

مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD و شناسایی نشانگرهای Informative برای عملکرد دانه و اجزای آن در ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه

Study of Genetic Diversity by RAPD Markers and Identification of Informative Markers for Grain Yield and its Components in Hulless Barley Genotypes

علیرضا پورمحمد^۱، محمد مقدم^۲، محمود خسروشاهلی^۳، سیدابوالقاسم محمدی^۲ و
احمد یوسفی^۴

- ۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
- ۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
- ۳- استاد، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز
- ۴- محقق، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۲۰

چکیده

پورمحمد، ع.، مقدم، م.، خسروشاهلی، م.، محمدی، س.ا.، و یوسفی، ا.ا. ۱۳۸۹. مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD و شناسایی نشانگرهای Informative برای عملکرد دانه و اجزای آن در ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه. *مجله به‌نژادی نهال و بذر* ۱-۲۶: ۲۶۷-۲۵۳.

بیست لاین جو بدون پوشینه با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور از ۸۵ آغازگر ده نوکلئوتیدی استفاده شد. سی و پنج آغازگر تصادفی (۴۱ درصد) چند شکلی مطلوبی را نشان دادند. تعداد نشانگرهای چند شکل ایجاد شده در این آزمایش ۲۲۷ نوار تکثیر شده تصادفی بود به طوری که میانگین تعداد نوار برای هر آغازگر چند شکل ۶/۴۸ به دست آمد. اندازه محصولات تکثیر شده از ۴۰۰ تا ۲۷۰۰ کیلوپاز متغیر بود. بیشترین تعداد نوار چند شکل (۱۴ عدد) به آغازگر ۵۴۰ و کمترین تعداد (۳ عدد) به آغازگرهای ۴۹۸، ۵۵۹، ۵۷۷ و MT9 تعلق داشت. دامنه ضرایب تشابه ژاکارد از ۰/۳۷۷ تا ۰/۸ متغیر بود. بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های شماره ۱۵ و ۱۶ (۰/۸) و ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۳ (۰/۷۵۹) مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای به روش دورترین همسایه‌ها و بر اساس ضریب فاصله ژاکارد، لاین‌ها را به سه گروه عمده طبقه‌بندی کرد. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱ و ۲۰ بود. گروه دوم ژنوتیپ‌های شماره ۱۰، ۸ و ۹ را در برداشت و گروه سوم شامل بقیه ژنوتیپ‌ها بود. ژنوتیپ‌های با شجره مشابه غالباً در یک خوشه قرار گرفتند که بیانگر کارآیی نشانگرهای RAPD در تشخیص تنوع ژنتیکی در جو بدون پوشینه است. تجزیه به بردارهای اصلی، پنج بردار اول مجموعاً ۴۲/۵۸ درصد تغییرات داده‌ها را توجیه کردند که حاکی از پراکنش خوب نشانگرهای مورد استفاده در ژنوم جو بدون پوشینه بود. بررسی ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه با محاسبه درصد دامنه تغییرات نسبت به میانگین کل برای ۲۵ صفت زراعی نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد. بر اساس تجزیه رگرسیون، از بین نشانگرهای RAPD مورد بررسی تعداد ۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۴، ۱۱ و ۱۰ نشانگر، به ترتیب از رابطه معنی‌داری با طول سنبله اصلی، تعداد دانه در سنبله اصلی، عملکرد دانه در بوته، تعداد پنجه بارور، تاریخ ظهور سنبله و وزن هزار دانه برخوردار بودند. از بین ۱۸ نشانگر Informative برای عملکرد دانه در بوته، ۸ نشانگر رابطه معنی‌داری نیز با تعداد دانه در سنبله اصلی نشان دادند در حالی که این وجه اشتراک در مورد تعداد پنجه بارور و وزن هزار دانه مشاهده نشد. بنابراین، از طریق نشانگرهای RAPD اهمیت تعداد دانه در سنبله به عنوان مهم‌ترین جزء عملکرد دانه در بوته در جو بدون پوشینه مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: جو بدون پوشینه، تنوع ژنتیکی، نشانگر Informative، نشانگر RAPD.

مقدمه

جهش منفرد از جو وحشی (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) و یا از جو پوشینه‌دار زراعی (*H. vulgare* subsp. *vulgare*) حاصل شده است. طول دوره رشد جو بدون پوشینه ۱۵-۱۰ روز کوتاه‌تر از جو معمولی بوده و کمی زودتر برداشت می‌شود (Anonymous, 2002). جو بدون پوشینه ارزش بیشتری در تغذیه انسان دارد چون ویتامین‌ها و عناصر معدنی در پوست کنی از بین نمی‌روند. همچنین دارای فیبر کمتری است که باعث افزایش میزان انرژی قابل متابولیسم آن می‌شود (Bhatty, 1999; Scott, 1995²).

