



## Evaluation of diversity and population structure of durum wheat (*Triticum durum* L.) using Dof markers

Seyed Ehsan Sangi<sup>1</sup>, Abdollah Najaphy<sup>2</sup>✉, Kianoosh Cheghamirza<sup>3</sup>, Reza Mohammadi<sup>4</sup> & Karim Sorkheh<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Production and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: [ehsan.sangi@yahoo.com](mailto:ehsan.sangi@yahoo.com)

<sup>2</sup>✉ Department of Plant Production and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: [nadjaphy@yahoo.com](mailto:nadjaphy@yahoo.com)

<sup>3</sup> Department of Plant Production and Genetics, Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: [cheghamirza@yandex.ru](mailto:cheghamirza@yandex.ru)

<sup>4</sup> Dryland Agricultural Research Institute, Sararood Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran. E-mail: [rmohammadi95@yahoo.com](mailto:rmohammadi95@yahoo.com)

<sup>5</sup> Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. E-mail: [k.sorkheh@scu.ac.ir](mailto:k.sorkheh@scu.ac.ir)

### ABSTRACT

**Introduction:** Assessment of the genetic diversity of crops is vital to plant breeding and heritage conservation programs. Genetic diversity in plant species is important for selecting the right parents for hybridization and producing suitable offspring. The genetic diversity of durum wheat compared to other crops has decreased significantly during the time, initially due to the domestication of the plant and gradually due to the use of uniform and modified germplasm, which has shown this to be a threat.

**Materials and methods:** Genetic diversity and population structure of a set of durum wheat germplasm, including 36 durum wheat landraces and five new cultivars, were evaluated using 15 Dof markers.

**Results:** The total number of amplified bands was 117, of which 79 were polymorphic with an average polymorphism of 62.32%. The mean polymorphism information content, marker index, and resolving power in the population were 0.34, 1.61 and 1.9, respectively. According to the indices calculated in this study, Dof16, Dof20, Dof31 and Dof35 markers are more suitable for studying the genetic diversity of durum wheat. Population structure analysis divided germplasm into three subgroups (K=3). The molecular analysis of variance based on three subgroups obtained from STRUCTURE for Dof markers showed that the variance within and between subgroups was 85% and 15% of the total variance, respectively. Principal coordinate analysis partly corresponded to the result of population structure and divided the germplasm into three groups.

**Conclusion:** The results of the present study showed a high level of polymorphism and diversity in Dof markers, indicating the efficiency of these markers in differentiating durum wheat genotypes in this study. Due to the very high conservation of Dof sequences, this specific marker is significant in plants, so this marker can be used to study genetic diversity in different plant species.

**Keywords:** Genetic diversity, molecular analysis of variance, molecular indices, principal coordinate analysis.

**Article Type:** Research Article

**Article history:** Received: 28/04/2022, Revised: 31/05/2022, Accepted: 05/06/2022, Published online: 28/06/2022

**Cite this article:** Sangi, S. E., Najaphy, A., Cheghamirza, K., Mohammadi, R. & Sorkheh, K. (2022). Evaluation of diversity and population structure of durum wheat (*Triticum durum* L.) using Dof markers. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*. 1 (2). 155-170. DOI: [10.22126/cbb.2022.7742.1011](https://doi.org/10.22126/cbb.2022.7742.1011)





# بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات



شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳

Homepage: <https://cbb.razi.ac.ir>

## ارزیابی تنوع و ساختار جمعیت گندم دوروم (*Triticum durum L.*) با استفاده از نشانگرهای Dof

سید احسان سنگی<sup>۱</sup>، عبدالله نجفی<sup>۲</sup>، کیانوش چقامیرزا<sup>۳</sup>، رضا محمدی<sup>۴</sup> و کریم سرخه<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، کرمانشاه،

ایران. رایانامه: [ehsan.sangi@yahoo.com](mailto:ehsan.sangi@yahoo.com)

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

[nadjaphy@yahoo.com](mailto:nadjaphy@yahoo.com)

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

[cheghamirza@yandex.ru](mailto:cheghamirza@yandex.ru)

<sup>۴</sup> دانشیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، معاونت سرارود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

[rmohammadi95@yahoo.com](mailto:rmohammadi95@yahoo.com)

<sup>۵</sup> استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. رایانامه: [k.sorkkeh@scu.ac.ir](mailto:k.sorkkeh@scu.ac.ir)

### چکیده

**مقدمه:** ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی برای برنامه‌های اصلاح نباتات و حفاظت از ذخایر توارثی کاربرد حیاتی دارد. تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای انتخاب والدین مناسب در دورگ‌گیری‌ها و تولید نتایج مناسب اهمیت دارد. تنوع ژنتیکی گندم دوروم نسبت به سایر گیاهان زراعی با گذشت زمان کاهش چشمگیری یافته است. این کاهش در ابتدا به دلیل اهلی کردن گیاه و به مرور به دلیل به‌کارگیری ژرمپلاسم یکنواخت و اصلاح شده بوده که اکنون به صورت یک تهدید نمایان گردیده است.

**مواد و روش‌ها:** تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت یک مجموعه از ژرمپلاسم گندم دوروم شامل ۳۶ رقم بومی و پنج رقم جدید ایرانی با استفاده از ۱۵ آغازگر Dof مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تعداد کل قطعات تکثیر شده ۱۱۷ نوار بود که ۷۹ عدد دارای چندشکلی بودند و میانگین درصد چندشکلی کل برابر با ۶۲/۳۲ بود. میانگین شاخص محتوای چندشکلی، شاخص نشانگر و قدرت تفکیک در جمعیت به ترتیب ۰/۳۴، ۱/۶۱ و ۱/۹ بود. بنابراین با توجه به شاخص‌های محاسبه شده در این مطالعه، نشانگرهای Dof16، Dof20، Dof31 و Dof35 برای بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم مناسب‌تر تشخیص داده شدند. تجزیه ساختار جمعیت، ژرمپلاسم را به سه زیرگروه (K=3) تقسیم کرد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی بر اساس سه زیرگروه حاصل از STRUCTURE برای نشانگرهای Dof، نشان داد که سهم واریانس درون و بین زیرگروه‌ها به ترتیب ۸۵ و ۱۵ درصد از واریانس کل بود. تجزیه به مختصات اصلی تقریباً با نتایج تجزیه ساختار جمعیت مطابقت داشت و ژرمپلاسم را به سه گروه تقسیم کرد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر سطح بالایی از چندشکلی و تنوع را با استفاده از نشانگرهای Dof نشان داد که بیانگر کارایی این نشانگرها در تمایز ژنوتیپ‌های گندم دوروم در این تحقیق بود. به دلیل حفاظت شدگی بسیار بالای توالی‌های Dof، این نشانگر اختصاصی در گیاهان از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. بنابراین می‌توان در بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی مختلف از این سیستم نشانگری استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** تنوع ژنتیکی، تجزیه به مختصات اصلی، تجزیه واریانس مولکولی، شاخص‌های مولکولی.

