

کاربرد نشانگرهای CDBP در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در برخی از توده‌های گندم زراعی و گونه‌های اجدادی آن

Applicability of CDBP markers to study of genetic diversity among some of the cultivated wheat accessions and their ancestral species

علیرضا اطمینان^{۱*}، علی اشرف مهرابی^۲، لیا شوشتری^۱، هدی مرادخانی^۱

۱- به ترتیب استادیاران، دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، واحد کرمانشاه،
دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ایلام، ایران

Etminan AR^{*1}, Mehrabi AA², Shooshtari L¹, Moradkhani H¹

1- Assistant Professors, Graduted MSc Student, Department of Plant breeding,
College of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah,
Iran

2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, College of
Agriculture and Natural resources, Ilam University, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.etminan@iauksh.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های خویشاوندی گندم اطلاعات مفیدی برای برنامه‌های اصلاحی و مدیریت منابع ژرم‌پلاسمی فراهم خواهد نمود. در این مطالعه، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در برخی از گونه‌های زراعی و وحشی گندم ۸۰ توده متعلق به گونه‌های *T. aestivum*، *T. durum*، *T. urartu*، *T. tauschii* و *Ae. speltooides* با استفاده از ۱۵ آغازگر CDBP مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع ۱۵ آغازگر، ۱۴ قطعه تکثیر یافت که تمامی آن‌ها چندشکل بودند. میانگین شاخص‌های اطلاعات چندشکل ($PIC = 0.48$) و قدرت تمایز ($Rp = 10.67$) بیانگر قابلیت این سیستم نشانگری در ارزیابی تنوع ژنتیکی بود. علاوه بر این، میانگین درصد مکان‌های چند شکل (PPL)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و مؤثر (Ne)، اطلاعات شانون (I) و تنوع ژنتیکی (H) به ترتیب برابر با ۷۲/۴۸ درصد، ۱/۴۴، ۱/۶۴، ۰/۳۸ و ۰/۲۶ بود که این یافته‌ها در تطبیق با نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) می‌باشد، به طوری که ۳۷ و ۶۳ درصد از تغییرات کل به ترتیب مربوط به تنوع بین و درون گونه‌ای بود. روابط ژنتیکی بین توده‌های مورد بررسی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد که کلیه توده‌ها درون سه گروه اصلی قرار گرفتند. نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز تأیید کننده نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بود و نشان داد که توده‌های مختلف بر اساس ساختار ژنومی خود در گروه‌های مختلف گروه‌بندی شدند. به طور کلی، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد نشانگرهای CDBP به طور مفیدی قادر به منعکس نمودن روابط بین گونه‌ای و میزان تنوع ژنتیکی در گونه‌های ژرم‌پلاسمی گندم هستند. از اینرو، استفاده از این تکنیک در سایر برنامه‌های اصلاحی مانند مکان‌یابی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی قابل توصیه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه واریانس مولکولی

خویشاوندان وحشی

گندم

نشانگرهای CDBP

مقدمه

جنس‌های تریتیکوم (*Triticum*) و آریلوپس (*Aegilops*) از مهم‌ترین جنس‌های موجود در تیره *Triticea* می‌باشند که گونه‌های موجود در آن‌ها مهم‌ترین خویشاوندان وحشی گندم زراعی را تشکیل می‌دهند به‌طوری که برخی از این گونه‌ها به صورت مستقیم و غیر مستقیم به‌عنوان والد بخشنده ژنوم A، B و D شناخته شده‌اند. ایران یکی از مراکز اصلی تنوع، توزیع و پراکنش گونه‌های خویشاوند گندم است به‌طوری که قرارگیری نواحی غرب، شمال‌غربی و بخش‌هایی از جنوب‌غربی در هلال حاصل‌خیز^۱ گویای این واقعیت است که این زیستگاه‌ها در تکامل گندم زراعی نقش به‌سزایی داشته است. به‌طوری که اخیراً مطالعات باستانشناسی گیاهی^۲ نیز شواهدی از تکامل گندم‌های امر^۳ در بخش‌هایی از رشته کوه‌های زاگرس واقع در مناطقی از استان ایلام (نواحی گلان) نشان داده است (Weide et al. 2013). خویشاوندان وحشی به‌دلیل قدمت و سازگاری آن‌ها به شرایط محیطی مختلف به‌عنوان منبع ژنتیکی غنی برای یافتن ژن‌ها و آللهایی برای مقابله با انواع تنش‌های محیطی و زنده و حتی کیفیت دانه در نظر گرفته شده‌اند (Schneider et al. 2008; Pour-Aboughadareh et al. 2017). به‌عنوان مثال، Munns et al. (2012) با انتقال ژن *TmHKT1;5A* از گونه *T. monococcum* به ارقام گندم دوروم نشان دادند تحت شرایط تنش شوری لاین‌های ایزوژنتیک برخوردار از این ژن ۲۵ درصد عملکرد دانه بیشتری نسبت به لاین‌های شاهد دارند. هم‌چنین Byrt et al. (2014) نیز گزارش کردند که انتقال ژن *Kna1* از گونه *T. monococcum* به ارقام اصلاحی گندم موجب افزایش تحمل به تنش شوری و کاهش کمتر عملکرد دانه می‌شود. در رابطه با کیفیت دانه نیز ژن‌های زیادی در گونه‌های خویشاوندی شناسایی و به ارقام اصلاحی منتقل شده‌است. در مطالعه Wang et al. (2018) مشخص شد ژنوم 1U از گونه *Ae. umbellulata* سبب بهبود کیفیت خمیر و نان در ارقام گندم نان خواهد شد. علاوه بر این Wang et al. (2016) نیز با شناسایی ژن *Glu-B3h* در گونه‌های

