

## بررسی تنوع مولکولی در لاین‌های اصلاحی گندم دوروم با استفاده از

### نشانگرهای SCoT

#### Evaluation of molecular diversity in breeding lines of durum wheat using SCoT markers

نصیبه شایگان<sup>۱</sup>، علیرضا اطمینان<sup>۲\*</sup>، اسلام مجیدی هروان<sup>۱</sup>، رضا عزیزی نژاد<sup>۱</sup>، رضا محمدی<sup>۳</sup>

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

۳- دانشیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، معاونت سرارود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، کرمانشاه، ایران

Shaygan N<sup>1</sup>, Etminan A<sup>\*2</sup>, Majidi Hervan E<sup>1</sup>, Azizi Nezhad R<sup>1</sup>, Mohammadi R<sup>3</sup>

1- PhD Student, Professor, Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

3- Associate Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Sararood Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alietminan55@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

#### چکیده

ارزیابی تنوع ژنتیکی در یک منبع ژرم‌پلاسمی در حفاظت مؤثر از ذخایر ژنتیکی اهمیت داشته و به کوتاه شدن مدت زمان برنامه‌های به‌نژادی کمک می‌نماید. تنوع ژنتیکی نقش بسیار مهمی در کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان دارد. در مطالعه‌ی حاضر، ۹۶ ژنوتیپ گندم دوروم برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از ۱۲ آغازگر SCoT مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که آغازگرهای SCoT، در مجموع ۷۶ باند چند شکل با متوسط ۵/۴۲ باند به ازای هر آغازگر در جمعیت مورد بررسی تکثیر نمودند. میانگین مقادیر شاخص نشانگر (MI) و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرهای SCoT به‌ترتیب ۰/۴۶ و ۲/۵۱ به‌دست آمد و نشان داد که نشانگرهای SCoT از کارایی بالایی در شناسایی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسِم گندم دوروم برخوردارند. برآورد تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، آلل مؤثر (Ne)، شاخص شانون (I) و میزان هتروزیگوسی (H) نشان داد که لاین‌های با منشأ ICARDA در مقایسه با لاین‌های با منشأ CIMMYT از میزان تنوع ژنتیکی بیش‌تری برخوردارند. گروه‌بندی لاین‌های مورد بررسی با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و الگوریتم Neighbor-joining لاین‌های مورد بررسی را تا حد زیادی بر اساس منشأ آن‌ها دسته‌بندی نمود. این نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در لاین‌های مورد مطالعه وجود داشته و نشانگرهای SCoT ابزاری مناسب برای مطالعه تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسِم گندم دوروم هستند.

#### واژه‌های کلیدی

پلی‌مورفیسم

تنوع ژنتیکی

گندم دوروم

نشانگر SCoT

گندم دوروم (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) گونه‌ای تتراپلوئید است که برای تهیه ماکارونی استفاده می‌شود و حدود ۱۰٪ کل سطح زیر کشت جهانی گندم را به خود اختصاص داده است (Lozhkin et al. 2020). گندم دوروم، در مقایسه با گندم نان سازگاری بهتری در شرایط اقلیمی نیمه‌خشک از خود نشان می‌دهد و مناطق مدیترانه‌ای، حدود ۶۰ درصد از گندم دوروم جهان را تولید می‌کنند (Lozhkin et al. 2020). در حال حاضر کشور ایتالیا از بزرگ‌ترین کشورهای تولید کننده گندم دوروم می‌باشد (Hammami and Sissons 2020).

پیشرفت در به‌نژادی گندم که غالباً با گزینش و خالص‌سازی مخلوط واریته‌های بومی و یا جمعیت‌های حاصل از دورگ‌گیری لاین‌های مطلوب انجام می‌گیرد، سبب کاهش تنوع ژنتیکی یا به اصطلاح فرسایش ژنتیکی شده است. با توجه به اهمیت این محصول و همچنین ضعیف شدن پایه ژنتیکی ارقام زراعی، به‌نژادگران همواره به دنبال اصلاح ارقام گندم و توسعه و بهبود ساختار ژنتیکی آن بوده‌اند. ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی برای برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت از ذخایر توارثی کاربرد حیاتی دارد (Bagheri et al. 1996). بررسی تنوع ژنتیکی از لحاظ کمک به مدیریت مؤثر و حفاظت از منابع ژرم‌پلاسمی اهمیت بالایی دارد و امکان شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم و مورد نظر را برای به‌نژادگران فراهم می‌سازد. علاوه بر آن، مطالعه الگوپذیری تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی توده‌ها نشان‌دهنده سازگاری احتمالی آن‌ها با محیط‌های متفاوت است (Mohammadi and 2003, Pradeep et al. 2002, Prasanna).

در واقع، مطالعه تنوع ژنتیکی هدفی ارزشمند برای حفاظت از گونه‌ها می‌باشد که در انتخاب افراد برای ورود ژن‌های مطلوب از ژرم‌پلاسم به درون پایه ژنتیکی نقشی مؤثر دارند. ورود ژن‌های مطلوب به داخل جمعیت‌ها می‌تواند کمیت و کیفیت محصولات را تحت تأثیر قرار دهد (Rao and Hodgkin 2002). در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی محصولات زراعی مختلف و از جمله گندم دوروم مطالعات زیادی انجام شده است (Golabadi and 2003, Farahani; Mangova and Petrova 2007; Singh 2003; Arzani).