آگاهی از تنوع ژنتیکی مجموعه‌های گیاهی ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های به‌نژادی تامین می‌کند. همچنین اطلاع از فاصله ژنتیکی بین افراد و جمعیت‌ها و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد (Virk et al., 1995). برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان از انواع نشانگرها استفاده کرد. نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی به علت دارا بودن چند شکلی قابل دسترس پایین، کمتر در طبقه‌بندی به کار می‌روند. نشانگرهای DNA، دارای قدرت تمایز بیشتری نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی هستند (Smith and Smith, 1992). زیرا نشانگرهای

جو (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*) یکی از اولین گیاهان زراعی اهلی شده به شمار می‌رود (Zohary and Hopf, 2000). جنس *Hordeum* شامل ۳۲ گونه دیپلوئید و پلی‌پلوئید است که در سرتاسر جهان گسترده‌اند (Bothmer et al., 1991). در سال ۲۰۰۷ تولید جهانی جو بیش از ۱۳۷ میلیون تن برآورد شده است که از ۵۶/۱۹ میلیون هکتار برداشت شد^۱ (FAO, 2008). جو در حدود ده هزار سال پیش در هلال حاصلخیز اهلی شده است (Zohary and Hopf, 2000). میزان DNA گونه‌های *Hordeum* از ۶/۸۵ الی ۱۰/۶۷ پیکوگرم در گونه‌های دیپلوئید تا ۲۹/۸۵ پیکوگرم در گونه‌های هگزاپلوئید متغیر است (Jakob et al., 2004).

جو بدون پوشینه یا لخت از جو پوشینه‌دار متفاوت است بدین معنی که برخلاف جو پوشینه‌دار، پوسته آن به آسانی جدا می‌شود. صفت بدون پوشینیگی به وسیله یک ژن مغلوب *nud* روی بازوی بلند کروموزوم 7H کنترل می‌شود (Choo et al., 2001; Kikuchi et al., 2003). تصور بر این است که اهلی شدن جو بدون پوشینه بعد از نوع پوشینه‌دار حدود ۶۵۰۰ سال قبل از میلاد انجام شده است (Zohary and Hopf, 2000). تاکتا و همکاران (Taketa et al., 2004) اظهار داشتند که جو لخت با یک

1. fao stat data. <http://www/faostat.org/faostat>
2. www.agric.gov.ab.ca/live stock/poultry

پوشینه را از چهار منطقه متفاوت یعنی شمال آمریکا، چین، ترکیه و آسیای مرکزی با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند. چهل و هفت نشانگر تکرار پذیر توسط ۹ آغازگر تولید شد. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که اکثر ارقام شمال آمریکا شدیداً خویشاوند بوده و در یک گروه قرار گرفتند و بقیه ارقام به گروه دیگر با سه زیر گروه منتسب شدند.

در روش‌های به‌نژادی کلاسیک گزینش برای عملکرد و اجزای آن در نسل‌های در حال تفرق به علت اثر محیطی از کارآیی زیادی برخوردار نیست. چنانچه بتوان گزینش را بر اساس ژنوتیپ از طریق نشانگرهای DNA انجام داد، کارآیی گزینش افزایش قابل ملاحظه‌ای خواهد داشت. در این راستا کراکمن و همکاران (Kraakman *et al.*, 2004, 2006) رابطه معنی‌داری بین برخی نشانگرهای DNA و صفاتی مانند عملکرد دانه، پایداری عملکرد، تاریخ ظهور سنبله و ارتفاع بوته در ارتباط با جوهای اروپایی به دست آوردند. ایواندیک و همکاران (Ivandic *et al.*, 2003) نیز یک نشانگر Informative برای تحمل به تنش خشکی در جو وحشی گزارش کردند. اطلاعات در مورد رابطه نشانگرهای DNA با صفات کمی در جو بدون پوشینه اندک است. تنها یو و همکاران (Yu *et al.*, 2002) و هوفمن و همکاران (Hoffman *et al.*, 2003) رابطه نشانگرهای RAPD را با بتا-گلوکان و کیفیت مالت عنوان کرده‌اند.

DNA علاوه بر تفاوت‌های توالی‌های کدکننده، اختلافات بین توالی‌های غیر کدکننده ژنوم را نیز آشکار می‌سازند (Cho *et al.*, 1999).

مطالعه تنوع ژنتیکی با نشانگرهای RAPD نسبتاً آسان، سریع و کارآ است، بنابراین از این نشانگرها برای تعیین تنوع ژنتیکی بین ارقام جو استفاده شده است (Hoffman *et al.*, 2003؛ Kroth *et al.*, 2005). کروت و همکاران (Kroth *et al.*, 2005) از نشانگرهای RAPD برای ارزیابی شش رقم جو بدون پوشینه و هفت رقم جو مالتی استفاده کردند. پنج آغازگر از ۱۱ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۳۴ نشانگر RAPD تولید کردند. متوسط ضریب شباهت ارقام جو بر اساس ضریب ژاکارد برابر ۰/۵۳ بود. نشانگرهای تک شکل و اختصاصی درون ارقام، امکان تمایز آن‌ها را فراهم کرد. میانگین ضرایب شباهت درون ارقام بین ۰/۵۳ و ۰/۸۵ متغیر بود. نشانگرهای RAPD حاصل برای شناسایی ارقام جو برزیلی مناسب تشخیص داده شدند. هونگ و همکاران (Hong *et al.*, 2001) از نشانگرهای RAPD برای ارزیابی روابط ژنتیکی ۴۲ رقم بومی جو بدون پوشینه و دو رقم زراعی چینی استفاده کردند. از ۵۲ آغازگر، ۱۷ آغازگر مجموعاً ۷۹ نوار چند شکل تولید کردند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضرایب نی و لی، ۴۴ ژنوتیپ را به چهار گروه منتسب کرد. هنگ و همکاران (Hang *et al.*, 1997) ۳۶ رقم جو بدون

هدف از این آزمایش، بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه با استفاده از نشانگرهای RAPD و شناسایی نشانگرهای Informative برای عملکرد دانه و برخی صفات زراعی به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی بود.

