

مطالعه تنوع ژنتیکی جو به کمک نشانگرهای ریز ماهواره و تجزیه ارتباط برای صفات وابسته به تحمل یخ‌زدگی

Genetic Diversity in Barley as Revealed by Microsatellite Markers and Association Analysis of These Markers by Traits Related to Freezing Tolerance

علیه گنج‌خانلو^۱، سیدابوالقاسم محمدی^۲، محمد مقدم^۲، کاظم قاسمی گل‌عدانی^۲،
محمد رضا شکیبا^۲، و احمد یوسفی^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۲- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- کارشناس، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۲۱

چکیده

گنج‌خانلو، ع.، محمدی، س.، مقدم، م.، قاسمی گل‌عدانی، ک.، شکیبا، م.، ر.، و یوسفی، ا. ۱۳۹۱. مطالعه تنوع ژنتیکی جو به کمک نشانگرهای ریز ماهواره و تجزیه ارتباط برای صفات وابسته به تحمل یخ‌زدگی. *مجله به‌نژادی نهال و بذر* ۱-۲۸: ۱۱۴-۱۰۱.

تنوع ژنتیکی ۳۵ ژنوتیپ جو با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره و رابطه این نشانگرها با برخی صفات وابسته به تحمل یخ‌زدگی بررسی شد. پس از استخراج و تکثیر DNA از برگ‌های جوان، محصولات تکثیر تفکیک و الگوی بانندی آن‌ها نمره‌دهی شد. بر اساس داده‌های حاصل میزان چند شکلی و میانگین تنوع ژنتیکی برای هر آغازگر محاسبه و در نهایت ژنوتیپ‌ها گروه‌بندی شدند. صفات وزن تر و خشک برگ، طوقه و گیاهچه، درصد آب بافت، میزان اتلاف آب بافت، درصد زنده‌مانی در دماهای ۶-، ۱۰-، ۱۴-، ۱۶- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد و LT50 در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه نیز اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج حاصل در مجموع ۲۶۸ الل چند شکل با میانگین ۱۷/۴۴ الل به ازای هر جایگاه ریز ماهواره تولید شد. نشانگر Hvm74 با ۲۱ الل بیشترین و Hvm2a با ۳ الل کمترین تعداد الل را دارا بودند. کمترین فراوانی الل شایع (۱۳/۰) به نشانگر Hvm20 و بیشترین آن (۵۳/۰) به Hvm14 مربوط بود. میانگین فراوانی الل شایع ۳۱/۰ به دست آمد. میزان اطلاعات چند شکلی بین ۴۲/۰ تا ۹۴/۰ با میانگین ۷۴/۰ متغیر بود و کمترین و بیشترین میزان به ترتیب به نشانگرهای Hvm74 و Hvm2a تعلق داشت. میزان تنوع ژنی برای نشانگرهای مورد استفاده در محدوده ۵۳/۰ تا ۹۳/۰ با میانگین ۷۸/۰ به دست آمد. بیشترین میزان هتروزیگوسی نیز به نشانگر Hvm74 (۲۵/۰) اختصاص یافت. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، نشانگرهای ریز ماهواره قادر بودند تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی ارقام جو را به نحو مطلوب شناسایی کنند. بر اساس تجزیه ارتباط نشانگرها با ارزش‌های فنوتیپی، ۶۲ الل از ۳۸ جفت نشانگر ریز ماهواره رابطه معنی‌داری با ۱۲ صفت از ۱۳ صفت مورد ارزیابی در ژنوتیپ‌های جو نشان دادند. بیشترین تعداد الل برای درصد آب طوقه (۱۰ الل) و کمترین آن برای میزان اتلاف آب بافت (یک الل) شناسایی شد. الل‌های مرتبط با LT50 برابر با ۵ عدد بودند که از آن‌ها، در صورت تأیید در سایر آزمایش‌ها، می‌توان در برنامه‌های اصلاح برای تحمل یخ‌زدگی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: جو، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریز ماهواره، تجزیه ارتباط، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم پلاسما گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات به شمار می‌رود. در گیاهان مختلف نشانگرهای مورفولوژیکی، ایزوزیم‌ها، پروتئین‌های ذخیره‌ای و نیز نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع و تعیین روابط ژنتیکی افراد استفاده شده‌اند ولی به علت محدود بودن تعداد نشانگرها و تأثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای کارآ و مکمل برای تعیین سطح تنوع و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Zhang et al., 2002؛ Mohammadi and Prasanna, 2003؛ Manifesto et al., 2001).

امروزه از نشانگرهای مبتنی بر DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی از جمله جو استفاده گسترده‌ای می‌شود (Tanyolac, 2003؛ Malus and Hayes, 2002؛ Davila et al., 1999؛ Fernández et al., 2002).

ریزماهورها از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که به علت ویژگی‌های منحصر به فرد مورد استقبال فراوان محققین قرار گرفته‌اند (Andaya et al., 1996). ریزماهورها به دلیل ماهیت هم‌بارز و چند اللی، محتوای اطلاعات چند شکلی بالا و توزیع تصادفی در ژنوم، ابزارهای مناسب

برای مطالعات تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های پیوستگی و نیز مکان‌یابی ژن‌ها محسوب می‌شوند (Snowdon and Fried, 2004؛ Langridge et al., 2001). توالی‌های احاطه‌کننده جایگاه‌های ریزماهورهای، در داخل یک گونه یا در گونه‌های داخل یک جنس و به ندرت در جنس‌های خویشاوند حفاظت شده هستند و از آن‌ها می‌توان برای طراحی آغازگر به منظور تکثیر جایگاه‌های ریزماهورهای استفاده کرد (Bernardo, 2001؛ Barriere et al., 2001). فراوانی ریزماهورها در ژنوم، سطح بالای تنوع اللی در جایگاه‌های ریزماهورهای و سهولت به کارگیری این نشانگرها، آن‌ها را از سایر نشانگرهای ژنتیکی متمایز ساخته است (Ovesna et al., 2002).

