ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۱۹۱- ۱۷۹

تجزیه ارتباطی زمان گلدهی و تنوع تک نوکلئوتیدی ژن‌های *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HvGI* در جو (*H.Vulgare*)

سالار شعف*[۱]، محمدرضا بی همتا[۲]، علیرضا طالعی[۳]، ولی اله محمدی[۴]، بنیامین کیلیان[۵]

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادان و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران

۵- موسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی IPK آلمان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:salarshaaf@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای SNP موثر در گلدهی جو در ژن‌های کاندید *Ppd-H1*، *CO1* و*GIGANTEA*، از تجزیه ارتباطی در مجموعه‌ای از ۵۲ رقم جو ایرانی و خارجی استفاده گردید. بر اساس ۴۲ نشانگر EST-SSR ساختار ژنتیکی جمعیت به دو زیرجمعیت فرعی تقسیم گردید که با مبدا ارقام در ارتباط بودند. تنوع نوکلئوتیدی بالایی در ناحیه اگزون ژن *Ppd-H1* مشاهده شد ولی ژن‌های *GIGANTEA* و *CO1* تنوع محدودتری نشان دادند. وسعت نامتعادلی پیوستگی (Linkage disequilibrium) در هر سه ژن متغیر و پایین بود که بیانگر سودمندی روش تجزیه ارتباطی ژن کاندیدا برای دسترسی به نقشه واضحی از ژن‌های کنترل زمان گلدهی در جو می-باشد. ارتباط معنی‌داری بین ژن‌های *GIGANTEA* و *Ppd-H1* با زمان گلدهی مشاهده شد به طوری که باعث تفاوت یک هفته‌ای در زمان گلدهی می‌شد، در حالی که ارتباط معنی‌داری بین زمان گلدهی و تنوع در ناحیه اینترون ژن *CO1* مشاهده نگردید. اثر متقابل بین مکان‌های ژنی نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. نتایج این تحقیق نشان داد که ژرم پلاسم مورد مطالعه و به ویژه ارقام ایرانی دارای تنوع زیادی از نظر ژن‌های کاندید مورد بررسی می‌باشند که می‌تواند در برنامه‌های به نژادی برای زمان گلدهی در جو مورد استفاده قرار گیرد. برخی از آلل‌های SNP شناسایی شده قادرند تا یک هفته زمان گلدهی را در جو تسریع نمایند که می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود. همچنین آلل جدیدی در ژن GIGANTEA شناسایی گردید که در گلدهی دیر هنگام نقش عمده‌ای دارد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه ارتباطی،
جو،
زمان گلدهی،
***CO1*،**
***Ppd-H1*،**
GIGANTEA.

مقدمه

گسترش کشاورزی از منطقه اهلی شدن گیاه نیازمند پراکندگی گیاهان زراعی به خارج از محدوده بومی اجداد خود و سازگاری آن‌ها با محیط‌های جدید بوده است. زمان گلدهی یکی از صفات کلیدی در سازگاری گیاهان است که از این طریق گیاه می‌تواند در زمان مناسب گرده افشانی و تولید بذر نماید (Cockram et al. 2007). گلدهی در زمان مناسب به خاطر تکامل مکانیسم‌های پیچیده ای در گیاهان است که آن‌ها را قادر می‌سازد تا در برابر تغییرات محیطی مهم از قبیل طول روز (فتوپریود) و دمای پایین (ورنالیزاسیون) واکنش نشان دهند.

