از هم متمایز شده‌اند.

در این تحقیق با استفاده از شاخص تنوع ژنتیکی Nei به-عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های بررسی تنوع ژنتیکی و تعداد آلل مؤثر، دو گونه *Ae. cylandrica* و *Ae. caudata* دارای تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بالایی در بین گونه‌های مورد بررسی بودند. در مقابل دو گونه *Ae. neglecta* و *Ae. umbelulata* کمترین تنوع درون گونه‌ای را داشتند. در مطالعه-ای که Aalami و همکاران (۲۰۱۵) بر روی سه گونه *Ae. cylandrica* و *Ae. crassa tauschii* با استفاده از نشانگر RAPD انجام دادند، بالاترین سطح تنوع را در *Ae. tauschii* با استفاده از پارامترهای تنوع ژنتیکی گزارش کردند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR، بیشترین تنوع ژنی Nei در گونه‌های *Ae. crassa tauschii* گزارش شده است (Moradkhani *et al.*, 2015).

در این تحقیق بیشترین تشابه بین دو گونه *Ae. truncialis* و *Ae. umbelulata* و بین دو گونه *Ae. neglecta* و *Ae. cylanrica* مشاهده شد. توماس و همکاران (Thomas *et al.*, 2010) در مطالعه گونه‌های گندم *Triticum* و *Aegilos* یونانی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بیشترین تشابه ژنتیکی را در بین توده‌های داخل گونه *Ae. Caudate* گزارش کردند. تجزیه خوشه‌ای در این تحقیق توانست به‌طور مناسبی گونه‌های مورد مطالعه را در گروه‌های مجزایی تفکیک کند. در تأیید صحت گروه‌بندی انجام شده، قرار گرفتن *Ae. truncialis*

- potential biomarkers in plant stress response. *American Journal of Plant Sciences*, 5(5): 748-759.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
 - Cenkcı, S., Yildiz, M., Konuk, M. and Eren, Y. 2008. RAPD analyses of some wild *Triticum* L. and *Aegilops* L. species and wheat cultivars in Turkey. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(1): 35-42.
 - Doyle, J.J., Doyle, J.K. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bulletin*, 19: 11-15.
 - Etminan, A., Mehrabi, A., Shooshtari, L., Moradkhani, H. 2018. Applicability of CBDP markers to genetic diversity among some of the cultivated wheat accessions and their ancestral species. *Modern Genetics Journal*, 13(1): 79-89. (In Persian)
 - Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Noori, A., Mahdavian, Z. and 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(6): 1075-1081.
 - Fabriki-Ourang, S. and Yousefi-Azarkhanian, M. 2018. Genetic variability and relationships among *Salvia* ecotypes/species revealed by TRAP-CoRAP markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1-10.
 - Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in genetics*, 5: 103-107.
 - Gong, H.Y., Liu, A.H. and Wang, J.B. 2006. Genomic evolutionary changes in *Aegilops* allopolyploids revealed by ISSR markers. *Acta phytotaxonomica Sinica*, 44(3): 286-295.
 - Gororo, N. N., Eagles, H. A., Eastwood, R. F., Nicolas, M. E., and Flood, R. G. 2002. Use of *Triticum tauschii* to improve yield of wheat in low-yielding environments. *Euphytica*, 123: 241-254.
 - Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32: 481-494.
 - Kantety, R.V., La Rota, M., Matthews, D.E. and Sorrells, M.E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant molecular biology*, 48(5-6): 501-510.
 - Kashkush, K., Feldman, M. and Levy, A.A. 2002. Gene loss, silencing and activation in a newly
- PourAboughadareh *et al.*,) تفاوت‌هایی را نشان داد (DM با ژنوم *Ae. crassa* و *Ae. cylandrica* با ژنوم DC در یک گروه می‌تواند به علت ژنوم D مشترک آنها باشد (Gong *et al.*, 2006). تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت نیز توانست نتایج بدست آمده از تجزیه خوشه-ای و تجزیه به مختصات اصلی را تأیید کند. در مطالعه‌ای برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گندم *Aegilops* و *Triticum* از نشانگرهای CBDP استفاده شد. نتایج تجزیه ساختار K بهینه را برابر با شش نشان داد و توانست گونه‌ها را از هم متمایز کند (Etminan *et al.*, 2018).
- ### سپاسگزاری
- بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) برای تأمین هزینه‌های مالی این تحقیق و دانشگاه ایلام بابت تهیه مواد گیاهی تشکر می‌گردد.
- ### منابع مورد استفاده
- Aalami, A., Abdollahi Mandoulakani, B., Azizi, H., Masoumi, F., Safiyar, S. and Karami, N. 2014. R-RAP: A new marker for genetic characterization and evaluation of relationships among different *Aegilops* species. *Crop Breeding Journal*, 4(1): 5-21.
 - Akhunov, E.D., Goodyear, A.W., Geng, S., Qi, L.L., Echaliier, B., Gill, B.S., Gustafson, J.P., Lazo, G., Chao, S., Anderson, O.D. and Linkiewicz, A.M. 2003. The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome research*, 13(5): 753-763.
 - Alwala, S., Andru S., Arro, J. A., Veremis, J. C. and Kimbeng, C. A. 2006. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Science*, 46(1): 448-455.
 - Asgari-Zakaria, R. 2016. *Aegilops* Species Identification and Utilization. Mohagghhe Ardabili University Press, 216p.
 - Baranduzi, A.J., Sofalian, O., Zakaria, R.A., Asghari, A. and Shokrpour, M. 2013. Assessment of genetic diversity in *Aegilops* species in North-West of Iran using ISSR marker. *Yuzuncu Yıl Universitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(2): 66-75.
 - Bej, S. and Basak, J. 2014. MicroRNAs: the