گونگ و همکاران (Gong et al., 2009) از ۵۲ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۳ رقم جو وحشی و ۵۶ رقم جو بومی، که عمدتاً از مناطق مختلف چین جمع‌آوری شده بودند، و یک رقم زراعی استفاده کردند. در مجموع ۲۰۶ الل در ۵۲ جایگاه ریزماهورها برای ۹۰ توده جو به دست آمد. تعداد الل به ازای هر جایگاه ریزماهورها بین ۱ تا ۹ الل با میانگین ۴ بود. متوسط میزان اطلاعات چند شکلی ۰/۵۴۷ بود که این میزان برای جوهای وحشی از صفر تا ۰/۸۱۳ با متوسط ۰/۵۴۳ و برای جوهای بومی در محدوده ۰ تا ۰/۷۹۰ با متوسط ۰/۴۹ متغیر بود. ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2009) در بررسی ۵۷ رقم جو

(Holton *et al.*, 2001) در بررسی ۴۳ نشانگر ریزماهواره در ۱۰۸ رقم جو میانگین تعداد ال‌ها را ۸/۸ و میانگین تنوع ژنی را ۰/۵۵ برآورد کردند. در این تحقیق آغازگرهایی با توالی تکراری (GA)_n بیشترین تعداد ال را داشتند. اورابی و همکاران (Orabi *et al.*, 2004) در بررسی ۲۴۰ لاین جو که از ۲۴ مزرعه نمونه‌گیری شده بود، میانگین تنوع ژنتیکی را بین ۰/۳۵ تا ۰/۵۵ به دست آوردند. مزاروس و همکاران (Meszaros *et al.*, 2007) برای نشان دادن تنوع ژنتیکی بین ۲۶ رقم جو از ۲۶ نشانگر SSR و ۳۶ نشانگر RAPD استفاده کردند و نشان دادند که نشانگرهای SSR به خوبی قادرند ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر تفکیک کنند. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2010) تنوع ژنتیکی ۷۳ نمونه جو ایران از دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* را با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی تنوع در هر دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* سودمند هستند.

حمزا و همکاران (Hamza *et al.*, 2004) از ۱۷ نشانگر ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم جو و تعیین ارتباط این نشانگرها با برخی صفات مورفولوژیک استفاده کردند. از میان ۱۷ نشانگر ریزماهواره ۱۵ نشانگر چندشکل بودند. میانگین تعداد ال‌ها برای هر جایگاه ۳/۶ و میزان اطلاعات

با استفاده از ۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره متوسط تعداد ال‌ها را ۱۷۶ و متوسط میزان اطلاعات چندشکلی (Polymorphic information content) PIC را ۰/۸۴۹ گزارش کردند. کوندون و همکاران (Condon *et al.*, 2004) بازده ژنتیکی و تنوع الی ۶۲ رقم از جوهای شش ردیفه را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. میانگین تنوع الی برای ۶۵ نشانگر SSR در میان ژنوم‌های مورد بررسی ۱۶ ال در هر مکان ژنی بود. هولتون و همکاران (Holton *et al.*, 2002) از ۴۱ نشانگر ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیکی یازده رقم جو استفاده کردند که از این تعداد ۱۶ نشانگر چندشکل بودند. ماتوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) نشانگرهای ریز ماهواره را برای بررسی تنوع ژنتیکی سه گروه از ژرم‌پلاسم جو، متشکل از ۱۴۷ ژنوتیپ، مورد استفاده قرار دادند. در این مطالعه ۶۳۷ ال در ۴۲ مکان ریزماهواره در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تکثیر شد. میزان اطلاعات چندشکلی برای این جایگاه‌ها از ۰/۰۸ تا ۰/۹۳ متغیر بود. تعداد ال در هر مکان در اجداد زراعی جو ۱۰/۲، در والدین جمعیت‌های در حال تفرق ۸/۴ و در ارقام مورد ارزیابی ۵/۶ بود. ورشنی و همکاران (Varshney *et al.*, 2005) میزان PIC نشانگرهای EST-SSR را در مجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های جو بین ۰/۲۴ تا ۰/۷۸ با میانگین ۰/۴۸ برآورد کردند. هولتون و همکاران

مدت یک دقیقه و بسط در دمای 72°C به مدت دو دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای 72°C بود. جداسازی محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌ساز ۶ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت Bio Rad انجام و رنگ آمیزی به روش نترات نقره انجام شد (Anonymous, 2005).

امتیازدهی الگوهای نواری به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) انجام شد. همچنین برای هر نشانگر تعداد ال‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت a، b، c... نامگذاری شدند. فراوانی‌های ال‌ها و پارامترهای ژنتیکی هر جایگاه ریز ماهواره و نیز فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها برآورد شد. هتروزیگوتی مورد انتظار و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) به ترتیب با استفاده از فرمول‌های $H = 1 - \sum pi^2$ و $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2pipj^2$ محاسبه شدند که در این فرمول‌ها، pi و pj به ترتیب فراوانی ال‌های i و j در جایگاه ریز ماهواره هستند (Wei et al., 2005). این پارامترها بر مبنای ۱۰۰۰ نمونه bootstrap با استفاده از برنامه PowerMarker V3.25 (Liu, 2004) برآورد شدند. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضرایب فاصله Kimura 2-parameters و با استفاده از نرم‌افزار MEGA3 محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای نیز براساس الگوریتم Neighbour-Joining انجام شد (Liu, 2004).

