



Evaluation of genetic diversity of durum wheat genotypes using RAPD and ISSR markers

Asieh Moradi ¹✉ & Reza Mohammadi ²

¹ Agricultural and Natural Resources Engineering Organization, Hamedan, Iran. E-mail: amoradi14@yahoo.com

² Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Sararood Branch, AREEO, Kermanshah, Iran. E-mail: r.mohammadi@areeo.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Knowledge of the amount of genetic diversity in germplasms provides plant breeders with valuable information for the effective preservation of genetic resources and their use. More knowledge about genetic diversity and genetic factors of diversity is very beneficial for exploring new genes. Maintaining such diversity and using it in breeding programs is one of the main principles of biological conservation and genetic breeding of crop plants.

Materials and methods: This research was conducted to evaluate the genetic diversity in 20 different durum wheat genotypes, including landraces, improved cultivars, and breeding lines using RAPD and ISSR molecular markers. In this research, 31 RAPD primers and 13 ISSR primers were used to evaluate the genetic diversity in durum wheat genotypes.

Results: Based on the results, the studied genotypes had significant diversity based on both molecular markers. In RAPD analysis, 31 primers amplified 319 bands, of which 204 bands were polymorphic and the percentage of polymorphic bands was estimated at 63.94%. In ISSR markers, 13 primers produced 125 bands, of which 88 bands were polymorphic and the total percentage of polymorphic bands was estimated at 70.4%. Genetic similarity and cluster analysis of RAPD and ISSR were estimated using the Jaccard coefficient. For RAPD, the similarity index values ranged from 0.22 to 0.90, and for ISSR from 0.22 to 0.94, which indicated the presence of high genetic diversity at the molecular level for the studied genotypes. The results of cluster analysis and principal coordinate analysis based on each of the RAPD and ISSR markers grouped genotypes into four groups. The results of the research showed that RAPD and ISSR markers are suitable markers for genetic diversity studies in durum wheat. But the ISSR marker is preferable due to its greater compatibility with the geographical origin, high reproducibility, and the similar cost as RAPD. The results showed that the grouping patterns of durum wheat genotypes are not mainly due to their geographical origins. The results indicated that the grouping of populations in different geographical regions in similar groups is probably due to the gene flow between regions through the gradual exchange of grains between farmers. This could also be due to the previous selection for sum agronomical traits in the populations for tolerance to environmental stresses.

Conclusion: Based on both markers, genotype # 20 (Stj3/Bcr/lks4) showed a different response from the other genotypes, so it was placed in a separate group in the analysis based on each of the markers. Therefore, this genotype can be used as one of the parents in crossing with other genotypes in subsequent studies.

Keywords: Durum wheat, cluster analysis, ISSR marker, RAPD marker.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 24/06/2022, Revised: 02/08/2022, Accepted: 16/09/2022, Published online: 29/09/2022

Cite this article: Moradi, A. & Mohammadi, R. (2022). Evaluation of genetic diversity of durum wheat genotypes using RAPD and ISSR markers. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*. 1 (3). 302-317. DOI: [10.22126/cbb.2022.8491.1024](https://doi.org/10.22126/cbb.2022.8491.1024)





بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳



بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات

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

ارزیابی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌های گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR

آسیه مرادی^۱ و رضا محمدی^۲

^۱ سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی، همدان، ایران. رایانامه: amoradi14@yahoo.com

^۲ موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، معاونت سرارود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران. رایانامه:

r.mohammadi@areeo.ac.ir

چکیده

مقدمه: آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسماها اطلاعات ارزشمندی را در جهت حفظ منابع ژنتیکی و کاربرد آنها را در اختیار به‌نژادگر قرار می‌دهد. دانش بیشتر درباره تنوع ژنتیکی و عوامل ژنتیکی تنوع برای کشف ژن‌های جدید بسیار سودمند است.

مواد و روش‌ها: این تحقیق با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۲۰ ژنوتیپ متنوع گندم دوروم شامل ارقام بومی، ارقام اصلاح شده و لاین‌های اصلاحی با استفاده از ۳۱ آغازگر RAPD و ۱۳ آغازگر ISSR انجام گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل، ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس هر دو نشانگر تنوع قابل توجهی داشتند. در تجزیه و تحلیل RAPD، ۳۱ آغازگر ۳۱۹ باند را تکثیر کردند که ۲۰۴ باند از آنها چندشکل بود و درصد نوارهای چندشکلی ۶۳/۹۴ درصد برآورد شد. در نشانگرهای ISSR، ۱۳ آغازگر ۱۲۵ باند تولید کردند که ۸۸ باند از آنها چند شکل بود و درصد کل نوارهای چندشکل ۷۰/۴ درصد برآورد شد. برآورد تشابه ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای RAPD و ISSR با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد انجام شد. مقادیر ضرایب تشابه جاکارد برای RAPD، از ۰/۲۲ تا ۰/۹۰ و برای ISSR از ۰/۲۲ تا ۰/۹۴ متغیر بود که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در سطح مولکولی برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی بر اساس هر یک از نشانگرهای RAPD و ISSR ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم نمود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای RAPD و ISSR، نشانگرهای مناسبی جهت مطالعات تنوع ژنتیکی در گندم دوروم می‌باشند. اما نشانگر ISSR به دلیل تطابق بیشتر با منشأ جغرافیایی، تکرار پذیری بالا و هزینه یکسان با RAPD از ارجحیت بیشتری برخوردار است. نتایج نشان داد که الگوهای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم دوروم عمدتاً به دلیل منشأ جغرافیایی آنها نیست. این نتایج بیانگر این است که گروه‌بندی توده‌های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف در گروه‌های مشابه احتمالاً به دلیل جریان ژن در بین مناطق از طریق تبادل تدریجی گندم بین کشاورزان و همچنین به این دلیل باشد که توده‌های مورد استفاده برای تحمل تنش‌های محیطی و برخی ویژگی‌های زراعی از پیش مورد گزینش قرار گرفته‌اند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست آمده از هر دو نشانگر، ژنوتیپ شماره ۲۰ (Stj3//Bcr/lks4) رفتاری کاملاً متفاوت با بقیه ژنوتیپ‌ها داشت، به‌طوری‌که در بررسی به کمک هر یک از نشانگرها در گروهی جداگانه قرار گرفت. بنابراین می‌توان از این ژنوتیپ به‌عنوان یکی از والدین در تلاقی با سایر ژنوتیپ‌ها در مطالعات آتی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: گندم دوروم، تجزیه کلاستر، نشانگر ISSR، نشانگر RAPD

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۰۳ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۵/۱۱ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۵، انتشار آنلاین: ۱۴۰۱/۰۷/۰۷

استناد: مرادی، آ. و محمدی، ر. (۱۴۰۱). ارزیابی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌های گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR. بیوتکنولوژی و بیوشیمی