Arzani 2007). امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی در تجزیه تنوع ژنتیکی و بررسی روابط بین گونه‌ای استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر چندین سیستم نشانگری جدید مبتنی بر PCR از جمله نشانگرهای هدفمند ژنی SCoT توسعه یافته است. نشانگرهای SCoT از جمله نشانگرهای نوظهور در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت محسوب می‌شوند. این نشانگرها همراه با دیگر نشانگرهای هدفمند ژنی نظیر CDBP در بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار جمعیت در انواع ژرم پلاسم زراعی و وحشی گندم مورد استفاده قرار گرفته‌اند و با توجه به گزارش‌های موجود از کارایی بالاتری در مقایسه با نشانگرهای پرکاربردی مانند ISSR برخوردار بوده‌اند (Etminan et al. 2016; Etminan et al. 2018). علاوه بر این، هزینه‌های مناسب و مقرون به صرفه، تکرارپذیری بالا و ارائه میزان بالایی از چندشکلی سبب شده تا این سیستم نشانگری بتواند در مطالعات مرتبط با تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و حتی در مکان‌یابی صفات کمی و هم‌چنین اشباع نقشه‌های ژنتیکی مورد استفاده داشته باشد (Collard and 2008, Mackill). از نشانگر SCoT در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی در گیاهان دارویی مانند سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) (Mirzaei and Mirzaghaderi 2017)، و گیاهان زراعی مانند برنج (Gorji et al. 2011) و سیب‌زمینی (Collard and Mackill 2009) نیز استفاده شده است. در مطالعات صورت گرفته بر روی ژرم پلاسم گندم با استفاده از نشانگرهای نوظهور نیز مشخص شده که نشانگرهای هدفمند ژنی مانند SCoT و CDBP در انگشت‌نگاری توده‌های گندم دارای عملکرد بسیار خوبی هستند؛ به‌طوری‌که این نشانگرها می‌توانند برای سایر مطالعات ژنتیکی در گندم مورد استفاده قرار گیرند (Etminan et al. 2017; Etminan et al. 2019; Hamidi et al. 2014). از طرفی مطالعات جدید، کارایی نشانگرهای SCoT را در بررسی تنوع ژنتیکی گندم و اجداد وحشی آن را تأیید کرده است (Por-Aboghatareh et al. 2018; Heidari et al. 2017). در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های مختلف آزیلوپس ایران با استفاده از دو سیستم نشانگری SCoT و TRAP نشانگرهای SCoT به‌عنوان نشانگرهایی قابل اعتماد، آگاهی بخش و با کارایی بالا در شناسایی چندشکلی

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ گندم دوروم شامل لاین‌های اصلاحی و ارقام شاهد دریافت شده از معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم (ایستگاه سرارود) واقع در کرمانشاه مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات لاین‌های اصلاحی گندم دوروم ارزیابی شده به همراه منشأ آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

موجود در ژرم پلاسما خویشاوندان وحشی گندم معرفی شدند که با توجه به قابلیت‌هایی که دارند می‌توانند در مطالعات ساختار جمعیت نیز مورد استفاده قرار گیرند (Ahmadi et al. 2019). در این مطالعه، از نشانگرهای SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی در ۹۶ ژنوتیپ گندم دوروم شامل ۵۴ لاین اصلاحی (BL) با منشأ (ICARDA)، ۳۸ لاین اصلاحی با منشأ (CIMMYT) و چهار ژنوتیپ شاهد (check) استفاده شد.