مواد و روش‌ها

بذر بیست ژنوتیپ جو بدون پوشینه (جدول ۱) از بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. برای تهیه نمونه برگ‌ی جهت استخراج DNA، ۱۵-۱۰ بوته از گیاهان در مرحله پنجه‌زنی به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌های برگ‌ی برداشت شد. این نمونه‌ها پس از اتیکت‌گذاری و بسته‌بندی آن‌ها در فویل آلومینیومی، در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج DNA در فریزر -80°C نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Saghai- Maroof *et al.*, 1984) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA‌های استخراج شده، با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از نظر شکستگی و قطعه‌قطعه شدن در طی استخراج، از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ استفاده شد.

در این آزمایش از ۸۵ آغازگرده نوکلئوتیدی با توالی تصادفی استفاده شد. جدول ۲ توالی آغازگرهای چند شکل را نشان می‌دهد. اجزای واکنش PCR برای حجم

۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR یک برابر، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار، آغازگر ۳۳ نانوگرم، Taq DNA پلیمراز یک واحد، مخلوط نوکلئوتیدی به میزان ۵ میکرومولار از هر نوکلئوتید و DNA الگو ۵۰ نانوگرم بود. این واکنش در دستگاه ترموسایکلر Biometra صورت گرفت.

به منظور تکثیر قطعات DNA، چرخه PCR به این شرح انجام شد: یک چرخه واسرشته سازی در 94°C به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشته سازی در دمای 94°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای 37°C به مدت ۱ دقیقه و مرحله بسط به مدت ۲ دقیقه در 72°C ، یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در 72°C . برای تفکیک فرآورده‌های PCR حاصل از تجزیه RAPD، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. برای انجام واکنش RAPD به هر تیوپ PCR، ۵ میکرولیتر از محلول بافر بارگذاری اضافه شد و از هر نمونه ۲۰ میکرولیتر در هر چاهک بارگذاری شد. ولتاژ مورد استفاده ۹۰ ولت و مدت زمان الکتروفورز ۳ ساعت بود. برای رنگ آمیزی ۵ میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید، به غلظت یک mgml^{-1} برای ۱۰۰ میلی لیتر ژل استفاده شد و برای مشاهده الگوهای نواربندی DNA از دستگاه عکس‌برداری ژل استفاده شد. نشانگر مورد استفاده نیز SM0321 بود.

الگوی نواری نشانگرها به صورت یک (وجود) یا صفر (عدم وجود) امتیازدهی شدند. بدین ترتیب یک ماتریس 227×20 تشکیل

جدول ۱- ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Hulless barley genotypes used in this study

ژنوتیپ Genotype No.	شجره Pedigree
1	(EHBYTM81-7)
2	Alanda // Lignee527/ Arar/ 3/ BF891M-616
3	PETUNIA 1/CHINIA (a)
4	STIPA/PETUNIA 1//KOLLA/BBSC (a)
5	ALOE/OLMO/3/LIGNEE640/DS4931//LIGNEE640/F7 70077/7/BOLDO/POLEO ...
6	PETUNIA 1/CHINIA (b)
7	CONGONA/BORR
8	STIPA/PETUNIA 1//KOLLA/BBSC (b)
9	PETUNIA 1/CHINIA (c)
10	STIPA/PETUNIA 1//KOLLA/BBSC (c)
11	GLORIA-BAR/COPAL//BEN. 4D/3/S. P-B/4/DC-B/SEN/5/CONGONA
12	DC-B/SEN//TOCTE/3/CONGONA
13	ICNB93-328
14	CHAMICO/TOCTE//CONGONA (a)
15	PALLIDUM48//NORDIC/563.6.5/3/CEL-B...2/MZQ//CEL-B/5/LINO/6/CONGONA
16	CHAMICO/TOCTE//CONGONA (b)
17	CHAMICO/TOCTE//CONGONA (c)
18	CERRAJA/CONGONA
19	CHAMICO/TOCTE//CONGONA (d)
20	(EHBYTM81-12)

* ژنوتیپ‌های دارای شجره مشابه، لاین‌های خواهری هستند.

Genotypes with similar pedigrees are sister lines.

جدول ۲- آغازگرهای تصادفی چند شکل RAPD برای مطالعه بیست ژنوتیپ جو بدون پوشینه

Table 2. RAPD primers showing polymorphism on twenty hulless barley genotypes

آغازگر Primer	توالی Sequence	آغازگر Primer	توالی Sequence
445	TAGCAGCTTG	577	GTCTGATGTG
485	AGAATAGGGC	578	GGTGTCCACT
491	TCCTGTCAAG	580	GCGATAGTCC
493	CCGAATCACT	586	CCGGTTCCAG
497	GCATAGTGCG	589	GACGGAGGTC
498	GACAGTCCGT	599	CAAGAACCGC
523	ACAGGCAGAC	666	CTTAACACGC
525	GCTGGTTGGA	MT7	ACCGCGAAGG
526	AACGGGCACC	MT8	GGACCCAACC
527	CTTCAACGTG	MT9	GTCGCCGTCA
530	AATAACCGCC	MT13	CCCAAGGTCC
540	CGGACCGCGT	MT15	TCAGGGAGGT
556	ATGGATGACG	MT16	AGATGCAGCC
558	CGATATCCGG	MT17	GGACTGCAGA
559	GAGAAGTGGC	MT20	GTTGCGATCC
561	CATAACGACC	MT23	CGTCACAGAG
562	CAAAGTAGCC	MT24	AAACCTGGAC
563	CGCCGCTCCT		