غلات، ۱ (۳): ۳۰۲-۳۱۷. DOI: [10.22126/cbb.2022.8491.1024](https://doi.org/10.22126/cbb.2022.8491.1024)



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه رازی

مقدمه

مورفولوژیک، ممکن است کاملاً قابل اطمینان نباشد؛ چراکه این صفات محدود بوده و تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند (Fufa et al., 2005). با وجود این محدودیت‌ها، خصوصیات فنوتیپی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای مطالعات تنوع ژنتیکی و توسعه رقم استفاده می‌شوند. آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما اطلاعات ارزشمندی را در جهت حفظ مؤثر منابع ژنتیکی و نیز کاربرد آن منابع در اختیار می‌گذارد (Kresovich et al., 1995). دانش بیشتر درباره تنوع ژنتیکی و عوامل ژنتیکی تنوع برای کشف ژن‌های جدید بسیار سودمند است. حفظ چنین تنوعی و کاربرد منطقی آن در طبیعت، از اصول اصلی حفظ بیولوژیکی و اصلاح ژنتیکی می‌باشد. تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما می‌تواند به وسیله نشانگرهای مورفولوژیکی، زراعی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گیرد (Jana, 1999; Peng et al., 2009). بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، اساس درک ساختار ژنوم، توصیف و نگهداری تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما گیاهی، شناسایی ژن‌های اساسی صفات مهم و ابداع روش‌های اصلاحی مطلوب برای بهبود محصول می‌باشد (Hayden et al., 2009). یکی از کاربردهای مهم نشانگرهای مولکولی، بهبود و افزایش کارایی روش‌های مرسوم اصلاح نباتات از طریق انتخاب غیرمستقیم توسط نشانگرهای مولکولی پیوسته با صفات است.

نشانگرهای مولکولی در مورد صفات تک ژنی و هم در مورد مکان‌های کنترل کننده صفات کمی مورد استفاده قرار می‌گیرند و چون تحت تأثیر محیط قرار نمی‌گیرند، می‌توان آن‌ها را در تمام مراحل رشدی گیاه به کار برد (MirMohammadi Maibody & Golkar, 2019).

گروال و همکاران (Grewal et al., 2007) رابطه ژنتیکی ۲۰ توده گندم هندی (۱۷ هگزاپلوئید، دو تتراپلوئید و یک دیپلوئید) را با استفاده از ۲۵ آغازگر RAPD^۱ بررسی نمودند. در مجموع ۳۷۲ باند با استفاده از ۲۵ آغازگر RAPD مشاهده شد که ۳۲۳ باند (۸۶/۸ درصد) چندشکلی

گندم دوروم (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) (Desf) Husn. گونه‌ای تتراپلوئید با ژنوم‌های A و B است که در مناطق با آب و هوای مدیترانه‌ای کشت می‌شود (Hu et al., 2015). مبدأ و منشأ گندم تتراپلوئید و خویشاوندان وحشی و ارقام بومی آن، غرب ایران معرفی شده است (Aghaee-Sarbarzeh, 2012). ایران به عنوان خاستگاه و مرکز تنوع اولیه گونه‌های گندم و خویشاوندان وحشی آن، دارای تنوع ژنتیکی بسیار غنی برای اصلاح گندم نان و دوروم و تولید ارقام پرمحصول و سازگار است (Aghaee-Sarbarzeh, 2012). گندم دوروم یکی از ضروری‌ترین گونه‌های غلات است و در سراسر جهان بیش از ۱۷ میلیون هکتار کشت شده و تولید جهانی آن در سال ۲۰۱۹ برابر ۳۸/۱ میلیون تن بوده است (Xynias et al., 2020). گندم دوروم حدود ۱۰٪ کل سطح زیر کشت جهانی گندم را به خود اختصاص داده است. با وجود سطح پایین کشت، به دلیل ویژگی‌ها و محصولات نهایی منحصر به فرد، یک محصول مهم اقتصادی به شمار می‌رود. دانه‌های گندم دوروم معمولاً بزرگ، زرد کهربایی و نیمه شفاف هستند. این خصوصیات، همراه با محتوای پروتئینی و گلوتن بیشتر، آن را برای ساخت محصولات غذایی متنوع مخصوصاً پاستا و ماکارونی مناسب کرده است (Aghaee-Sarbarzeh, 2012).

آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، در اصلاح نباتات از اهمیت زیادی برخوردار است و تنوع ژنتیکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار محسوب می‌شود. بیشتر به‌نژادگران معتقد هستند که کمبود تنوع ژنتیکی، پیشرفت‌های اصلاحی را در آینده مختل می‌کند (Rajaram, 2010). فقدان تنوع ژنتیکی می‌تواند به صورت بالقوه توانایی سیستم‌های زراعی را برای مقاومت در برابر آفات و پاتوژن‌های ناشناخته، یا شرایط محیطی ناسازگار محدود نماید. صفات مورفولوژیک (فنوتیپی) معمولاً برای تخمین تنوع ژنتیکی استفاده می‌شوند، زیرا اندازه‌گیری آن‌ها ساده هستند. اما بررسی تنوع تنها بر اساس صفات

¹ Randomly amplified polymorphic DNA

کاراکا و ایزبیراک (Karaca & Izbirak, 2008) به منظور تجزیه و تحلیل مقایسه تنوع ژنتیکی در ارقام گندم دوروم ترکیه با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR، آزمایشی را انجام دادند که درصد چندشکلی برای هر دو نشانگر به ترتیب ۴۲/۹ و ۵۷/۹ درصد بود که با توجه به درصد چند شکلی، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از نشانگر ISSR کارآمدتر بوده است. پاسکولون و همکاران (Pasqualone *et al.*, 2000) آزمایشی را در مورد ارزیابی سودمندی نشانگر ISSR برای شناسایی ۳۰ رقم و ۲۲ لاین اصلاحی گندم دوروم ایتالیایی را با استفاده از ۹ آغازگر انجام دادند و نتیجه گرفتند که آغازگرهای مورد استفاده برای متمایز کردن تمام ارقام گندم دوروم مورد بررسی، مناسب بودند و حتی دو آغازگر هم برای تشخیص ارقام و لاین‌های اصلاحی گندم دوروم کافی است که این موضوع نشان‌دهنده توانایی تمایز بالای نشانگر ISSR می‌باشد.

محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2022) در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی تنوع فنوتیپی و مولکولی در ژرم‌پلاسم اصلاح شده گندم دوروم دریافتی از مراکز بین المللی ایکاردا و سیمیت، تنوع قابل توجهی بر اساس داده‌های فنوتیپی صفات آگرو-فیزیولوژیک و نشانگر SCoT در این ژرم‌پلاسم گزارش نمودند. آن‌ها پیشنهاد نمودند که می‌توان از این اطلاعات برای گروه‌بندی ژرم‌پلاسم و تعیین گروه‌های مختلف فنوتیپی و ژنوتیپی، توسعه ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا و استفاده در دورگ‌گیری در برنامه‌های به‌نژادی گندم دوروم استفاده نمود.