جدول ۱- کد شناسایی، منشأ و مشخصات ژنومی لاین‌های مورد ارزیابی

| No. | Variety / Line                      | Type            | Origin | No. | Variety / Line                 | Type     | Origin |
|-----|-------------------------------------|-----------------|--------|-----|--------------------------------|----------|--------|
| 1   | Mrf1/Stj2//Gdr2/Mgnl1/3/Bcrch1      | BL <sup>۱</sup> | ICARDA | 49  | Stj3//Bcr/Lks4/3/Ter3/4/       | BL       | ICARDA |
| 2   | Ter1//Mrf1/Stj2/3/Icasyr1           | BL              | ICARDA | 50  | Icarasha1//Quabrach3/          | BL       | ICARDA |
| 3   | Icarasha2 (Stj3//Bcr/Lks4/3/Ter3)   | BL              | ICARDA | 51  | Saji (check)                   | Cultivar | Iran   |
| 4   | Adnan1//Mgnl3/Ainzen1               | BL              | ICARDA | 52  | Zahab (check)                  | Cultivar | Iran   |
| 5   | Geromtel1/IRANYT053//Mgnl3/Ainze    | BL              | ICARDA | 53  | SRN-1/KILL//2*FOLTA-1 (check)  | AL       | CIMMYT |
| 6   | IcamorTA0462/4/Gdr2//SwAlg/Gdr1-    | BL              | ICARDA | 54  | Imren (check)                  | AL       | Turkey |
| 7   | IcamorTA0471//IcamorTA0459/Arisl    | BL              | ICARDA | 55  | Miki3 (Stj3//Bcr/Lks4)         | BL       | ICARDA |
| 8   | IcamorTA041/4/IcamorTA0469/3/Bcr    | BL              | ICARDA | 56  | Mrb3/Tboeoticum500648/         | BL       | ICARDA |
| 9   | Waha (Plc/Ruff//Gta/Rtte)           | BL              | ICARDA | 57  | Mrb3/Tboeoticum500648/3/ICAM/A | BL       | ICARDA |
| 10  | Mrb3/Mna1//Ter1/3/IcamorTA0459/     | BL              | ICARDA | 58  | SwAlgia/Gd181//Ch158/3/Marsyr3 | BL       | ICARDA |
| 11  | Maamouri1/5/IcamorTA0462/4/Stj3     | BL              | ICARDA | 59  | ALTAR 84                       | BL       | CIMMYT |
| 12  | Azeghar2/5/IcamorTA0462/4/Stj3      | BL              | ICARDA | 60  | SORA/2*PLATA_12/3/SOR          | BL       | CIMMYT |
| 13  | Mgnl3/Ainzen1/3/Bcr/Gro1//Mgnl1     | BL              | ICARDA | 61  | ALTAR 84/STINT//SILVER_45/3    | BL       | CIMMYT |
| 14  | Ossl1/Stj5/5/Bicrederaa1/4          | BL              | ICARDA | 62  | CAMAYO//HYDRANASSINIA          | BL       | CIMMYT |
| 15  | Omrabi5 (Jori c69/Hau)              | BL              | ICARDA | 63  | ALTAR 84/BINTEPE 85D           | BL       | CIMMYT |
| 16  | Azeghar1/6/Zna1/5/Awl1/4/Ruff/1     | BL              | ICARDA | 64  | PLATA_7//ILBOR06/3*MOJ         | BL       | CIMMYT |
| 17  | Aghrass1/3/HFN94N8/Mrb5//           | BL              | ICARDA | 65  | PLATA_7//ILBOR_1//SOMAT_3      | BL       | CIMMYT |
| 18  | Ouasloukos1/5/Azn1/4/               | BL              | ICARDA | 66  | MINIMUS/COMB DUCK_2C           | BL       | CIMMYT |
| 19  | Ter1/3/Stj3//Bcr/Lks4/4/Aghrass1/3  | BL              | ICARDA | 67  | MIRADOUX/3/AG 1-22/2*ACO8      | BL       | CIMMYT |
| 20  | Ter1/3/Stj3//Bcr/Lks4/4             | BL              | ICARDA | 68  | CBC 509 CHILE/5/2*AJAIA        | BL       | CIMMYT |
| 21  | Korifla/AegSpeltoidesSyr//Amedakul  | BL              | ICARDA | 69  | STORLOM/3/RASCON_37/TARRO      | BL       | CIMMYT |
| 22  | Korifla/AegSpeltoidesSyr//Mrb5      | BL              | ICARDA | 70  | BRENNUR/CIRNO C 2008           | BL       | CIMMYT |
| 23  | Korifla/AegSpeltoidesSyr//Loukos    | BL              | ICARDA | 71  | GEROMTEL-3/7/ALTAR 84/B        | BL       | CIMMYT |
| 24  | Korifla/AegSpeltoidesSyr//Amedaku   | BL              | ICARDA | 72  | GERUFTEL-1//GUAYACAN           | BL       | CIMMYT |
| 25  | Younes/TdicoAlpCol//Korifla         | BL              | ICARDA | 73  | CHILE/5/2*AJAIINIA/GUANAY/     | BL       | CIMMYT |
| 26  | Waha (Plc/Ruff//Gta/Rtte)           | BL              | ICARDA | 74  | SOOTY_9/RASCON_37//GUAYAC      | BL       | CIMMYT |
| 27  | Korifla/AegSpeltoidesSyr//Lahn      | BL              | ICARDA | 75  | INIA/GUANAY//PORRON_4/BEJA     | BL       | CIMMYT |
| 28  | T.dic.Crosses61/4/Quarmal/Gbch2/3   | BL              | ICARDA | 76  | INIA/GUANAY//PORRON_4/         | BL       | CIMMYT |
| 29  | Younes1/6/Ouasloukos1/5             | BL              | ICARDA | 77  | INIA/GUANAY/8/GED              | BL       | CIMMYT |
| 30  | Icarasha1/T.Aeg.Crosses             | BL              | ICARDA | 78  | CNDO/VEE//PLATA_8/3/6*         | BL       | CIMMYT |
| 31  | Terbol975/Gerufel2/7/Icasyr1//Mrf2/ | BL              | ICARDA | 79  | RANCO//CIT71/CII/3/COMDK       | BL       | CIMMYT |
| 32  | Icamilmus1/3/Marsyr3                | BL              | ICARDA | 80  | RANCO//CIT71/CII/3/COMDK/4/    | BL       | CIMMYT |
| 33  | Icasyr1/3/Gcn//Stj/Mrb3/4/Mgnl3/A   | BL              | ICARDA | 81  | 1A.1D 5+1-06/3*MOJO//RCOL/4    | BL       | CIMMYT |

<sup>1</sup> Breeding lines

|    |                                     |    |        |    |                              |    |        |
|----|-------------------------------------|----|--------|----|------------------------------|----|--------|
| 34 | Marsyr3/Murlagost2//T.              | BL | ICARDA | 82 | CBC 509 CHILE/6/ECO/CMH7     | BL | CIMMYT |
| 35 | Waha//Azeghar2/RedSeedTer112        | BL | ICARDA | 83 | CANELO_8//SORA/2*PLATA_      | BL | CIMMYT |
| 36 | Icasyr1/3/Bcr/Sbl5//T.urartu/4/T.Ae | BL | ICARDA | 84 | CANELO_8//SORA/2*PLATA_12/4/ | BL | CIMMYT |
| 37 | Icarasha2 (Stj3//Bcr/Lks4/3/Ter3)   | BL | ICARDA | 85 | ALTAR 84/BINTEPE 85/3        | BL | CIMMYT |
| 38 | Marsyr3/3/Gcn//Stj/Mrb3/4/T.Aeg.Cro | BL | ICARDA | 86 | BYBLOS/6/PLATA_6/GREEN_17/3/ | BL | CIMMYT |
| 39 | Marsyr3//Saadi1989/Chan/3/T.Aeg.    | BL | ICARDA | 87 | BYBLOS/6/TPDY_18/FOCHA_1//   | BL | CIMMYT |
| 40 | ICAMORTA0469/4/ICAMORTA0463         | BL | ICARDA | 88 | PLATA_10/6/MQUE/4/USDA5      | BL | CIMMYT |
| 41 | Jk/Ch1613//TpolonicumIG97746        | BL | ICARDA | 89 | ATIL/3/KNIPA/ /PLANETA/TRILE | BL | CIMMYT |
| 42 | T.Aeg.Crosses/Atlas2                | BL | ICARDA | 90 | OROBEL//BUSHEN_4/2*GREEN     | BL | CIMMYT |
| 43 | Jk/Ch1523//Atlas2/3/Mrb5/Lahaucan   | BL | ICARDA | 91 | MÂALI/10/ALTAR 84/CMH82A     | BL | CIMMYT |
| 44 | Jk/Ch1604//Ysf1/Otb6/3/Adnan2       | BL | ICARDA | 92 | MOHAWK/4/DUKEM_1//PATKA      | BL | CIMMYT |
| 45 | Icamilmus1/3/Marsyr3//Saadi1989/    | BL | ICARDA | 93 | GUAYACAN INIA/2*SNITAN/      | BL | CIMMYT |
| 46 | Mgnl3/Aghrass2/4/IcamorTA0462/      | BL | ICARDA | 94 | ALTAR 84/STINT//SILVER_      | BL | CIMMYT |
| 47 | Icasyr1//Mrf2/T.d                   | BL | ICARDA | 95 | PLATA_7//LBOR_1//SO          | BL | CIMMYT |
| 48 | Icasyr1//Mrf2/T.dids20123/6/        | BL | ICARDA | 96 | CBC 509 CHILE/6/ECO/CM       | BL | CIMMYT |