نتایج و بحث

به طور کلی از ۸۵ آغازگر تصادفی به کار رفته در این آزمایش ۳۵ آغازگر (۴۱ درصد) قطعات تکثیر متفاوتی را بین بیست ژنوتیپ جو بدون پوشینه ایجاد کردند. میزان آغازگرهای چند شکل در مطالعات کروت و همکاران (Kroth *et al.*, 2005) ۴۵ درصد، شی و همکاران (Shi *et al.*, 2004) ۱۵ درصد، هونگ و همکاران (Hong *et al.*, 2001) ۳۳ درصد، کوشیوا و همکاران (Kochieva *et al.*, 2001) ۴۵ درصد، سلباک و مولینا (Selbach and Molina, 2000) ۹۳ درصد و کرایچ و همکاران (Kraich *et al.*, 1998) ۴۲ درصد بود. تعداد نشانگرهای چند شکل ایجاد شده در این آزمایش ۲۲۷ نوار تکثیر شده تصادفی بود. به طوری که میانگین نواردهی برای هر آغازگر چند شکل ۶/۴۸ به دست آمد. اندازه محصولات تکثیر شده از ۴۰۰ تا ۲۷۰۰ کیلوباز متغیر بود. بیشترین تعداد نوار چند شکل به آغازگر ۵۴۰ (۱۴ عدد) و کمترین تعداد به آغازگرهای ۴۹۸، ۵۵۹، ۵۷۷ و MT9 (۳ عدد) متعلق بود. تعداد نوارهای سایر آغازگرها از ۴ تا ۱۰ در نوسان بود. میانگین ضرایب تشابه ژاکارد برابر ۰/۵۳۵ و دامنه آن از ۰/۳۷۷ الی ۰/۸ متغیر بود. بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های شماره ۱۵ و ۱۶ (۰/۸) و ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۳ (۰/۷۵۹) مشاهده شد. بعد از این دو ژنوتیپ، فاصله ژنوتیپ شماره ۶ با ژنوتیپ‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۸، ۱۱، ۱۵، ۱۶ و

شد. گروه‌بندی ارقام بر اساس داده‌های RAPD، با استفاده از تجزیه خوشه‌ای انجام شد. در این راستا از روش دورترین همسایه‌ها و ضریب تشابه ژاکارد استفاده شد. به منظور برش دندروگرام و تعیین تعداد خوشه‌ها، از نسبت $\sqrt{\frac{n}{2}}$ (n تعداد ژنوتیپ‌ها) استفاده شد. افزون بر این، تجزیه به بردارهای اصلی (Principal Coordinate Analysis) انجام شد. نرم افزار NTSYS-pc ver. 2.02 برای انجام این تجزیه‌ها به کار رفت. علاوه بر این، دامنه تغییرات ۲۵ صفت زراعی برحسب نسبتی از میانگین که در سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی تبریز اندازه گیری شده بودند محاسبه شد. در نهایت به منظور شناسایی نشانگرهای Informative برای صفات عملکرد دانه در بوته و برخی از صفات مهم زراعی مانند تعداد دانه در سنبله اصلی، وزن هزار دانه، تعداد پنجه‌های بارور، طول سنبله اصلی و تاریخ ظهور سنبله، ابتدا رگرسیون چندگانه با در نظر گرفتن نشانگرها به عنوان متغیرهای مستقل و هر کدام از صفات به عنوان متغیر وابسته به کار رفت. با وجود این، چون VIF (Variance Inflation Factor) کلیه متغیرها در حوالی یک به دست آمد که بیانگر عدم وجود چند همخطی در بین متغیرهای مستقل (نشانگرها) بود، از رگرسیون خطی ساده برای هر ترکیب نشانگر-صفت کمی استفاده شد. برای انجام تجزیه رگرسیون نرم افزار SPSS مورد استفاده قرار گرفت.

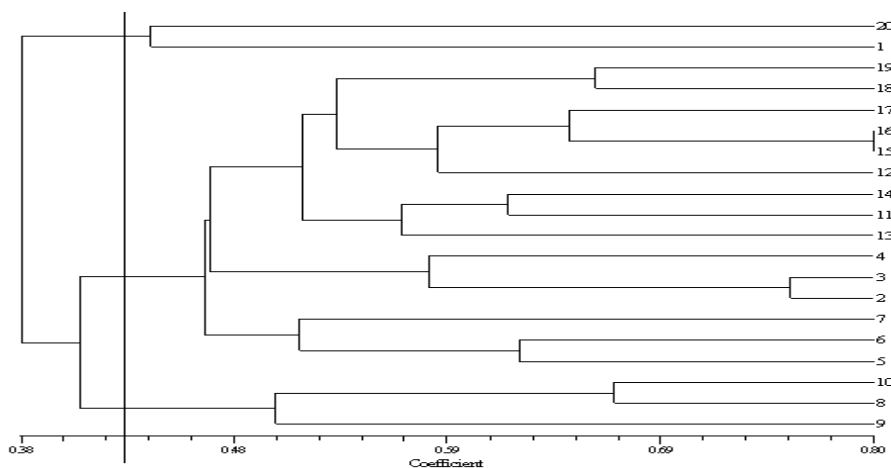
ژنوتیپ‌های شماره ۱ و ۲۰ که دارای شجره یکسان هستند در تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه بر اساس نشانگرهای RAPD نیز در خوشه اول قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های شماره ۸ و ۱۰ نیز که لاین‌های خواهری هستند در خوشه سوم در یک زیر خوشه، گروه‌بندی شدند. به همین ترتیب لاین‌های خواهری شماره ۳ و ۶ در خوشه دوم و لاین‌های خواهری شماره ۱۴، ۱۶، ۱۷ و ۱۹ در همین خوشه و در یک زیر خوشه جای گرفتند. بنابراین، نشانگرهای RAPD از توانایی تشخیص تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم جو بدون پوشینه برخوردار بودند.