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۸ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۳/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۵، انتشار آنلاین: ۱۴۰۱/۰۴/۰۷

استناد: سنگی، س. ا.، نجفی، ع.، چقامیرزا، ک.، محمدی، ر. و سرخه، ک. (۱۴۰۱). ارزیابی تنوع و ساختار جمعیت گندم دوروم (*Triticum durum L.*) با

استفاده از نشانگرهای Dof. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۲). ۱۵۴-۱۴۰. DOI: [10.22126/cbb.2022.7742.1011](https://doi.org/10.22126/cbb.2022.7742.1011)



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی

## مقدمه

مانند چندشکلی قطعات DNA تکثیر یافته تصادفی<sup>۱</sup>، چندشکلی طولی قطعات برش یافته<sup>۲</sup>، چندشکلی طولی قطعات تکثیر یافته<sup>۳</sup>، توالی‌های تکراری ساده یا ریزماهواره‌ها<sup>۴</sup> و غیره به‌طور گسترده برای مطالعه تغییرات توالی DNA درون و بین گونه‌ها استفاده شده‌اند (Karp *et al.*, 1997). استفاده از آغازگرها از ناحیه کدکننده ژن‌ها یا دُمین‌های حفاظت شده مانند فاکتور رونویسی Dof (اتصال DNA با یک انگشت<sup>۵</sup>) برای تجزیه و تحلیل تنوع می‌تواند جایگزینی برای توسعه نشانگرهای عملکردی باشد که با صفات مهم زراعی ارتباط معنی‌داری دارند (Rouhian *et al.*, 2017).

بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از طریق کنترل رونویسی ژن‌های خاص در گیاهان تنظیم می‌شوند. بنابراین، گیاهان برای تنظیم رونویسی مناسب و دقیق در پاسخ به مراحل رشد و تغییرات محیطی به تعداد زیادی فاکتور رونویسی<sup>۶</sup> (TF) نیاز دارند. فاکتورهای رونویسی عناصر توالی DNA خاص را در پروموتور تشخیص می‌دهند و مسئول فعال کردن یا سرکوب فعالیت RNA پلیمرز در مقابل کنترل بیان زمانی و مکانی یک ژن هدف هستند (Takatsuji, 1998). یک فاکتور رونویسی گیاهی معمولی شامل یک دُمین اتصال به DNA، یک محل الیگومریزاسیون، یک دُمین تنظیم

گندم دوروم (*Triticum turgidum* L. var durum)، گونه‌ای تتراپلوئید شامل ژنوم‌های A و B (AABB) است که در مناطق با آب و هوای مدیترانه‌ای کشت می‌شود (Hu *et al.*, 2015). گندم دوروم یکی از ضروری‌ترین گونه‌های غلات است که در سراسر جهان در سطحی بیش از ۱۷ میلیون هکتار کشت می‌شود و تولید جهانی آن ۳۸/۱ میلیون تن در سال ۲۰۱۹ بوده است (Xynias *et al.*, 2020). ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی برای برنامه‌های اصلاح نباتات و حفاظت از ذخایر توارثی، کاربرد حیاتی دارد. تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای انتخاب والدین مناسب در دورگ‌گیری‌ها و تولید نتاج مناسب اهمیت دارد. تنوع ژنتیکی گندم دوروم نسبت به سایر گیاهان زراعی با گذشت زمان کاهش چشمگیری یافته است که در ابتدا این کاهش به دلیل اهلی کردن گیاه و به مرور به دلیل به-کارگیری ژرمپلاسم یکنواخت و اصلاح شده بوده که این موضوع را به صورت تهدیدی نمایان ساخته است (Dubcovsky & Dvorak, 2007). بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی اساس درک ساختار ژنوم، توصیف و نگهداری تنوع ژنتیکی در ژرمپلاسم گیاهی، شناسایی ژن‌های اساسی صفات مهم و ابداع روش‌های اصلاحی مطلوب برای بهبود محصول می‌باشد (Hayden *et al.*, 2009). روش‌های مولکولی، به‌ویژه نشانگرهای مولکولی

<sup>1</sup> Random Amplified Polymorphic DNA

<sup>2</sup> Restriction Fragment Length Polymorphism

<sup>3</sup> Amplified Fragment Length Polymorphism

<sup>4</sup> Simple Sequence Repeats

<sup>5</sup> DNA binding with one finger

<sup>6</sup> Transcription Factor

ویژگی‌های ساختاری آن‌ها، دامنه اتصال به DNA و نقش‌های بیولوژیکی آن‌ها توسط گوپتا و همکاران (Gupta *et al.*, 2015) خلاصه شده است.

اتصال DNA با یک انگشت (Dof) فاکتورهای رونویسی مخصوص گیاه هستند. پروتئین‌های Dof عموماً دارای طول ۲۰۰ تا ۴۰۰ اسیدآمینه با دُمین بسیار حفاظت‌شده Dof از ۵۰ تا ۵۲ اسیدآمینه هستند که به عنوان یک انگشت روی نوع C2C2 ساخته شده است که یک عنصر تنظیم‌کننده سیس را با دنباله هسته مشترک '۳-AAAG-۵' می‌شناسد (Yanagisawa & Schmidt, 1999). برخلاف دُمین N ترمینال حفاظت شده، یک دُمین تنظیمی رونویسی در ترمینال C پروتئین‌های Dof بسیار متفاوت است که می‌تواند با پروتئین‌ها یا مواد تنظیم‌کننده مختلف واکنش نشان دهد تا رونویسی ژن را فعال یا مهار کند (Yanagisawa, 2002). دُمین Dof یک دُمین دو عملکردی است که هر دو برهمکنش DNA-پروتئین و پروتئین-پروتئین را تنظیم می‌کنند (Kang & Singh, 2000). به‌عنوان یک پروتئین متصل به DNA، اولین پروتئین Dof (ZmDof1) در ذرت شناسایی و مشخص شد (Yanagisawa & Izui, 1993). متعاقباً تعداد زیادی ژن Dof در ژنوم‌های مختلف گیاهان یافت شد. تعداد ژن‌های Dof شناسایی شده از بررسی‌های مبتنی بر ژنوم بسته به گونه‌های گیاهی متفاوت است؛ مثلاً ۳۶ در آراییدوپسیس، ۳۰ در برنج، ۲۶ در جو، ۲۸ در سورگوم، ۳۴ در