چندشکلی ۰/۴۵ بود. آن‌ها همبستگی مثبت و معنی‌داری بین برخی از نشانگرها و داده‌های مورفولوژیکی به دست آوردند.

اهداف این تحقیق بررسی تفاوت‌های ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره و تجزیه ارتباط آن‌ها با ارزش‌های فنوتیپی مربوط به چند صفت وابسته به تحمل یخ‌زدگی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد ارزیابی شامل ۳۵ ژنوتیپ جو بودند که از بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند.

استخراج DNA ژنومی براساس روش سقای معروف و همکاران (Saghai-Marooft et al., 1984) انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. برای تکثیر جایگاه‌های ریز ماهواره از ۴۴ جفت آغازگر ریز ماهواره استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر با اجزای ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۲۵ میلی‌مولار آغازگر، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA، ۰/۲۵ میلی‌مولار مخلوط dNTP انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای 94°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دماهای 65°C – 50°C به

علاوه بر بررسی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه از نظر نشانگرهای ریزماهوره، وزن تر و خشک برگ، طوقه و گیاهچه، میزان اتلاف آب بافت، درصد آب بافت (Brule-Bable and Fowler, 1989)؛ Fowler *et al.*, 1981) و درصد زنده‌مانی آن‌ها در دماهای ۶-، ۱۰-، ۱۴-، ۱۶- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد نیز در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از مقادیر درصد زنده‌مانی، LT50 ژنوتیپ‌ها به کمک تبدیل پروبیت محاسبه گردید.

برای شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات فیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های جو تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهوره و ارزش‌های فنوتیپی این صفات با استفاده از تجزیه رگرسیون چندگانه به روش گام به گام انجام شد. به این ترتیب که ال‌های نشانگرهای مورد ارزیابی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد نظر به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند. برای کاهش خطای تجزیه رگرسیون، سطح احتمال ۰/۰۱ برای ورود متغیرها به مدل و سطح احتمال ۰/۰۵ برای خروج از مدل منظور شد.

نتایج و بحث

مشخصات ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده در این بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است.

از مجموع ۴۴ جفت آغازگر ریزماهوره

مورد بررسی، ۳۶ جفت آغازگر الگوی نواری مناسبی را تولید کردند. از بین ۳۶ جفت آغازگر ریزماهوره در مجموع ۲۶۸ ال‌ها با میانگین ۷/۴۴ ال‌ها به ازای هر نشانگر در ۳۵ ژنوتیپ جو تولید شد (جدول ۲). نشانگر Hvm2A با ۳ ال‌کمترین تعداد و نشانگر Hvm74 با ۲۱ ال بیشترین تعداد ال‌ها را دارا بودند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2009) در بررسی ۵۷ رقم جو با استفاده از ۲۱ جفت آغازگر ریزماهوره تعداد کل ال‌ها را ۱۷۶ به دست آوردند. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2010) با مطالعه تنوع ژنتیکی ۷۳ نمونه جو ایران در گونه‌های *H. vulgare* و *H. spontaneum* به کمک ۱۵ جفت نشانگر ریزماهوره، اظهار داشتند که بیشترین تعداد ال‌ها در گونه *H. vulgare* مربوط به جایگاه‌های Bmac0316 و Hvm40 با ۸ ال‌ها و کمترین آن مربوط به جایگاه Hvm70 با دو ال‌ها بود. بیشترین تعداد ال‌ها در گونه *H. spontaneum* نیز به جایگاه Hvm40 با ۹ ال‌ها و کمترین آن به جایگاه‌های Hvm70 و HvmLoH1A با ۲ ال‌ها تعلق داشت.

میزان اطلاعات چندشکلی برای نشانگرهای مورد بررسی در این مطالعه بین ۰/۴۲ تا ۰/۹۴ با میانگین ۰/۷۴ متغیر بود. نشانگر Hvm2A کمترین و نشانگر Hvm74 بیشترین میزان PIC را داشتند. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌ها به شمار

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده در آزمایش
Table 1. The characteristics of barley genotypes used in the experiment

شماره	کد ژنوتیپ	شجره
No.	Genotype code	Pedigree
1	EC79-10	Walfajre/Miraj 1
2	EC79-13	Kmk//Rbr/Wa2196-68/3/EBC(A)
3	EC79-18	Lignee 131//4341 N/Ortolan
4	EC80-7	YEA389.3/YEA475.4
5	EC80-11	Alger/(CI10117/Choyo..
6	EC80-13	Ceres//WI2192/Emir/3/Karoon
7	EC81-11	Coss/OWB 71080-44-IH
8	EC81-13	Comp 89-9Cr-79-07/Atem//(Alpha/HC1905//Robur)/3/.
9	EC82-10	Arar/Productive
10	EC83-4	L.131/Gerbel//Ager-Ceres/3/(Scotia/Wa...)
11	EC83-5	Arar/L.1242
12	EC83-12	K-096M3
13	EC83-17	Makouee//Zarjow/80-5151
14	A1C84-7	Star/Dundy
15	A1C84-9	F2//Radical/Karat/3/Radical/4/Xemus
16	A1C84-12	Kozir/330
17	A1C84-14	Astrix(C)/3/Mal/OWB753328-5H//Perga/Boyer
18	A1C84-15	Monolit/Plaisant
19	A2C84-5	CWB117-77-9-7/Teran 78
20	A2C84-8	Legia/3/Arizona5908/Aths//L.640
21	A2C84-11	Roho/Mazurka//Dyton
22	A2C84-12	Boyer(F356)126//Cem1413/Kt2085
23	A2C84-14	Cyclone/Arar
24	A2C84-18	Mal/OWB753328-5H//11840-76/3/Radical
25	A2C84-17	Monolit/Plaisant
26	Makouee	Makouee
27	CB74-2	CB74-2
28	Rihaneh	Rihane
29	KAVIR	Kavir
30	73M4-C	73M4-30
31	Schulyer	Schulyer
32	L.1242	L.1242
33	Aths	Aths
34	EM80-7	Rihane//Aths/Bc
35	EM80-9	LB.Iran/Una 8271//Gloria"S"/Come"s"-11M/3/Kavir