بر اساس نتایج مربوط به تجزیه به بردارهای اصلی (جدول ۳) پنج بردار اول مجموعاً ۴۲/۵۸ درصد تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. مولفه اول ۱۰/۳۹ درصد از تنوع کل را تبیین کرد. این مقدار برای مولفه‌های دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب ۸/۹۰، ۸/۱۷، ۷/۸۵ و ۷/۲۵ درصد بود. تبیین کم تنوع به وسیله چند مولفه اول، نشان دهنده توزیع مناسب نشانگرهای مورد استفاده در ژنوم و نمونه‌برداری از قسمت‌های مختلف ژنوم است (Mohammadi, 2002)، بنابراین می‌توان اظهار داشت که پراکنش نشانگرهای مورد استفاده از وضعیت خوبی برخوردار بوده و نمونه برداری مناسب از کل ژنوم در این تجزیه انجام شده است.

دامنه صفات زراعی مورد بررسی برحسب درصدی از میانگین کل در جدول ۴ نشان داده

۱۸، ژنوتیپ شماره ۱۱ با ژنوتیپ‌های شماره ۴، ۱۲ و ۱۴، ژنوتیپ شماره ۸ با ژنوتیپ‌های شماره ۱۰، ۱۵ و ۱۶، ژنوتیپ شماره ۱۵ با ژنوتیپ‌های شماره ۱۳، ۱۷، ۱۸ و ۱۹، ژنوتیپ شماره ۱۶ با ژنوتیپ‌های شماره ۱۲، ۱۴، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ و ژنوتیپ شماره ۱۸ با ۱۹ در سطح بالاتری از سایر فاصله‌ها قرار داشت (داده‌ها درج نشده‌اند). از این ژنوتیپ‌ها می‌توان به عنوان والدین جهت ایجاد تنوع ژنتیکی بیشتر در نسل‌های در حال تفکیک استفاده کرد. متوسط ضریب شباهت ژاکارد بین ارقام جو در مطالعات کروت و همکاران (۲۰۰۵) ۰/۵۳، سلباک و مولینا (۲۰۰۰) ۰/۵۲ و کرایچ و همکاران (۱۹۹۸) ۰/۲۵ گزارش شده است.

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در سه گروه عمده قرار داد (شکل ۱). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱ و ۲۰ بود. گروه دوم ژنوتیپ‌های شماره ۱۰، ۸ و ۹ را در بر داشت و گروه سوم نیز شامل بقیه ژنوتیپ‌ها (شماره ۱۹، ۱۸، ۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۱، ۱۴، ۱۲، ۱۳، ۴، ۳، ۲، ۷، ۶، ۵) بود. این نتایج بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در بین بیست ژنوتیپ جو بدون پوشینه در این مطالعه بود. افزون بر این، از ژنوتیپ‌های خوشه‌های مختلف می‌توان در امر دورگ‌گیری برای ایجاد تنوع جدید و گزینش لاین‌های برتر استفاده کرد. یو و همکاران (Yu et al., 2002) به کمک نشانگرهای RAPD و انجام تجزیه خوشه‌ای وجود اختلافات ژنتیکی را در بین ۲۳ رقم جو بدون پوشینه گزارش کردند.



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه بر اساس روش دورترین همسایه‌ها و ضریب تشابه ژاکارد

Fig. 1. Cluster analysis of hulless barley genotypes based on complete linkage method and Jacard similarity coefficient

جدول ۳- بردارهای اصلی و مقادیر ویژه آن‌ها بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD در ارتباط با ژنوتیپ‌های جو بدون پوشینه

Table 3. Principal coordinates and their eigenvalues based on data from RAPD markers in relation to hulless barley genotypes

بردار Coordinate	مقدار ویژه Eigenvalue	درصد Percent	درصد تجمعی Cumulative
1	0.9226	10.39	10.39
2	0.7902	8.90	19.29
3	0.7254	8.17	27.47
4	0.6969	7.85	35.32
5	0.6441	7.25	42.58
6	0.5739	6.46	49.05
7	0.5374	6.05	55.10
8	0.5040	5.67	60.78
9	0.4564	5.14	65.92
10	0.4413	4.97	70.90

بیوماس تک‌بوته، عرض برگ پرچم، عملکرد کاه تک‌بوته، تعداد دانه در سنبله اصلی، بیوماس کل کرت، طول سنبله اصلی و وزن سنبله اصلی در حد متوسط (۳۱-۵۵ درصد) قرار داشت. از طرف دیگر صفات تعداد سنبلچه در سنبله اصلی، عملکرد کاه کل،

شده است. دامنه تغییرات صفات تاریخ ظهور غلاف، وزن هزار دانه، تاریخ ظهور سنبله، درصد پروتئین دانه و ارتفاع بوته پایین (۲۰-۹ درصد) بود. این دامنه در مورد صفات طول پدانکل، شاخص برداشت تک‌بوته، عملکرد سنبله اصلی، طول برگ پرچم،

