Research Article

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research DOI: 10.22092/ijrfpbgr.2024.365117.1458

Vol. 32, No. 1, Page 16-30 (2024)

Investigating the Allelic Diversity of D Genome Microsatellite Loci in *Aegilops tauschii* with mir-SSR Markers

N. Nikoo [1], J. Ahmadi [2]*, S. Fabriki-Ourang [3], A. Mehrabi [4]

1. M.Sc. Graduate, Dept. Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
2. Corresponding Author, Prof. Dept. Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. Email: ahmadi.j@eng.ikiu.ac.ir
3. Assoc. Prof. Dept. Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.
4. Assoc. Prof. Research Center of Medicinal Plants, Shahed University, Tehran, Iran.

Received: 25.02.2024 Accepted: 11.06.2024

Extended Abstract

Background and Objectives:

Genetic diversity is crucial for plant breeding and results in natural evolution of the biological systems. Among various *Aegilops* species, *Ae. tauschii* is the primary wild relative of bread wheat, contributing the D genome to cultivated wheat. The objective of this research was to explore the allelic diversity of D genome microsatellite loci in 89 *Ae. tauschii* accession originated from various regions of Iran, Turkey, Afghanistan, Armenia, Sweden, and Azerbaijan and to evaluate the effectiveness of 32 pairs of mir-SSR microsatellite markers in segregating *Ae. tauschii* accessions for identification and use in germplasm management and breeding programs.

Methodology:

Seeds from 89 *Ae. tauschii* accessions were sown in pots, and DNA was extracted from young leaves using the CTAB method. Allelic amplification was performed using 32 pairs of mir-SSR microsatellite primers. Band patterns were scored based on the presence/absence of bands and allele sizes. Statistical analysis was conducted using GenAlex and NTSYS software.

Results:

From the 32 primer pairs studied, 31 pairs with suitable band patterns were selected, producing 104 alleles, of which 91 were polymorphic. The number of alleles per primer pairs, ranged from 2 to 5, with an average of 3.35 alleles per pair. The average percentage of polymorphism for the primers was 88.91%. The polymorphic information content (PIC) for different primer pairs ranged from 0.52 to 0.95, with an average of 0.81. Specific alleles were identified for each population, and 13 specific alleles were found in the 14 *Ae. tauschii* studied populations with the Mazandaran population showing the highest number of specific alleles. Cluster analysis grouped the accessions into five main clusters, although the 14 populations were not distinguishable.

Conclusion:
The results demonstrated the effectiveness of mir-SSR markers in detecting polymorphisms across the studied populations, revealing high genetic diversity and differentiation, particularly in the Mazandaran population. Cluster analysis indicated significant genetic mixing or similar geographical conditions among accessions in the same group. Overall, the mir-SSR markers used in this study exhibited high polymorphism and could distinguish populations and their allelic diversity. These markers are valuable tools for investigating genetic diversity in other breeding programs.

Keywords: *Aegilops tauschii*, Allelic diversity, MiRNA-SSR, Molecular marker.

بررسی تنوع آللی جایگاه‌های ریزماهواره ژنوم D در *Aegilops tauschii* با نشانگرهای mir-SSR

نسا نیکو[۱]، جعفر احمدی[۲*]، صدیقه فابریکی اورنگ[۳] و علی اشرف مهرابی[۴]

۱ – دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲*– نویسنده مسئول، استاد، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

پست الکترونیک: ahmadi.j@eng.ikiu.ac.ir

۳– دانشیار، گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۴ – دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹

چکیده

سابقه و هدف:

تنوع ژنتیکی مهمترین نیاز اصلاح نباتات است که ناشی از تکامل طبیعی است و یکی از مهمترین اجزای پایداری نظام‌های بیولوژیک می‌باشد. در میان گونه‌های مختلف آژیلوپس، *Ae. tauschii* با بخشیدن ژنوم D به گندم‌های زراعی به عنوان اصلی‌ترین خویشاوند وحشی گندم نان معرفی شده است. هدف اصلی این پژوهش، بررسی تنوع آللی جایگاه‌های ریزماهواره ژنوم D در ۸۹ توده آژیلوپس متعلق به گونه *Aegilops tauschii*جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران و کشورهای ترکیه، افغانستان، ارمنستان، سوئد و آذربایجان و بررسی کارایی ۳۲ جفت نشانگر ریزماهواره mir-SSR در تفکیک توده‌های *Ae. tauschii* برای شناسایی و استفاده در برنامه‌های مدیریت ژرم‌پلاسم و استفاده از آن در برنامه‌های به‌نژادی بود.

مواد و روش‌ها:

بذرهای ۸۹ توده ایرانی و غیرایرانی *Ae. tauschii* در گلدان‌های مناسب کشت گردیده و در مرحله شش برگی استخراج DNA از بافت برگ با روش CTAB انجام شد. سپس تکثیر آلل‌ها با ۳۲ جفت آغازگر ریزماهواره mir-SSR انجام گردید. الگوی باندی براساس حضور و عدم حضور باند و براساس اندازه آلل امتیازدهی شد. تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Gen Alex و NTSYS انجام شد.

نتایج:

از ۳۲ جفت آغازگر مورد مطالعه ۳۱ جفت آغازگر با الگوی باندی مناسب انتخاب و در مجموع ۱۰۴ آلل تولید شد که ۹۱ آلل چند شکل بودند. تعداد آلل‌ها برای هر آغازگر از ۲ تا ۵ با میانگین تعداد آلل ۳/۳۵ برای هر جفت آغازگر متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی برای آغازگرهای مورد مطالعه ۸۸/۹۱ محاسبه گردید. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آغازگرهای مختلف از ۰/۵۲ تا ۰/۹۵ با میانگین ۰/۸۱ بود. برای تعیین نشانگرهای متمایزکننده توده‌ها، آلل‌های اختصاصی برای توده‌های هر گروه شناسایی شدند. در ۱۴ جمعیت *Ae. tauschii* مورد مطالعه ۱۳ آلل اختصاصی شناسایی شد که از این میان جمعیت مازندران بیشترین تعداد آلل اختصاصی را به خود اختصاص داد. تجزیه خوشه‌ای، توده‌های مورد بررسی را به ۵ گروه اصلی طبقه‌بندی نمود، به‌طوری‌که این گروه‌بندی نتوانست ۱۴ جمعیت مختلف را به‌طور کامل از هم تفکیک کند.

نتیجه‌گیری:

نتایج نشان داد تنوع ژنتیکی بیشتری در توده‌های مازندران نسبت به توده‌های دیگر مشاهده شد. گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بیانگر اختلاط ژنتیکی زیاد بین این جمعیت‌ها و یا مشابه بودن شرایط جغرافیایی توده‌های قرار گرفته در یک گروه است. در مجموع، نتایج حاصل نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره mir-SSR دارای چندشکلی بالا و از قدرت تمایز مناسب بین توده‌ها و تبیین تنوع آللی برخوردار بودند و می‌توان از آنها به عنوان آغازگرهای سودمند برای بررسی تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع آللی، نشانگر مولکولی، *Aegilops tauschii*، miRNA-SSR