¹ Fertile crescent² Archaeobotanical³ Emmer

خویشاوند وحشی و انتقال آن به ارقام زراعی سبب بهبود خاصیت کشسانی خمیر و کیفیت نان شدند. ضعیف شدن پایه ژنتیکی ارقام زراعی از یک سو و تغییرات اقلیمی از سوی دیگر سبب شده‌است تا به‌نژادگران گندم به دنبال منابع جدیدی جهت بهره‌برداری از آن‌ها در راستای بهبود پایه ژنتیکی گندم باشند. با توجه به اینکه تنوع ژنتیکی پایه و اساس هر برنامه اصلاحی می‌باشد (Mohammadi and Prasanna 2003) و نظر به وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون منابع ژرم‌پلاسمی گندم موجود در ایران، به‌نظر می‌رسد به‌کارگیری از این منابع عظیم طبیعی مسیر تازه‌ای در به‌کارگیری از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی آینده ایجاد نماید. تنوع ژنتیکی و الگوی ساختار جمعیت در منابع ژرم‌پلاسمی و گونه‌های خویشاوند گندم زراعی با استفاده از طیف وسیعی از نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان نمونه، در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌هایی از گونه *Ae. tauschii* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران از نشانگرهای SSR سطح بالایی از سطح بالایی از تنوع ژنتیکی مشاهده شده‌است (Saeidi et al. 2006). در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های وحشی مربوط به جنس تریتیکوم توسط Gulbitt et al. (2007) انجام گرفت از نشانگرهای AFLP استفاده شد. با توجه به نتایج مطالعه آن‌ها میزان چندشکلی مشاهده شده در گونه‌های *T. monococcum* و *T. boeoticum* بیشتر از سایر گونه‌های جنس تریتیکوم بود. علاوه بر این، Naghavi et al. (2009) در بررسی تنوع ژنتیکی مجموعه‌ای از توده‌های وحشی *T. boeoticum* جمع‌آوری شده از نواحی غربی ایران از نشانگرهای AFLP، RAPD و SSR استفاده کردند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه این محققان مشخص شد که نشانگرهای SSR نسبت به دو سیستم نشانگری دیگر از میزان اطلاعات چندشکلی بالاتری برخوردار هستند. علاوه بر این، براساس دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داده شد که جمعیت‌های جمع‌آوری شده از نواحی جغرافیایی مختلف مربوط به استان‌های کرمانشاه و لرستان سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص دادند به‌طوری که این مناطق سطح وسیعی از زیستگاه این گونه را در غرب ایران به‌عنوان بخشی از حوزه هلال

CBDP¹ نیز از جمله نشانگرهای نو ظهور در عرصه بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت به شمار می‌آیند. این نشانگرها با استفاده از نقاط حفاظت شده ژنوم می‌توانند چندشکلی مبتنی بر نقاط هدفمند ژنوم ایجاد نمایند. آغازگرهای استفاده شده در این سیستم دارای طول ۱۸ نوکلئوتید بوده و منجر به نشان دادن چندشکلی موجود در ناحیه جعبه CAAT پروموتور ژن‌های گیاهان می‌شوند. علاوه بر این، مقرون به صرفه بودن، تکرارپذیری بالا و ارائه میزان بالایی از چندشکلی سبب شده‌است تا این سیستم نشانگری بتواند در مطالعات مرتبط با تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و حتی در مکان یابی صفات کمی (QTL²) و همچنین اشباع نقشه‌های ژنتیکی مورد توجه قرار گیرد (Singh et al. 2014). تا کنون مطالعات زیادی در رابطه با ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌ای در ژرم‌پلاسما گندم با استفاده از انواع گوناگونی از سیستم‌های نشانگری صورت گرفته است، با این حال اطلاعاتی در رابطه با کاربرد سیستم نشانگری CBDP در دسترس نمی‌باشد. از این‌رو، هدف از این پژوهش بررسی میزان تنوع ژنتیکی موجود در برخی از توده‌های گندم زراعی و گونه‌های نیای وحشی آن یعنی *Ae. tauschii*، *Ae. speltoidea* و *T. urartu* می‌باشد. علاوه بر این، نشان دادن قابلیت این سیستم در تفکیک و گروه‌بندی توده‌های مورد بررسی از دیگر اهداف این تحقیق به‌شمار می‌آید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۸۰ توده زراعی و وحشی متعلق به گونه‌های *T. urartu*، *Ae. tauschii*، *Ae. speltoidea* جمع‌آوری شده از نواحی جغرافیایی مختلف ایران مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت. کلیه توده‌های مورد مطالعه از بانک ژن غلات واقع در دانشگاه ایلام (Ilam University Gene Bank; IUGB) تهیه و مشخصات ژنومی و محل جمع‌آوری آن‌ها در جدول ۱ درج شده است.

به‌منظور استخراج DNA ژنومی، ابتدا تعداد ۱۰ بذر از هر یک از توده‌های مورد ارزیابی در گلدان کشت شد و نمونه‌های برگ‌ی در

حاصل‌خیز به خود اختصاص داده‌اند. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های مختلف *Ae. tauschii* و *T. aestivum* با استفاده از نشانگرهای SSR نشان داده است که میزان هتروزیگوتی مشاهده شده (*Ho*)، تنوع ژنتیکی (*He*) و شاخص شانون (*I*) در توده‌های نمونه‌برداری شده از نواحی شمالی ایران نسبت به سایر مناطق بیش‌تر بوده و میزان تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های *T. aestivum* به مراتب بسیار کمتر از تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های وحشی *Ae. tauschii* است. علاوه بر این، وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گلستان، مازندران نسبت به نمونه‌های مربوط به استان‌های اردبیل، قزوین و سمنان نیز می‌تواند بیانگر قابلیت این نواحی جغرافیایی در تأمین منابع بالقوه‌ای از پتانسیل‌های اصلاحی مفید برای اصلاح گندم باشد (Naghavi et al. 2010). در مطالعه‌ای که به‌منظور نشان دادن میزان تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های دیپلوئید گندم اینکورن نمونه‌برداری شده از نواحی مختلف رشته‌های زاگرس با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام گرفت، مشخص شد که گونه‌های *T. boeoticum* و *T. monococcum* به‌ترتیب بیش‌ترین (۹۰ درصد) و کمترین (۶۸/۶۲ درصد) میزان چندشکلی را نشان دادند (Mousavifard et al. 2015). هم‌چنین در این مطالعه، از نقطه نظر تنوع منطقه‌ای نیز، توده‌های مربوط به نواحی غربی (۸۶/۴۴ درصد) نسبت به نواحی جنوبی غربی (۷۴/۷۰ درصد) زاگرس از چند شکلی بیش‌تری برخوردار بودند. در ارزیابی Pour-Aboughadareh et al. (2017) نیز سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های *T. boeoticum* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران گزارش شد، به‌طوری‌این محققان اظهار داشتند که نواحی غربی ایران به‌ویژه مناطق مربوط به استان‌های کرمانشاه می‌تواند به‌عنوان منبع مفیدی از پتانسیل‌های ژنتیکی و اصلاحی برای کاوش ژن‌های مهم در این گونه در نظر گرفته شود.