Safeview II (Co.LTD) آشکارسازی و سپس بر اساس وجود یا عدم وجود باند به ترتیب به صورت یک و صفر امتیازدهی شدند. شاخص‌های کارایی نشانگر همچون محتوای اطلاعات چندشکل<sup>۱</sup> (PIC)، شاخص نشانگر<sup>۲</sup> (MI) و قدرت تمایز<sup>۳</sup> (Rp) بر اساس روابط ارائه شده توسط (Powell et al. 1996) محاسبه شد. به منظور تعیین سهم واریانس ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx (Peakall and Smouse 2006) انجام شد.

جهت بررسی و مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از جمعیت‌ها پارامترهای ژنتیکی نظیر درصد لوکوس‌های چندشکل، شاخص شانون، تعداد آلل‌های مؤثر و ... برآورد شدند. گروه‌بندی لاین‌های مورد بررسی بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به روش Neighbor-joining و همچنین تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار DARwin (Perrier et al. 2003) انجام شد.

### نتایج و بحث

در جدول ۲ خلاصه‌ای از نتایج به دست آمده از الگوهای باندی تکثیر یافته توسط ۱۲ آغازگر مورد استفاده در این پژوهش نشان داده شده است. تعداد کل قطعات تکثیری چندشکل با میانگین

به منظور استخراج DNA ژنومی، ابتدا بذر هر یک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی در گلدان کشت شد و پس از رشد گیاهچه‌های مورد نیاز، استخراج DNA از برگ‌های جوان بر اساس دستورالعمل CTAB انجام شد (Doyle and Doyle 1987). کیفیت DNA استخراجی توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از ۱۵ آغازگر SCoT استفاده شد اما تنها ۱۲ مورد از این آغازگرها الگوهای باندی قابل امتیازدهی ایجاد نمودند که مشخصات هر کدام از آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر (شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix 2X PCR (Ampliqon, ID: 5200300-1250)، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر آغازگر (با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BIORAD مدل T-100 انجام شد. شرایط دمایی واکنش‌های PCR به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه برای واسرشت‌سازی، دمای بهینه شده برای هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و دمای ۷۲ سلسیوس به مدت دو دقیقه جهت همانند سازی و در نهایت ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس جهت بسط نهایی تنظیم شد. محصول واکنش‌های تکثیری بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE تفکیک و با استفاده از رنگ‌آمیزی با (kiagen Teb

<sup>1</sup> Polymorphism information content

<sup>2</sup> Marker Index

<sup>3</sup> Resolving power

استفاده برای ارزیابی ژرم پلاسما مطالعه باشد و بر این اساس می‌توان آغازگرهای مناسب با حداکثر چندشکلی را برای ژرم پلاسماهای مشابه در مطالعات آتی توصیه نمود. لازم به ذکر است در یک مطالعه به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در گندم دوروم با استفاده از همین نشانگر متوسط شاخص PIC برابر ۰/۳۹ گزارش شد که نتایج این تحقیق را تایید می‌کند (Heidari et al. 2017). همچنین در مطالعه دیگری در استفاده از دو سیستم نشانگری ISSR و SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌هایی از گندم دوروم نشانگرهای SCoT بر اساس مقادیر شاخص‌های PIC، RP و MI به‌عنوان نشانگرهایی کارآمد در شناسایی چندشکلی موجود در ژرم پلاسما گندم دوروم معرفی شدند (Etminan et al. 2016).

با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که آغازگرهای 4-SCoT و SCoT-8 به‌ترتیب با مقادیر ۴/۸۷ و ۹/۱۸ دارای کم‌ترین و بیشترین میزان قدرت تمایز (Rp) در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در لاین‌های مورد مطالعه بودند. شاخص MI نیز برای آغازگرهای مورد استفاده در دامنه‌ای ۱/۷۰ (SCoT-24) تا ۳/۱۵ (SCoT-8) با میانگین ۲/۵۱ متغیر بود.