جدول ۴ - دامنه صفات مختلف در بیست ژنوتیپ جو بدون پوشینه
Table 4. Range of the different traits in twenty hulless barley genotypes

صفت	ارتفاع بوته	طول پدانکل	طول سنبله اصلی	طول برگ پرچم	عرض برگ پرچم	وزن سنبله اصلی	تعداد سنبله در سنبله اصلی	تعداد دانه در سنبله اصلی	عملکرد سنبله اصلی	تعداد پنجه	تعداد پنجه بارور	تعداد دانه در پنجه بارور	عملکرد پنجه‌های بارور		
Trait	Plant height (cm)	Peduncle length (cm)	Main spike length (cm)	Flag leaf length (cm)	Flag leaf width (cm)	Main spike weight (g)	No. of spikelets in main spike	No. of grains in main spike	Main spike yield (g)	Tiller no.	Effective tiller no.	No. of grains in effective tillers	Effective tiller yield		
Max.	حداکثر	71.23	22.63	12.84	0.97	2.12	23.70	38.34	1.42	3.91	2.2	42.94	1.53		
Min.	حداقل	58.47	16.41	8.81	0.62	1.17	13.90	24.51	0.97	1.56	1	14.66	0.51		
		((Max-Min)/ Mean)*100	20.38	30.67	48.56	39.94	42.17	55.23	61.13	44.82	39.13	94.76	80	96.62	103.03
صفت	عملکرد دانه	بیوماس تک	عملکرد کاه تک	شاخص برداشت تک بوته	بیوماس کل کرت	عملکرد دانه کل	عملکرد کاه کل	شاخص برداشت کل	وزن هزار دانه	پروتئین دانه	تاریخ ظهور غلاف	تاریخ ظهور سنبله			
Trait	Grain yield per plant (g)	Biomass per plant (g)	Straw yield per plant (g)	Harvest index per plant (%)	Biomass per plot (gm ⁻²)	Grain yield per plot (gm ⁻²)	Straw yield per plot (gm ⁻²)	Harvest index per plot (%)	1000 Grain weight (g)	Grain protein	Booting date	Heading date			
Max.	حداکثر	2.86	7.83	5.25	42.40	1557.23	472.27	1209.70	39.38	33.63	10.11	48.00	59.75		
Min.	حداقل	1.48	5.16	3.28	29.10	958.80	232.85	621.16	20.42	30.35	8.41	43.50	52.62		
		((Max-Min)/ Mean)*100	64.19	40.45	44.37	38.55	46.76	71.47	62.20	71.87	18.52	9.93	12.84		

عملکرد دانه تک بوته، عملکرد دانه کل، شاخص برداشت کل، تعداد پنجه بارور، تعداد پنجه، تعداد دانه در پنجه‌های بارور و عملکرد پنجه‌های بارور از دامنه بالایی (۱۰۳-۶۱ درصد) نسبت به سایر صفات برخوردار بودند که نشانگر وجود تنوع زیاد برای این صفات است. تنوع موجود برای صفات عملکرد دانه در بوته، طول سنبله اصلی، تعداد دانه در سنبله اصلی، تعداد پنجه بارور، تاریخ ظهور سنبله و وزن هزار دانه، بررسی رابطه رگرسیونی نشانگرهای RAPD با این صفات را به منظور شناسایی نشانگرهای Informative توجیه کرد.

نتایج مربوط به تجزیه رگرسیون خطی هر کدام از نشانگرها با برخی از صفات مهم زراعی در جدول ۵ درج شده است. تعداد نشانگرهای Informative برای طول سنبله اصلی، تعداد دانه در سنبله اصلی، عملکرد دانه در بوته، تعداد پنجه بارور، تاریخ ظهور سنبله و وزن هزار دانه به ترتیب ۲۰، ۱۹، ۱۸، ۱۴، ۱۱ و ۱۰ بود. به نظر می‌رسد که می‌توان از این نشانگرها در امر گزینش لاین‌های جو بدون پوشینه به منظور بهبود عملکرد دانه و اجزای آن استفاده کرد. در عین حال برای حصول نتایج قطعی باید آزمایش‌ها در سال‌های بیشتر و در چند مکان تکرار شود. یو و همکاران (Yu et al., 2002) برای گزینش ارقام جو بدون پوشینه دارای بتا-گلوکان بالا و هوفمن و همکاران (Hoffman et al., 2003) به منظور تعیین ژنوتیپ‌های جو با کیفیت بیشتر برای

مالت‌سازی استفاده از نشانگرهای RAPD را پیشنهاد کردند. کراکمن و همکاران (Kraakman et al., 2004) نیز ۱۹ نشانگر AFLP مرتبط با عملکرد دانه را، که ۵۴/۵ درصد از تغییرات را توجیه کرد در جوهای دوردیفه بهاره جدید در اروپا شناسایی کردند. در مطالعه‌ای دیگر، کراکمن و همکاران (Kraakman et al., 2006) رابطه تاریخ ظهور سنبله و ارتفاع بوته را با برخی از نشانگرهای AFLP و SSR عنوان کردند. ایواندیک و همکاران (Ivandick et al., 2005) نیز با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره رابطه معنی دار یک نشانگر را با تحمل به تنش خشکی در جو وحشی (*Hordeum spontaneum*) گزارش کردند.