رونویسی و یک سیگنال مکان‌یابی هسته‌ای است. بسیاری از فاکتورهای رونویسی تنها یک نوع ناحیه اتصال به DNA و ناحیه الیگومریزاسیون دارند، اگرچه برخی فاقد دُمین تنظیمی رونویسی یا ناحیه اتصال به DNA خاص هستند (Gupta *et al.*, 2015). دُمین اتصال به DNA یک TF، به دلیل وجود اسیدآمینه بازی با DNA در عناصر توالی سیس تعامل نموده و بنابراین ویژگی فاکتور رونویسی را تعیین می‌کند. به نظر می‌رسد آرایش فضایی این بقایای اسیدآمینه در دُمین اتصال به DNA بر میل ترکیبی و گزینش‌پذیری آن‌ها تأثیر می‌گذارد. ناحیه الیگومریزاسیون مسئول تعیین برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین است، زیرا اکثر عوامل رونویسی می‌توانند هترو و/یا همودایمرهایی را تشکیل دهند که در نهایت بر ویژگی عنصر توالی، کارایی فعال‌سازی-ترانس یا میل اتصال به DNA و مکان‌یابی هسته تأثیر می‌گذارند (Kono *et al.*, 2012). تخمین زده می‌شود که تقریباً پنج درصد از ژن‌های یوکاریوتی TFs را رمزگذاری می‌کنند (Riechmann & Ratcliffe, 2000). تا به امروز، بیش از ۱۰۰ دُمین مختلف اتصال به DNA شناسایی شده است (Kummerfeid & Teichmann, 2006). بر اساس دُمین‌های اتصال به DNA، TFها به خانواده‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند که برخی از آن‌ها (مانند MYB یا bHLH) در همه یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند، در حالی که برخی دیگر (DREB، WRKY، NAC، DOF) قلمرو اختصاصی دارند. فهرستی از عوامل رونویسی مخصوص گیاه،

روش دستگاه اسپکتروفتومتر بر اساس جذب UV و ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ۱۵ آغازگر Dof طراحی شده برای خانواده غلات (جدول ۲) توسط روحیان و همکاران (Rouhian *et al.*, 2017)، و با استفاده از مستر میکس Ampliqon (Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red) انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش 2X (Amplicon)، ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، دو میکرولیتر آغازگر (۵ pmol/μl) و دو میکرولیتر DNA ژنومی (۵ ng/μl) بود. تعیین بهترین دمای اتصال آغازگرها بر اساس توصیه شرکت سازنده و پس از انجام چند واکنش PCR در دماهای مختلف برای هر آغازگر مشخص شد. در این تحقیق از دستگاه ترموسایکلر مدل SimpliAmp ساخت شرکت Applied Biosystems استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل واسرشت‌سازی اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۵ سیکل به شرح زیر بود: واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به مدت یک دقیقه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

فرآورده‌های PCR حاصل از نشانگرهای Dof با استفاده از الکتروفورز افقی با ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و به منظور

گوجه‌فرنگی، ۴۶ در ذرت، ۳۶ در خیار، ۳۳ در فلفل، ۲۹ در بادمجان، ۳۱ در گندم و ۷۸ در سویا (Rouhian *et al.*, 2017). ژن‌های Dof از بررسی‌های مبتنی بر ژنوم شناسایی شده‌اند. بر اساس شباهت توالی اسیدهای آمینه در ناحیه دُمین Dof، خانواده Dof به هفت زیرخانواده A-G طبقه‌بندی شد. این زیرخانواده‌ها ممکن است نشان‌دهنده گروه‌های عملکردی متفاوت در تنظیم رشد و نمو گیاهان باشند (Moreno-Risueno *et al.*, 2007).

تاکنون در مورد بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم با استفاده از Dof به عنوان نشانگر عملکردی مطالعه‌ای انجام نشده است. لذا هدف این مطالعه تخمین تنوع و ساختار ژنتیکی ارقام گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای Dof می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۴۱ ژنوتیپ گندم دوروم شامل ارقام بومی و جدید (جدول ۱) از معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، سرارود کرمانشاه تهیه و تحت شرایط گلخانه‌ای در گلدان، کشت داده شدند. بعد از نمونه‌برداری در اوایل رشد از برگچه‌های جوان و انتقال آن‌ها به دمای منفی بیست درجه سانتی‌گراد با هدف توقف فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده، استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌ی جوان با استفاده از کیت BIO BASIC (Cat/Sk8262) انجام شد. به‌منظور حذف RNA از نمونه‌ها، ۲-۱ میکرولیتر از آنزیم RNase برای هر نمونه استفاده شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از دو

2000). در این روش از تجزیه خوشه‌ای بیز<sup>۱۰</sup> و مبتنی بر مدل برای اختصاص ژنوتیپ‌ها به K cluster بدون داشتن پیش‌فرض از خویشاوندی‌های جمعیت استفاده می‌شود. تعداد بهینه K (زیرجمعیت‌های مورد مطالعه در جمعیت مورد نظر) از طریق شبیه‌سازی با طول دوره ۱۰۰۰۰۰ Burning و تعداد تکرار ۱۰۰۰۰۰ MCMC در این نرم‌افزار تعیین شد. تعداد K نیز ۱۰-۱ در نظر گرفته شد، همچنین تعداد زیر جمعیت از طریق رسم [LnP(D)] و  $\Delta K$  با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Structure harvester تعیین شد (Evanno *et al.*, 2005). تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار Past3.02 انجام گرفت. برای تجزیه واریانس مولکولی از نرم‌افزار GenAlex 6.51 استفاده شد.