نشانگرهای مولکولی به‌عنوان بخشی از گزینش به کمک نشانگر (MAS)^۴ به حساب می‌آیند و به توسعه و آزادسازی ارقام جدید، کیفیت و سرعت بخشیده اند (Bevan & Uauy, 2013; Cavanagh *et al.*, 2013; Randhawa *et al.*, 2013). نشانگرهای مولکولی هم‌چنین شناسایی رقم را بدون ابهام، تسهیل می‌نمایند و توان بالایی در

بودند. تعداد ۱۶ آغازگر، ۳۰ باند منحصر به‌فرد را برای ژنوتیپ‌های خاص تکثیر کردند که در شناسایی ژنوتیپ و طراحی راهبرد اصلاحی آینده بسیار مفید خواهند بود. مقادیر ضریب شباهت از ۰/۵۲ تا ۰/۸۲ متغیر بود که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ‌های گندم بود. کاروالو و همکاران (Carvalho *et al.*, 2009) تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم گندم نان و ۵۱ رقم گندم دوروم کشور پرتغال با استفاده از ۱۸ آغازگر ISSR^۲ بررسی نمودند و از روش تجزیه کلاستر مبتنی بر UPGMA^۳ برای گروه‌بندی ارقام گندم استفاده کردند که بر اساس سطح پلوئیدی و گونه، در دو گروه جدا یعنی ارقام گندم نان در یک گروه و ارقام گندم دوروم در گروه دیگر قرار گرفتند و مشخص گردید که نشانگر ISSR به شکل بسیار خوبی می‌تواند تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، بین گونه‌ای و بین ارقام را نشان دهد. وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2009) تنوع ژنتیکی ۹۰ نمونه گندم شامل ۴۵ نمونه وحشی از منطقه تبت چین و ۴۵ توده از کشورهای مختلف خاورمیانه را با استفاده از نشانگرهای ISSR و SSR بررسی کردند. بر اساس نتایج حاصل، از ۱۰ آغازگر مورد استفاده ۹۱ آلل در ژنوتیپ‌های تبت و ۸۲ آلل در ژنوتیپ‌های خاورمیانه تکثیر شد که از میان آنها به ترتیب ۷۹ (۸۶/۸۱ درصد) و ۶۶ (۴۹/۸۰ درصد) آلل در ژنوتیپ‌های تبت و خاورمیانه چندشکل بودند. از ۱۱ آغازگر SSR مورد استفاده ۱۰۰ نوار چند شکل تشکیل شد که ژنوتیپ‌های تبت ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان دادند. اما از ۷۸ نوار تکثیر شده در ژنوتیپ‌ها خاورمیانه ۷۷ نوار چند-شکل بودند. نتایج نشان داد که به طور کلی با استفاده از دو نشانگر ISSR و SSR، نمونه‌های وحشی انتخاب شده از منطقه تبت دارای تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به توده‌های انتخاب شده از منطقه خاورمیانه می‌باشند

^۲ Inter simple sequence repeats

^۳ - Unweighted pair group method with arithmetic Mean

^۴ - Marker-Assisted Selection

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس روش ویلیامز و همکاران (Williams *et al.*, 1990) با تغییر جزئی و با استفاده از ۳۱ آغازگر RAPD و ۱۳ آغازگر ISSR انجام شد. جهت بهینه‌سازی مقدار و نسبت اجزای مخلوط واکنش، مخلوط‌ها بر اساس سطوح مختلف $MgCl_2$ و DNA آزمون شدند. نهایتاً تکثیر DNA در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl (pH 8.4)، ۵۰ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۱۰ میکروگرم آغازگر، ۰/۱ میلی‌مول dNTP، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۱۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل CORBETT research تکثیر با شرایط زیر صورت گرفت: واسرشت سازی اولیه $94^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت سازی در $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در $40-30^{\circ}C$ به مدت ۱۵ ثانیه و بسط در $72^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه. قطعات حاصل روی ژل آگارز ۱/۲ درصد تفکیک گردیدند. رنگ آمیزی ژل‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. سپس باندها بر اساس حضور و عدم حضور در هر نمونه امتیازدهی شدند. ماتریس دو طرفه ارقام و متغیرها بر اساس صفر و یک تشکیل شده و سپس تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYSpc version 2.02e انجام گرفت. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و در نهایت دندروگرام رسم گردید.

شفاف‌سازی و روشن نمودن تاریخچه اجدادی ژنوتیپ‌های تحت بررسی دارند. نشانگرهای مولکولی برای بررسی فاصله ژنتیکی و شباهت افراد داخل کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم استفاده می‌شوند (Gupta *et al.*, 2008). در این زمینه، همچنین می‌توان به استفاده از نشانگرهای DNA و ایجاد نقشه‌های ارتباطی (Marcotuli *et al.*, 2015) در گندم دوروم اشاره کرد. شناسایی QTLها و استفاده از نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی که ارزیابی فنوتیپی آنها سخت و دشوار است، یک ابزار مفید تلقی می‌شود که بهبود توانایی روش‌های کلاسیک را در شناسایی ژن‌های کاندید فراهم می‌کند (Yousef & Juvik, 2001). از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های گندم دوروم شامل ارقام بومی، ارقام اصلاح شده و لاین‌های اصلاحی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی گندم دوروم انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم شامل ارقام بومی، ارقام اصلاح شده و لاین‌های اصلاحی دریافت شده از معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم (سرارود کرمانشاه) (جدول ۱)، مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA

DNA از برگ‌های جوان پنج گیاه از هر ژنوتیپ با استفاده از روش دلاپورتا (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی گردید. غلظت نهایی DNA هر نمونه به ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) رسانده شد.

واکنش تکثیر RAPD و ISSR

جدول ۱- کد، نام، نوع و منشأ جغرافیایی ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد بررسی.

Table 1. The code, names, type of genotype and origins of the studied durum wheat genotypes.