امروزه با پیشرفت روش‌های مولکولی انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری در تجزیه تنوع ژنتیکی و بررسی روابط بین گونه استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر چندین سیستم نشانگری جدید مبتنی بر PCR توسعه یافته است که در بین آن‌ها نشانگرهای

¹ CATT-box derived polymorphism

² Quantitative traits loci

مرحله ۲ برگه به صورت بالک برداشت و استخراج DNA ژنومی با استفاده از دستورالعمل^۱ CTAB و بر اساس روش Doyle and

Doyle (1987) انجام شد. کیفیت DNA استخراجی هر توده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

^۱ Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide

جدول ۱- کد، محل جمع‌آوری و مشخصات ژنومی توده‌های مورد ارزیابی در این پژوهش

ردیف	گونه	کد	استان	ردیف	گونه	کد	استان
۱	<i>Ae. tauschii</i> (D genome)	IUGB-00269	گیلان	۴۱	<i>T. durum</i> (AB genome)	IUGB-01671	لرستان
۲		IUGB-00020	اردبیل	۴۲		IUGB-01695	کرمانشاه
۳		IUGB-00107	گیلان	۴۳		IUGB-01696	کرمانشاه
۴		IUGB-00164	اردبیل	۴۴		-	مرکزی
۵		IUGB-00193	آذربایجان شرقی	۴۵		-	لرستان
۶		IUGB-00196	مازندران	۴۶		IUGB-00038	اصفهان
۷		IUGB-00198	زنجان	۴۷		IUGB-00268	خوزستان
۸		IUGB-00222	گلستان	۴۸		IUGB-00517	خوزستان
۹		IUGB-00223	مازندران	۴۹		IUGB-00520	اردبیل
۱۰		IUGB-00224	گیلان	۵۰		IUGB-00522	کهگیلویه و بویراحمد
۱۱		IUGB-00245	مازندران	۵۱	<i>T. urartu</i> (A genome)	IUGB-00531	کردستان
۱۲		IUGB-00247	مازندران	۵۲		IUGB-00543	کردستان
۱۳		IUGB-00260	گیلان	۵۳		IUGB-00651	گلستان
۱۴		IUGB-00261	مازندران	۵۴		IUGB-00658	خراسان رضوی
۱۵		IUGB-00275	اردبیل	۵۵		IUGB-00663	خراسان رضوی
۱۶		IUGB-00325	مازندران	۵۶		IUGB-00770	کهگیلویه و بویراحمد
۱۷		IUGB-00365	مازندران	۵۷		IUGB-00912	ایلام
۱۸		IUGB-00366	گیلان	۵۸		IUGB-01673	لرستان
۱۹		IUGB-00369	گیلان	۵۹		IUGB-01677	لرستان
۲۰		IUGB-00402	مازندران	۶۰		IUGB-01859	کرمانشاه
۲۱	<i>Ae. speltoides</i> (B genome)	IUGB-00025	کرمانشاه	۶۱	<i>T. aestivum</i> (ABD genome)	IUGB-01692	کرمانشاه
۲۲		IUGB-00083	کرمانشاه	۶۲		IUGB-01731	ایلام
۲۳		IUGB-00337	-	۶۳		IUGB-01688	کرمانشاه
۲۴		IUGB-00416	-	۶۴		IUGB-00077	کرمانشاه
۲۵		IUGB-00963	ایلام	۶۵		IUGB-00079	کردستان
۲۶		IUGB-01057	ایلام	۶۶		IUGB-00094	کردستان
۲۷	<i>T. aestivum</i> (ABD genome)	IUGB-00074	آذربایجان غربی	۶۷		IUGB-00124	کردستان
۲۸		IUGB-00133	خراسان رضوی	۶۸		IUGB-00128	کرمانشاه
۲۹		IUGB-00134	قزوین	۶۹		IUGB-00145	کردستان
۳۰		IUGB-00264	اصفهان	۷۰		IUGB-00154	کهگیلویه و بویراحمد
۳۱		IUGB-00447	کردستان	۷۱		IUGB-00162	چهارمحال و بختیاری
۳۲		IUGB-00453	آذربایجان غربی	۷۲		IUGB-00206	کرمانشاه
۳۳		IUGB-00460	زنجان	۷۳		IUGB-00285	کرمانشاه
۳۴		IUGB-00480	آذربایجان غربی	۷۴		IUGB-00286	چهارمحال و بختیاری
۳۵		IUGB-00482	کردستان	۷۵		IUGB-00324	کرمانشاه
۳۶		IUGB-00485	آذربایجان غربی	۷۶		IUGB-00344	کرمانشاه
۳۷		IUGB-00516	خوزستان	۷۷		IUGB-00346	کردستان
۳۸		IUGB-00911	ایلام	۷۸		IUGB-00347	اردبیل
۳۹		IUGB-01569	لرستان	۷۹		IUGB-00423	کرمانشاه
۴۰		IUGB-01635	ایلام	۸۰		IUGB-00426	کردستان

جدول ۲- مشخصات توالی آغازگرهای CDBP و نتایج حاصل از تکثیر PCR در ۸۰ توده مورد مطالعه