مشاهده قطعات تکثیر یافته با (sinaclon) safe stain رنگ‌آمیزی گردیدند. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت دو ساعت و نیم انجام شد. مشاهده و عکس‌برداری به کمک دستگاه Gel Doc(WGD-30, Daihan Scientific, WISD) صورت گرفت. در نهایت به منظور امتیازبندی داده‌های حاصل از الکتروفورز و به دلیل ماهیت کیفی داده‌ها هر یک از قطعات DNA تکثیر شده به‌عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و امتیازدهی آن‌ها به صورت یک (وجود قطعه) و صفر (عدم وجود قطعه) در نرم‌افزار Excel انجام شد. برای محاسبه شاخص محتوای چندشکلی از رابطه زیر استفاده شد:

$$PIC = 1 - p^2 - q^2$$

که p فراوانی نوار موجود و q فراوانی نوار غایب است (Mousapour Gorgi *et al.*, 2011). برای محاسبه شاخص نشانگر<sup>۷</sup> (MI) تعداد نوارهای چندشکل در شاخص محتوای چندشکلی ضرب شد (Kumar *et al.*, 2009). به منظور برآورد شاخص نسبت چندشکلی موثر<sup>۸</sup> (EMR) درصد چندشکلی در تعداد نوارهای چندشکلی ضرب شد (Kumar *et al.*, 2009). قدرت تفکیک<sup>۹</sup> (RP) نیز از رابطه  $RP = \sum IB$  به دست آمد که  $IB = 1 - [2 \times (\frac{1}{5} - Pi)]$  و Pi نسبت افراد دارای نوار است (Altıntaş *et al.*, 2008).

تعیین ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 انجام شد (Pritchard *et al.*, )

<sup>7</sup> Marker Index

<sup>8</sup> Effective Multiplex Ratio

<sup>9</sup> Resolving Power

<sup>10</sup> Bayesian Clustering Method

جدول ۱- منشأ، نام و شماره ۴۱ ژنوتیپ گندم دوروم مورد بررسی.

Table 1. Origin, name and number the 41 of Durum wheat genotype.

منشأ	نام/شجره ژنوتیپ	بومی/جدید	شماره	منشأ	نام/شجره ژنوتیپ	بومی/جدید	شماره
Origin	Name	Landrace/New	NO.	Origin	Name	Landrace/New	NO.
Khorramabad	KC-656	Landrace	22	Khorramabad	KC-643	Landrace	1
Iran	Dena	New cultivar	23	Khorramabad	KC-659	Landrace	2
Islamabad-e-Gharb	KC-591	Landrace	24	Kermanshah	KC-911	Landrace	3
Khorramabad	KC-647	Landrace	25	Iran	KC-981	Landrace	4
Iran	W-C 45587	Landrace	26	Iran	KC-1033	Landrace	5
Gachsaran	TN-12571	Landrace	27	Iran	KC-1047	Landrace	6
Kermanshah	TN-12595	Landrace	28	Iran	KC-2887	Landrace	7
Iran	G-1252/ZARDAK	Landrace	29	Mashhad	KC-3296	Landrace	8
Iran	Zardak/3/61-130/414-44//CAK 79	Landrace	30	Mashhad	KC-3399	Landrace	9
Iran	Saji	New cultivar	31	Iran	KC_3632	Landrace	10
Iran	Zardak	Landrace	32	Kermanshah	TN_12598	Landrace	11
Iran	65-12-3-3	Landrace	33	Khorramabad	KC-678	Landrace	12
Iran	25-25-1-5	Landrace	34	Kermanshah	KC-874	Landrace	13
Iran	75-5-3-5	Landrace	35	Khorramabad	KC-963	Landrace	14
Iran	409	Landrace	36	Iran	KC-1298	Landrace	15
Iran	259	Landrace	37	Iran	KC-1648	Landrace	16
Iran	15-15-1-3	Landrace	38	Mashhad	KC-3296	Landrace	17
Iran	240	Landrace	39	Ahar	TN-12736	Landrace	18
Iran	37-24-2-3	Landrace	40	Iran	Shabrang	New cultivar	19
Iran	249	Landrace	41	Iran	Behrang	New cultivar	20
				Iran	Dehdasht	New cultivar	21

## نتایج

۷۹ عدد دارای چندشکلی بودند و میانگین درصد چندشکلی

کل برابر با ۶۲/۳۲ بود. بیشترین شاخص محتوای چندشکلی

۰/۴۹ و مربوط به آغازگرهای Dof16، Dof 25 و Dof31 بود

و کمترین آن ۰/۰۲ بود که به نشانگر Dof37 تعلق

داشت. میانگین شاخص محتوای چندشکلی (PIC) در

جمعیت ۰/۳۴ بود. محتوای اطلاعات چندشکلی یکی از

۱۵ جفت آغازگر Dof استفاده شده در این پژوهش همگی

دارای قابلیت نمره‌دهی بوده و مورد استفاده قرار گرفتند.

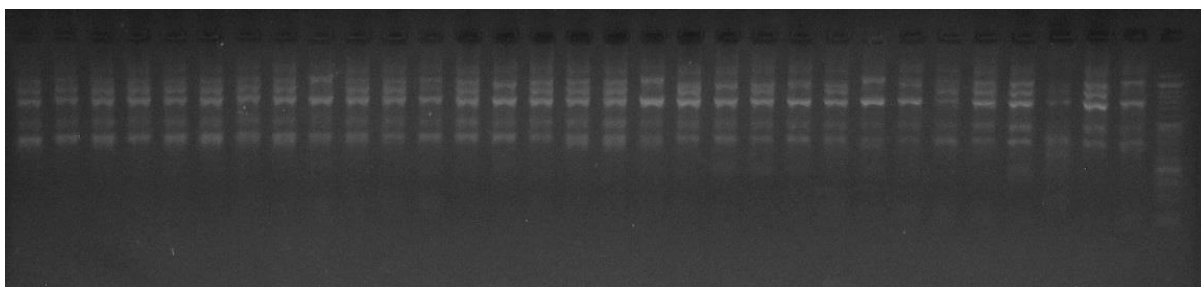
نمونه عکس الکتروفورز محصولات در شکل ۱ نشان داده