(Ebrahimi *et al.*, 2010) روی جوهای ایران نیز میزان PIC در گونه *H. vulgare* از ۰/۸ در جایگاه Bmac0040 تا ۰/۱۹ در جایگاه Bmag0603 و در گونه *H. spontaneum* از ۰/۱۹ در جایگاه Bmac0415 تا ۰/۴۳ در جایگاه Hvm70 متغیر بود. میزان اطلاعات

می‌رود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین، نشانگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک مفید هستند. براساس مطالعه ابراهیمی و همکاران

جدول ۲- تعداد الل، فراوانی الل شایع، میزان هتروزیگوسی، تنوع ژنی، میزان اطلاعات چند شکلی و مکان کروموزومی نشانگرهای ریزماهواره در ژنوتیپ های جو

Table 2. Allele number^a, frequency of more common allele^b, amount of heterozygosity^c, mean gene diversity^d, chromosome location^e and polymorphic information content^f for SSR markers in relation to barley genotypes

نشانگر	تعداد الل	فراوانی الل شایع	میزان هتروزیگوسی	تنوع ژنی	مکان کروموزومی	میزان اطلاعات چند شکلی
Marker	a	b	c	d	e	f
Hvm7	6	0.259	0.00	0.809	7	0.782
Hvm63	6	0.345	0.00	0.773	5	0.739
Hvm64	5	0.333	0.00	0.760	5	0.721
Hvm5	11	0.200	0.00	0.877	1	0.865
Hvdhn9	9	0.258	0.03	0.827	7	0.805
Hvm2a	3	0.500	0.00	0.531	7	0.421
Hvdhn7	10	0.293	0.05	0.828	7	0.808
Hvbkasi	8	0.333	0.13	0.777	2	0.744
Hvm6	7	0.364	0.00	0.736	7	0.697
Hvcma	9	0.274	0.03	0.820	1	0.798
Hvm13	5	0.516	0.00	0.662	4	0.621
Hvm26	5	0.367	0.00	0.722	2	0.676
Hvm30	4	0.320	0.00	0.742	7	0.695
Hvm31	7	0.321	0.00	0.796	6	0.768
Hvm27	9	0.233	0.00	0.836	3	0.815
Hvm20	11	0.133	0.03	0.897	5	0.888
Hvm14	7	0.533	0.00	0.647	6	0.606
Hvm33	4	0.378	0.00	0.703	3	0.650
Hvm36	9	0.258	0.06	0.831	2	0.810
Hvm40	9	0.317	0.03	0.828	4	0.810
Hvm43	4	0.429	0.00	0.663	5	0.600
Hvm9	8	0.243	0.00	0.841	3	0.822
Hvcs-1	6	0.345	0.00	0.751	2	0.712
Hvcs-2	6	0.286	0.00	0.768	2	0.752
Hvm4	5	0.400	0.00	0.704	1	0.625
Hvleu	7	0.290	0.00	0.778	7	0.745
Hvm54	6	0.324	0.00	0.787	2	0.757
Hvm49	12	0.167	0.00	0.896	1	0.868
Hvm51	5	0.438	0.00	0.701	1	0.655
Hvm65	5	0.321	0.00	0.740	6	0.693
Hvm60	9	0.231	0.00	0.852	3	0.835
Hvm67	11	0.367	0.00	0.811	4	0.794
Hvm68-1	7	0.267	0.00	0.827	4	0.804
Hvm68-2	7	0.226	0.00	0.843	4	0.823
Hvm70	5	0.267	0.00	0.782	3	0.747
Hvm74	21	0.156	0.25	0.927	6	0.923
میانگین	7.44	0.314	0.03	0.780		0.748
انحراف معیار	0.53	0.015	0.016	0.014		0.016

اطلاعات چندشکلی را برای ۲۶ رقم جو ۰/۴۵ گزارش کردند. به نظر می‌رسد که در ژرم پلاسما جوهای زراعی موجود در ایران و سایر نقاط دنیا (Beyen *et al.*, 2005) چند شکلی قابل توجهی وجود دارد.