کد	ژنوتیپ	نوع ژنوتیپ	منشاء
Code	Genotype	Type of genotype	Origin
1	Zardak	Old variety	Iran
2	65-12-3-3	Landrace	Iran
3	25-25-1-5	Landrace	Iran
4	75-5-3-5	Landrace	Iran
5	409	Landrace	Iran
6	259	Landrace	Iran
7	15-15-1-3	Landrace	Iran
8	240	Landrace	Iran
9	37-24-2-3	Landrace	Iran
10	249	Landrace	Iran
11	Heider/Mt/Ho	Breeding line	ICARDA
12	Saji	New cultivar	Iran
13	Waha-B53	Breeding line	ICARDA
14	Arthar 71/Bcr//ch5	Breeding line	ICARDA
15	Stj3/4/stn//Hvi/Somo/3/yav/fg/Roh	Breeding line	ICARDA
16	Gidara-2	Breeding line	ICARDA
17	Lgt3/4/Bcr/3/chl//Gta/stk	Breeding line	ICARDA
18	Aghrass-2	Breeding line	ICARDA
19	Quadalete//Erp/mol/3/unk/4/Mrb3/Mnal	Breeding line	ICARDA
20	Stj3//Bcr/lks4	Breeding line	ICARDA

نتایج و بحث

نشانگر تولید شد که از بین آن‌ها، حدود ۲۰۴ باند چندشکل و درصد چندشکلی کل برابر با ۶۳/۹۵ درصد بود. اندازه باندها بین ۲۰۰-۳۵۰۰bp متغیر بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط چندشکلی برای هر آغازگر به ترتیب برابر با ۱۰/۲۹ و ۶/۵۸ به دست آمد. در بررسی آغازگرها مشاهده شد که بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای T19 و UBC51 به میزان ۱۰۰٪ و کمترین میزان

نتایج حاصل از نشانگر RAPD

نتایج حاصل از ۳۱ آغازگر RAPD مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم در جدول ۲ آمده است. همچنین در شکل ۱، الگوی باندهای ۳۱ آغازگر RAPD ارائه شده است. در مجموع ۳۱۹ باند توسط این

شده است. در شکل ۲، الگوی بانندی ۱۳ آغازگر ISSR ارائه شده است. در کل، ۱۲۵ باند تولید شد که حدود ۸۸ باند چندشکل بود و درصد چندشکلی کل ۷۰/۴ درصد محاسبه گردید که در مقایسه با RAPD (۶۳/۹۵ درصد) دارای درصد چند شکلی بالاتری است. اندازه باندها بین ۳۵۰۰-۲۰۰ جفت باز متغیر بودند. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای UBC854 و UBC864 به میزان ۱۰۰ درصد (شکل ۳) و کمترین درصد چند شکلی به آغازگر UBC841 که آغازگری تک‌شکل بود، تعلق داشت. متوسط تعداد کل باندها و متوسط چندشکلی برای هر آغازگر به ترتیب برابر با ۹/۶۲ و ۶/۷۷ بود که در قیاس با نشانگر RAPD، متوسط تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر کمتر از RAPD (۱۰/۲۹)، اما متوسط باند چندشکل تولید شده بیشتر از آن (۶/۵۸) بود. با توجه به مطالب گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر ISSR در مقایسه با RAPD توانایی بالایی در آشکارسازی تنوع بین ژنوتیپها داشته است؛ به طوری که با تعداد آغازگر کمتر (۱۳ در مقابل ۳۱)، می‌توان نتایج مطلوب‌تری را به دست آورد.

چندشکلی مربوط به آغازگر UBC82 بود که باندهای تک-شکل ایجاد نمود. در مورد علل این چندشکلی کم، می‌توان به میزان بالای DNA تکراری در ژنوم گندم دوروم و پسروری^۵ ناشی از خودگشنی و به طور کلی یک پایه ژنتیکی محدود و باریک که احتمالاً ناشی از پیشرفت‌های اخیر در اصلاح نباتات باشد، اشاره نمود (Habash *et al.*, 2009; Kabbaaj *et al.*, 2017).

نتایج حاصل از نشانگر ISSR

تعداد ۱۳ آغازگر از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از هر یک از آغازگرها در جدول ۳ ارائه شده است. در شکل ۲، الگوی بانندی ۱۳ آغازگر ISSR ارائه شده است. در کل، ۱۲۵ باند تولید شد که حدود ۸۸ باند چندشکل بود و درصد چندشکلی کل ۷۰/۴ درصد محاسبه گردید که در مقایسه با RAPD (۶۳/۹۵ درصد) دارای درصد چند شکلی بالاتری است. اندازه باندها بین ۳۵۰۰-۲۰۰ جفت باز متغیر بودند. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای UBC854 و UBC864 به میزان ۱۰۰ درصد (شکل ۳) و کمترین درصد چند شکلی به آغازگر UBC841 که آغازگری تک‌شکل بود، تعلق داشت. متوسط تعداد کل باندها و متوسط چندشکلی برای هر آغازگر به ترتیب برابر با ۹/۶۲ و ۶/۷۷ بود که در قیاس با نشانگر RAPD، متوسط تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر کمتر از RAPD (۱۰/۲۹)، اما متوسط باند چندشکل تولید شده بیشتر از آن (۶/۵۸) بود. با توجه به مطالب گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر ISSR در مقایسه با RAPD توانایی بالایی در آشکارسازی تنوع بین ژنوتیپها داشته است؛ به طوری که با تعداد آغازگر کمتر (۱۳ در مقابل ۳۱)، می‌توان نتایج مطلوب‌تری را به دست آورد.

نتایج حاصل از نشانگر ISSR

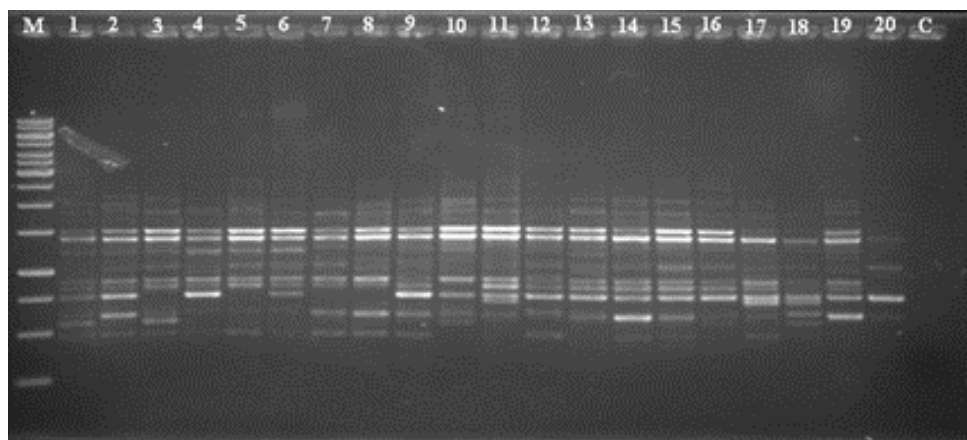
تعداد ۱۳ آغازگر از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از هر یک از آغازگرها در جدول ۳ ارائه

⁵ -Inbreeding

جدول ۲- مشخصات ۳۱ آغازگر RAPD و اطلاعات تنوع ژنتیکی پرایمرها برای ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی.