آغازگر	Sequence (5'→3')	درصد GC	تعداد قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی	محتوی اطلاعات چندشکل	قدرت تمایز	شاخص نشانگری
CBDP-1	TGAGCACGATCCAATAGC	۵۰	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۴۹۶	۱۰/۷۵	۴/۹۶
CBDP-2	TGAGCACGATCCAATAAT	۳۸/۸۹	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۹۹	۹/۱۲	۴/۴۹
CBDP-3	TGAGCACGATCCAATACC	۵۰	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۹۶	۹/۷۵	۴/۴۶
CBDP-4	TGAGCACGATCCAATAAG	۴۴/۴۴	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۴۹۷	۹/۳۵	۴/۹۷
CBDP-5	TGAGCACGATCCAATCTA	۴۴/۴۴	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۹۹	۸/۶۲	۴/۴۹
CBDP-6	TGAGCACGATCCAATCAG	۵۰	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۶۰	۱۱/۵۲	۴/۱۴
CBDP-7	TGAGCACGATCCAATCGA	۵۰	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۴۶۱	۱۵/۳۲	۵/۵۳
CBDP-8	TGAGCACGATCCAATCGG	۵۵/۵۶	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۶۵	۱۱/۳۴	۴/۱۹
CBDP-9	TGAGCACGATCCAATGAT	۴۴/۴۴	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۸۸	۱۰/۳۵	۴/۳۹
CBDP-10	TGAGCACGATCCAATGTT	۴۴/۴۴	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۴۹۰	۱۱/۴۰	۴/۹۰
CBDP-11	TGAGCACGATCCAATTGC	۵۰	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۸۹	۹/۱۷	۳/۹۱
CBDP-12	TGAGCACGATCCAATATA	۳۸/۸۹	۱۱	۱۱	۱۰۰	۴۹۲	۱۲/۳۷	۵/۴۱
CBDP-13	TGAGCACGATCCAATGAG	۵۰	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۸۳	۱۰/۶۲	۴/۳۵
CBDP-14	TGAGCACGATCCAATGCG	۵۵/۵۶	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۷۰	۱۱/۲۰	۴/۲۳
CBDP-15	TGAGCACGATCCAATTGA	۴۴/۴۴	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۸۶	۹/۳۰	۳/۸۹
میانگین								
			۹/۴۰	۹/۴۰	۱۰۰	۰/۴۸	۱۰/۶۷	۴/۵۵

بر اساس روابط ارائه شده توسط Powell et al. (1996) محاسبه شد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بین جنس‌ها و گونه‌ها و همچنین تنوع درون آن‌ها، تجزیه واریانس مولکولی ($AMOVA^5$) با استفاده از نرم‌افزار GenA1EX انجام شد. جهت بررسی و مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از گونه‌های خویشاوندی پارامترهای ژنتیکی درصد لوکوس‌های چندشکل (PPL^6)، شاخص شانون (I^7)، تنوع ژنی نی (H^8)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na^9) و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne^{10}) با استفاده از نرم‌افزار POP-GENE برآورد شدند. گروه‌بندی توده‌های مورد بررسی بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به روش Neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار DARwin ver. 6 صورت گرفت. تجزیه به مختصات اصلی ($PCoA^{11}$) نیز با استفاده از نرم‌افزار GenA1EX و با هدف ارزیابی روابط بین گونه‌های مختلف و تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای انجام شد.

از بین ۲۵ آغازگر طراحی شده بر اساس مطالعه Singh et al. (2014)، ۱۵ آغازگر که قادر به تولید قطعات چند شکل بودند انتخاب و ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس آن‌ها انجام شد. مشخصات هر یک از این آغازگرها در جدول ۲ نشان داده شده‌است. پس از بهینه‌سازی شرایط تکثیر، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR^1) در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر آغازگر انجام شد. تکثیر PCR در ترموسایکلر با دمای واسرشت-سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، یک دقیقه دمای اتصال هر آغازگر و دو دقیقه در دمای ۷۲ سلسیوس به عنوان دمای گسترش و در نهایت ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس جهت بسط نهایی انجام شد. محصولات PCR نیز در ژل آگارز ۱/۵ درصد و با استفاده از رنگ‌آمیزی با Safeview II تفکیک و سپس امتیازدهی شدند. پس از امتیازدهی قطعات تکثیری، معیارهای کارایی نشانگر هم‌چون محتوی اطلاعات چندشکل (PIC^2)، شاخص نشانگر (MI^3) و قدرت تمایز (Rp^4)

³ Marker index⁴ Resolving power⁵ Analysis of molecular variance⁶ Percentage of polymorphism loci⁷ Shannon's information index⁸ Nei's genetic diversity⁹ Number of observed alleles¹⁰ Effective number of alleles¹¹ Principal coordinate analysis¹ Polymerase chain reaction² Polymorphism information content

نتایج

در جدول ۲ خلاصه‌ای از نتایج به دست آمده از تکثیر ۱۵ آغازگر مورد استفاده در این پژوهش نشان داده شده است. در کل آغازگرها ۱۴۱ قطعه تکثیری یافت شد که تمامی آن‌ها چندشکل بودند. تعداد کل قطعات تکثیری از هشت (مربوط به آغازگر CDBP-11 و CDBP-15) تا ۱۲ قطعه (مربوط به آغازگر CDBP-7) با میانگین ۹/۴ قطعه متغیر بود. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که آغازگرهای CDBP-5 و CDBP-7 به ترتیب با مقادیر ۸/۶۲ و ۱۵/۳۲ دارای کم‌ترین و بیش‌ترین قدرت تمایز (R_p) در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های مورد مطالعه بودند. شاخص MI نیز بین نشانگرهای استفاده شده متغیر و دارای دامنه‌ای بین ۳/۸۹ (آغازگر CDBP-15) و ۵/۵۳ (آغازگر CDBP-7) با میانگین ۴/۵۵ بود. متوسط شاخص PIC برابر ۰/۴۸ بود و کلیه آغازگر دارای مقداری بیش از ۰/۴۶ بودند.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس نشانگرهای CDBP نشان داد که ۳۷ درصد از تغییرات کل، مربوط به تنوع بین گونه‌ای است در حالی که ۶۳ درصد از تغییرات با تنوع درون گونه‌ای قابل توجیه می‌باشد. به عبارت دیگر آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق به خوبی قادر بودند تنوع ژنتیکی معنی‌داری را در بین و درون توده‌های مورد ارزیابی نشان دهند (جدول ۳).