از بین نشانگرهایی که رابطه معنی‌دار با عملکرد دانه در بوته نشان دادند، هیچ کدام از آن‌ها در میان نشانگرهای Informative برای وزن هزار دانه، طول سنبله اصلی، تعداد پنجه بارور و تاریخ ظهور سنبله قرار نداشتند. در حالی که هشت تا از این نشانگرها یعنی نشانگرهای دارای اندازه ۱۹۰۰ و ۱۴۵۰ (آغازگر ۵۲۶)، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۸۰۰ (آغازگر ۵۳۰)، ۱۲۰۰ (آغازگر ۵۵۸) و ۱۵۰۰ (آغازگر MT9) به عنوان نشانگرهای Informative برای عملکرد دانه در بوته و تعداد دانه در سنبله اصلی شناسایی شدند (جدول ۵). این نتایج حاکی از آن است که در جوهای بدون پوشینه اصلاح شده، تعداد

جدول ۵- نشانگرهای Informative برای عملکرد دانه در بوته و برخی صفات زراعی در جو بدون پوشینه

Table 5. Informative markers for yield per plant and several characters in hulless barley

صفت	آغازگر	اندازه نشانگر	سطح احتمال معنی دار	صفت	آغازگر	اندازه نشانگر	سطح احتمال معنی دار	صفت	آغازگر	اندازه نشانگر	سطح احتمال معنی دار
Trait	Primer	Marker size (kb)	Significance probability level	Trait	Primer	Marker size (kb)	Significance probability level	Trait	Primer	Marker size (kb)	Significance probability level
عملکرد دانه تک بوته				طول سنبله اصلی				تعداد دانه در سنبله اصلی			
Yield per plant	525	1900	0.031	Main spike length	493	1800	0.029	اصلی	525	1900	0.023
		1450	0.011		523	1100	0.037	No. of grains in main spike	526	1450	0.023
		1100	0.005		540	1050	0.042			1400	0.017
		400	0.029		556	1100	0.000		530	1500	0.039
	526	1400	0.035		558	500	0.055			1000	0.039
		800	0.053		563	950	0.000			800	0.039
	530	1500	0.016			550	0.043		540	700	0.001
		1200	0.050		580	1900	0.044		556	2700	0.056
		1000	0.016		589	1600	0.006		558	1450	0.008
		800	0.016		599	1200	0.000			1200	0.014
		600	0.050		666	1600	0.032		559	1700	0.050
		500	0.050		MT8	1900	0.035		580	1450	0.023
	540	1100	0.043			1100	0.051		599	1100	0.041
		600	0.043		MT9	1450	0.032		MT8	900	0.044
		1200	0.006			1350	0.000		MT9	1500	0.010
	558	1500	0.003		MT13	1350	0.001		MT13	1350	0.006
	MT9	1900	0.016		MT16	1000	0.027		MT16	1900	0.002
	MT16	1900	0.052		MT20	1000	0.020			700	0.036
	MT23	1900	0.052			800	0.013		MT22	1350	0.038
					MT22	1800	0.000				

Table 5. Continued

ادامه جدول ۵

صفت Trait	آغازگر Primer	اندازه نشانگر Marker size (kb)	سطح احتمال معنی دار Significance probability level	صفت Trait	آغازگر Primer	اندازه نشانگر Marker size (kb)	سطح احتمال معنی دار Significance probability level	صفت Trait	آغازگر Primer	اندازه نشانگر Marker size (kb)	سطح احتمال معنی دار Significance probability level
تعداد پنجه بارور No. of Effective Tiller	493	1800	0.050	تاریخ ظهور سنبله Heading Dat	445	900	0.000	وزن هزار دانه 1000 Grains Weight	493	1200	0.058
	523	1100	0.033		485	550	0.009		497	700	0.008
	556	1100	0.009		491	650	0.052		540	1050	0.034
	558	500	0.036		493	1800	0.030		556	1350	0.052
	561	2400	0.028			1700	0.038			850	0.046
		2200	0.022		523	1100	0.019		558	900	0.053
	563	950	0.053		558	900	0.059		561	650	0.009
	577	500	0.005			500	0.035		580	1900	0.026
	666	1100	0.047		MT8	1900	0.023		MT15	1350	0.035
	MT7	1800	0.041		MT9	1350	0.049			900	0.006
	MT8	1900	0.043		MT16	1800	0.057				
		1100	0.037								
	MT9	1350	0.009								
	MT22	700	0.057								

شده در این بررسی به عنوان نشانگر های Informative در امر گزینش برای افزایش عملکرد دانه و اجزای آن استفاده به عمل آورد. در صورت وجود این رابطه در ژرم پلاسما های دیگر می توان با تبدیل این نشانگرها به نشانگر STS، کارآیی گزینش را نیز افزایش داد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین بخش غلات موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به خاطر فراهم کردن مواد گیاهی مورد بررسی قدردانی می شود.

دانه در سنبله اصلی مهم ترین جزء عملکرد دانه است. گارسیا دل مورال و همکاران (Garcia Del Moral *et al.*, 1985, 1991) نیز نقش تعداد دانه در سنبله را روی عملکرد دانه در جو در مطالعات مزرعه ای بیشتر از سایر اجزای عملکرد گزارش کرده اند.