Table 2. 31 RAPD primers and genetic diversity information of primers for 20 studied genotypes.

درصد باندهای چندشکل Percentage of polymorphic bands	تعداد باندهای چندشکل Number of polymorphic bands	تعداد کل باندها Total number of bands	دمای اتصال Annealing	توالی Sequence 5'-3'	پرایمر Primer name
25	1	4	30	CCTGCGCTTA	UBC9
33.33	1	3	30	GGGCCGTTTA	UBC18
57.14	4	7	37	CCCGCCTTCC	UBC23
66.66	4	6	31	CCGGCCTTAA	UBC28
62.5	5	8	33	CCGGCCTTAC	UBC29
25	1	4	30	CCGGCCTTCC	UBC31
100	10	10	35	CTACCCGTGC	UBC51
63.64	7	11	30	TTCCCGGAGC	UBC52
57.14	4	7	31	GAGGTCCAGA	UBC75
0	0	4	30	GGGCCCCGAGG	UBC82
50	2	4	30	GGGGGCTTGG	UBC89
87.5	14	16	40	CACCCCTGAG	T9
47.06	8	17	40	GATGCCAGAC	T18
100	22	22	40	GTCCGTATGG	T19
33.33	2	6	40	AGACCCAGAG	U11
91.66	11	12	40	CACCAGGTGA	E10
87.5	14	16	37	GGTGACTGTG	E16
46.15	6	13	40	CTACTGCCGT	E17
70	14	20	40	ACGGCGTATG	E19
30.76	4	13	40	CCGTCGGTAG	AB1
75	12	16	35	CTCACCGTCC	C9
28.57	2	7	40	AGATGCAGCC	E7
66.66	8	12	37	ACCTGGGGAG	U17
77.77	7	9	40	GTCCCGACGA	OPC07
55.55	5	9	40	TGGACCGGTG	OPC08
33.33	2	6	40	AAGCCTCGTC	OPC13
27.27	3	11	40	GACGGATCAG	OPC15
62.5	10	16	40	CACACTCCAG	OPC16
42.85	3	7	35	CCGCATCTAC	OPC04
93.33	14	15	40	CACCGTATCC	D12
37.5	3	8	40	GAAACGGGTG	A7



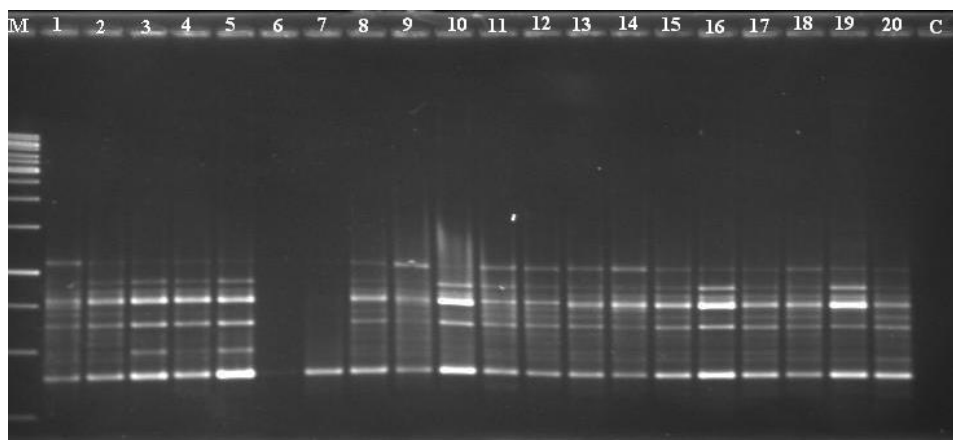
شکل ۱- الگوی بانندی آغازگر ۳۱ RAPD بر اساس ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم.

Figure 1. Banding pattern of ISSR primer No. 31 for 20 durum wheat genotypes

جدول ۳- مشخصات ۱۳ آغازگر ISSR و اطلاعات تنوع ژنتیکی آنها در ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم مورد بررسی.

Table 3. 13 ISSR primers and genetic diversity information of primers for studied 20 durum wheat genotypes.

درصد باندهای چند شکل Percentage of polymorphic bands	تعداد باندهای چند شکل Number of polymorphic bands	تعداد کل باندها Total number of bands	دمای اتصال Annealing	توالی Sequencing 5'-3'	پرایمر Primer name
0	0	5	52	(GA)8YC	UBC-841
77.77	7	9	58	(AG)8C	UBC-808
30	3	10	54	(CA)8G	UBC-818
75	3	4	58	(GT)8C	UBC-820
72.73	8	11	33	(GATA)4	UBC-872
85.71	6	7	50	(GACA)4	UBC873
100	12	12	42	(TC)8RG	UBC-854
87.5	7	8	54	(AC)8YA	UBC-856
100	16	16	58	(ATG)6	UBC-864
54.55	6	11	53	(GGAGA)3	UBC-880
36.36	4	11	56	(GA)8C	UBC-811
75	9	12	53	(AG)8T	UBC-807
77.78	7	9	52	(GAA)6	UBC-868



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از آغازگر شماره ۱۳ ISSR در ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم.

Figure 2. Banding pattern of ISSR primer No. 13 for 20 durum wheat genotypes

یکسان بود و نیز نتایج مشخص کرد که ژرم پلاسما گندم ماچا نسبت به گندم اسپلتا دارای تنوع بیشتری بود. با توجه به این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از RAPD می‌تواند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی نژادهای تکثیر شده، در ژرم پلاسما گندم استفاده شود. اوکونو و همکاران (Okuno *et al.*, 1998) با استفاده از تجزیه RAPD، ۱۱۲ اکسشن از چندین گونه آجیلوپس را به دو گروه اصلی مطابق با ژنوم‌های U و D تقسیم نمودند اما ارتباطی بین منشا جغرافیایی و تنوع حاصل از نشانگرهای RAPD پیدا نکردند.