میزان هتروزیگوسی مورد انتظار یا تنوع ژنتیکی یکی دیگر از معیارهای ارزیابی تنوع اللی نشانگرها و میزان اطلاعات نشانگری در

چندشکلی در مطالعات ماتوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) بین ۰/۰۸ تا ۰/۹۳ در ۱۴۷ رقم جو در نوسان بود. متوسط میزان PIC گزارش شده توسط گونگ و همکاران (Gong *et al.*, 2009) ۰/۵۴۷ و ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2009) ۰/۸۴۹ بود. حمزا و همکاران (Hamza *et al.*, 2004) نیز میانگین میزان

بیشترین میانگین PIC و تنوع ژنی مربوط به نشانگرهای سه نوکلئوتیدی است (جدول ۳). به عبارت دیگر در این مطالعه نشانگرهای ریزماهواره با توالی‌های تکراری سه نوکلئوتیدی قدرت تفکیک بالاتری نسبت به سایر نشانگرها داشتند. این امر شاید به تعداد کم این نشانگرها در مقایسه با نشانگرهای دو نوکلئوتیدی مربوط باشد. نشانگرهای دارای توالی‌های تکراری دو و چهار نوکلئوتیدی از میانگین PIC و تنوع ژنی تقریباً یکسانی برخوردار بودند.

دندروگرام حاصل از روش Neighbour- Joining بر اساس ضریب فاصله Kimura 2- parameters در شکل ۱ مشاهده می‌شود. با توجه به اعداد Bootstrap بیشترین تمایز گروه‌ها در محل برش دندروگرام با سه گروه حاصل شد. در مواردی که ژنوتیپ‌ها دارای شجره مشابه بودند، اغلب در یک گروه قرار گرفتند. به عنوان مثال لاین‌های A1C84-15 و A2C84-17 که از شجره یکسان (Monolit/Plaisant) برخوردار بودند، در گروه اول واقع شدند. همچنین دو ژنوتیپ EC82-10 و EC83-5 که یکی از والدین آن‌ها رقم Arar بود، در گروه دوم قرار گرفتند. افزون بر این، ژنوتیپ EM80-7 که در تشکیل آن لاین‌های Aths و Rihane نقش داشتند، با خود این لاین‌ها در گروه سوم جای گرفتند. این نتایج کارایی نشانگرهای ریزماهواره را در تشخیص تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی بیان می‌دارد.

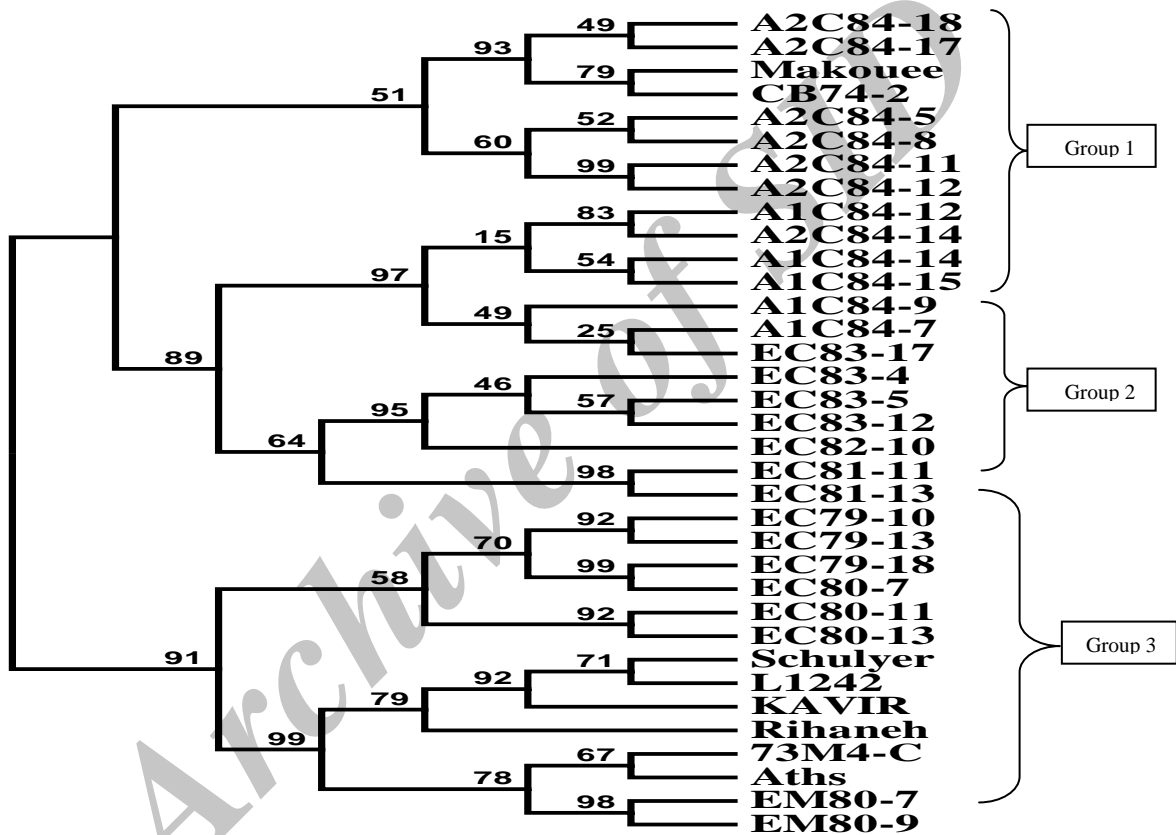
مطالعات بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است. این شاخص احتمال متفاوت بودن دو الل تصادفی در دو فرد را نشان می‌دهد. در این پژوهش میانگین تنوع ژنی برابر ۰/۷۸ بود که در محدوده ۰/۵۳ تا ۰/۹۳ نوسان داشت. در مطالعات هولتون و همکاران (Holton et al., 2001) نیز میانگین تنوع ژنتیکی در بین ۱۰۸ رقم جو برای ۴۳ نشانگر ریزماهواره ۰/۵۵ برآورد شد. فراوانی الل شایع (الل‌ی که بیشترین فراوانی را بین الل‌های یک جایگاه دارد) در این مطالعه از ۰/۱۳ (Hvm20) تا ۰/۵۳ (Hvm14) با میانگین ۰/۳۱ متفاوت بود. مقایسه نشانگرهای با توالی تکراری متفاوت نشان داد که نشانگرهای با توالی‌های تکراری دو نوکلئوتیدی دارای بیشترین تعداد الل، میزان اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی و کمترین میزان فراوانی الل شایع بودند. با مقایسه مقادیر PIC و تنوع ژنی نشانگرهای مختلف رابطه بالایی بین این دو پارامتر مشاهده می‌شود. تفاوت اندک این دو پارامتر نیز از وجود هتروزیگوتی میان ژنوتیپ‌ها منشأ می‌گیرد و در حالت هتروزیگوتی برابر صفر این دو پارامتر تقریباً مشابه خواهند بود. در حالت کلی هر چه تعداد الل بیشتر باشد تنوع ژنی و PIC بالایی نیز وجود خواهد داشت ولی فراوانی الل شایع آن نشانگر پایین خواهد بود (Mohammadi, 2006).