مقدمه

استفاده از ذخایر ژنتیکی گیاهان زراعی می‌تواند به عنوان یک راهبرد مطلوب برای بهره‌گیری از ظرفیت آلل‌های موجود در آنها به اصلاحگران نبات در توسعه ارقام جدید و مقاوم به انواعی از تنش‌های محیطی کمک کند (Ahmadi *et al.*, 2019). گونه‌های خویشاوند زراعی به عنوان یکی از مهمترین منابع ژنی برای اصلاح گیاهان و حفظ پایداری اکوسیستم زراعی به حساب می‌آیند (Eslamzadeh-Hesari *et al.*, 2021). خویشاوندان وحشی گندم زراعی، به‌طور بالقوه به عنوان منابع ژنی مهم در بهبود تولیدات کشاورزی و حفظ کشاورزی پایدار استفاده می‌شوند. ورود ژن‌های جدید از ژرم‌پلاسم به عنوان یکی از راهبردهای ارزشمند برای افزایش تحمل گیاه به تنش‌های مختلف غیرزیستی و بهبود بهره‌وری آن شناخته شده است. به این ترتیب در شرایط تنش‌زا اصلاح‌کنندگان باید این میزان تأثیر تنش‌های محیطی بر عملکرد نهایی را از طریق بهبود پس‌زمینه ژنتیکی کاهش دهند. گندم دارای خزانه ژنی بزرگی است و بیشتر مطالعات بر روی ظرفیت ژرم‌پلاسم آن متمرکز شده است و جنس آژیلوپس و تریتیکوم دو عضو مهم در ژرم‌پلاسم گندم هستند. بنابراین گونه‌های متعلق به این جنس‌ها نقش مهمی در اهلی کردن گندم دارند. در مطالعات متعدد هریک از این گونه‌ها منبع ایده‌الی از ژن‌ها و حتی آلل‌ها هستند که مربوط به تنش-های زیستی که عمدتاً تحمل سرما، خشکسالی، گرما و شوری است، می‌باشند. بنابراین همه گونه‌های آژیلوپس و تریتیکوم می‌توانند یک خزانه ژنی بالقوه برای اصلاح‌کنندگان گندم فراهم کنند (Pour-Aboughadareh *et al.*, 2022).

Aegilops tauschii گیاهی یکساله با سنبله‌هایی به طول ۱۱-۹ سانتی‌متر است که با بخشیدن ژنوم D به گندم‌های زراعی به عنوان اصلی‌ترین خویشاوند وحشی گندم نان معرفی شده است (Pour-Aboughadareh, 2017). در واقع ژنوم D نقش کلیدی در مقاومت در برابر بیماری و تحمل به تنش‌های محیطی و افزایش عملکرد دانه دارد. به دلیل توزیع گسترده گونه *Ae.tauschii* در خاورمیانه، به‌ویژه ایران و نواحی قاره آسیای مرکزی که دارای زیستگاه‌های بسیار خشک بوده است این فرضیه مطرح می‌شود که ممکن است در آن گونه‌هایی که دارای تحمل به خشکی هستند تکامل یافته و برتر از گندم معمولی باشند. محققان نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی در ژنوم DD گونه *Ae.tauschii* بسیار بالاتر از ژنوم DD گندم نان ایرانی است (Moosavi *et al.*, 2017). تنوع ژنتیکی مهمترین نیاز اصلاح نباتات است که ناشی از تکامل طبیعی است و یکی از مهمترین اجزای پایداری نظام‌های بیولوژیک می‌باشد (Pour-Aboghadareh, 2017). اهمیت ارزیابی تنوع ژنتیکی به این دلیل است که در کشاورزی نوین استفاده از واریته اصلاح شده با حداکثر کیفیت و عملکرد، موضوعی اجتناب‌ناپذیر و ضروری است که باعث کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود. یکنواختی ژنتیکی در گیاهان موضوعی نامطلوب بوده و باعث آسیب‌پذیری ژنتیکی گیاهان در برابر بیماری‌ها، آفات و عوامل محیطی می‌گردد (Fabriki-ourang *etal.*, 2022).

نشانگرهای مولکولی ابزارهایی کارآمد هستند که در جهت پیشرفت فرایند اصلاح گیاهان چشم‌انداز جدیدی را برای محققان فراهم کرده‌اند. بعضی از نشانگرها تأثیرپذیری از تغییرات محیطی ندارند و فراوانی بالای آنها از نظر تعداد و تنوع زیاد آنها از لحاظ ساختاری از مزایای آنها در تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی و نیز تشخیص هویت گیاهان شمرده می‌شود (Mirmohamadi & Golkar, 2019). در بین نشانگرهای مولکولی، ریزماهواره‌ها (SSR) از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این نشانگرها شامل واحدهای تکی تا شش‌تایی تکرارشونده‌ای هستند که در ژنوم بیشتر یوکاریوت‌ها پراکنده شده‌اند، به‌طوری‌که در هر ده کیلو جفت باز از توالی DNA حداقل یک توالی ریزماهواره‌ای دیده می‌شود (Litt&lutty, 1989; Daneshvar *et al.*,2020). به‌طورکلی نشانگرهای SSR به‌طور گسترده‌ای در ژنوم گیاهی ازجمله مناطق کدکننده و غیر کدکننده توزیع می‌شوند که بیشتر نشانگرهای SSR گزارش شده در گندم مربوط به نواحی کدکننده پروتئین است، در حالی که مناطق رونویسی غیرکدکننده ناشناخته باقی مانده‌اند. توالی‌های میکرو RNA (miRNAs) نقش کلیدی در تغییر بیان ژن تحت تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی دارند. امروزه تلاش‌های زیادی برای کشف هرچه بیشتر توالی‌های miRNA مشتق شده از نشانگرهای مولکولی SSR به دلیل اصلاح گونه‌های گندم مقاوم به انواع تنش‌ها انجام شده است. توالی‌های miRNA از لحاظ تکاملی بسیار حفاظت شده هستند، ازاین‌رو می‌توانند تنوع بیشتری در بین ژنوتیپ‌ها در مقایسه با نشانگرهای دیگر نشان دهند (Tyagi *et al.*, 2021). نشانگرهای SSR پرمصرف‌ترین نشانگرها هستند که به‌ویژه برای گونه‌های وحشی مفید می‌باشند. همچنین نشانگرهای SSR در مطالعات اندازه‌گیری تنوع براساس فاصله ژنتیکی، در مطالعات تکاملی بیش از همه برای استنتاج روابط زیرگونه، ساخت نقشه‌های ژنی، مکان‌یابیQTL، برآورد درجه خویشاوندی بین ژنوتیپ‌ها، کدگذاری برای شناسایی و مطالعات ساختار جمعیت، نقشه‌های ژنتیکی و تکاملی و در کل ابزاری برای اصلاح‌کنندگان است تا تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی را به هم ربط دهند (Vieria *et al.*, 2016).