نتایج حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس نشانگر ISSR و ضریب تشابه جاکارد (شکل ۴-ب) نشان داد که ژنوتیپ‌ها در چهار گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱ (شاهد)، ۲، ۳، ۴، ۵، ۸، ۹ و ۱۰، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۱۱، ۱۲ (شاهد ساجی)، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ۶، ۷ و گروه چهارم شامل ژنوتیپ شماره ۲۰ بود. ضریب کوفنتیک بالا و برابر با ۰/۸۵۵ بود که بیانگر همبستگی زیاد ماتریس تشابه و ماتریس حاصل از دندروگرام می‌باشد. در مقایسه با کلاستر حاصل از RAPD، شباهت چندانی جز در گروه‌بندی ژنوتیپ شماره ۲۰ بین آن‌ها مشاهده نشد. هو و همکاران (Hou *et al.*, 2005) از نشانگرهای RAPD و ISSR برای

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR و ضرایب تشابه جاکارد در شکل ۴ آمده است. بر اساس نشانگر RAPD (شکل ۴-الف)، و با توجه به میانگین ضرایب تشابه خط برش تعیین، و ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱ (شاهد زردک)، ۱۹، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۲ (شاهد ساجی)، ۱۱، ۱۰، ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲ و گروه دوم شامل ژنوتیپ شماره ۱۸، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ و ۱۷ و گروه چهارم شامل ژنوتیپ شماره ۲۰ بود. ضریب کوفنتیک بالا و برابر با ۰/۹۱ بود که بیانگر همبستگی زیاد ماتریس تشابه و ماتریس حاصل از دندروگرام می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر RAPD تطابق چندانی با توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها نداشت. کائو و همکاران (Cao *et al.*, 1998) از تکنیک RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین ۶۹ نژاد گندم اسپلتا^۶ و ۳۲ نژاد گندم ماچا^۷ استفاده کردند. طبقه بندی نژادهای اسپلتا و ماچا بر اساس ضرایب تشابه ژنتیکی جاکارد برای نشانگرهای RAPD با منشأ جغرافیایی

⁶ - Spelta

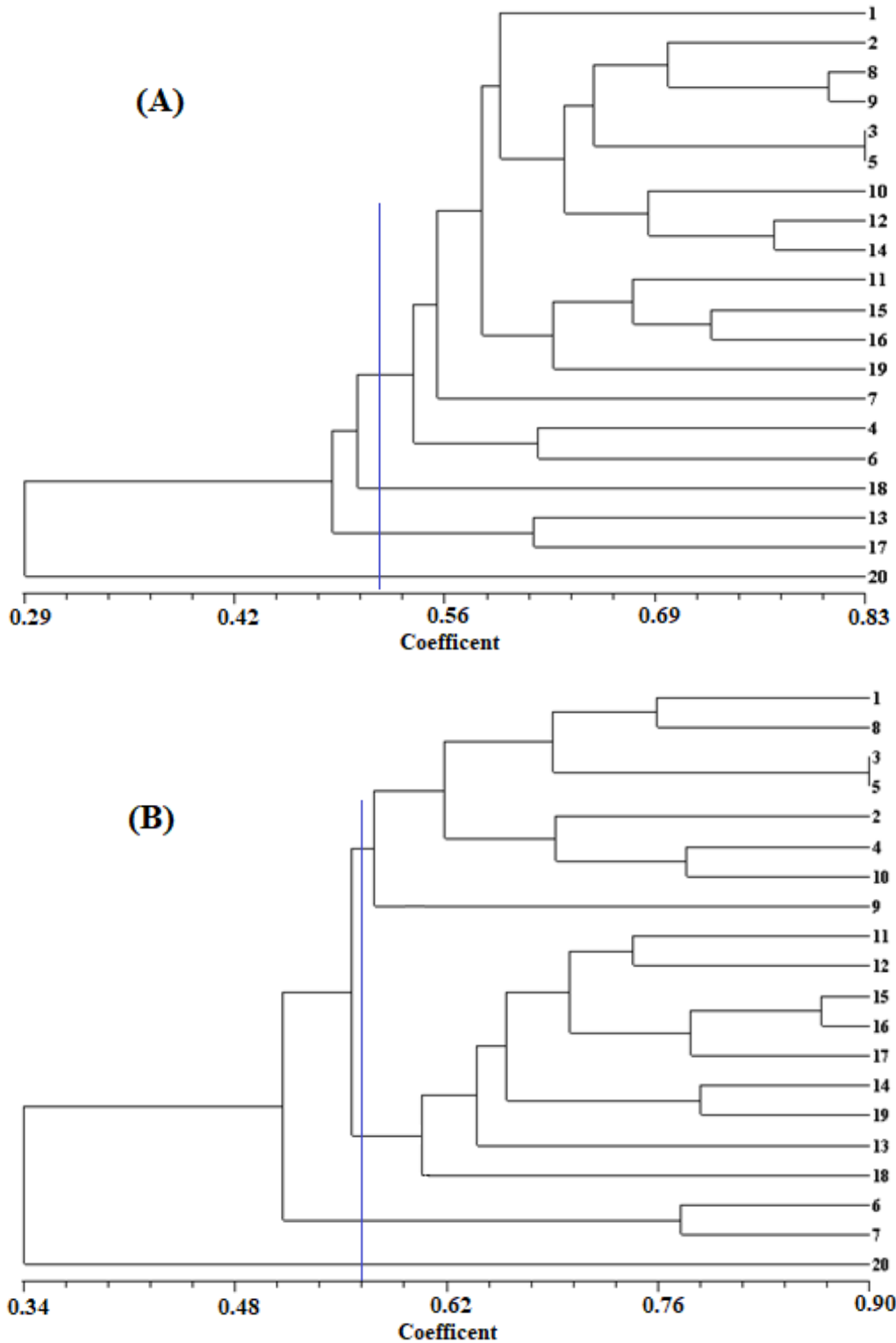
⁷ - Macha

ژنوتیپی را از هم تفکیک و در توافق با نتایج تجزیه خوشه‌ای بود. این نتایج، مجدداً کارآیی نشانگرهای مورد استفاده در تفکیک ژنوتیپ‌ها بر اساس خصوصیات ژنتیکی و تاکسونومی را تأیید نمود. به عبارت دیگر، توزیع مناسب مواد ژنتیکی مورد بررسی، نشان‌دهنده تنوع کافی در ژنوتیپ‌ها و پوشش ژنومی مناسب توسط نشانگرهای استفاده شده می‌باشد. نتایج نشان داد که الگوهای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های دوروم عمدتاً به دلیل منشأ جغرافیایی آن‌ها نیست. این در توافق با سایر گزارش‌های گندم است که نشان می‌دهد توده‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه جغرافیایی، در گروه‌های مختلف، گروه‌بندی شده‌اند (Mengistu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2020). گروه‌بندی توده‌های متعلق به مناطق مختلف در گروه‌های مشابه، احتمالاً به دلیل جریان ژن در بین مناطق از طریق کانال‌های بازار و همچنین تبادل تدریجی غلات در بین کشاورزان است. همچنین می‌تواند به این دلیل باشد که توده‌های مورد استفاده، برای تحمل به تنش‌های محیطی و برخی ویژگی‌های زراعی از پیش انتخاب شده، بوده‌اند (Mohammadi & Amri, 2022).