بررسی تنوع ژنی نشانگرها به تفکیک تعداد نوکلئوتید در واحدهای تکراری نشان داد که

جدول ۳- میانگین تنوع ژنتیکی و میزان اطلاعات چند شکلی نشانگرهای ریز ماهواره به تفکیک توالی‌های تکراری در ۳۵ ژنوتیپ جو

Table 3. Mean gene diversity (MGD) and polymorphic information content (PIC) of microsatellite markers for 2- and 3- nucleotide sequence repeats in 35 barley genotypes

پارامتر ژنتیکی Genetic parameter	تعداد نوکلئوتیدهای واحدهای تکراری Number of nucleotide repeats		
	2	3	4
MGD	0.78	0.83	0.77
PIC	0.74	0.81	0.74



شکل ۱- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله Kimura 2-parameters

Fig. 1. Grouping of barley genotypes using the Neighbor-Joining algorithm and distance coefficient of Kimura 2-parameters

نشانگرهای SSR به خوبی قادرند چند شکلی بالایی را بین ژنوتیپ‌های جو آشکار سازند و از این رو ابزارهای مفیدی برای انگشت نگاری ژنوتیپ‌ها و دسته‌بندی آن‌ها در گروه‌های

به طور کلی در بین ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه تنوع ژنتیکی مشاهده شد که از این تنوع می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده به عمل آورد. افزون بر این، می‌توان اظهار داشت که

یک از نشانگرهای ریزماهواره نداشت. در مجموع ۶۲ ال از ۳۸ نشانگر ریزماهواره ارتباط معنی‌داری با تغییرات ۱۲ صفت داشتند. درصد آب طوقه با ۱۰ ال مثبت بیشترین و درصد زنده‌مانی در دمای 10°C - با دو ال و میزان اتلاف آب بافت با یک ال کمترین تعداد ال مرتبط را داشتند. تعداد پنج ال با ضریب تبیین ۰/۸۹ با LT50 ارتباط داشتند که از میان آن‌ها سه ال (Hvm13b و Hvm6d، Hvm74f) از ضریب رگرسیون منفی برخوردار بودند. با توجه به ماهیت LT50 می‌توان گفت که این نشانگرها دارای ال‌های مطلوب در کنترل صفت LT50 هستند و وجود این ال‌ها موجب افزایش تحمل به یخ‌زدگی می‌شود. بنابراین در صورت تداوم نفش آن‌ها در آزمایش‌های دیگر، امکان استفاده از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاح برای تحمل یخ‌زدگی می‌تواند میسر شود. حمزا و همکاران (Hamza et al., 2004) ارتباط ۱۷ نشانگر ریزماهواره با تعدادی از صفات مورفولوژیکی در ۲۶ ژنوتیپ جو را بررسی کردند. همبستگی حاصل از داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیکی معنی‌دار ولی پایین بود. آن‌ها همچنین نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالایی در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه وجود دارد.

مختلف به شمار می‌روند. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi et al., 2010) نیز با بررسی جوهای ایران عنوان کردند که نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی تنوع در هر دو گونه *H. spontaneum* و *H. vulgare* مفید هستند.

بین ژنوتیپ‌های جو از نظر صفات درصد آب برگ، طوقه و گیاهچه، میزان اتلاف آب نسبی، درصد زنده‌مانی در دماهای ۶-، ۱۰- درجه سانتی‌گراد و LT50 اختلاف معنی‌داری وجود داشت (داده‌ها درج نشده‌اند). این نتایج حاکی از آن هستند که علاوه بر مشاهده تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه از نظر نشانگرهای ریزماهواره، در بین صفات مرتبط با تحمل یخ‌زدگی نیز تفاوت‌های ژنتیکی وجود داشت. نتایج تجزیه ارتباط ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهواره و ارزش فنوتیپی آن‌ها برای ۱۳ صفت وابسته به تحمل یخ‌زدگی با استفاده از تجزیه رگرسیون گام به گام برای شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات در جو در جدول ۴ درج شده است. تجزیه واریانس رگرسیون، رابطه معنی‌داری بین برخی از نشانگرهای ریزماهواره و ۱۲ صفت از ۱۳ صفت اندازه‌گیری شده نشان داد. وزن خشک برگ رابطه معنی‌داری با هیچ