۵/۴۲ باند به‌ازای هر آغازگر از چهار باند (مربوط به آغازگرهای SCoT-4 و SCoT-24) تا هفت باند (مربوط به آغازگر SCoT-8) متغیر بود. در بین شاخص‌های تعیین‌کننده کارایی یک سیستم نشانگری، شاخص PIC از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در واقع این شاخص به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته بوده و احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر را بین دو نمونه نشان می‌دهد (Powell et al. 1996). کارایی یک نشانگر مولکولی بستگی به میزان چندشکلی ایجاد شده و قدرت تمایز افراد مورد مطالعه دارد و در نشانگرهای غالب، آغازگرهایی که مقدار PIC آن‌ها در محدوده ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ باشد از سودمندی خوبی برخوردار هستند و داده‌های حاصل از آن‌ها در مطالعات تنوع قابل اعتماد می‌باشند (Botstein et al. 1980). در این تحقیق بیشترین میزان محتوی اطلاعات چندشکلی مربوط به آغازگرهای SCoT-2 و SCoT-1 با مقدار ۰/۴۹ و کمترین میزان آن مربوط به آغازگر SCoT-21 با مقدار ۰/۴۲ به‌دست آمد و میانگین PIC برابر ۰/۴۶ محاسبه شد که نشان‌دهنده کارایی بسیار خوب آغازگرهای مورد بررسی است. بالا بودن درصد محتوی اطلاعات چندشکلی نشان دهنده انتخاب صحیح آغازگرهای مورد

جدول ۲- مشخصات توالی آغازگرهای SCoT و نتایج حاصل از تکنیک PCR در ۹۶ ژنوتیپ گندم دوروم مورد مطالعه

| شاخص نشانگر | محتوی اطلاعات چندشکلی | قدرت تمایز | تعداد قطعات چندشکلی | تعداد قطعات تکثیر شده | Sequence (Primer)  | آغازگر  |
|-------------|-----------------------|------------|---------------------|-----------------------|--------------------|---------|
| ۲/۹۵        | ۰/۴۹                  | ۶۷۲        | ۶                   | ۷                     | CAACAATGGCTACCACCC | SCoT-2  |
| ۲/۹۵        | ۰/۴۹                  | ۶۷         | ۶                   | ۶                     | CAACAATGGCTACCACCG | SCoT-3  |
| ۱/۹         | ۰/۴۷                  | ۴/۸۷       | ۴                   | ۶                     | CAACAATGGCTACCACCT | SCoT-4  |
| ۲/۳۹        | ۰/۴۷                  | ۶          | ۵                   | ۷                     | CAACAATGGCTACCACGA | SCoT-5  |
| ۲/۴         | ۰/۴۸                  | ۵/۹۵       | ۵                   | ۶                     | CAACAATGGCTACCACGG | SCoT-7  |
| ۳/۱۵        | ۰/۴۵                  | ۹/۱۸       | ۷                   | ۷                     | CAACAATGGCTACCACGT | SCoT-8  |
| ۲/۸۶        | ۰/۴۷                  | ۷/۲۹       | ۶                   | ۷                     | CAACAATGGCTACCAGCA | SCoT-9  |
| ۲/۸۵        | ۰/۴۷                  | ۷/۳۱       | ۶                   | ۷                     | AAGCAATGGCTACCACCA | SCoT-11 |
| ۲/۶۵        | ۰/۴۴                  | ۸/۰۲       | ۶                   | ۶                     | ACGACATGGCGACCAACG | SCoT-12 |
| ۲/۳۴        | ۰/۴۶                  | ۶/۲۵       | ۵                   | ۶                     | ACGACATGGCGACCACCG | SCoT-14 |
| ۲/۱۸        | ۰/۴۳                  | ۶۷۷        | ۵                   | ۷                     | ACGACATGGCGACCGCGA | SCoT-15 |
| ۲/۱۰        | ۰/۴۲                  | ۶/۹۷       | ۵                   | ۶                     | CACCATGGCTACCACCAT | SCoT-21 |
| ۱/۷         | ۰/۴۴                  | ۵/۳۳       | ۴                   | ۷                     | CCATGGCTACCACCGCCA | SCoT-24 |
| ۲/۸۲        | ۰/۴۷                  | ۷/۴۵       | ۶                   | ۶                     | ACAATGGCTACCACCATC | SCoT-26 |
| ۳۵/۲۴       | ۶/۴۵                  | ۹۴/۸۱      | ۷۶                  | جمع                   |                    |         |
| ۲/۵۱        | ۰/۴۶                  | ۶۷۷        | ۵/۴۲                | میانگین               |                    |         |

جدول ۳- نتایج واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از آغازگر SCoT

| درصد واریانس تبیین شده | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | واریانس تخمینی | درصد واریانس تبیین شده |
|------------------------|------------|--------------|----------------|----------------|------------------------|
| بین جمعیت‌ها           | ۲          | ۵۹/۷۹۵       | ۲۹/۸۹۸         | ۰/۸۲۶          | ۸ %                    |
| درون جمعیت‌ها          | ۹۳         | ۸۴۴/۹۵۵      | ۹/۰۸۶          | ۹/۰۸۶          | ۹۲ %                   |
| جمع                    | ۹۵         | ۹۰۴/۷۵۰      | ۰              | ۹/۹۱۱          | ۱۰۰ %                  |

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس داده‌های SCoT نشان داد که ۸ درصد از تغییرات کل، مربوط به تنوع بین جمعیتی است در حالی که ۹۲ درصد از تغییرات با تنوع درون جمعیتی قابل توجیه می‌باشد (جدول ۳). در یک مطالعه به منظور بررسی پتانسیل نشانگر SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۶ نمونه خارمریم (*Silybum marianum* L.) از مناطق مختلف خوزستان و ایلام نیز واریانس ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از بخش بین جمعیتی به دست آمد (Zamani et al. 2018). برخی محققان پدیده جریان ژنی را عامل اصلی این تفاوت می‌دانند (Sorkheh et al. 2016). بالاتر بودن سهم واریانس درون جمعیتی نسبت به بین جمعیت‌ها بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از نشانگرهای مختلف مانند CBPD و SCoT در بسیاری از مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Pour-Aboughadareh et al. 2017; Etminan et al. 2016; Ahmadi et al. 2019).