نتایج حاصل از برآورد پارامترهای ژنتیکی در گونه‌های مختلف در جدول ۴ نشان داده شده است. شاخص Na با میانگین ۱/۶۴ دارای دامنه تغییراتی بین ۱/۲۴ تا ۱/۷۹ بود به طوری که کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار آن به ترتیب در گونه‌های *Ae. speltoides* و *T. aestivum* مشاهده شد. از نظر شاخص Ne نیز گونه *T. durum* دارای بیش‌ترین مقدار بود و به دنبال آن گونه *Ae. tauschii* نسبت به سایر گونه‌ها از شاخص Ne بالاتری برخوردار بودند. این حال کم‌ترین مقدار این شاخص در گونه‌های *Ae. speltoides* مشاهده شد. متوسط مقدار این پارامتر نیز در کلیه گونه‌های مورد مطالعه ۱/۴۴ به دست آمد. مقدار شاخص I نیز بین گونه‌های مختلف متفاوت و دارای میانگین ۰/۳۸ بود و بیش‌ترین مقدار این پارامتر متعلق به گونه‌های *T. durum*، *T. aestivum* و *Ae. tauschii* بود. شاخص H نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین معیارهای تنوع ژنتیکی باعث نشان دادن الگوی متفاوتی از گونه‌های مورد مطالعه شد. گونه‌های *T. durum*، *T. aestivum* و *Ae. tauschii* به ترتیب از بیش‌ترین مقدار تنوع ژنتیکی برخوردار بودند و در مقابل گونه *Ae. speltoides* دارای کم‌ترین مقدار H بود. با این وجود، در بین گونه‌های مورد بررسی *Ae. speltoides* بیش‌ترین میزان چندشکلی در مکان‌های ژنی را نسبت به سایر گونه‌ها نشان داد.

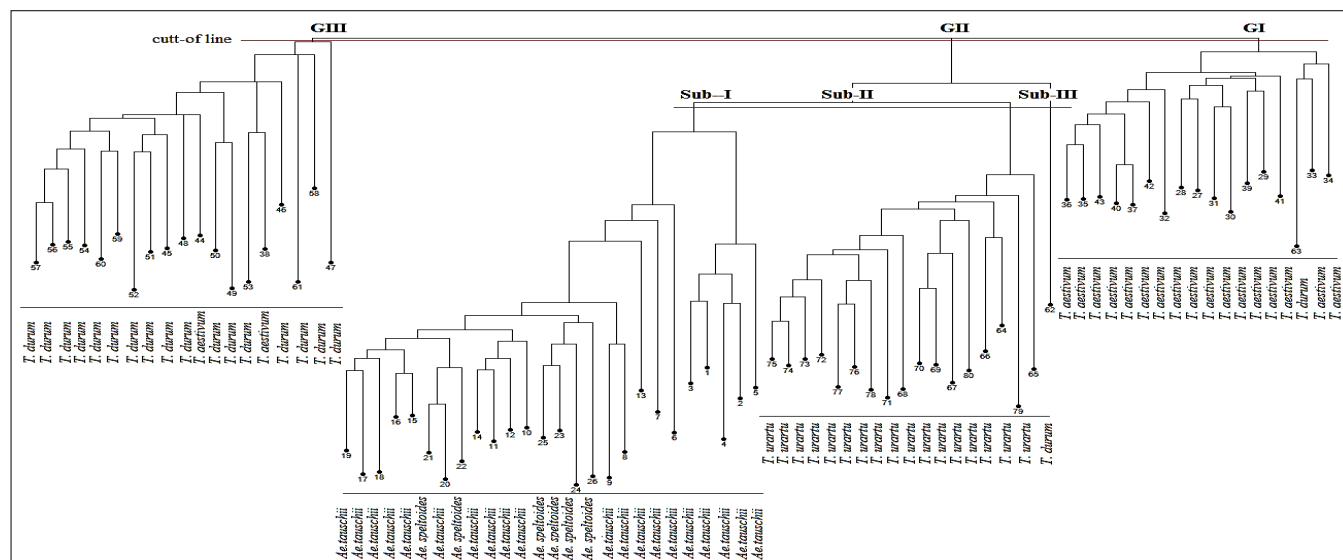
جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۸۰ توده مورد ارزیابی با استفاده از آغازگرهای CDBP

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس برآورد شده	درصد تغییرات
بین گونه	۴	۷۶۹/۶۱	۱۹۲/۴۰	۱۱/۱۰	۳۷
درون گونه	۷۵	۱۴۴۴۵/۲۸	۱۹/۲۷	۱۹/۲۷	۶۳
کل	۷۹	۲۲۱۴/۹۰		۳۰/۳۷	۱۰۰

جدول ۴- نتایج حاصل از برآورد پارامترهای ژنتیکی در گونه‌های زراعی و گونه‌های نیای وحشی آن‌ها