- 694-703.
- 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.
 - Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K. and Pardo, J.M. 2002. Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13): 9061-9066.
 - Saeidi, H., Rahiminejad, M.R. and Heslop-Harrison, J.S., 2008. Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) sub-taxa in Iran. *Annals of botany*, 101(6): 855-861.
 - Schneider, A., Molnar, I. 2008. Utilization of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, 163:1-19.
 - Shahidi, B., Ahmadi, J., Fabriki-Ourang, S. 2019. The Study of microRNAs expression pattern involved in drought stress tolerance in ancestors and wild-domestic relatives of wheat. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 27(1): 1-14. (In Persian)
 - Struss, D., Plieske, J. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 308-31
 - Thomas, K.G., Bebeli, P.J. 2010. Genetic diversity of greek *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56: 951-961.
 - Van Slageren, M. W. 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (jaub. And Spach) Eig (*poaceae*). Wageningen Agricultural University. Wageningen, the Netherland, pp: 94-107.
 - Weir, B.S. 1996. Intraspecific differentiation. In: D.M. Hillis et al. (Ed). *Molecular systematics*, 2nd edition. Sunderland: Sinauer Associates Pub 385-403.
 - Zhu, Q.H., Spriggs, A., Matthew, L., Fan, L., Kennedy, G., Gubler, F. and Helliwell, C. 2008. A diverse set of microRNAs and microRNA-like small RNAs in developing rice grains. *Genome research*, 18(9):1456-1465.
 - synthesized wheat allotetraploid. *Genetics*, 160(4): 1651-1659.
 - Khoramifard, T., Mehrabi, A.A., Arminian A. and Fazeli A. 2017. Genetic diversity structure of *Aegilops crassa* accessions revealed by genomic ISSR markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25(1): 111-122. (In Persian)
 - Landjeva, S., Korzon, V. and Ganeva, G. 2006. Evaluation of genetic diversity among Bulgarian diversity in barley populations. *Theoretical Applied Genetics*, 97: 308-315.
 - Metakovsky, E. V., Baboev, S. K. 1992. Polymorphism and inheritance of gliadin polypeptides in *Triticum monococcum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 971-975.
 - Moradkhani, H., Mehrabi, A.A., Etminan, A. and 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(1): 81-95.
 - Naghavi, M.R., Aghaei, M.J., Taleei, A.R., Omidi, M., Mozafari, J., Hassani, M.E. 2009. Genetic diversity of the D-genome in *T. aestivum* and *Aegilops* species using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 499-506.
 - Pan, D., Yu-Ming, W., Guo-Yue, C., Wei, L., Ji-Rui, W., Eviatar, N. and You-Liang, Z. 2009. EST-SSR diversity correlated with ecological and genetic factors of wild emmer wheat in Israel. *Hereditas*, 146: 1-10.
 - Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6: 288-295.
 - Poczai, P., Hyvonen, J., Taller, J., Jahnke, G. and Kocsis, L. 2013. Phylogenetic analyses of Teleki grapevine rootstocks using three chloroplast DNA markers. *Plant molecular biology reporter*, 31(2): 371-386.
 - Pour-Aboughadareh, A., Ahmadi, J., Mehrabi, A.A., Etminan, A. and 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(4):

Fingerprinting of *Aegilops* species using genes-targeted derived and conserved regions CoRAP markers

S. Fabriki Ourang^{1*}, H. Karimi², J. ahmadi³, A. Ashraf Mehrabi⁴

1*- Corresponding author: Assoc. Prof., Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran. Email: s.ourang10@gmail.com, ourang@eng.ikiu.ac.ir

2- M.Sc. of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran.

3- Prof., Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran.

4- Assoc. Prof. Dept. Biotechnology, Research Institute of Forest and rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 02.05.2021 Accepted: 11.09.2021

Abstract

Aegilops range grasses (Poaceae family) as one of the most important ancestors of wheat is a rich source of stresses tolerance genes. For this, the fingerprinting of genetic relationships in accessions belonging to eight species of *Aegilops* was studied using targeted genes-related CoRAP molecular markers. In designing the fixed primers, six genes *CAT*, *MnSoD*, *SoS1*, *miR398*, *miR160b* and *miR169gR* responsible for abiotic stresses tolerance were used. The lowest and highest polymorphic information contents were related to CoRAP2 and CoRAP10 primers with 0.92 and 0.96, respectively. The marker index varied from 6.89 in CoRAP7 primer to 13.49 in CoRAP9 primer. Low gene flow (N_m) and high differentiation (G_{st}) was observed between species. Also, the F_{st} index equal to 0.45 showed that the studied populations were completely separated. Due to the high values of the effective allele number and N_{ei} genetic diversity, two species *Ae. cylindrica* and *Ae. caudata* showed high intra-specific diversity. The greatest similarity was observed between two species *Ae. truncialis* and *Ae. umbelulata* as well as *Ae. neglecta* and *Ae. cylanrica*. Cluster analysis appropriately divided species into distinct groups, and principal coordinate analysis confirmed the results of cluster analysis. Using structure analysis of the population, the mode of gene flow and genetic intermixture among species were in accordance with the grouping results of cluster analysis and PCoA biplot.

Keywords: Genetic diversity, Range grasses, Resistance genes, Targeted markers, Wild wheat.