شده است. نتایج مربوط به این آغازگرها در جدول ۳ ارائه

شده است. تعداد کل قطعات تکثیر شده ۱۱۷ نوار بود که

چندشکلی برای آغازگرها در اختیار می‌گذارد، زیرا علاوه بر مزایای شاخص محتوای چندشکلی، تعداد کل باندها و نسبت چندشکلی را هم در نظر می‌گیرد و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید باند بیشتر مشخص می‌کند (Powell *et al.*, 1996). بالاترین قدرت تفکیک ۴/۷۸ و مربوط به آغازگر Dof16 و کمترین آن ۰/۰۹ بود که به آغازگر Dof37 تعلق داشت. در مجموع با توجه به این نتایج اکثر آغازگرهای مورد استفاده از کارایی قابل قبولی برخوردار بودند. آغازگرهایی که مقادیر PIC آن‌ها بین ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ باشد سودمند هستند و آنهایی که کمتر از ۰/۲۵ هستند، حاوی اطلاعات اندکی می‌باشند (Ditta *et al.*, 2018). بنابراین با توجه به شاخص‌های محاسبه شده در این مطالعه، نشانگرهای Dof16، Dof20، Dof31 و Dof35 برای بررسی تنوع ژنتیکی گندم دوروم مناسب‌تر به نظر می‌رسند.

پارامترهای مهم برای مقایسه نشانگرها از نظر قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این شاخص دلالت بر چندشکلی زیاد و بیانگر قدرت تفکیک بالای آن نشانگر است (Carvalho *et al.*, 2009). شاخص محتوای چندشکلی در نشانگرهای غالب از صفر تا نیم متغیر است و هر چه این عدد بزرگتر باشد، نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر آغازگر مورد استفاده است (Anderson *et al.*, 1993). بیشترین درصد چندشکلی را آغازگرهای Dof18 و Dof35 به مقدار ۱۰۰ درصد داشتند و کمترین آن مربوط به آغازگر Dof37 به مقدار ۲۵ درصد بود. بیشترین نسبت چندشکلی موثر ۱۰/۰۸ بود که به آغازگر Dof16 تعلق داشت و کمترین نسبت آن ۰/۲۵ بود که مربوط به آغازگر Dof37 بود. بالاترین شاخص نشانگر ۴/۹۷ و مربوط به آغازگر Dof16 و کمترین آن ۰/۰۰۶ و برای نشانگر Dof37 ثبت شد. شاخص نشانگر اطلاعات بیشتری نسبت به شاخص محتوای



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR ژنوتیپ‌های مختلف گندم دوروم برای آغازگر Dof بر روی ژل آگارز.

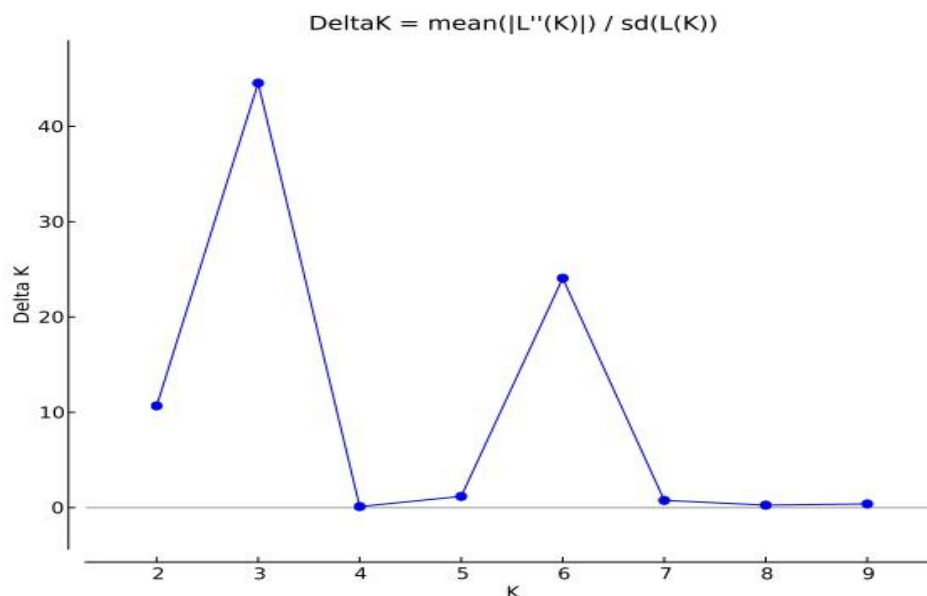
**Figure 1. Electrophoresis of PCR products from different genotypes of durum wheat for Dof marker on agarose gel.**



جدول ۲- مشخصات آغازگرهای Dof مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد مطالعه.

**Table 2. Characteristics of Dof markers used to investigate the genetic diversity of durum wheat genotypes studied.**

دمای اتصال Annealing temperature	توالی برگشت آغازگر ۵'→۳' Reverse Primer 5'→3'	توالی رفت آغازگر ۵'→۳' Forward Primer 5'→3'	آغازگر Primer	ردیف NO.
56	CGTTGCCACCGCCCCAGAAT	GCACCACCACCACCACCACCAG	Dof 16	1
52	AGCCGCCATGTA CTGCCTCTG	GCGCGGCCGA ACTCAAT	Dof 18	2
53	GGAGAAATGAAGGGCCAACTGAA	AGGGTGGTGGATCGAGTGAAGAGA	Dof 19	3
53	CGCGATCCCCGAGGTGTAGTAG	CGGAGGCGCAAGAAGACGAA	Dof 20	4
48	TGCCACGCGGTCAGGTC	GCAGGGGCAGGGATACG	Dof 22	5
52	ATCACCGCCGCTGCTGTTATT	GCCCTCGGTGCAAGTCTGG	Dof 24	6
52	TGAGGCCCCACCAGTTGTCT	GTGGCAGTGGGGAGCGTAAG	Dof 25	7
53	GCTCCCGCCGTTCCAGTAATC	GAGGCGGCCGTC AAGTGC	Dof 28	8
53	CGCCGCGTTATTGTTGTCT	GCCCTCGGTGCAAGTCTGGTA	Dof 31	9
51	CACAGAAATGGGACGGAACAAT	CACCCACAAAGCCACTGATAACAA	Dof 35	10
43	ATGACCTCCATTTCCATT	CCCTTCATTACCTGATG	Dof 36	11
46	AGCGAAATAAGTCAAGCAAG	AAACTCCAAGAGCAAGGCAG	Dof 37	12
56	GACGGCCCCACGGAGGACGAC	CGCGGCCGAGAAGGAGAAG	Dof D2	13
45	GACGACGGCTTGTCTT	GGAGAAGGCGCTCAAGT	Dof D3	14
55	GACGGCCCCACGGAGGACGAC	CGCGGCCGAGAAGGAGA	Dof D4	15



شکل ۲- نمودار دو طرفه برای تعیین تعداد K بر مبنای آغازگرهای Dof.