گونه	ژنوم	تعداد نمونه	تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)	تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)	شاخص شانون (I)	تنوع ژنتیکی نی (H)	درصد مکان‌های چندشکل
<i>T. aestivum</i>	ABD	۱۸	۱/۷۹±۰/۰۴	۱/۴۵±۰/۰۳	۰/۴۱±۰/۰۲	۰/۲۷±۰/۰۱	۸۳/۶۹
<i>T. durum</i>	AB	۱۹	۱/۷۸±۰/۰۴	۱/۵۲±۰/۰۳	۰/۴۵±۰/۰۲	۰/۳۰±۰/۰۱	۸۲/۲۷
<i>T. urartu</i>	A ^u	۱۷	۱/۶۳±۰/۰۵	۱/۴۴±۰/۰۳	۰/۳۸±۰/۰۲	۰/۲۶±۰/۰۱	۷۳/۷۶
<i>Ae. speltoides</i>	B	۶	۱/۲۴±۰/۰۱	۱/۲۹±۰/۰۲	۰/۲۴±۰/۰۱	۰/۱۶±۰/۰۱	۹۰/۲۹
<i>Ae. tauschii</i>	D	۲۰	۱/۷۳±۰/۰۵	۱/۴۷±۰/۰۳	۰/۴۱±۰/۰۲	۰/۲۷±۰/۰۱	۸۰/۱۴
کل		۸۰	۱/۶۴±۰/۰۲	۱/۴۴±۰/۰۳	۰/۳۸±۰/۰۲	۰/۲۶±۰/۰۲	۷۲/۴۸±۷/۶۷

<i>T. aestivum</i>	<i>T. durum</i>	<i>Ae. speltoides</i>	<i>Ae. tauschii</i>	<i>T. urartu</i>	گونه
	۰/۹۰	۰/۶۶۱	۰/۷۳۴	۰/۷۲۴	<i>T. aestivum</i>
۰/۱۰۵		۰/۸۶۳	۰/۸۵۶	۰/۷۵۹	<i>T. durum</i>
۰/۴۱۴	۰/۱۴۷		۰/۸۹۴	۰/۷۰۵	<i>Ae. speltoides</i>
۰/۳۰۹	۰/۱۵۶	۰/۱۱۲		۰/۷۲۶	<i>Ae. tauschii</i>
۰/۳۲۲	۰/۲۷۶	۰/۳۵۰	۰/۳۲۱		<i>T. urartu</i>

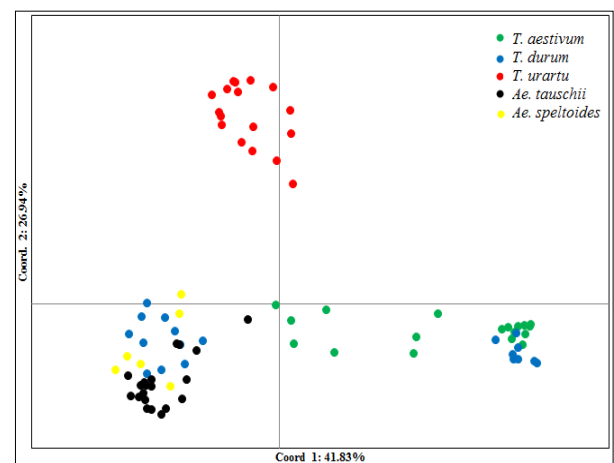


توصیف دقیق‌تر روابط بین گونه‌های ارزیابی شده، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس شباه ژنتیکی جاکارد و به روش Neighbor-Joining انجام شد. ضریب کوفتیک به‌دست آمده برای این روش در مقایسه با سایر روش‌های تجزیه خوشه‌ای دارای بالاترین مقدار خود بود (۰/۹۸۴). با توجه به دندروگرام حاصل از این تجزیه ۸۰ توده زراعی و وحشی گندم در سه گروه اصلی از یکدیگر متمایز شدند (شکل ۱). گروه اول (GI) شامل ۱۶ توده متعلق به گونه *T. aestivum* و یک توده مربوط به گونه *T. durum* بود. گروه دوم (GII) در برگیرنده در برگیرنده کلیه خویشاوندان وحشی بود به طوری که از سه زیر گروه تشکیل شد. کلیه توده‌های مربوط به گونه‌های *Ae. tauschii* و *Ae. speltoide* در زیر گروه اول (Sub-I) قرار گرفتند. زیر گروه دوم نیز شامل کلیه توده‌های مربوط به گونه *T. urartu* بود. یک توده متعلق به گونه *T. durum* نیز به تنهایی به‌عنوان زیر گروه سوم (Sub-III) از دیگر توده‌ها متمایز شد. سومین گروه اصلی نیز شامل توده‌های مربوط به گونه *T. durum* به همراه دو توده متعلق به گونه *T.*

人々

و همچنین ارائه سیستم‌های نشانگری جدید شده است (Poczai et al. 2013). از جمله سیستم‌های نشانگری جدید می‌توان به نشانگرهای CDBP اشاره نمود. اگرچه تا کنون مطالعات گوناگونی در رابطه با ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط بین خویشاوندی در گیاهان مختلف با استفاده از این تکنیک صورت گرفته است، با این حال اطلاعاتی در رابطه با قابلیت این تکنیک در ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی خویشاوندان وحشی گندم موجود نمی‌باشد. از این‌رو، این نتایج می‌تواند نخستین گزارش در این زمینه باشد. نتایج حاصل از این ارزیابی نشان داد ۱۵ آغازگر استفاده شده به‌طور کامل قادر به ارائه میزان چندشکلی بالایی بودند به طوری که میزان چندشکلی به‌دست آمده با استفاده از این آغازگرها برابر ۱۰۰ درصد بود که این میزان نسبت به سایر مطالعات انجام شده در گیاهان مختلف مانند Jojoba با ۵۱/۹۰ درصد (Heikrujam et al. 2011)، Fenel با ۶۶/۱۴ درصد (Yadav and Malik 2017) و Kalmeg با ۸۵/۵۷ درصد (Tiwari et al. 2017) بیشتر بود. بنابراین به‌نظر می‌رسد این سیستم نشانگری دارای قابلیت بالایی در نشان دادن میزان چندشکلی موجود در بین گونه‌های ژرم‌پلاسمی گندم می‌باشد. در بین معیارهای تعیین کننده کارایی سیستم‌های نشانگری، شاخص‌های *PIC* و *Rp* از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند زیرا این دو شاخص قابلیت یک سیستم نشانگری در تعیین اثر بخشی و پتانسیل آغازگرهای استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی و قدرت تمایز نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهند (Powell et al. 1996). به عبارت دیگر شاخص *PIC* احتمال تشخیص چندشکلی ایجاد شده توسط یک آغازگر بین دو فرد می‌باشد که به تعداد آلل‌های قابل تشخیص و فراوانی آن‌ها وابسته است. شاخص *Rp* نیز به عنوان معیاری جهت تمایز آغازگرهای به‌کار رفته مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حقیقت این شاخص توانایی یک سیستم نشانگری را در ایجاد باندهای قابل امتیازدهی تعیین می‌کند. با این وجود، (Prevost and Wilkinson 1999) اظهار داشتند که این شاخص نمی‌تواند اطلاعاتی درباره توانایی یک آغازگر در بازتاب روابط ژنتیکی با تاکسونومی یک گروه ژنوتیپ تحت مطالعه را فراهم کند. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار داشت که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون مجموعه ژرم‌پلاسم