دامنه تغییرات میزان فاصله ژنتیکی در تجزیه داده‌های حاصل از نشانگرهای SCoT بین دو مقدار ۰/۰۹ تا ۰/۸۳ با متوسط ۰/۳۳ به دست آمد. بیشترین میزان فاصله ژنتیکی (۰/۸۳) بین لاین‌های شماره ۸ و ۹۴ مشاهده شد و کمترین فاصله ژنتیکی (۰/۰۹) برای دو لاین ۷۳ و ۷۶ به دست آمد. به طور کلی دقت در تخمین فاصله ژنتیکی افراد به تعداد نشانگر مورد استفاده، میزان چندشکلی و میزان پوشش ژنومی نشانگرها بستگی دارد.

به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد بررسی، شاخص‌های ژنتیک جمعیت شامل تعداد الل مؤثر، مقدار هتروزیگوسی، شاخص شانون و درصد چند شکلی برای هر جمعیت محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۴ ارائه شده است. در مقایسه بین جمعیت‌های مورد مطالعه، جمعیت با منشأ ICARDA شامل ۵۴ لاین بر اساس مقادیر هتروزیگوسی، شاخص شانون و تعداد الل مؤثر از تنوع بیشتری برخوردار بود. متوسط مقدار

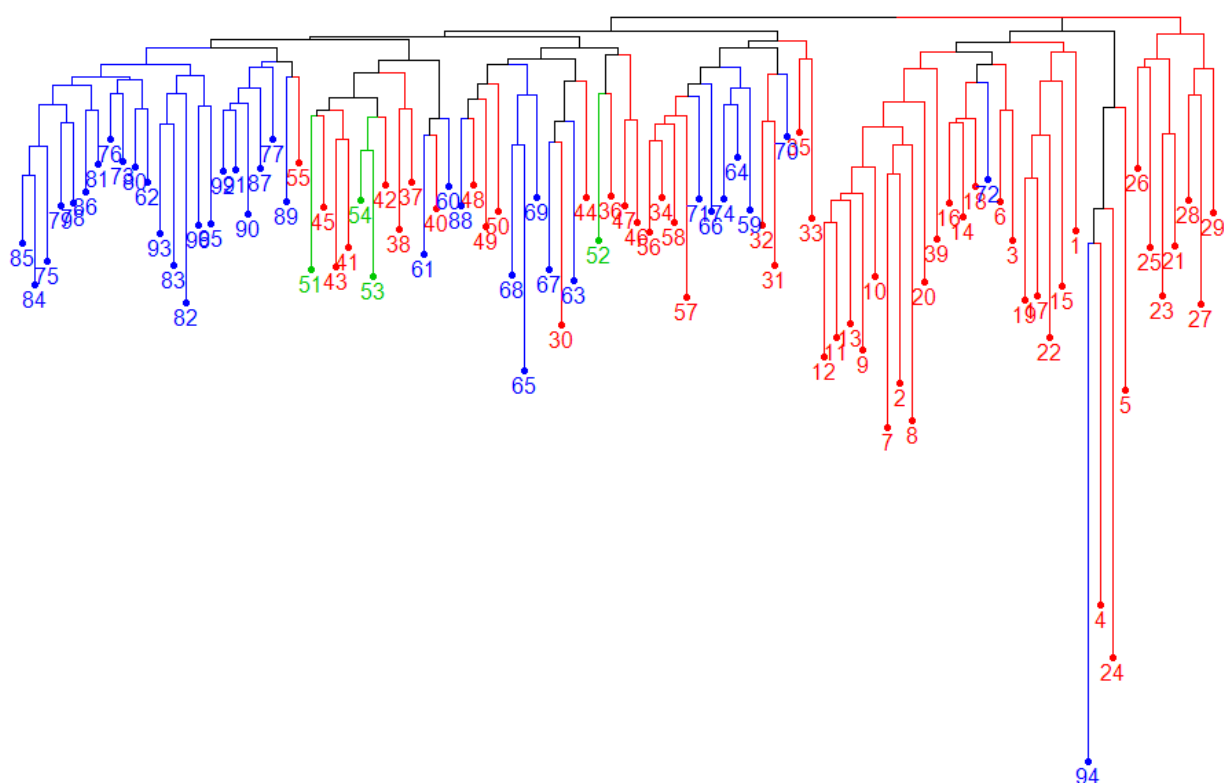
شاخص شانون برای لاین‌های با منشأ ICARDA برابر با ۰/۴۸ بود که در مقایسه با این مقدار برای لاین‌های با منشأ CIMMYT (۰/۳۹) بیشتر بود. همین برتری در مورد تعداد الل مؤثر (۱/۵۶) در جمعیت ICARDA در برابر ۱/۴۵ در جمعیت (CIMMYT) و هتروزیگوسی (۰/۳۲) در جمعیت ICARDA در برابر ۰/۲۶ در جمعیت (CIMMYT) مشاهده شد.

وجود تنوع ژنتیکی بالا درون گونه‌های ژرم پلاسمی با استفاده از نشانگرهای مولکولی متفاوت مانند RAPD، SCoT و ISSR توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Pour-Aboughadareh et al. 2017; Etminan et al. 2016; Ahmadi et al. 2019; Etminan et al. 2017; Thomas and Bebeli 2010). گروه‌بندی ۹۶ ژنوتیپ مورد مطالعه از سه جمعیت بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر SCoT با استفاده از ضریب جاکارد و الگوریتم Neighbour-joining صورت گرفت که دندروگرام حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به دندروگرام حاصل ژنوتیپ‌های مربوط به هر جمعیت به طور نسبی از یکدیگر تفکیک شدند اگرچه در این بین اختلاط‌هایی نیز ملاحظه شد. در این دسته‌بندی، ژنوتیپ‌های شاهد عمدتاً همراه با ژنوتیپ‌های با منشأ ICARDA گروه‌بندی شدند.