Archive of SID

ژن‌های مسیر فتوپریود در بین آرابیدوپسیس که گیاهی روزبلند است و برنج که روزکوتاه است به خوبی حفاظت شده‌اند (Greenup et al. 2009). در آرابیدوپسیس ژن *CO* باعث ترجمه ژن *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) شده و گلدهی را تحت شرایط روزهای بلند سرعت می‌بخشد. ژن *GI* (*GIGANTEA*) احتمالا در بالادست ژن *CO* در مسیر فتوپریود به طور مثبت عمل می‌کند (Suarez-Lopez et al. 2001). جو نیز مانند آرابیدوپسیس یک گیاه روز.بلند است ولی از لحاظ فیلوژنتیکی به برنج نزدیک‌تر است. در جو نیز همولوگ‌های مختلفی شناسایی شده‌اند که در مسیر فتوپریود نقش کلیدی دارند از جمله ژن *HvCO1* (Griffith et al. 2003) واقع در کروموزوم ۷، ژن *GI* (Dunford et al. 2005) واقع در کروموزوم ۳ و ژن مهم *Ppd-H1* واقع در کروموزوم ۲ که اخیراً همسانه شده است (Turner et al. 2005). در جو آلل‌های غالب (حساس به فتوپریود) *Ppd-H1* باعث گلدهی زود هنگام تحت روزهای بلند می‌شوند ولی تحت روز-های کوتاه تاثیری در گلدهی ندارند. گیاهان دارای آلل مغلوب (غیر حساس به فتوپریود) *ppd-H1* دارای گلدهی دیر هنگام هستند. *Ppd-H1* یک شبه تنظیم کننده واکنش است که بسیار مشابه ژن PRR7 در آرابیدوپسیس عمل می‌کند (Turner et al. 2005). از آنجایی که این ژن‌ها در تعیین زمان گلدهی در جو نقش عمده‌ای دارند مطالعه آن‌ها به عنوان ژن‌های کاندید در مطالعات تجزیه ارتباطی در ژرم پلاسم‌های طبیعی جالب توجه خواهد بود و از این طریق می‌توان تنوع صفات پیچیده را به سطح ژن و یا نوکلئوتید رساند. روش ژنتیک ارتباطی بر اساس توالی-یابی مجدد ژن کاندید روش قدرتمندی در جهت دسترسی به این هدف به مجرد اطلاعات گسترده ژنومیک و تجزیه گسترده فنوتیپی است. طی سالیان اخیر شناسایی و بهره‌برداری سیستماتیک از تنوع طبیعی روش مهمی در پژوهش ژنومی گیاهان و به نژادی گیاهی به شمار می‌رود (Buckler et al. 2002). تجزیه ارتباطی که به تجزیه LD نیز مرسوم است مزیت‌های عمده‌ای نسبت به مکان‌یابی معمول دارد. اولاً به دلیل اینکه در این‌گونه مطالعات از جوامع طبیعی استفاده می‌شود تنوع ژنتیکی وسیع‌تری نسبت به جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی وجود دارد، دوم اینکه بسته به جمعیت، نقشه‌یابی LD دارای دقت بسیار بالاتری است چرا که در این نوع نقشه‌یابی تمام رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است در نظر گرفته می-شود در صورتی‌که در روش معمول نقشه‌یابی تنها در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشنی میوز اتفاق می‌افتد. Jones و همکاران (Jones et al. 2008) ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در توالی *Ppd-H1* و زمان گلدهی را در کلکسیونی از جوهای بومی اروپا مطالعه نمودند و یک تک نوکلئوتید به نام SNP۴۸ را به عنوان مهم‌ترین SNP گزارش نمودند که درصد بالایی از تنوع در زمان گلدهی را توجیه می‌کرد و با تنوع در عرض جغرافیایی نمونه ها مرتبط بود. همچنین آن‌ها مشاهده نمودند که مکان SNP گزارش شده توسط Turner et al. 2005 عامل اصلی تنوع در گلدهی نبوده است. در مطالعه دیگری Stracke et al. (2009) تنوع نوکلئوتیدی سه ژن کاندید *Ppd-H1*، *HvFt1* و *HvCO1* و ارتباط آن‌ها را با زمان گلدهی تحت روزهای بلند در کلکسیونی از جو زراعی بهاره بررسی کردند و مشاهده نمودند که ناحیه کد کننده ژن *Ppd-H1* در مقایسه با دو ژن دیگر بسیار متنوع بوده و ارتباط بسیار قوی با زمان گلدهی دارد. در مطالعات مذکور عمدتاً از ژرم پلاسم‌های با منشاء اروپا استفاده شده در صورتی که کشور ما از مراکز مهم تنوع جو در دنیا محسوب می‌شود، از طرفی ژن *HVGI* یکی از ژن‌های مهم در مسیر فتوپریودی در جو محسوب شده و مطالعه ارتباط آن با زمان گلدهی در تجزیه ارتباطی دارای اهمیت است. هدف از این مطالعه بررسی تنوع نوکلئوتیدی و ارتباط بین تنوع در ژن‌های کاندید *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HVGI* و تنوع در زمان گلدهی در مجموعه‌ای از ارقام و ژنوتیپ‌های جو ایرانی و خارجی است. هدف دیگر این تحقیق امکان شناسایی نشانگرهای SNP یا هاپلوتیپ‌هایی است که در گلدهی جو نقش مهم و تعیین کننده دارند.