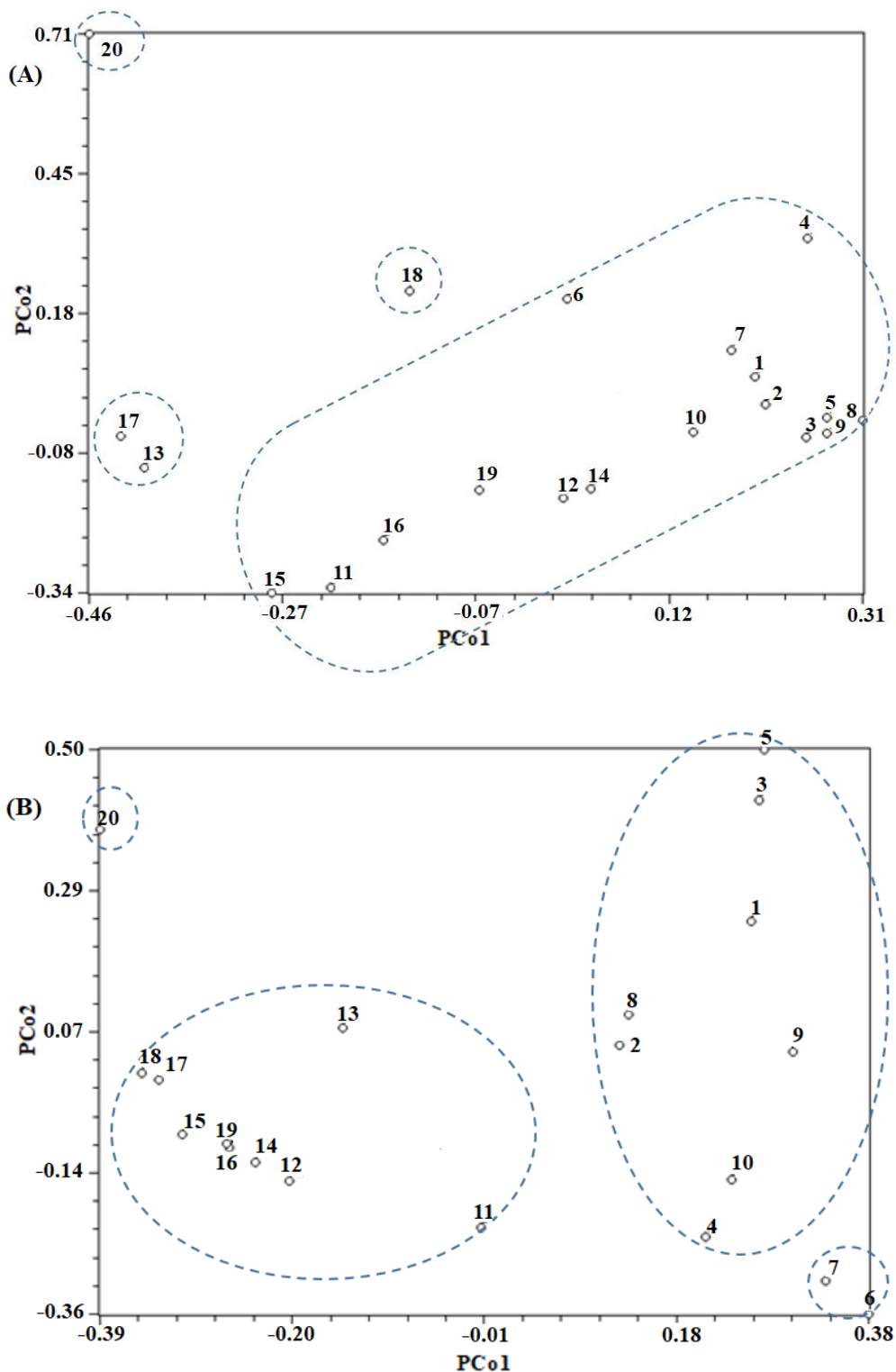
تعیین تنوع ژنتیکی نژادهای وحشی و بومی جو در غرب چین استفاده کردند. در گزارش آنها دندروگرام ایجاد شده توسط ماتریس ISSR مطابقت بهتری با خاستگاه جغرافیایی ژنوتیپ‌ها نسبت به دندروگرام ایجاد شده توسط نتایج RAPD داشت.

در آزمایشی که توسط پاسکوالون و همکاران (Pasqualone *et al.*, 2000) به منظور ارزیابی سودمندی نشانگرهای ISSR برای شناسایی ۳۰ رقم و ۲۲ لاین اصلاحی گندم دوروم با ۹ آغازگر صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که آغازگرهای مورد استفاده برای متمایز کردن همه ارقام گندم دوروم مورد بررسی مناسب بودند و حتی دوآغازگر هم برای تشخیص ۵۲ رقم و لاین اصلاحی گندم دوروم کافی بود که دلالت بر توانایی تمایز خیلی خوب تکنیک ISSR دارد. زیتکوویچ و همکاران (Zietkiewicz *et al.*, 1994) بیان کردند که نشانگرهای ISSR برای مطالعه تنوع درون گونه‌ای از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند، به‌طوری‌که در آشکارسازی سطوح پائین تنوع ژنتیکی، مؤثرند.

تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۵)، نتایج تجزیه کلاستر بر اساس هر دو نشانگر RAPD (شکل ۵-الف) و ISSR (شکل ۵-ب) را تأیید نمود. تشکیل گروه‌های ژنوتیپی مجزا و با فواصل ژنتیکی معنی‌دار بیانگر تنوع ژنتیکی در مواد ژنتیکی مورد بررسی می‌باشد. نتایج، بیانگر پوشش ژنومی مطلوب توسط نشانگرهای مورد بررسی بود که به خوبی گروه‌های



شکل ۴- تجزیه کلاستر روابط ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای (الف) RAPD و (ب) ISSR.
 Figure 4. Cluster analysis of genetic relationships for 20 durum wheat genotypes using A (RAPD) and (B) ISSR markers.



شکل ۵- نمایش گرافیکی بای پلات مبتنی بر تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ۲۰ ژنوتیپ گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای RAPD (A) و ISSR (B).

Figure 5. Biplot showing principal coordinate analysis (PCoA) for 20 durum wheat genotypes using (A) RAPD and (B) ISSR markers.

با بقیه ژنوتیپ‌ها داشت، به‌طوریکه در بررسی به کمک هر یک از نشانگرها، در گروهی جداگانه قرار گرفت. بنابراین، می‌توان از این ژنوتیپ به عنوان والد در تلاقی با ژنوتیپ‌هایی که دورترین فاصله را با آن دارند، مانند ژنوتیپ‌های ۱، ۴، ۶، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۱ بهره برد و از اینبرد لاین‌های نوترکیب حاصل از آن‌ها، در تجزیه QTL استفاده نمود.