**Figure 2. Two-way diagram for determining the number of K based on Dof markers.**

جدول ۳- شاخص‌های مولکولی محاسبه شده برای آغازگرهای Dof استفاده شده در ۴۱ ژنوتیپ گندم دوروم.

Table 3. Molecular indices calculated for Dof markers used for the 41 durum wheat genotypes.

قدرت تفکیک	شاخص نشانگر	نسبت چندشکلی مؤثر	درصد چند شکلی	تعداد قطعات چند شکل	تعداد کل قطعات تکثیر شده	شاخص محتوای چند شکلی	آغازگر	ردیف
Resolving power	Marker index	Effective multiplex ratio	Polymorphic c %	Number of polymorphic fragment	Number of amplified fragment	Polymorphic information Content	Primer	NO.
4.78	4.97	10.08	91.66	11	12	0.49	Dof 16	1
1.65	2.48	9	100	9	9	0.27	Dof 18	2
2.53	1.25	3.6	60	6	10	0.34	Dof 19	3
3.8	2.52	5.44	77.78	7	9	0.46	Dof 20	4
.024	0.02	0.33	33.33	1	3	0.07	Dof 22	5
3.17	1.93	4.5	75	6	8	0.43	Dof 24	6
0.19	0.24	0.5	50	1	2	0.49	Dof 25	7
0.92	0.33	1	33.33	3	9	0.33	Dof 28	8
2.68	4.02	8.1	90	9	10	0.49	Dof 31	9
2.73	3.49	8	100	8	8	0.43	Dof 35	10
0.43	0.96	2.28	57.14	4	7	0.42	Dof 36	11
0.09	0.006	0.25	25	1	4	0.02	Dof 37	12
2.97	1.23	4.08	58.33	7	12	0.3	Dof D2	13
0.34	0.28	0.66	33.33	2	6	0.42	Dof D3	14
2.04	0.55	2	50	4	8	0.27	Dof D4	15
-	-	-	-	79	117	-	-	کل
1.9	1.61	3.98	62.32	5.26	7.8	0.34	-	میانگین

شاخص، با عنوان یک ژنوتیپ مخلوط<sup>۱۱</sup> تعریف می‌شوند (Spataro *et al.*, 2011). نتایج تجزیه ساختار جمعیت براساس آغازگرهای Dof با نرم‌افزار STRUCTURE، ۳ زیرجمعیت احتمالی (K=3) را در افراد مورد مطالعه شناسایی کرد و کل ژنوتیپ‌ها در سه زیرگروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۲) که نتایج حاصل از رسم بارپلات (شکل ۳) نیز این مطلب را تأیید کرد.

تجزیه ساختار جمعیت با نرم‌افزار STRUCTURE امکان شکستن جمعیت به زیرجمعیت‌های با ساختارهای مختلف را امکان‌پذیر می‌کند. زیرجمعیت‌های موجود از نظر ژنتیکی با هم متفاوت هستند و اگر ژنوتیپ‌هایی اختلاط داشته باشند، با انجام این تجزیه شناسایی می‌شوند (Pritchard *et al.*, 2000). یک ژنوتیپ وقتی درصد عضویت آن در یک کلاستر (زیرجمعیت) بیشتر و مساوی ۰/۷ باشد، به آن کلاستر نسبت داده می‌شود و افراد با درصد عضویت کمتر از این

<sup>11</sup> Admixed

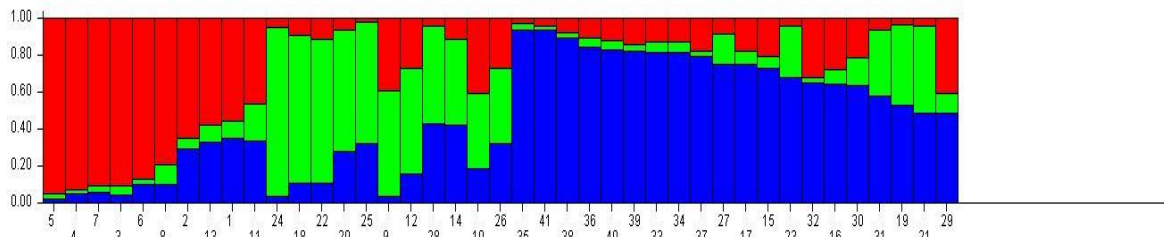
جمعیت می‌تواند به دلایل زیادی از جمله تلاقی بین ارقام مختلف، تعداد مکان‌های مورد بررسی، موقعیت نوارهای تکثیر شده، ویژگی‌های ژنوتیپی جمعیت، بزرگ بودن ژنوم و اندازه جمعیت باشد (Mahjoob et al., 2014).

نتایج تجزیه به مختصات اصلی برای مجموع نشانگرهای Dof نشان داد که پنج مؤلفه اول ۴۶/۷۱ درصد کل تنوع را توجیه می‌کنند. بای‌پلات مؤلفه اول روی مؤلفه دوم، جمعیت را به سه گروه تقسیم کرد. مؤلفه اول ۱۳/۹۹ درصد و مؤلفه دوم ۱۲/۴۹ درصد و در مجموع این دو مؤلفه ۲۶/۴۸ درصد از کل تنوع را توجیه کردند. ملچینگر (Melchinger, 1993) نقش دو روش تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه ساختار جمعیت را در ارزیابی تنوع ژنتیکی ذرت و جو مقایسه کرد و اظهار نمود که تجزیه به مختصات اصلی زمانی که سه مؤلفه اول بیشتر از ۲۵ درصد از تغییرات کل را تبیین کنند، روابط موجود بین گروه‌ها و ژنوتیپ‌ها را صحیح‌تر توصیف می‌کنند (Melchinger, 1993). همچنین علی‌پور و همکاران (Alipour et al., 2017) بیان کردند که برای استخراج بیشترین اطلاعات از داده‌های نشانگر مولکولی، تجزیه به مختصات اصلی می‌تواند در ترکیب با تجزیه ساختار جمعیت به کار رود، خصوصاً اگر سه مؤلفه اول بیشتر از ۲۵ درصد از تغییرات کل را توجیه کنند. در مطالعه حاضر سه مؤلفه اول در تجزیه به مختصات اصلی، ۳۴/۵ درصد از تغییرات کل را توجیه کردند. نتیجه تجزیه به