aestivum بود. با توجه به نتایج حاصل از گروه‌بندی توده‌های مورد مطالعه می‌توان عنوان نمود که تفکیک توده‌ها در گروه‌های مختلف منطبق بر ساختار ژنومی آن‌ها می‌باشد. به‌منظور تأیید نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) انجام شد. با توجه به نتایج حاصل از این تجزیه مشخص شد دو مؤلفه نخست قادر به توجیه ۶۸/۷۷ درصد از تغییرات موجود در داده‌های مولکولی بودند که بر این اساس نمودار پراکنش توده‌های مورد بررسی بر مبنای این مؤلفه (Coord 1 و 2) ترسیم شد. همانطور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، ۸۰ توده مورد بررسی در گروه‌های تقریباً مجزایی از یکدیگر تفکیک شدند که به میزان زیادی تأیید کننده نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بود. با توجه به بای‌پلات ترسیم شده، توده‌های مربوط به گونه *T. urartu* به صورت یک گروه جداگانه از سایر توده‌ها متمایز شدند. توده‌های مربوط به دو گونه *Ae. tauschii* و *Ae. speltooides* به همراه چند توده از گونه *T. durum* در ناحیه مجزایی از مرکز بای پلاست جای گرفتند. در نهایت اکثر توده‌های مربوط به گونه *T. aestivum* نیز به همراه تعدادی از توده‌های متعلق به گونه *T. durum* نیز از سایر توده‌ها متمایز شدند.



شکل ۲- نمودار بای‌پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ۸۰ توده گندم زراعی و نیای وحشی آن‌ها بر اساس آغازگرهای CDBP

بحث

پیشرفت در ابزارهای مولکولی منجر به تغییر الگوی به‌کارگیری از نشانگرهای تصادفی و مبتنی بر DNA به نشانگرهای مبتنی بر ژن

بررسی الگوی گروه‌بندی به‌دست آمده با استفاده از تجزیه خوشه‌ای و PCoA می‌تواند بیانگر انطباق ساختار ژنومی با روند گروه‌بندی توده‌های مورد بررسی باشد. همان‌گونه که در شکل‌های ۲ و ۳ ملاحظه می‌شود توده‌های زراعی، *T. aestivum* و *T. durum*، به خوبی از سایر خویشاوند وحشی خود در گروه‌های جداگانه‌ای متمایز شده‌اند. از طرف دیگر کلیه توده‌های مربوط به گونه *T. urartu* با ساختار ژنومی A و همچنین توده‌های مربوط به گونه‌های *Ae. tauschii* و *Ae. speltooides* به ترتیب با ساختارهای ژنومی D و B از یکدیگر و دو فرم زراعی گندم متمایز شدند. به‌طور کلی نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که سیستم نشانگری CDBP دارای پتانسیل بالایی در نشان دادن روابط بین گونه‌ای و گروه‌بندی افراد بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها می‌باشد. از این‌رو می‌توان اظهار داشت که استفاده از این نشانگر مولکولی در آزمایشات تجزیه‌ارتباط و نقشه‌یابی ژنتیکی می‌تواند به‌طور مؤثری مورد استفاده قرار گیرد. زیرا این نشانگر بر اساس تنوع ناحیه حفاظت شده عمل می‌کند و با توجه به اینکه این مناطق عموماً شامل دامین‌هایی در ارتباط با توالی‌های حفاظت‌شده DNA درون ژن هستند و بر مناطق ژنی متمرکز می‌باشند به‌همین دلیل در برنامه‌های کاربردی نظیر نقشه‌یابی QTL نسبت به نشانگرهای تصادفی برتری دارند (Andersen and Lubberstedt 2003).

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه به‌خاطر فراهم آوردن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

گندم مورد مطالعه در این تحقیق وجود دارد. در این رابطه بسیاری از مطالعات قبلی صورت گرفته با استفاده از دیگر نشانگرهای مولکولی نیز سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را بین گونه‌های آزیلوپس و تریتیکوم نشان داده‌اند (Naghavi et al. 2009; Tahernezhad et al. 2010; Hamidi et al. 2014; Mousavifard et al. 2015; Moradkhani et al. 2015; Pour-Aboughadareh et al. 2018).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را بین و درون جمعیت‌های بررسی شده نشان داد که به‌نظر می‌رسد این تنوع می‌تواند در برنامه‌های اصلاح گندم مورد استفاده قرار گیرد. در این رابطه، Pour-Aboughadareh et al. (2017a) نیز با بررسی جمعیت‌هایی از گونه‌های زراعی و وحشی جنس تریتیکوم با استفاده از نشانگرهای SCoT سطح بالایی از تنوع ژنتیکی را گزارش کردند. وجود تنوع ژنتیکی بالا درون گونه‌های ژرم‌پلاسمی با استفاده از نشانگرهای مولکولی متفاوت مانند RAPD, SCoT, SSR و ISSR توسط سایر محققان نیز گزارش شده‌است (Thomas et al. 2010; Etminan et al. 2016; Etminan et al. 2017). بررسی نتایج به‌دست آمده از مقایسه گونه‌های مختلف از نظر مهم‌ترین پارامترهای ژنتیکی نشان داد از نظر کلیه پارامترهای برآورد شده (*Na*, *Ne*, *I*, *H* و *PPL*) گونه‌های *T. aestivum*، *T. durum* و *Ae. tauschii* نسبت به دو گونه اجدادی *T. urartu* و *Ae. speltooides* از میزان تنوع آلی و ژنتیکی بیشتری برخوردارند. در این راستا (Huang et al. 2002). Gulbati-Onarici et al. (2007)، Etminan et al. (2017) و Pour-Aboughadareh et al. (2018) نیز با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف سطح قابل توجهی از میزان تنوع ژنتیکی در گونه‌های ذکر شده را گزارش نمودند. با این حال، نتایج مطالعه Wang et al. (2013) در ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌های خویشاوند وحشی نشان داد که گونه‌های *Ae. tauschii*، *T. urartu* و *Ae. speltooides* دارای بیش‌ترین میزان تنوع ژنتیکی در مقایسه با گونه‌های زراعی هستند. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد اختلاف مشاهده شده در میزان سطح تنوع ژنتیکی برآورد شده در بین گونه‌های مختلف ممکن است ناشی از تعداد توده‌های موجود در هر گونه و یا حتی منشأ جغرافیایی نمونه‌های مورد بررسی باشد.