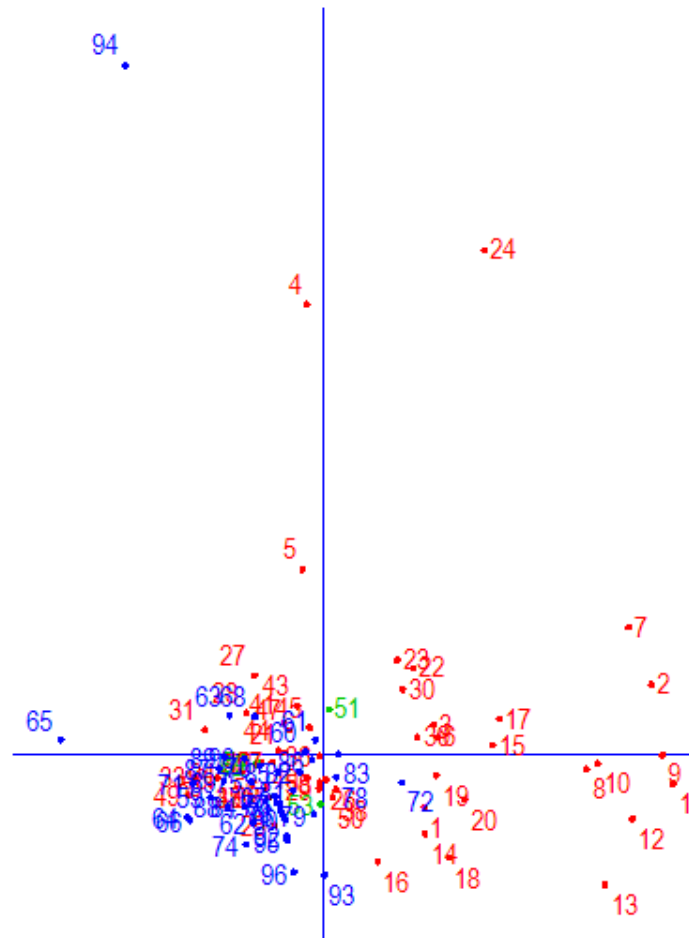
نتیجه تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز با نتایج تجزیه خوشه‌ای تا اندازه‌ای مطابقت داشت (شکل ۲). در بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی هم گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس منشأ آن‌ها و هم وجود تنوع بیشتر در ژنوتیپ‌های با منشأ ICARDA مشهود است به طوری که این ژنوتیپ‌ها که به رنگ قرمز (در مقابل ژنوتیپ‌های با منشأ CIMMYT به رنگ آبی) نشان داده شده‌اند از پراکندگی بیشتری در صفحه مختصات برخوردارند.

جدول ۴- شاخص‌های تنوع محاسبه شده در جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس نشانگر SCoT

| جمعیت‌ها | شاخص آماری     | شاخص تنوع جمعیت |                |            |                |       |
|----------|----------------|-----------------|----------------|------------|----------------|-------|
|          |                | تعداد کل آلل‌ها | تعداد آلل مؤثر | شاخص شانون | تنوع ژنتیکی نی |       |
| ICARDA   | میانگین        | N               | (Na)           | (Ne)       | (I)            | (H)   |
|          | خطای استاندارد | ۵۴              | ۱/۹۳۴          | ۱/۵۵۹      | ۰/۴۷۹          | ۰/۳۲۲ |
| CIMMYT   | میانگین        | ۳۸              | ۱/۶۳۲          | ۱/۴۵۱      | ۰/۳۹۱          | ۰/۲۶۳ |
|          | خطای استاندارد |                 | ۰/۰۳۴          | ۰/۰۴۰      | ۰/۰۲۶          | ۰/۰۲۰ |
| Check    | میانگین        | ۴               | ۱/۵۷۹          | ۱/۵۸۳      | ۰/۴۴۵          | ۰/۳۱۱ |
|          | خطای استاندارد |                 | ۰/۰۷۷          | ۰/۰۴۲      | ۰/۰۳۱          | ۰/۰۲۲ |
|          | میانگین        |                 | ۰/۰۸۴          | ۰/۰۵۰      | ۰/۰۳۴          | ۰/۰۲۵ |
|          | خطای استاندارد |                 |                |            |                |       |



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۹۶ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از ضریب فاصله جاکارد و الگوریتم Neighbour-joining (ژنوتیپ‌های با منشأ ICARDA، با منشأ CIMMYT و شاهد‌ها به ترتیب با رنگ قرمز، آبی و سبز نشان داده شده‌اند).



شکل ۲- پراکنش لاین‌های گندم دوروم بر اساس دو بردار اول حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از داده‌های SCoT

گونه‌های *Aegilops* بهتر از نشانگرهای CDBP عمل نمایند (Pour-Aboughadareh et al. 2019).

#### نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج به‌دست آمده از این تحقیق بیانگر تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی در لاین‌های اصلاحی مورد مطالعه بود که دارای دو منشأ مختلف CIMMYT و ICARDA بودند و در مقایسه این دو جمعیت، ژنوتیپ‌های متعلق به جمعیت ICARDA بر اساس تمامی شاخص‌های تنوع برآورد شده و همچنین نتایج تجزیه‌های آماری انجام شده از تنوع بیشتری برخوردار بودند. همچنین این نتایج نشان داد که سیستم نشانگری SCoT دارای پتانسیل بالایی در نشان دادن روابط ژنتیکی و گروه‌بندی افراد بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها می‌باشد. از سوی دیگر با توجه به ماهیت طراحی آغازگرها در این سیستم نشانگری که نواحی فعال ژنوم را هدف

همچنین نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان دهنده پوشش ژنومی نسبتاً مناسب آغازگرهای مورد استفاده با وجود تعداد اندک آن‌ها بود که این نتیجه مجدداً بیانگر کارایی مناسب نشانگرهای SCoT در تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی می‌باشد. در اغلب مطالعات تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت با استفاده از نشانگرهای SCoT کارایی این نشانگرها به‌خوبی مورد اشاره قرار گرفته است. به‌عنوان مثال در ارزیابی مقایسه‌ای نشانگرهای SCoT و CDBP که هر دو از گروه نشانگرهای هدفمند ژنی هستند، نشانگرهای SCoT در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های مختلف *Aegilops* نسبت به نشانگرهای CDBP از لحاظ شاخص‌های آگاهی بخش سیستم نشانگری بهتری گزارش شد و مشخص شد که آغازگرهای SCoT به‌خوبی می‌توانند در شناسایی قطعات اختصاصی در

دلیل در برنامه‌های کاربردی نظیر نقشه‌یابی QTL نسبت به نشانگرهای تصادفی برتری دارند (Andersen Lubberstedt 2003) (and).