بر اساس نتایج بارپلات، ۲۱ ژنوتیپ از کل ۴۱ ژنوتیپ گندم دوروم استفاده شده با احتمال بیشتر از ۷۰ درصد در سه گروه رنگی قرار گرفتند که ۶ ژنوتیپ (۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸) به گروه قرمز، ۳ ژنوتیپ (۱۸، ۲۲ و ۲۴) به گروه سبز و ۱۲ ژنوتیپ (۱۵، ۱۷، ۲۷، ۳۳، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰ و ۴۱) به گروه آبی تعلق داشتند. همچنین ۲۰ ژنوتیپ دیگر چون درصد عضویت کمتر از ۰/۷۰ داشتند، به هیچ گروهی تعلق نداشته و جزو ژنوتیپ‌های مخلوط قرار گرفتند. به احتمال زیاد علت این موضوع، استفاده از والدین مشترک در مسیر برنامه‌های بن‌زادی این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. این مطلب با نتیجه پژوهشی که با استفاده از نشانگرهای SNP و SilicoDART روی ژنوتیپ‌های گندم دوروم انجام گرفته، مطابقت دارد (Baloch et al., 2017).

بر اساس سه زیرگروه بدست آمده از تجزیه ساختار جمعیت، تجزیه واریانس مولکولی برای آغازگرهای Dof انجام شد. نتایج (جدول ۴) نشان داد که بر اساس سطح معنی‌داری آماره PhiPT، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ بین سه زیرگروه وجود دارد. همچنین ۱۵ درصد از تنوع کل بین زیرگروه‌ها و ۸۵ درصد آن مربوط به درون زیرگروه‌ها است. بنابراین تفاوت ژنتیکی بین زیرگروه‌ها بسیار معنی‌دار می‌باشد. وجود تنوع ژنتیکی بالا درون جمعیت‌ها علاوه بر اینکه نشان‌دهنده هتروزیگوسیتی زیاد آن‌ها می‌باشد، بیانگر ناهمگنی اختلاف ژنتیکی افراد درون جمعیت از لحاظ مکان ژنی تکثیر یافته است. به طور کلی ناهمگنی بالا درون

مختصات اصلی تقریباً با نتیجه ساختار جمعیت مطابقت داشت و ژرم پلاسم را به سه گروه تقسیم کرد (شکل ۴).



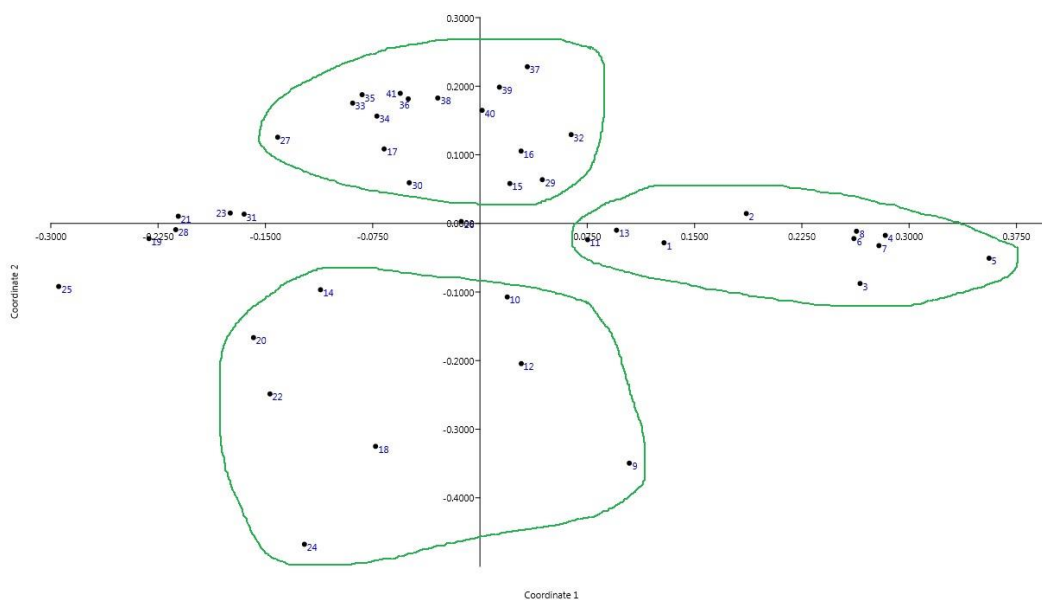
شکل ۳- بارپلات ساختار جمعیت مستخرج از نرم افزار STRUCTURE برای نشانگرهای Dof که در سه بخش رنگی تقسیم شده است. اعداد روی محورهای افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر گروه را نشان می‌دهند.

Figure 3. Barplot of the population structure extracted from STRUCTURE software for Dof markers, which is divided into 3 color sections. The numbers on the horizontal and vertical axes show the number of people and the coefficient of belonging of each person to each group, respectively.

جدول ۴- تجزیه واریانس ژنوتیپ‌های گندم دوروم بر مبنای تجزیه ساختار جمعیت.

Table 4. Analysis of variance of durum wheat genotypes based on population structure analysis.

سطح معنی‌داری Significance level	PhiPT	درصد تنوع Variation%	واریانس برآورد شده Estimated variance	میانگین مربعات MS	درجه آزادی d.f.	منابع تغییرات S.O.V.
0.001	0.148	15	1.66	31.09	2	بین زیرگروه‌ها Between subgroups
		85	9.56	9.56	38	درون زیرگروه‌ها Within subgroups
		100	11.22	-	40	کل Total



شکل ۴- تجزیه به مختصات اصلی ۴۱ ژنوتیپ گندم دوروم با نشانگرهای Dof.

Figure 3. Principal coordinate analysis of 41 genotypes of durum wheat using Dof markers.

#### نتیجه گیری

نشانگر Dof به دلیل اختصاصی بودن در گیاهان از اهمیت بالایی برخوردار است. همچنین توالی‌های Dof دارای حفاظت شدگی بسیار بالایی هستند. بنابراین می‌توان در بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی مختلف از آن‌ها استفاده کرد.