مطالعات بسیار متنوعی در رابطه با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR در ارزیابی و بررسی تنوع ژنتیکی و آللی موجود در گندم و خویشاوندان وحشی آن در سایر نقاط جهان و ایران انجام شده است. Mehrabi و همکاران (۲۰۱۵) تنوع آللی مکانهای ریزماهواره ژنومی گندم نان در ۳۵ جمعیت *Ae. trincialis* را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره برگرفته از ژنوم A و D گندم نان بررسی کردند که در مجموع ۷۱ آلل برای تمامی مکان‌های SSR مشاهده شد که ۶۸ آلل دارای چند شکلی بودند و دامنه آلل‌ها از ۱ تا ۸ با میانگین ۴/۱۸ برای هر مکان ژنی متغیر بود. روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای نتوانست جمعیت‌ها را به‌طور کامل از هم تفکیک کند و نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد ۱۰۰ درصد تنوع کل مربوط به تنوع درون گروهی است و هیچ آلل اختصاصی برای جمعیت‌های ذکرشده دیده نشد. Shirvani و همکاران (۲۰۲۳) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی جو وحشی *H. spontaneum* را با استفاده از نشانگرهای EST-SSR بررسی کردند و نتایج نشان داد که تعداد آلل‌های تکثیر شده از ۲ تا ۴ آلل برای نشانگرها متفاوت بود و آغازگرهای مورد بررسی در مجموع ۴۰ آلل با میانگین ۲/۸۵ به ازای هر نشانگر تکثیر کردند. Amini و همکاران (۲۰۱۶) تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با مکانهای QTL دخیل در تحمل شوری در ۲۵ ژنوتیپ گندم نان را با استفاده از ۴۵ جفت نشانگر ریزماهواره مرتبط با شوری ارزیابی نمودند. در این تحقیق درمجموع ۹۵ آلل مشاهده شد که ۸۹ آلل دارای چند شکلی بودند، به‌طوری‌که تعداد آلل برای هر آغازگر از ۲ تا ۷ متغیر بود. میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) ۰/۲۵۸ و میانگین شاخص نشانگری ۰/۷۹ بود. به‌طورکلی نتایج بیان کرد که از بین نشانگرهای مورد بررسی ۷ نشانگر به‌طور نسبی از PIC و MI بیشتری برخوردار بوده و از قدرت تفکیک بالاتری در مقایسه با سایر آغازگرها برخوردار هستند و به عنوان نشانگرهای مفید برای بررسی تنوع ژنتیکی و

برنامه‌های به‌نژادی برای تنش‌های شوری استفاده می‌شوند. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی بین ۴۰ توده از جمعیت *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از پنج استان مختلف چین با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای SSR ارزیابی شد. با ۸ آغازگر استفاده شده، ۲۷ آلل با میانگین ۳/۳۷ برای هر آغازگر، حداکثر محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) برابر ۰/۶۳ و دامنه فراوانی آلل از ۰/۴۱ تا ۱ گزارش شد و براساس تجزیه خوشه‌ای جمعیت ۴۰ توده‌ای *Ae. tauschii* به سه گروه تفکیک گردید (Abbas *et al.*,2018).

هدف از این تحقیق، مطالعه تنوع آللی و ژنتیکی توده‌های مختلف *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف ایران و کشورهای دیگر با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر mir-SSR برای شناسایی و استفاده در برنامه‌های مدیریت ژرم‌پلاسم و استفاده از آن در برنامه‌های به‌نژادی و بررسی کارایی نشانگرهای mir-SSR در تفکیک تودهای *Ae. tauschii* مورد مطالعه بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش برای مطالعه تنوع ژنتیکی و آللی، از ۸۹ توده آژیلوپس متعلق به گونه تائوشی (*Ae. tauschii*) که بذر آنها از بانک ژن غلات دانشگاه ایلام (IUGB) تهیه و مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است، استفاده گردید. توده‌های مورد مطالعه به ۱۴ جمعیت مختلف شامل استان‌های (گیلان، اردبیل، آذربایجان‌شرقی، مازندران، آذربایجان‌غربی، خراسان، سمنان، گلستان) و تعدادی توده‌های بدون شناسه استانی از ایران بودند و تعدادی به کشورهای افغانستان، ارمنستان، ترکیه، آذربایجان و سوئد تعلق داشتند. پس از کشت بذرها و تولید گیاهچه جوان، استخراج DNA ژنومی از بافت برگ‌های تازه براساس روش CTAB انجام شد (Doyel & Doyle, 1987). برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دو روش اسپکتروفتومتری (Nanodrop, Thermo Scientific) و ژل آگارز یک درصد استفاده گردید.

جدول ۱- اطلاعات محل جمع‌آوری ۸۹ توده *Ae. tauschii* ارزیابی شده در این مطالعه

Table 1. Collection site information for 89 *Ae. tauschii* accessions evaluated in this study

Code	Gene bank No.	Collection site	Cluster No.	Code	Gene bank No.	Collection site	Cluster No.
2	39	Iran	1	65	386	Iran (Keailbar)	4
5	107	Iran (Gilan)	1	66	396	Iran (Mazandaran)	2
6	108	Iran	1	67	400	Iran (Karaj-Chaloos Road)	2
7	141	Iran	1	68	401	Iran (Noor)	2
8	143	Iran	1	69	402	Iran (Noor)	2
10	151	Iran (Ardabil-Sareyn)	1	70	404	Iran (Rasht-Talesh)	2
12	164	Iran (Astara- Ardabil)	1	71	405	Iran (Karaj-Chaloos Road)	2
13	193	Iran (Ahar-Kalibar)	1	72	429	Iran	2
18	238	Iran (Karaj-Chaloos Road)	1	73	1746	Iran (East Azarbaijan)	2
19	245	Iran (Karaj-Chaloos)	1	74	50006	Iran (West Azarbaijan)	2
20	247	Iran (Mazandaran-Amol)	1	75	50037	Iran (Khorasan)	2
21	249	Iran (Mazandaran)	5	76	50084	Iran (East Azarbaijan)	2
22	260	Iran (3km Astara)	1	77	50133	Iran (Khorasan)	2
23	261	Iran (Karaj-Chaloos Road)	1	78	50136	Iran (Khorasan)	2
26	273	Iran (Saren-Ardabil)	1	79	312	Iran (West Azarbaijan)	2
27	274	Iran (Chaloos)	1	81	562	Iran (Semnan)	2
28	276	Iran (20 km Behshahr)	1	84	667	Iran (East Azarbaijan)	2
29	279	Iran (Ahar- Tabriz)	1	86	804	Iran (Golestan)	2
30	289	Afghanistan	1	87	836	Iran (Mazandaran)	3

Code	Gene bank No.	Collection site	Cluster No.	Code	Gene bank No.	Collection site	Cluster No.
32	291	Azarbaijan	1	88	945	Iran (Mazandaran)	3
35	295	Turkey	1	90	1559	Iran (Semnan)	3
36	296	Armenia	1	94	1970	Iran (Khorasan)	3
37	297	Iran	1	96	2115	Iran (Mazandaran)	3
38	298	Iran	1	97	2120	Iran (Mazandaran)	3
40	300	Iran	4	99	Aladozgeh	Iran (Rasht)	3
41	302	Afghanistan	4	100	Aladozgeh	Iran (Rasht)	3
42	303	Turkey	4	101	Gilan	Iran (Rasht)	3
43	305	Iran	4	102	1	Iran	3
45	307	Iran	4	104	3	Iran	3
46	308	Azarbaijan	4	105	18	Iran	3
47	309	Iran	4	106	23	Iran (Rezvanshahr)	3
48	310	Iran	4	107	24	Iran (Rezvanshahr)	3
49	311	Sweden	4	109	26	Iran (J-ponel)	3
50	312	Iran	4	111	28	Iran (J-ponel)	3
51	313	Iran	4	112	29	Iran (J-ponel)	3
53	315	Iran	4	114	33	Iran (J-Rasht)	1
54	325	Iran (Karaj-Chaloos)	4	115	34	Iran (J-Rasht)	1
55	362	Armenia	4	116	35	Iran (J-Rasht)	1
56	365	Iran (Mazandaran)	4	118	43	Iran (Foman)	1
58	367	Iran (Keailbar)	4	C1	205	Iran (Ardabil)	1
59	369	Iran (Gilan)	1	C2	222	Iran (Golestan)	1
60	370	Iran	1	C4	381	Iran (Astara)	4
61	371	Iran	1	C5	382	Iran	4
62	374	Iran (Astane)	4	C6	2076	Iran	4
63	375	Iran (Dasht Meghan)	2				

آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه در دمای بهینه‌سازی شده برای هر آغازگر (بین ۵۷–۶۵)، بسط آغازگر (پلیمریزاسیون) به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه بود. پس از انجام واکنش تکثیر، محصول PCR با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۳ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با SafeView انجام و قطعات تکثیری توسط دستگاه Gel Documentation آشکارسازی شدند.