پژوهش حاضر نشان داد که بین ارقام جو بدون پوشینه، تنوع مطلوبی وجود دارد به طوری که از این تنوع می توان برای اهداف مختلف به نژادی استفاده کرد. همچنین نتایج این آزمایش حاکی از آن بود که امکان استفاده از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه بندی ارقام جو بدون پوشینه وجود دارد. افزون بر این، به نظر می رسد که بتوان از برخی از نشانگرهای شناسایی

References

- Anonymous, 2002.** Hulless barley and its possibility to use as chicken food. Deputy of Agronomy, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran (in Farsi).
- Bhatty, R.S. 1999.** The potential of hulless barley. *Cereal Chemistry* 76: 589-599.
- Bothmer, R., Jacobsen, N., Baden, C., Jorgensen, R. ., and Linde-Larsen, I. 1991.** An ecogeographical study of the genus *Hordeum*. 2nd ed. IPGRI, Rome, Italy
- Cho, Y. C., Shing, S. N., Ahn, S. N., Georgia, G. B., Kang, K. H., Bar, D., and Moon, H. P. 1999.** DNA fingerprinting of rice cultivars using AFLP and RAPD markers. *Korean Journal of Crop Science* 44: 26-31.
- Choo, T. M., Ho, K. M., and Martin, R. A. 2001.** Genetic analysis of hulless * covered cross of barley using doubled-haploid lines. *Crop Science* 41: 1021-1026.
- Garcia Del Moral, L. F., Ramos, J. M., Garcia Del Moral, M. B., and Jimenez-Tajeda, M. P. 1991.** Ontogenetic approach to grain production analysis. *Crop Science* 31: 1179-1185.

- Garcia Del Moral, L. F., Ramos, J. M., and Recalde, L. 1985.** Relationships between vegetative growth, grain yield and grain protein content in six barley cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* 65: 523-532.
- Hang, A., Hoffman, D. L., and Burton, C. S. 1997.** DNA variation and genetic relationships among hulless barley accessions as detected by RAPD. *Genetics and Breeding* 50: 337-347.
- Hoffman, D., Hang, A., Larson, S., and Jones, B. 2003.** Conversion of a RAPD marker to an STS marker for barley variety identification. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 81-91.
- Hong, Q., Hou, L., Luo, X.Y., Li, D., Xiao, Y., Pei, Y., Yang, K., and Jia, C. 2001.** Using RAPD for evaluating genetic background among naked barley varieties in Sishuan northwestern region. *Scientia Agricultura Sinica* 34: 133-138.
- Ivandic, V., Thomas, W.T.B., Nevo, E., Zhang, Z., and Forster, B.P. 2003.** Association of simple sequence repeats with quantitative trait variation including biotic and abiotic stress tolerance in *Hordeum spontaneum*. *Plant Breeding* 122: 300-304.
- Jakob, S. S., Meister, A., and Blattner, F. R. 2004.** The considerable genome size variation of *Hordeum* species (Poaceae) is linked to phylogeny, life forms and speciation rates. *Molecular Biology and Evolution* 21: 860-869.
- Kikuchi, S., Taketa, S., Ichii, M., and Kawasaki, S. 2003.** Efficient fine mapping of the naked caryopsis gene (*nud*) by HEGS (High Efficiency Genome Scanning)/ AFLP in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 73-78.
- Kochieva, E. Z., Goryunova, S. V., and Pomortsev, A. A., 2001.** RAPD analysis of the genomic in species of the genus *Hordeum*. *Genetika Moskova* 37: 1088-1094.
- Kraakman, A. T. W., Martinez, F., Mussiraliev, B., van Eeuwijk, F. A., and Niks, R. E. 2006.** Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding* 17: 41-58.
- Kraakman, A. T. W., Niks, R. E., Van den Berg, P. M. M. M., Stam, P., and van Eeuwijk, F. A. 2004.** Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168: 435-446.
- Kraich, J., Zakova, M., and Gregova, M. 1998.** Comparison of differentiation capability of RAPD and SSR marker in commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Cereal Research Communications* 26: 375-382.

- Kroth, M. A., Ramella, M. S., Tagliari, C., de Francisco, A., and Arisi, A. C. M. 2005.** Genetic similarity of Brazilian hulless and malting barley varieties evaluated by RAPD markers. *Scientia Agricola* 62: 36-39.
- Mohammadi, S. A., 2002.** Statistical methods in genetics. Proceedings of 6th Statistics International Conference. University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran (in Farsi).
- Saghai-Marouf, M. A., Biyashav, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q., and Allard, R. W. 1994.** Extraordinary polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 91: 5466-5470.
- Selbach, A., and Molina, S. C. 2000.** RAPD characterization of Brazilian barley. *Euphytica* 111: 127-135.
- Shi, Y. T., Bian, H. W., Han, N., Pan, J. W., Tong, W. X., and Zhu, M. Y. 2004.** Genetic variation analysis by RAPD of some barley cultivars in China. *Acta Agronomica Sinica* 30: 256-265.
- Smith, J. S. C., and Smith, O. S. 1992.** Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 47: 140-149.
- Taketa, S., Kikuchi, S., Awayama, T., Yamamoto, S., Ichii, M., and Kawasaki, S. 2004.** Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analysis of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*). *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1236-1242.
- Virk, P. S., Ford-Lloyd, B. V., Jachson, M. T., and Newbury, H. J. 1995.** Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity* 74: 170-179.
- Yu, Z., Li-Qiong, L., Huan, L., Jie, B., Man-Ye, Y., Chen, M., Ying-Fan, C., Xiao-Lin, Q., and Fang, C., 2002.** RAPD markers in diversity detection and variety identification of Tibetan hulless barley. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 369-377.
- Zohary, D., and Hopf, M. 2000.** Domestication of plants in the world: The origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe and the Nile valley. Clarendon Press, Oxford, UK.