منابع

- Anderson JR, Lubberstedt T (2003) Functional markers in plants. *Trends in Plant Science* 8:554-560.
- Byrt C, Xu B, Krishnan M (2014) The Na⁺ transporter, *TaHKT1;5-D*, limits shoot Na⁺ accumulation in bread wheat. *The Plant Journal* 80:516-526.
- Doyle JJ, Doyle KJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Mohammadi R, Ahmadi-Rad A, Moradi Z, Mahdavian Z, Noori A (2017) Evaluation of genetic diversity in a mini core collection of Iranian durum wheat germplasms. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 27:1582-1587.
- 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.
- Gulbittini-Onarici S, Sumer S, Ozcan S (2007) Phylogenetic relationships among some wild wheat species revealed by AFLP markers. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153:67-72.
- Hamidi H, Talebi R, Keshavarz F (2014) Comparative efficiency of functional genebased markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived Polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications* 42:558-567.
- Heikrujam M, Kumar J, Agrawal V (2015) Genetic diversity analysis among male and female Jojoba genotypes employing gene targeted molecular markers, start codon targeted (SCoT) polymorphism and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Meta Gene* 5:90-97.
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P (2002) Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:8133-8138.
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43:1235-1248.
- Moradkhani H, Mehrabi AA, Etminan A, Pour-Aboughadareh A (2015) Molecular diversity and phylogeny of *Triticum-Aegilops* species possessing D genome revealed by SSR and ISSR markers. *Plant Breeding and Seed Science* 71:82-95.
- Mousavifard SS, Saeidi H, Rahiminejad MR, Shamsadini M (2015) Molecular analysis of diversity of diploid *Triticum* species in Iran using ISSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 62:387-394.
- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt C, Hare RA, Tyerman SD, Tester M, Plett D, Gilliam M (2012) Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology* 30:360-364.
- Naghavi MR, Hajikram M, Taleei AR, Aghaei MJ (2010) Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of *Aegilops tauschii* Coss. in northern Iran. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57:423-430.
- Naghavi MR, Maleki M, Alizadeh H, Pirseiedi M, Mardi M (2009) An assessment of genetic diversity in wild diploid wheat *Triticum boeoticum* from west of Iran using RAPD, AFLP and SSR markers. *Journal of Agricultural Science and Technology* 11:585-598.
- Pocza P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JP, Hyvonen J (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9:1-31.
- Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA, Etminan A, Moghaddam M (2017a) 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, Mohmoudi M, Ahmadi J, Moghaddam M, Mehrabi AA, Alavikia SS (2017) Agromorphological and molecular variability in *Triticum boeoticum* accessions from Zagros Mountains, Iran. *Genet Resources and Crop Evolution* 64:545-556.
- 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.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98:107-112.
- Saeidi H, Rahiminejad MR, Vallian S, Heslop-Harison JS (2006) Biodiversity of diploid D-genome *Aegilops tauschii* Coss. in Iran measured using microsatellites. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1477-1484.
- Schneider A, Molnar I, Molnar-Lang M (2008) Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163:1-19.
- 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.
- Tahernezah Z, Zamani MJ, Solouki M, Zahraei M, Imamjomeh AA, Jafaraghaei M and Bihamta MR (2010) Genetic diversity of Iranian *Aegilops tauschii* Coss. using microsatellite molecular markers and morphological traits. *Molecular Biology Reports* 37:3413-3420.
- Thomas KG, Bebeli PJ (2010) Genetic diversity of Greek *Aegilops* species using different types of nuclear genome markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:951-961.
- Tiwari G, Singh R, Singh N, Choudhury DR, Paliwal R (2016) Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in Kalmegh

[*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees]. Industrial Crops and Products 86:1-11.

Wang J, Wang C, Li X, Yan Y (2018) Low-molecular-weight glutenin subunits from the 1U genome of *Aegilops umbellulata* confer superior dough rheological properties and improve breadmaking quality of bread wheat. Journal of the Science and Food Agriculture 98:2156-2167.

Wang Y, Wang C, Zhang H, Yue Z, Liu X, Ji W (2013) Genetic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) and related species with SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 60:1105-1117.

Wang Y, Zhen S, Luo N, Han C, Lu X, Xia X, He Z, Yan Y (2016) Low molecular weight glutenin subunit gene Glu-B3h confers superior dough strength and breadmaking

quality in wheat (*Triticum aestivum* L). Scientific Reports 6:27182.

Weide A, Rieh S, Zeidi M, Conard NJ (2013) Using new morphological criteria to identify domesticated emmer wheat at the aceramic Neolithic site of Chogha Golan (Iran). Journal of Archaeological Science 57:109-118.

Yadav C, Malik CP (2017) Genetic diversity analysis among fennel genotypes employing gene targeted molecular markers, CAAT-box derived polymorphism (CBDP) and conserved DNA derived polymorphism (CDDP) markers. International Journal of Life Sciences 6:107-114.