الگوهای باندی حاصل به صورت وجود باند (یک) و عدم وجود باند (صفر) و به صورت همبارز براساس تعداد آلل‌ها امتیازدهی شدند. در تحقیق ذکرشده اندازه آلل‌ها به ترتیب از کوچکترین با شماره ۱ تا بزرگترین با شماره ۵

برای بررسی تنوع ژنتیکی و آللی در توده‌های مختلف از ۳۲ جفت آغازگر mir-SSR استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر و تعیین دمای اتصال آغازگرها اجزای واکنش PCR شامل یک میکرولیتر DNA ژنومی، یک میکرولیتر آغازگر SSR رفت، یک میکرولیتر آغازگر SSR برگشت، ۷/۵ میکرولیتر Master Mix و ۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه شده در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی PCR در سیستم نشانگری مورد مطالعه شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشت‌سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال

در بین شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی یک سیستم نشانگری، شاخص PIC از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که در واقع شاخص ذکرشده به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آنها وابسته است و احتمال تشخیص چند شکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر را بین دو نمونه نشان می‌دهد (Powell *et al.*,1996). مقدار میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) محاسبه شده در این مطالعه برابر ۰/۸۱ بود که دامنه آن از ۰/۵۲ تا ۰/۹۵ برای آغازگرهای مختلف متفاوت بود. میزان شاخص نشانگری (MI) بدست آمده برای آغازگرهای مورد مطالعه بین ۰/۱۹ و ۴/۷ با میانگین برابر ۱/۸۲ متغیر بود. بررسی میزان قدرت تفکیک نشانگر (RP) نشان داد که آغازگرهای mir-SSR استفاده شده در این مطالعه دارای قدرت تمایز متفاوتی می‌باشند که کمترین و بیشترین قدرت تمایز آغازگری به ترتیب برابر ۰/۶۶ و ۳/۱۸ با میانگین RP برابر با ۱/۸۸ بود (جدول ۲).

به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی در ۱۴ جمعیت مورد بررسی مقادیر میانگین شاخص‌های ژنتیک جمعیت شامل تعداد آلل مشاهده شده (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I)، تنوع ژنی نی (He) و درصد مکان‌های چند شکل (PPL) برای هر جمعیت محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است. متوسط تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) در کل جمعیت‌های مورد بررسی برابر با ۱/۷۵، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) در کل برابر ۱/۵۴ و میانگین شاخص اطلاعات شانون (I) کل بدست آمده برابر با ۰/۴۱ بوده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود میانگین هریک از شاخص‌های Na، Ne، I، He و PPL به ترتیب با مقادیر ۲/۷۸، ۲/۰۳، ۰/۷۶، ۰/۴۵ و ۹۳/۷۵٪ در توده‌های ایران با ۲۲ ژنوتیپ نسبت به بقیه جمعیت‌ها بیشتر بود و این بدان معنی است که این جمعیت از تنوع درون گونه‌ای بالایی برخوردار است و این تنوع می‌تواند امکان یافتن ژن‌ها و آلل‌های مفید را برای به‌نژادگران گیاهی فراهم کند.

نامگذاری شدند و براساس آنها مقادیر هریک از شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی سیستم نشانگری مانند تعداد آلل‌های تکثیر شده، تعداد آلل‌های چند شکل، تعداد آلل‌های اختصاصی، محتوای چند شکلی (PIC)، شاخص نشانگری (MI) و شاخص تفکیک (RP) برای هر آغازگر محاسبه گردید. پارامترهای تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و درصد چند شکلی (PPL) با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex ver. 6.503 محاسبه شد (Peakall & Samouse, 2006). برای گروه‌بندی توده‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc2.02 e انجام شد.

نتایج

از ۳۲ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق ۳۱ آغازگر الگوی باندی واضح و قابل تفکیکی را تکثیر کردند که نشان‌دهنده وجود توالی آغازگرهای اختصاصی در توده‌های *Ae. tauschii* مورد مطالعه می‌باشد. آغازگر SSR4 در طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هیچ‌گونه قطعه‌ای را تکثیر نکرد، بنابراین هیچ باندی روی ژل آگارز مشاهده نشد. براساس نتایج حاصل، در مجموع ۱۰۴ آلل تکثیر شد که ۹۱ آلل از آنها چند شکل بودند و میانگین درصد چند شکلی برای آغازگرهای مورد مطالعه ۸۸/۹۱ محاسبه گردید. تعداد آلل-های تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر از ۲ تا ۵ آلل (جدول ۲) با میانگین تعداد آلل‌ها ۳/۳۵ برای هر جفت آغازگر متغیر بود که نشان‌دهنده قدرت متفاوت نشانگرها در شناسایی چند شکلی، در توده‌های *Ae. tauschii* مورد بررسی بود. به‌طورکلی آغازگرهای SSR12، SSR18، SSR23، SSR24، SSR30 و SSR31 با دو آلل کمترین و آغازگرهای SSR1، SSR7، SSR20، SSR27 وSSR28 با ۵ آلل بیشترین تعداد آلل را در میان آغازگرهای بررسی شده داشتند.

جدول ۲- مشخصات آغازگرها و نتایج حاصل از تکثیر آنها، تعداد آلل‌ها (TAB)، آلل‌های چند شکل (NPB)، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک نشانگر (RP)

Table 2. Characteristics of the primers and their amplification results, the number of alleles (TAB), polymorphic alleles (NPB), polymorphic information content (PIC), marker index (MI) and marker resolutions (RP).

Primer	Motif	TAB	NPB	PIC	MI	RP
SSR1	(GCAT)3	5	4	0.88	1.4	1.96
SSR2	(CATG)3	3	3	0.86	2.58	1.94
SSR3	(GAA)11	4	4	0.92	3.68	1.94
SSR5	(CT)7	3	3	0.77	2.31	0.66
SSR6	(AGTGGG)5	4	3	0.91	0.85	1.96
SSR7	(CTCCC)5	5	5	0.86	4.3	3.18
SSR8	(CT)7CA(CT)3(GT)4(GC)6	4	3	0.91	0.85	1.96
SSR9	(TC)16	4	4	0.92	3.68	1.92
SSR10	(AC)6ATGCAGCGC(GCAGG)4	4	3	0.92	3.86	1.98
SSR11	(GCCG)4	3	3	0.94	2.28	1.24
SSR12	(CTG)7	2	2	0.84	1.68	1.38
SSR13	(CT)13	3	3	0.73	2.19	1.94
SSR14	(AAATCC)3	4	3	0.86	0.8	1.96
SSR15	(CT)8	4	3	0.8	0.75	1.92
SSR16	(TGAGA)4	4	3	0.91	0.85	1.96
SSR17	(CGGC)4	3	2	0.8	0.29	1.98
SSR18	(TA)6	2	2	0.71	1.42	1.98
SSR19	(AG)6	2	2	0.69	1.38	1.98
SSR20	(TC)21	5	5	0.94	4.7	1.96
SSR21	(GATG)3	3	3	0.84	2.52	1.88
SSR22	(TTC)5	3	3	0.84	2.52	1.96
SSR23	(GAGC)3	2	2	0.55	1.1	1.98
SSR24	(TTC)4	2	2	0.75	1.5	1.98
SSR25	(CATG)3	3	3	0.86	2.58	1.90
SSR26	(AGCT)3	3	2	0.81	0.29	1.98
SSR27	(GGAGA)3	5	4	0.95	1.52	1.94
SSR28	(CCT)5	5	4	0.95	1.52	1.90
SSR29	(GGAC)3	3	2	0.52	0.19	1.98
SSR30	(GTA)4	2	2	0.55	1.1	1.98
SSR31	(CCCTCT)4	2	2	0.85	1.7	1.22
SSR32	(GAGAGG)4	3	2	0.71	0.26	1.96
Mean		3.35	2.69	0.81	1.82	1.88