نتیجه‌گیری
نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که RAPD و ISSR، نشانگرهای مناسبی جهت مطالعات تنوع ژنتیکی در گندم دوروم می‌باشند. نشانگر ISSR به دلیل تطابق بیشتر با منشأ جغرافیایی، تکرارپذیری بالا و هزینه یکسان با RAPD، از ارجحیت بیشتری برخوردار است. بر اساس هر دو نشانگر، ژنوتیپ شماره ۲۰ (Stj3//Bcr/lks4) رفتاری کاملاً متفاوت

References

- Aghaee-Sarbarzeh, M. 2012. Variation of agronomic traits in durum wheat genotypes. *Seed and Plant Journal*, 28 (3), 481-502. [In Persian] doi: 10.22092/spij.2017.111121
- Bevan, M. W., & Uauy, C. 2013. Genomics reveals new landscapes for crop improvement. *Genome Biology*, 14, 206.
- Cao, W., Hucl, P., Scoles, G., & Chibbar, R.N. 1998. Genetic diversity within spelta and macha wheats based on RAPD analysis. *Euphytica*, 104, 181-189. <https://doi.org/10.1023/A:1018628102650>
- Carvalho, A., Guedes-Pinto, H., & Lima-Brito J. 2009. Genetic diversity among old Portuguese bread wheat cultivars and botanical varieties evaluated by ITS rDNA PCR-RFLP markers. *Journal of Genetics*, 88 (3), 363-367.
- Cavanagh, C. R., Chao, S., Wang, S., Huang, B. E., Stephen, S., Kianic, S., Forrest, K., Saintenac, C., Brown-Guedira, G. L., Akhunov, A., See, D., Bai, G., Pumphrey, M., Tomar, L., Wong, D., Kong, S., Reynolds, M., Lopez da Silvak, M., Bockelman, M., Talbert, L., Anderson, J. A., Dreisigacker, S., Baenziger, S., Carter, A., Korzun, V., Morrell, P. L., Dubcovsky, J., Morella, M. K., Sorrells, M. E., Hayden, M. J., & Akhunov, E. 2013. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 8057-8062.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., & Hicks, J.B. 1983. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21.
- Fufa, H., Baenziger, P., Beecher, B., Dweikat, I., Graybosch, R., & Eskridge, K. 2005. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, 145, 133-146.
- Grewal, S., Kharb, P. Malik, R., Jian, S., & Jain, R. K. 2007. Assessment of genetic diversity among some Indian wheat cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 6 (1), 18-23.
- Gupta, P. K., Mir, R. R., Mohan, A., & Kumar, J. 2008. Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects. *International Journal of Plant Genomics*, 896451.
- Habash, D., Kehel, Z. & Nachit, M. 2009. Genomic approaches for designing durum wheat ready for climate change with a focus on drought. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2805-2815.
- 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 characterization of Australian barley germplasm. *Crop and Pasture Science*, 61 (1), 70-83.
- Hou, Y.C., Yan, Z.H., Wei, Y.M., & Zheng Y.L. 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genetics Newsletter*, 35, 9-22.

- 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.
- Jana, S. 1999. Some recent issues on the conservation of crop genetic resources in developing countries. Genome, 42, 562–569.
- Kabbaj, H., Sall, A. T., Al-Abdallat, A., Geleta, M., Amri, A., Filali-Maltouf, A., Belkadi, B., Ortiz, R., & Bassi, F. M. 2017. Genetic diversity within a global panel of durum wheat (*Triticum durum*) landraces and modern germplasm reveals the history of alleles exchange. Frontiers in Plant Science, 8, 1277.
- Karaca, M., & Izbirak, A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity in Turkish durum wheat cultivars using RAPD and ISSR markers. Journal of Food Agriculture and Environment, 6 (3), 219–225.
- Kresovich, S., Szewc-McFadden, A., Bliet S., & McFerson, J. 1995. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rape seed). Theoretical and Applied Genetics, 91, 206–211.
- Marcotuli, I., Houston, K., Waugh, R., Fincher, G. B., Burton, R. A., Blanco, A., & Gadaleta, A. 2015. Genome wide association mapping for arabinoxyylan content in a collection of tetraploid wheats. PLoS ONE, 10 (7), e0132787.
- Mengistu, D. K., Kiros, A. Y., & Pè, M. E. 2015. Phenotypic diversity in Ethiopian durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum) landraces author links open overlay panel. The Crop Journal, 3(3), 190–199.
- MirMohammadi Maibody, S. A. M., & Golkar, P. 2019. Application of DNA molecular markers in plant breeding (Review article). Plant Genetic Researches, 6 (1), 1–30 [In Persian].
- Mohammadi, R., & Amri, A. 2022. Assessment of the suitability of *Triticum turgidum* accessions for incorporation into a durum wheat breeding program. Euphytica, 218, 70. <https://doi.org/10.1007/s10681-022-03024-w>
- Mohammadi, R., Cheghamirza, K., Geravandi, M., & Abbasi, S. 2022. Assessment of genetic and agro-physiological diversity in a global durum wheat germplasm. Cereal Research Communications, 50, 117–126.
- Okuno, K., Ebana, K., Noov, B., & Yoshida, H. 1998. Genetic diversity of Central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 45, 389–394.
- Pasqualone, A., Lotti, C., Bruno, A., De Vita, P., Di Fonzo, N., & Blanco, A. Use of ISSR markers for cultivar identification in durum wheat. In: Royo C. (ed.), Nachit M. (ed.), Di Fonzo N. (ed.), Araus J.L. (ed.). Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges. Zaragoza: CIHEAM, 2000. p. 157-161 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 40).
- Peng, J., Bai, Y., Haley, S., & Lapitan, N. 2009. Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid. Genetica, 135, 95–122.
- Rajaram, S. 2010. International Wheat Breeding. The Proceeding of 11th Iranian Crop Science Congress: Crop Production, Pp 225–238.
- Randhawa, H. S., Asif, M., Pozniak, C., Clarke, J. M., Graf, R. J., Fox, S. L., Humphreys, D. G., Knox, R. E., DePauw, R. M., Singh, A. K., Cuthbert, R. D., Hucl, P., & Spaner, D. 2013. Application of molecular markers to wheat breeding in Canada. Plant Breeding, 132, 458–471.
- Wang, A., Yu, Z., & Ding, Y. 2009. Genetic diversity analysis of wild close relatives of barley from Tibet and the Middle East by ISSR and SSR markers. Comptes Rendus Biologies, 332, (4), 393–403.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18 (22), 6531–5.
- 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, 432.

- Yang, X., Tan, B., Liu, H., Zhu, W., Xu, L., Wang, Y., Fan, X., Sha, L., Zhang, H., Zeng, J., Wu, D., Jiang, Y., Hu, X., Chen, G., Zhou, Y., & Kang, H. 2020. Genetic diversity and population structure of Asian and European common wheat accessions based on genotyping-by-sequencing. *Frontiers in Genetics*, 11, 580782.
- Yousef, G. G., & Juvik, J. A. 2001. Comparison of phenotypic and marker-assisted selection for quantitative traits in sweet corn. *Crop Science*, 41, 645–655.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183.