جدول ۴- نام، جایگاه کروموزومی و ضریب رگرسیون نشانگرهای مثبت برای صفات مرتبط با تحمل یخزدگی در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

Table 4. Name, chromosome location and regression coefficient of informative markers for traits related to freezing tolerance in studied barley genotypes

صفت Trait	نشانگر مثبت Informative marker	شماره کروموزوم Chromosome number	ضریب رگرسیون Regression coefficient	ضریب رگرسیون استاندارد شده Standardized regression coefficient
LT50	Hvleu (g)	7	2.88 ± 0.39	0.743
	Hvm49 (f)	1	5.36 ± 0.95	0.538
	Hvm74 (t)	6	-3.41 ± 0.66	-0.478
	Hvm6 (d)	7	-3.46 ± 0.72	-0.485
	Hvm13 (b)	4	-1.57 ± 0.43	-0.353
درصد زنده‌مانی در -6°C % survival at -6°C	Hvm49 (f)	1	-47.52 ± 6.91	-0.523
	Hvm64 (d)	5	-20.60 ± 2.77	-0.596
	Hvm64 (e)	5	-12.97 ± 4.58	-0.239
	Hvm74 (a)	6	-33.89 ± 6.90	-0.374
	Hvm13 (e)	4	-24.41 ± 5.67	-0.374
درصد زنده مانى در -10°C % survival at -10°C	Hvm40 (b)	4	-11.69 ± 3.59	-0.267
	Hvm68 (e)	4	-50.15 ± 10.34	-0.592
وزن تر طوقه Crown fresh weight	Hvm14 (e)	6	-63.00 ± 17.32	-0.444
	Hvcma (d)	1	0.038 ± 0.008	0.35
	Hvm49 (b)	1	0.055 ± 0.008	0.51
	Hvm5 (g)	1	0.062 ± 0.01	0.41
	Hvm64 (a)	5	0.035 ± 0.007	0.39
	Hvm33 (a)	3	0.017 ± 0.004	0.27
وزن خشک طوقه Crown dry weight	Hvcma (g)	1	-0.017 ± 0.004	-0.28
	Hvm27 (e)	3	0.014 ± 0.005	0.21
درصد آب گیاهچه Seedling moisture	Hvm5 (c)	1	1.68 ± 4.823	0.444
	Hvm70 (d)	3	-2.62 ± 0.906	-0.407
	Hvdhn9 (e)	7	0.020 ± 0.408	0.63
	Hvm60 (a)	3	-0.039 ± 0.008	-0.50
میزان اتلاف آب نسبی Relative water loss	Hvm26 (c)	2	0.012 ± 0.003	0.39
	Hvcsg (e)	2	0.013 ± 0.004	0.33
درصد آب طوقه Crown moisture	Hvdhn9 (e)	7	0.005 ± 0.002	0.45
	Hvm9 (e)	1	-0.44 ± 0.068	0.36
	Hvm5 (f)	1	0.65 ± 0.071	-0.45
	Hvcma (d)	1	0.88 ± 0.097	0.42
	Hvm5 (c)	1	-0.83 ± 0.134	-0.28
	Hvm30 (a)	7	-0.44 ± 0.068	-0.35
	Hvm67 (a)	4	-0.79 ± 0.132	-0.27
	Hvm26 (d)	2	-0.43 ± 0.084	-0.24
	Hvm5 (h)	1	0.43 ± 0.077	0.27
	Hvm31 (d)	6	0.35 ± 0.076	0.22
وزن تر برگ Leaf fresh weight	Hvm68 (d)	4	0.26 ± 0.083	0.15
	Hvcma (d)	1	0.29 ± 0.04	0.729
	Hvm30 (a)	7	-0.17 ± 0.02	-0.716
	Hvm64 (d)	5	-0.08 ± 0.015	-0.408
	Hvm5 (a)	1	-0.14 ± 0.03	-0.337
	Hvm33 (c)	3	-0.085 ± 0.018	-0.317
	Hvm65 (a)	6	-0.176 ± 0.05	-0.315
درصد آب برگ Leaf moisture	Hvm5 (j)	1	-0.05 ± 0.02	-0.196
	Hvm9 (e)	3	-0.57 ± 0.091	-0.37
	Hvm5 (c)	1	-1.27 ± 0.18	-0.35
	Hvm5 (f)	1	0.70 ± 0.09	0.39
	Hvcma (d)	1	1.14 ± 0.136	0.43
	Hvm30 (a)	7	-0.65 ± 0.09	-0.43
	Hvm67 (a)	4	-1.09 ± 0.181	-0.29
	Hvm26 (d)	2	-0.58 ± 0.116	-0.26
وزن تر گیاهچه Seedling fresh weight	Hvm5 (h)	1	0.37 ± 0.101	-0.19
	Hvbkasi (c)	2	-0.28 ± 0.088	-0.17
	Hvcma (d)	1	0.26 ± 0.052	0.48
	Hvm30 (a)	7	-0.15 ± 0.031	-0.46
	Hvm64 (d)	5	-0.12 ± 0.03	-0.42
وزن خشک گیاهچه Seedling dry weight	Hvm63 (f)	5	0.23 ± 0.073	0.31
	Hvm49 (b)	1	0.16 ± 0.052	0.30
	Hvm5 (c)	1	4.32 ± 0.992	0.457
	Hvm5 (g)	1	5.35 ± 1.028	0.566
	Hvm67 (b)	4	3.04 ± 0.716	0.448
	Hvm4 (e)	1	-1.30 ± 0.408	-0.353