(*al.*,2008). طبق محاسبات انجام شده بیشترین تعداد آلل اختصاصی برای جمعیت مازندران با ۶ آلل با استفاده از نشانگرهای SSR17، SSR30، SSR27 و SSR28 و کمترین تعداد آلل اختصاصی برای جمعیت‌های گیلان، اردبیل و آذربایجان‌شرقی با یک آلل با استفاده از نشانگرهای

تعداد آلل‌های اختصاصی نشان‌دهنده تعداد آلل‌های منحصر به فرد برای یک جمعیت خاص می‌باشد که در جدول ۴ تعداد باندهای اختصاصی مربوط به هر جمعیت به تفکیک هر آغازگر نشان داده شده است. آلل اختصاصی به آللی گفته می‌شود که فقط در یک یا تعدادی از افراد یک گروه بوده و در گروه‌های دیگر وجود نداشته باشد (Mohamadi *et*

توجیه می‌باشد (جدول ۵). بالا بودن تنوع ژنتیکی درون گروهی مشاهده شده بین توده‌های مورد بررسی می‌تواند به دلیل زمینه ژنتیکی بسیار متفاوت درون توده‌های *Ae. tauschii* و منشأ ژنتیکی متفاوت آنها باشد.

SSR26، SSR29 و SSR8 شناسایی شد.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۶ درصد از تغییرات کل مربوط به تنوع بین جمعیتی است، در حالی که ۹۴ درصد از تغییرات با تنوع درون جمعیتی قابل

جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I)، میزان هتروزیگوسیتی (He) و درصد چند شکلی (PPL) در توده‌های *Ae. tauschii* مورد بررسی

Table 3. Genetic diversity indices, the number of observed alleles (Na), number of effective alleles (Ne), Shannon's index (I), Expected heterozygosity (He), percentage of polymorphism (PPL) in studied *Ae. tauschii* accessions.

Population	Na	Ne	I	He	PPI %
Iran	2.78	2.03	0.76	0.45	93.75
Iran-Gilan	2.56	1.89	0.69	0.41	90.63
Iran-Ardabil	2.09	1.83	0.59	0.37	78.13
Iran- East Azarbaijan	2.15	1.79	0.31	0.2	81.25
Iran-Azandaran	2.75	2.02	0.75	0.44	90.63
Iran-West Azarbaijan	1.46	1.46	0.34	0.25	50.00
Iran-Khorasan	1.34	1.2	0.23	0.15	40.63
Iran-Semnan	1.18	1.18	0.19	0.14	28.13
Iran-Golestan	1.56	1.54	0.41	0.29	59.38
Afghanistan	1.34	1.34	0.26	0.18	50.37
Turkey	1.34	1.34	0.28	0.2	40.63
Azarbaijan	1.37	1.36	0.27	0.19	40.63
Armenia	1.56	1.55	0.4	0.28	56.25
Sweden	0.96	0.96	0.02	0.01	3.13
Total	1.75	1.54	0.41	0.27	56.47

جدول ۴- تعداد و شماره آلل‌های اختصاصی در توده و جمعیت‌های *Ae. Tauschii* مورد بررسی

Table 4. The number and specific alleles code in the 14 studied *Ae. tauschii* accessions and populations

Population	Accession code	Primer	No. Privet allele	Privet allele code
Iran	6	SSR6	1	1
Iran	104	SSR10	1	1
Iran-Gilan	109	SSR26	1	3
Iran-Ardabil	12	SSR29	1	1
Iran-East Azarbaijan	73	SSR8	1	1
Iran-Mazandaran	18	SSR17	1	2
Iran-Mazandaran	19	SSR30	1	2
Iran-Mazandaran	20	SSR30	1	2
Iran-Mazandaran	21	SSR17, SSR27, SSR30	3	2, 5, 3
Armenia	36	SSR28	1	5
Armenia	55	SSR14	1	1

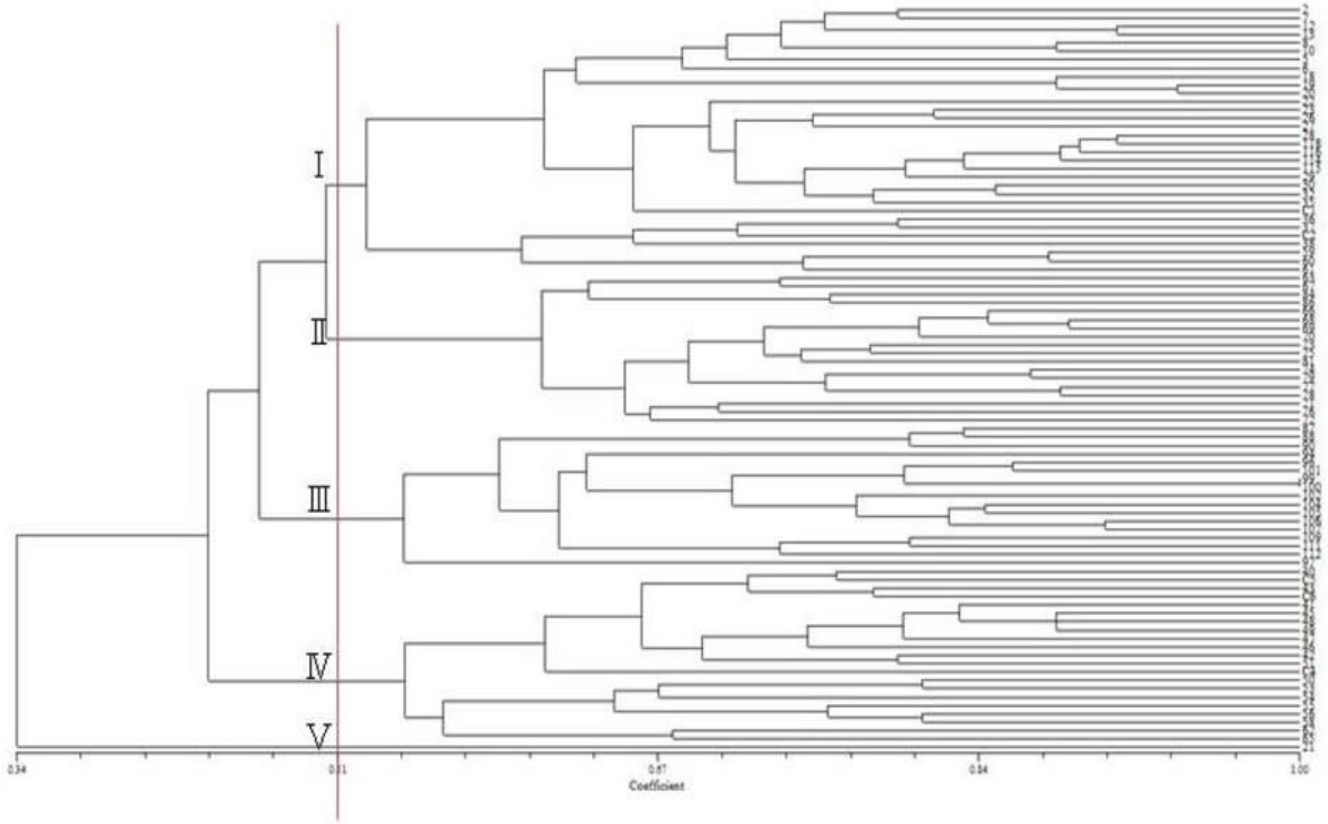
جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی براساس آغازگرهای mir-SSR در توده‌های *Ae. tauschii* مورد بررسی