می‌گیرد، می‌توان انتظار داشت که این نشانگرها در آزمایشات تجزیه ارتباط و نقشه‌یابی نیز بتوانند مفید واقع شوند زیرا پوشش ژنومی این نشانگرها بر مناطق واجد ژن متمرکز بوده و به همین

### منابع

- Ahmadi J, Fabriki-Ourang S, Pour-Aboughadareh A (2019) Evaluation of genetic diversity in Aegilops populations possessing D genome using SCoT and TRAP markers. *Modern Genetics Journal* 14:221-230 (In Farsi).
- Andearson JR, Lubberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8:554-560.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Collard BC, Mackill DJ (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 27:86.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Mehrabi AA, Shooshtari L, Ahmadi-Rad A, Moradkhani H (2019) Molecular characterization of the wild relatives of wheat using CAAT-box derived polymorphism. *Plant Biosystems* 153:398-405.
- Etminan 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.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Mohammadi R, Ahmadi-Rad A, Noori A, Mahdavian Z, Moradi Z (2017) Evaluation of genetic diversity in a mini core collection of Iranian durum wheat germplasms. *Journal of Animal and Plant Sciences* 27:1582-1587.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Noori A, Ahmadi-Rad A, Shooshtari L, Mahdavian Z, Yousefiazar-Khanian M (2018) Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32:610-617.
- Farahani E, Arzani A (2007) Study of Genetic Diversity of Cultivars and F1 Hybrids of Durum Wheat Using Agronomic and Morphological Traits. *Journal of Science And Technology of Agriculture And Natural Resources* 4:341-354 (In Farsi).
- Golabadi M, Arzani A (2003) Study of Genetic Variation and Factor Analysis of Agronomic Traits in Durum Wheat. *Journal of Water and Soil Science* 7(1):115-127(In Farsi).
- Gorji AM, Pocza P, Polgar Z, Taller J (2011) Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American journal of potato research* 88:226-237.
- Hamidi H, Talebi R, Keshavarz F (2014) Comparative Efficiency of Functional Gene-based 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.
- Hammami R, Sissons M (2020) Durum Wheat Products, Couscous. In *Wheat Quality For Improving Processing And Human Health*. Springer Press, [http://doi.org/10.1007/978-3-030-34163-3\\_15](http://doi.org/10.1007/978-3-030-34163-3_15). 345-366
- Heidari P, Etminan A, Azizinezhad R, Khosroshahli M (2017) Genomic Variation studies in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) using CDDP, SCoT and ISSR markers. *Indian Journal of Genetics and plant breeding* 77:379-386.
- Lozhkin A, Malchikov P, Makushev A, Vasiliev O, Shashkarov L, Pushkarenko N (2020) Evaluation of spring durum wheat varieties by yield, structure and grain quality. In: *Proceedings of IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 433:012045, Cheboksary, Russia.
- Mangova M, Petrova I (2007) Detection of quality diversity of durum wheat (*Triticum. durum* Desf.) using cluster and principal component analyses. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 13:301-308.
- Matus IA, Hayes PM (2002) Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* 45:1095-1106.
- Melchinger A (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant breeding* 104:1-19.
- Mirzaei K, Mirzaghaderi G (2017) Genetic diversity analysis of Iranian *Nigella sativa* L. landraces using SCoT markers and evaluation of adjusted polymorphism information content. *Plant Genetic Resources* 15:64-71.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants, salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43:1235-1248.
- Peakall R, Smous P (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. *Population genetic*.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan 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, Etminan A, Moghaddam M (2018) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some Aegilops and Triticum species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. *Plant Biosystems* 152:694-703.
- Pour-Aboughadareh A, Etminan A, Shooshtari 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 Farsi).
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Pradeep-Reddy M, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Rao VR, Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:1-19.
- Reif JC, Xia XC, Melchinger AE, Warburton ML, Hoisington DA, Beck D, Bohn M, Frisch M (2004) Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize population of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. *Crop Science* 44:326-334.
- Singh AK, Rana MK, Singh S, Kumar S, Kumar R, Singh R (2014) CAAT box-derived polymorphism (CBDP): a novel promoter-targeted molecular marker for plants. *Journal of plant biochemistry and biotechnology* 23:175-183.
- Sorkheh K, Amirbakhtiar N, Ercli S (2016) Potential Start Codon Targeted (SCoT) and interretrotransposon amplified polymorphism (IRAP) markers for evaluation of genetic diversity and conservation of wild pistacia species population. *Biochemical Genetics* 54:368-387.
- Spanoleti-Zeuli PL, Qualset CO (1987) Geographical diversity for quantitative spike chracters in a world collection of durum wheat. *Crop Science* 27:235-241.
- Thomas KG, Bebeli, PJ (2010) Genetic diversity of Greek Aegilops species using different types of nuclear genome marker. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:951-961.
- Zamani N, Mirzaei K, Zamani W (2018) Evaluation of genetic diversity in several populations of medicinal Milk thistle using molecular marker. *Journal of Molecular and cellular research (Iranian Journal of Biology)* 31:293-305 (In Farsi).