References

- Andaya, V. C., Tabanao, D., Maramara, G., and Sebastian, L. S. 1996.** Correlation of molecular diversity with heterosis in nine low land rice. *Philippine Journal of Crop Science* 21 (Supplement no. 1): 4 (Abstract).
- Anonymous, 2005.** Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Barriere, Y., Gibelin, C., Argillier, O., and Mechin, V. 2001.** Genetic analysis in inbred lines of early dent forage maize. I-QTL mapping for yield, earliness, starch and crude protein contents from per se value and top cross experiments. *Maydica* 46: 253-266.
- Bernardo, R. 2001.** Breeding potential of intra- and inter- heterotic group crosses in maize. *Crop Science* 41: 68-71.
- Beyen, Y., Botha, A. M., and Myburg, A. A., 2005.** A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highlands maize. *African Journal of Biotechnology* 4: 586-595.
- Brule-Bable, A. L., and Fowler, D. B. 1989.** Use of controlled environments of winter cereals cold hardiness evaluation: Controlled freeze tests and tissue water content. *Canadian Journal of Plant Science* 69: 355-366.
- Condon, F., Smith, K. P., and Schieffelin, E. 2004.** Allelic diversity and genetic gain in Midwestern six- rowed barely germplasm. Abstracts of the 9th International Barley Genetic Symposium, Brno, Czech Republic. pp. 35-42.
- Davila, J. A., Loarce, Y., and Ferrer, E. 1999.** Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 265-273.
- Ebrahimi, A., Naghavi, M. R., Sabokdast, M., and Mardi, M. 2010.** Assessment of genetic diversity in two accessions of barely species (*H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L.) using SSR markers. *Iranian Journal of Crop Sciences* 12: 333-345 (in Persian).
- Fernández, M. E., Figueiras, A. M., and Benito, C. 2002.** The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 845-851.
- Fowler, D. B., Gusta, L. V., and Tyler, N. J. 1981.** Selection for winter hardiness in wheat. III. Screening methods. *Crop Science* 21: 896-901.
- Gong, X., Westcott, S., Li, C., Yan, G., Lance, R., and Sun, D. 2009.** Comparative analysis of genetic diversity between Qinghai-Tibetan wild and Chinese landrace barley. *Genome* 52: 849-861.

- Hamza, S., Hamida, W. B., Rebai, A., and Harrabi, M. 2004.** SSR-Based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. *Euphytica* 135: 107-118.
- Holton, T. A., Christopher, J. T., McClure, L., Harker, N., and Henry, R. J. 2002.** Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding* 9: 63-71.
- Holton, T. A., Cross, M., Karakousis, A., and Henry, R. J. 2001.** Genetic screening of Australian barely varieties using microsatellite markers. 49th Royal Australian Chemical Institute Cereal Chemistry Division Conference, Melbourne, Victoria. pp. 16-20.
- Langridge, P. E., Lagudah, S., Holton, T. A., Appels, R., Sharp, P. J., and Chalmers, K. J. 2001.** Trends in genetic and genome analyses in wheat: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1043-1077.
- Liu, J. 2004.** Power Marker V3.25 Manual. <http://www.power marker.net>.
- Manifesto, M. M., Schlatter, A. R., Hopp, H. E., Suarez, E. Y., and Dubcivsky, J. 2001.** Quantitative evaluation of diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Science* 41: 682-690.
- Matus, I. A., and Hayes, P. M. 2002.** Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* 45: 1095-1106.
- Meszaros, K., Karsai, I., Kuti, C., Banyai, J., Lang, L., and Bedo, Z. 2007.** Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). *South African Journal of Botany* 73: 43-48.
- Mohammadi, S. A. 2006.** Analysis of molecular data from the view point of genetic diversity. Proceedings of Keynote Papers, 9th Iranian Crop Science Congress. 27-29 Aug. Aboreyhan Pardis, University of Tehran, Tehran, Iran. pp. 96-119 (in Persian).
- Mohammadi, S. A., and Prasanna, B. M. 2003.** Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 123-1248.
- Orabi, J., Backes, G., Tekle, B., Wolday, A., Yahyaoui, A., and Jahoor, A. 2004.** *In situ* conservation of genetic diversity at small- scale farmer in Eritrea. International Barley Genetic Symposium, Brno, Czech Republic. pp. 20-26.
- Ovesna, J., Polakova, K., and Leisova, L. 2002.** DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 38: 29-40.
- Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K., Jorgensen, R. A., and Allard, R. W. 1984.** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 8014-8018.
- Snowdon, R. J., and Fried, W. 2004.** Molecular markers in Brassica oilseed breeding, current status and future possibilities. *Plant Breeding* 123: 1- 8.

- Tanyolac B. 2003.** Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) populations from west Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 611-614.
- Varshney, R. K., Grosse, I., Hahnel, U., Prasad, M., Stein, N., Langridge, P., Altschmied, L., and Graner, A. 2005.** Genetic mapping and BAC selection using EST-SSR markers provides an estimate on the gene space in the barley genome. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 239- 250.
- Wei, Y. M., Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wu, W., Zhang, Z. Q., Liu, D. C., and Zhang, Y. L. 2005.** Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 3-9.
- Zhang, X. Y., Li, C. W., Wang, L. F., Wang, H. M., You, G. X., and Dong, Y. S. 2002.** An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 67-73.
- Zhang, J.V., Yang, X.H., Yu Ya, X., He, Z., Wei, Z., Lide, Y., and Zhao, H.S. 2009.** Study on genetic relationship of Yunnan Naked barley by SSR markers. *Journal of Triticeae Crops* 1: (In Chinese with English abstract).