Tabe 5. Analysis of molecular variance based on mir-SSR primers in *Ae. tauschii* accessions

Sources	df	SS	MS	Est. Variance	Variance %
Among pop	12	454.913	37.909	1.378	6
Within pop	75	2207.473	29.433	29.433	94
Total	87	2662.386		30.811	100

ایجاد خط برش در فاصله ۰/۵۱، نمودار درختی حاصل، ۸۹ توده را به پنج گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. گروه اول متشکل از ۳۲ توده که توده‌های غیرایرانی مانند افغانستان، ارمنستان، ترکیه و آذربایجان با توده‌هایی از استان‌های مختلف ایران در یک گروه قرار گرفتند، گروه دوم متشکل از ۱۸ توده و گروه سوم متشکل از ۱۷ توده و همه شامل توده‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف ایران بود، گروه چهارم متشکل از ۲۱ توده که توده‌های غیرایرانی ترکیه، افغانستان، ارمنستان، آذربایجان و سوئد در کنار توده‌های متعلق به نواحی مختلف ایران در کنار هم و در یک گروه قرار گرفتند و گروه پنجم فقط شامل تک توده ۲۱ (مازندران) بود (شکل ۱).

میزان تشابه ژنتیکی بین توده‌ها از طریق ماتریس شباهت ژنتیکی Nei محاسبه گردید که براساس داده‌های مربوط به آغازگرهای mir-SSR مورد بررسی این میزان از ۰/۵۳ تا ۰/۹۲۹ متغیر بود. کمترین میزان تشابه یا بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو توده از کشورهای سوئد و خراسان بود و در مقابل دو توده از استان‌های اردبیل و مازندران دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با یکدیگر بودند. با توجه به فاصله ژنتیکی بین تعدادی از توده‌های مورد بررسی، می‌توان در برنامه‌های هتروزیس و دورگ‌گیری بیشتر از این توده‌ها استفاده کرد. گروه‌بندی ۸۹ توده *Ae. tauschii* مورد مطالعه با تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم UPGMA و ضریب فاصله دایس انجام شد و دندروگرام آن در شکل ۱ نشان داده شده است. با

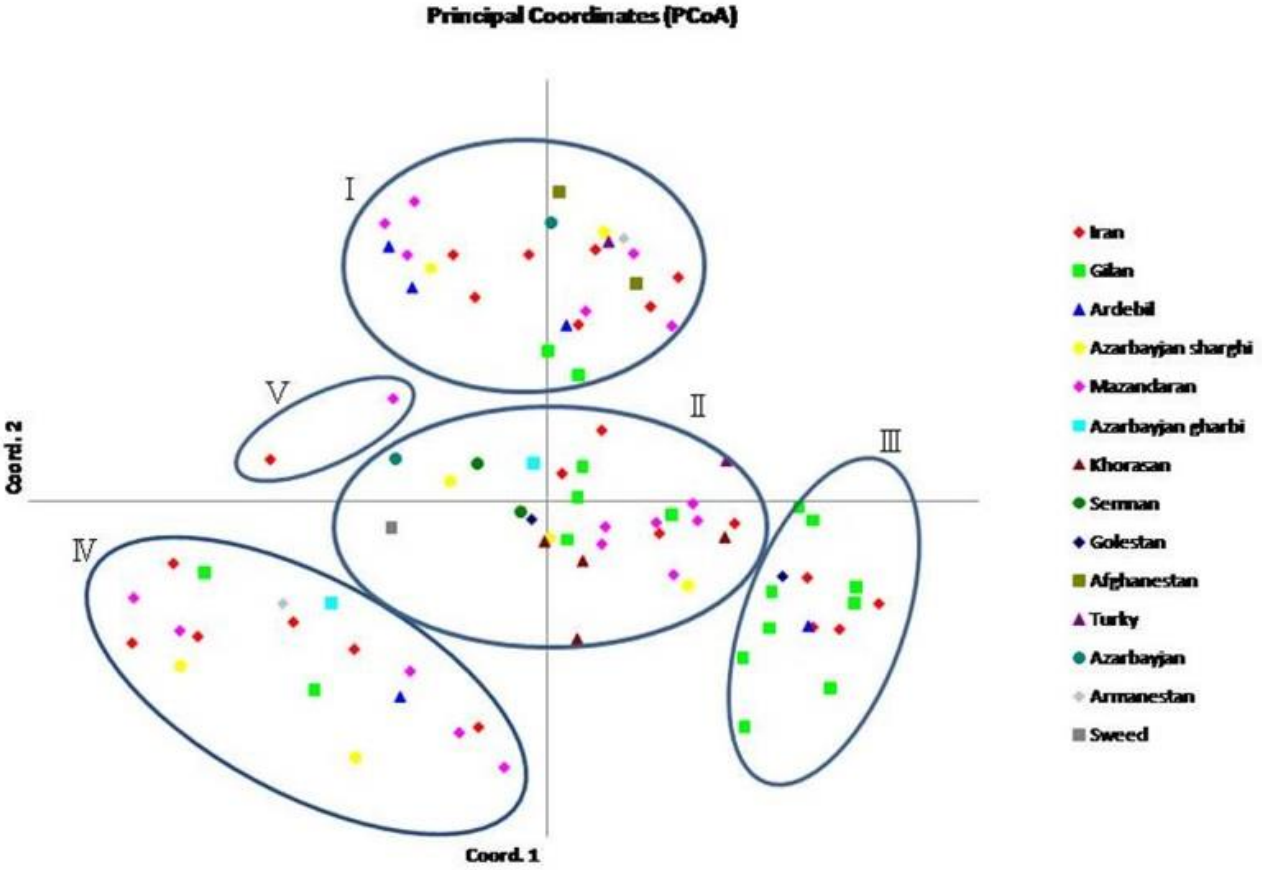


شکل ۱- دندروگرام ۸۹ توده ***Ae. tauschii*** با تجزیه خوشه‌ای به روش **UPGMA** (منشأ و مشخصات توده‌ها در جدول ۱ آمده است)

Figure 1. Dendrogram of 89 *Ae. tauschii* accessions using cluster analysis by UPGMA method. (The origin and characteristics of the accessions are listed in Table 1)

بای‌پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز توده‌ها به ۵ دسته کلی تقسیم‌بندی شدند و پراکنش توده‌ها به نحوی بود که ۱۴ جمعیت مورد بررسی نتوانستند به وضوح از هم تفکیک شوند. همچنین نتایج نشان داد سه مؤلفه نخست تجزیه به مختصات اصلی در مجموع ۴۱/۷۱ درصد از اطلاعات مولکولی را دربرداشتند که بیانگر پوشش ژنومی نسبتاً مناسب آغازگرهای مورد استفاده بود و این نتیجه دوباره نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگرهای mir-SSR در تفکیک توده‌های مورد مطالعه براساس ویژگی‌های ژنتیکی می‌باشد.