مطالعه حاضر سطح بالایی از چندشکلی و تنوع را در سطح نشانگرهای Dof نشان داد که بیانگر کارایی این نشانگرها در تمایز ژنوتیپ‌های گندم دوروم بود. نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق جنبه عمومی داشتند (برای خانواده غلات طراحی شدند)، لذا بهتر است برای هر گیاه مجموعه‌ای از نشانگرهای مربوط به آن به صورت اختصاصی طراحی شوند.

#### References

- Alipour, H., Bihamta, M. R., Mohammadi, V., Peyghambari, S. A., Bai, G., & Zhang, G. 2017 . Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01293>

- Altıntaş, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A., & Özkan, H. 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127 (1), 9-14. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01424.x>
- Anderson, J. A., Churchill, G. A., & Auntrique, J. E. 1993. Optimizing parental for genetic linkage maps. *Genome*, 36 (1), 181-186. <https://doi.org/10.1139/g93-024>
- Baloch, F. S., Alsaleh, A., Shahid, M. Q., Ciftci, V., Saenz de Maria, L., Aasim, M., Nadeem, M. A., Aktas, H., Ozkan, H., & Hatipoglu, R. 2017. A whole genome DArTseq and SNP analysis for genetic diversity assessment in durum wheat from central fertile crescent. *PLoS One*, 12 (1), e0167821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167821>
- Carvalho, A., Lima-Brito, J., Maças, B., & Guedes-Pinto, H. 2009. Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. *Biochemical Genetics*, 47 (3-4), 276-294. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9227-5>
- Ditta, A., Zhou, Z., & Cai, X. 2018. Assessment of genetic diversity, population structure, and evolutionary of uncharacterized genes in a novel germplasm collection of diploid and allotetraploid *Gossypium* accessions using EST and genomic SSR markers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (8), 2401. <https://doi.org/10.3390/ijms19082401>
- Dubcovsky, J., & Dvorak, J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316 (5833), 1862-1866. <https://doi.org/10.1126/science.1143986>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14 (8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Gupta, S., Malviya, N., Kushwaha, H., Nasim, J., Bisht, N. C., Singh, V. K., & Yadav, D. 2015. Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. *Planta*, 241 (3), 549-562. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2239-3>
- Hayden, M., Tabone, T., Nguyen, T., Coventry, S., Keiper, F., Fox, R., Chalmers, K., Mather, D., & Eglinton, J. 2009. An informative set of SNP markers for molecular characterisation of Australian barley germplasm. *Crop and Pasture Science*, 61 (1), 70-83. <https://doi.org/10.1071/CP09140>
- Hu, X., Ren, J., Ren, X., Huang, S., Sabiel, S. A., Luo, M., Nevo, E., Fu, C., Peng, J., & Sun, D. 2015. Association of agronomic traits with SNP markers in durum wheat (*Triticum turgidum* L. durum (Desf.)). *PLoS One*, 10, e0130854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130854>
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayad, W. G., & Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI. Rome.

- Kang, H. G., & Singh, K. 2000. Characterization of salicylic acid-responsive *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. *The Plant Journal*, 21 (4), 329-339. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00678.x>
- Kono, H., Imanishi, M., Negi, S., Tatsutani, K., Sakaeda, Y., Hashimoto, A., Nakayama, C., Futaki, S., & Sugiura, Y. 2012. Rational design of DNA sequence-specific zinc fingers. *FEBS Letters*, 586 (6), 918-923. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.025>
- Kumar, M., Mishra, G. P., Singh, R., Kumar, J., Naik, P. K., & Singh, S. B. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15 (3), 225-236. <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0026-6>
- Kummerfeld, S. K., & Teichmann, S. A. 2006. DBD: a transcription factor prediction database. *Nucleic Acids Research*, 34, 74-81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj131>
- Mahjoob, B., Najafi-Zarini, H., & Hashemi, S. H. R. 2014. Assesment of genetic relationships among 36 Brassica genotypes using ISSR molecular markers. *Journal of Crop Breeding*, 6 (14), 96-106. [In Persian]. <http://jcb.sanru.ac.ir/article-1-322-en.html>
- Melchinger, A. 1993. Use of RFLP markers for analysis of genetic relationships among breeding materials and prediction of hybrid performance. *International Crop Science I*. CSSA, Madison, WI, USA Chap. 81, 621-628. <https://doi.org/10.2135/1993.internationalcropscience.c98>
- Moreno-Risueno, M. A., Martinez, M., Vicente-Carbajosa, J., & Carbonero, P. 2007. The family of Dof transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277 (4), 379-390. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0186-9>
- Mousapour Gorgi, A., Pocazi, 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. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9187-2>
- Powell, W. W., Koput, K. W., & Smith-Doerr, L. 1996. Interorganizational collaboration and the locus of innovation: Networks of learning in biotechnology. *Administrative Science Quarterly*, 41 (1), 116-145. <https://doi.org/10.2307/2393988>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A., & Donnelly, P. 2000. Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67 (1), 170-181. <https://doi.org/10.1086/302959>
- Riechmann, J. L., & Ratcliffe, O. J. 2000. A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (5), 423-434. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00107-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00107-2)
- Rouhian, S., Ahmadi, D. N., & Sorkkeh, K. 2017. Development of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor gene-specific primers through data mining as a functional marker and their use for

- genetic diversity study in barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm. *Genes & Genomics*, 39, 567-579. <https://doi.org/10.1007/s13258-016-0510-7>
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Zeuli, P. S., & Negri, V. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122 (7), 1281-1291. <https://doi.org/10.1007/s00122-011-1530-y>
- Takatsuji, H. 1998. Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54, 582-596. <https://doi.org/10.1007/s000180050186>
- Xynias, I. N., Mylonas, I., Korpetis, E. G., Ninou, E., Tsaballa, A., Avdikos, I. D., & Mavromatis, A. G. 2020. Durum wheat breeding in the Mediterranean region: Current status and future prospects. *Agronomy*, 10 (3), 432. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030432>
- Yanagisawa, S. 2002. The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 7 (12), 555-560. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02362-2](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02362-2)
- Yanagisawa, S., & Izui, K. 1993. Molecular cloning of two DNA binding Proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif. *Journal of Biochemical Chemistry*, 268 (21), 6028-6036.
- Yanagisawa, S., & Schmidt, R. J. 1999. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal*, 17 (2), 209-214. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00363.x>