برای بررسی بیشتر تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی توده‌های مختلف *Ae. tauschii* از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) با استفاده از داده‌های مولکولی استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نتایج تجزیه خوشه‌ای تا حد زیادی مطابقت داشت و اختلافات جزئی در گروه‌بندی‌ها به این علت است که نمودار بای‌پلات با اطلاعات دو مؤلفه اول (برابر ۳۰/۶۸ درصد از اطلاعات کل داده‌ها) ترسیم شده است، در حالی که دندروگرام خوشه‌ای با استفاده از ۱۰۰ درصد اطلاعات داده‌ها ترسیم شده است (شکل ۲). در



شکل ۲- نمودار بای‌پلات ۸۹ توده ***Ae. tauschii*** با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی (**PCOA**) و تجزیه خوشه ای

Figure 2. Biplot diagram of 89 *Ae. tauschii* accessions using principal coordinate analysis (PCOA) and cluster analysis.

محاسبه گردید و تعداد آلل‌های تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر از ۲ تا ۵ آلل متغیر بود. مشابه این نتایج توسط Mirdrikvand و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی تنوع ژنتیکی

بحث

براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش، میانگین درصد چندشکلی برای آغازگرهای مورد مطالعه ۸۸/۹۱

می‌باشد. Ferreiral و همکاران (۲۰۱۶) میزان محتوای اطلاعات چندشکل را در جو برزیلی با استفاده از نشانگرهای SSR از ۰/۰۷ تا ۰/۸۶ با میانگین محاسبه شده برابر ۰/۵۷ برآورد کردند که نشان داد آغازگرهای مورد بررسی دارای اطلاعات متوسطی برای نشان دادن چند شکلی‌های جمعیت مورد مطالعه آنها می‌باشند. Daneshvar و همکاران (۲۰۲۰) نیز در آزمایشی میزان محتوای اطلاعات چند شکل را در دو گونه *Ae. tauschii* و *T. aestivim* با استفاده از نشانگرهای SSR بررسی کردند که در نتایج آنها نیز کمترین و بیشترین میزان PIC به ترتیب برابر ۰/۱۴ و ۰/۳۸ بود و نشان‌دهنده این است که نشانگرهای SSR مورد بررسی آنها نسبت به تحقیق ذکرشده دارای کارایی و قدرت تمایز بسیار کمتری هستند. Laosatit و همکاران (۲۰۲۲) میزان محتوای اطلاعات چند شکل را در جمعیتی از *Psophocarpus tetragonolobus* بدست آوردند که میزان PIC در آن از ۰/۱۴ تا ۰/۶۸ متغیر بود و میانگین بدست آمده برای آغازگرهای SSR در آن پژوهش نیز برابر ۰/۵۰ بود.

بررسی ارتباط بین باندهای اختصاصی و صفات مربوط به عملکرد گزینه مهمی است که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی بسیار مورد استفاده قرار گیرد، یا اینکه با استفاده از نشانگرهای با آلل اختصاصی برای جمعیت‌های مختلف می‌توان با تعداد کمتر نشانگر به‌طور مؤثر ژنوتیپ‌های مختلف را از هم تفکیک کرد. در این مطالعه ۱۳ آلل اختصاصی شناسایی شد که از این میان جمعیت مازندران بیشترین تعداد آلل اختصاصی را به خود اختصاص داد. در مطالعات Jamali-Rad و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ۱۲۳ آلل اختصاصی برای گروه‌های شش‌گانه گندم شناسایی شد که در بین نشانگرهای مورد مطالعه آنها بیشترین تعداد آلل اختصاصی برابر ۹ آلل و کمترین آن با یک آلل شناسایی شد. در مطالعات Mehrabi و همکاران (۲۰۱۵) تمام قطعات تکثیر شده در همه گروه‌ها موجود بود و هیچ آلل ریزماهواره ژنومی از میان جایگاه‌های مورد مطالعه آنها مختص به گروه خاصی نبود و هیچ آلل اختصاصی دیده نشد.

۲۵ ژنوتیپ گندم نان و دوروم دیم با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر SSR بود که دامنه تعداد آلل تکثیر شده توسط آغازگرهای SSR را بین ۲ تا ۵ نشان دادند که با نتایج بدست آمده از این تحقیق نیز همخوانی دارد. Mehrabi و همکاران (۲۰۱۵) تنوع آللی جایگاه‌های ریزماهواره ژنومی گندم نان را در ۳۵ جمعیت *Ae. trincialis* با استفاده از ۵۶ جفت نشانگر برگرفته از ژنوم D و A گندم نان بررسی کردند و نتایج نشان داد که تعداد آلل‌ها در دامنه ۱ تا ۸ با میانگین ۴/۱۸ آلل برای هر مکان ژنی قرار داشتند و در مجموع ۷۱ آلل برای تمام مکان‌های آغازگر SSR مشاهده شد که ۶۸ آلل دارای چندشکلی بودند. Babae و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تنوع آللی در ۶۴ لاین اصلاحی سویا با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر SSR در مجموع ۴۱ آلل برای مکان‌های ژنی شناسایی کردند که تعداد آلل‌ها از ۲ تا ۵ متغیر بود و میانگین تعداد آلل‌ها را ۲/۹۳ برآورد کردند. Jamali-Rad و همکاران (۲۰۰۸) تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی بین ۷۰ رقم گندم نان را براساس تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند که در مجموع ۳۹۰ آلل چند شکل با میانگین ۹/۲۶ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره در ژنوتیپ‌ها تکثیر گردید و تعدا آلل‌ها از ۳ تا ۱۸ متفاوت بوده است. در تحقیقات Targonskal و همکاران (۲۰۱۶) درصد چندشکلی در گیاه چاودار زراعی (*Secale cereale*) برابر ۹۳ درصد بیان شده است. همچنین Mehrabi و همکاران (۲۰۲۳) میانگین درصد چندشکلی گیاه جو وحشی (*H. spontaneum*) با استفاده از آغازگرهای EST-SSR را ۹۶/۴۲ درصد بیان کردند. با توجه به مقایسات انجام شده، می‌توان گفت که نشانگرهای mir-SSR به‌ویژه نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای ارزیابی ژنتیکی گیاه *Ae. trincialis* بسیار مناسب هستند.

نتایج حاصل از محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)، شاخص نشانگر (MI) و قدرت تفکیک (RP) در این تحقیق نشان داد که آغازگرهای مورد مطالعه قدرت تشخیص بالایی در تعیین فاصله ژنتیکی در مقایسه با سایر آغازگرهای دیگر دارند و نیز نشان‌دهنده کارایی بالا و انتخاب درست آنها در تمایز و ارزیابی توده‌های وحشی *Ae. trincialis* مورد بررسی

ذکرشده قابل پیش‌بینی بود. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی تا حد زیادی با نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت و در مجموع تأییدکننده تجزیه خوشه‌ای بدست آمده بود.

به‌طورکلی نتایج تجزیه‌های مختلف نشان‌دهنده سطح بالای تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های *Ae. tauschii* مورد مطالعه بود که این میزان تنوع می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد برای استفاده از این منابع ژرم‌پلاسمی در برنامه‌های به‌نژادی گندم مورد استفاده قرار بگیرد. تعداد آلل‌های اختصاصی بدست آمده در توده‌های مورد بررسی گزینه مهمی است که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی بسیار مورد استفاده قرار گیرد. شاخص‌های نشانگری حاصل از نتایج این تحقیق بیان کرد که نشانگرهای mir-SSR مورد استفاده از قدرت تفکیک و تمایز بالایی برخوردارند. مقدار بالای چندشکلی محاسبه شده در الگوهای باندی نیز نشان داد که استفاده از آغازگرهای mir-SSR تکنیک مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌ها و جمعیت‌های *Ae. tauschii* هستند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که سیستم نشانگری SSR دارای ظرفیت بالا در گروه‌بندی افراد براساس ساختار ژنتیکی آنها و نشان دادن روابط درون گونه‌ای آنها می‌باشد. در نتیجه می‌توان بیان کرد که این نشانگرها در مطالعات نقشه‌یابی ژنتیکی و آزمایش‌های تجزیه ارتباط از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و می‌توانند به‌طور مؤثری مورد استفاده قرار بگیرند. در مطالعات Mosavi-Shabestari و همکاران (۲۰۱۹) نتایج تجزیه واریانس مولکولی برای توده‌های گندم وحشی *Triticum boeiticum* با استفاده از نشانگرهای ISSR نیز نشان داد که ۹۴ درصد از تنوع برآورد شده مربوط به درون جمعیت‌ها و ۶ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها بود که با نتایج بدست آمده از این پژوهش کاملاً همخوانی دارد.

با توجه به الگوی گروه‌بندی توده‌های مورد بررسی با تجزیه خوشه‌ای دیده شد که در برخی موارد توده‌های *Ae. tauschii* براساس منشأ جغرافیایی خود در گروه‌های جداگانه‌ای از یکدیگر متمایز شده‌اند. حضور برخی توده‌ها از استانهای ایران و کشورهای مختلف در یک گروه دور از انتظار نبود، زیرا با توجه به شباهت اقلیم جغرافیایی و شرایط آب و هوایی بعضی از مناطق مختلف ایران به یکدیگر و همچنین به کشورهای دیگر، به‌ویژه کشورهای همسایه و یا قدمت کشت و احتمال حضور ارقام ایرانی و غیرایرانی در کنار هم در گذشته و تنوع ژنتیکی زیاد توده‌های مورد بررسی، نتیجه

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان محترم دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) به‌دلیل حمایت‌های مالی و معنوی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

Reference

- Abbas, A., Yu, H.Y., Cui, H. L., Yu, H.L., Li X.J., 2018. Assessment of the genetic diversity in *Aegilops tauschii* (coss) by using markers and morphological traits. Applied Ecology and Environmental Research, 18(5):7011-7020.
- Ahmadi, J., Fabriki-Ourang, S., Pour-Aboughadareh, A., 2019. Evaluation of genetic diversity in Aegilops populations possessing D genome using SCoT and TRAP marker. Modern Genetics Journal14:221-230. (In Persian).
- Amini, A., Qazvini, H., Amirnia, R., 2016. Study on salinity tolerance and allelic diversity of microsatellite markers associated with salinity in Iranian wheat genotypes. Crop Biotech16: 75-89. (In Persian).
- Babae, H., 2021. Evaluation allelic diversity in soybean breeding lines (*Glycin max* L.) using microsatellite markers (SSR). Journal of Crop Breeding 40: 122-132. (In Persian)
- Daneshvar, Z., Omidi, M., Etminan, A., Ebrahimi, A., 2020. Assessment of genetic diversity and population structure in two wild wheat species *Aegilops cylindrica* and *Ae. crassa* using microsatellite (SSR) markers. Modern Genetics Journal 15:267-276. (In Persian).

– Doyle, JJ., Doyle, KJ., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19:11–15.
– Eslamzadeh-Hesari, M., Rashidi, V., Omidi, M., Etminan, A., Ahmadzade, A., 2021. Evaluation of genetic diversity and population structure analysis in some *Aegilops* species using CBDP markers. Modern Genetics Journal 16: 1-8. (In Persian)
– Fabriki-ourang, S., Karimi, H., Ahmadi, J., Mehrabi, A., 2022. Fingerprinting of *Aegilops* species using genes-targeted derived and conserved regiens CoRAP markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 58: 207-220. (In Persian).
– Ferreiral,J., Fernando Pereira,J., Turchetto,C., Minella,E., Consoli, L., Delatorre, C., 2016. Assessment of genetic diversity in Brazilian barley using SSR markers. Genetics and Molecular Biology 39(1): 86-96.
– Laosatit, K., Amkul, K., Chankaew, S., Somta, P., 2022. Molecular genetic diversity of winged bean gene pool in Thailand assessed by SSR markers. Horticultural Plant Journal 8: 81-88.
– Litt, M. and Luty J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. The American Journal of Human Genetics 44:397-401.
– Mehrabi, A., Mohammadi, S., Valian, S., Khosroshahi, M., 2015. Genetic diversity of *Aegilops trincialis* L. accessions of Iran revealed by microsatellite markers. Iranian Journal of Field Crop Research 46: 237-245 (In Persian).
– Mirdrikvand, R., Khairalahi, R., Ebrahimi, A., Rezvani, M., 2015. Study of genetic diversity among some rainfed bread and durum wheat genotypes using SSR markers. Plant Genetics Researches 1:35-44. (In Persian).
– Mirmohamadi-maybodi, A., Golkar, P.,2019. Application of DNA molecular markers in plant breeding. Plant Genetic Researches, 6:1-30. (In Persian).
– Moosavi, S., Nazari, M., Maleki, M., 2017. Responses of above and below-ground traits of wheat wild relative (*Aegilops tauschii*) and bread wheat *(Triticum aestivum L.*) to imposed moisture stress. Desert 22(2): 209-220.
– Mosavi-Shabestari, A., Etminan, A., Khosroshaheli, M., 2019. Assessment of genetic diversity in *Triticum boeoticum* populations using CBDP and ISSR molecular markers. Modern Genetics Journal 14:163-170. (In Persian).
– Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology 6:288-295.
– Pour-Aboughadareh, A., Gadidi, O., Shoshtari, L., Poczae, P., Mehrabi, A., 2022. Association analysis for some biochemical traits in wild relatives of wheat under drought stress conditions. Gene 13:1491.
– Pour-Aboghadareh, A., 2017. Evaluation of wheat germplasm species in response to drought and salinity stresses using classical and molecular methods. Thesis for University of Imam Khomeini International, Iran. (In Persian)
– 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.
– Jamali-Rad, Sh., Mohammadi, A., Khodarahimi, M., Torchi, M.,2008. Investigating the genetic relationships of bread wheat cultivars based on the allelic diversity of microsatellite markers. Modern Genetics Journal 1:79-89. (In Persian)
– Shirvani, H., Mehrabi, A., Farshadfar, M., Safari, H., Arminian, A., Fatehi, F., 2023. Evaluation of genetic diversity of *H. Spontaneum* wild barley Populations using EST-SSR molecular marker. Journal of Crop Breeding, 45: 23-45. (In Persian)
– Targonskal, M., Bolibok-Brągoszewska, H., Rakoczy-Trojanowska, M., 2016. Assessment of genetic diversity in *Secale cereal* based on SSR markers. Plant Molecular Biology Report 34:37-51.
– Tyagi, S., Kumar, A., Gautam, T., Pandey, R., Roufmir, R., 2021. Development and use of miRNA-derived SSR markers to Study genetic diversity, population structure and characterization of genotypes for heat tolerance breeding in wheat varieties. Plos one 16(2): 1-17.
– Vieria, M., Santini,L., Diniz, A., Munhoz, C., 2016. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. Genetic and Molecular Biology 39(3):312-328.