مواد و روش‌ها

۵۲ رقم جو از موسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیه و در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. که از این تعداد ۲۷ رقم ایرانی و بقیه خارجی بودند. ارقام ایرانی خود شامل۲۳ رقم بومی و ۴ رقم اصلاح شده بودند. ارقام خارجی نیز فقط شامل ارقام تجاری از

Archive of SID
www.SID.ir

کشورهای مختلف آسیا، اروپا، آمریکا و آفریقا بودند. از نظر تیپ رشدی تعداد ۱۱ رقم دارای تیپ بینابینی وبقیه ارقام تیپ بهاره داشتند. از نظر تیپ سنبله تعداد ۲۰ رقم دو ردیفه و بقیه ۶ ردیفه بودند. تاریخ گلدهی ارقام در شرایط آب و هوایی کرج ثبت شده و داده‌های فنوتیپی ارقام بین یک تا سه سال در دسترس بودند.

تجزیه داده‌های فنوتیپی

با در نظر گرفتن رقم به عنوان تیمار و سال به عنوان تکرار تجزیه آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. از آنجایی که تکرار به صورت نامتعادل بود و ارقام ژنتیکی مورد مطالعه به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند بنابراین از روش آماری REML (Restricted Maximum Likelihood) برای برآورد اجزای واریانس با استفاده از دستور PROC MIXED و در محیط نرم افزار آماری SAS استفاده شد. وراثت پذیری عمومی زمان گلدهی از طریق تقسیم جزء واریانس ژنتیکی بر واریانس فنوتیپی محاسبه گردید. سپس مقادیر ارزش‌های ژنوتیپی یا BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) برای هر یک از ارقام محاسبه و در تجزیه‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین ژنوتیپ جمعیت

DNA ژنومی از برگ‌های جوان ارقام مورد مطالعه به روش Doyle و همکاران استخراج شد (Doyle et al. 1990). تعداد ۴۲ نشانگر همبارز EST-SSR غیر پیوسته با توزیع یکنواخت روی ۷ کروموزوم جو و ۵ تا ۷ SSR در هر کروموزوم که در (جدول۱) مندرج است جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ارقام مورد استفاده قرار گرفتند(Thiel et al. 2003). معیار انتخاب نشانگرها محل آن‌ها روی نقشه با حداکثر پوشش ژنومی و میزان تنوع نشانگرها (یعنی نشانگرهای با چند شکلی بالا یا دارای آلل‌های فراوان) بودند. جفت آغازگرهای مستقیم و معکوس ۴۲ نشانگر SSR به صورت فلورسنت با سه رنگ آبی، سبز و قرمز برچسب گذاری شده و در ۱۴ ترکیب آغازگری به صورت تریپلکس ادغام گردیدند. روش PCR در واکنش ۵ میکرولیتری شامل ng ۱۰ DNA ژنومی، µM ۰/۰۱ از هر آغازگر و بافر ۱ برابر مالتی پلکس (Qiagen, Chatsworth, CA) انجام شد. نیمرخ‌های حرارتی PCR به صورت: $96^{o}C$ به مدت ۱۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه، ۴۰ چرخه به صورت $95^{o}C$ در یک دقیقه، $60^{o}C$ در۳۰ ثانیه، $72^{o}C$ در ۳۰ ثانیه و $72^{o}C$ به مدت ۱۰ دقیقه بود. جداسازی محصولات تکثیر شده PCR به روش الکتروفورز موئین با استفاده از دستگاه (Amersham) Mega BACE1000 صورت گرفت. این دستگاه مبتنی بر سیستم آنالیز DNA بر اساس فلورسنس بوده که از روش الکتروفورز موئین در شناسایی و تفکیک قطعات تکثیر شده استفاده می‌کند. جهت تعیین کیفیت، اندازه و نام‌گذاری قطعات تفکیک شده از روش استاندارد MegaBACE ET400-R با استفاده از نرم افزار MegaBACE™ Genetic Profiler استفاده شد(www.gelifesciences.com).

تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت

به دلیل اینکه در تجزیه ارتباطی از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود وجود نیروهای تکاملی در آن‌ها اجتناب ناپذیر است و نادیده گرفتن آن‌ها باعث ایجاد پیوستگی‌های دروغین نشانگر-صفت می‌شود. لذا ساختار ژنتیکی جمعیت و تعیین زیر جمعیت-های احتمالی با روش گروه‌بندی Bayes و نرم افزار STRUCTURE انجام شد (Pritchard et al. 2000). این روش هر یک از ارقام را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیر جمعیت میزان LD حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. بین ۱ تا ۶ زیر جمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هرکدام از زیر جمعیت‌ها سه تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آللی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش یا burn-in و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC استفاده شد تا منحنی حداکثر درست نمایی حاصل شود. نرم افزار STRUCTURE برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت) یک ماتریس بنام (Q_{st}) را بدست می دهد. این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر رقم در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت (K)، با استفاده از دو روش برآورد شد یکی بر اساس معیار انتخابی در STRUCTURE یعنی Ln*P*(D) که احتمال پسین داده‌ها را با در نظر گرفتن K فرضی محاسبه می‌کند، و دیگری بر اساس روش Evanno et al. 2005 استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- اسامی، محل کروموزومی، فاصله ژنتیکی، اندازه و تعداد آلل و تنوع ۴۲ نشانگر EST-SSRs در جمعیت جو مورد مطالعه.

کروموزوم	لوکوس	فاصله ژنتیکی(cM)	اندازه(bps)	تعداد آلل	مقدار PIC
۱H	GBM۱۰۰۷	۳۰/۰	۱۸۰-۲۴۰	۱۹	۰/۸۶
	GBM۱۰۲۹	۵۹/۴	۲۲۲-۲۲۸	۳	۰/۵۳
	GBM۱۰۱۳	۶۴/۳	۱۶۱-۱۷۴	۶	۰/۵۰
	GBM۱۳۳۴	۶۹/۸	۱۰۸-۱۳۵	۶	۰/۴۲
	GBM۱۰۰۲	۹۷/۷	۲۶۱-۳۶۳	۱۷	۰/۶۱
	GBM۱۰۶۱	۱۲۷/۹	۳۰۶-۳۵۱	۸	۰/۷۹
	GBM۱۴۶۱	۱۳۱/۸	۱۹۴-۲۲۴	۱۱	۰/۸۳
۲H	GBM۱۰۳۵	۲۵/۲	۲۷۲-۲۸۰	۵	۰/۶۰
	GBM۱۴۵۹	۵۷/۹	۱۵۶-۱۷۲	۹	۰/۶۷
	GBM۱۲۱۸	۶۵/۱	۱۳۴-۱۵۰	۶	۰/۶۸
	GBM۱۲۰۸	۱۰۶/۳	۱۴۲-۱۶۳	۶	۰/۶۴
	GBM۱۰۴۷	۱۴۰/۹	۲۱۰-۲۱۶	۳	۰/۶۵
۳H	GBM۱۲۸۰	۹/۲	۲۷۹-۲۹۱	۴	۰/۵۷
	GBM۱۴۱۳	۶۵/۷	۱۵۰-۱۸۰	۷	۰/۶۸
	GBM۱۰۳۱	۶۸/۸	۲۸۴-۲۹۲	۵	۰/۷۷
	GBM۱۱۱۰	۷۶/۷	۲۰۷-۲۳۷	۷	۰/۶۴
	GBM۱۴۰۵	۱۰۹/۵	۲۷۶-۲۸۸	۴	۰/۶۷
۴H	GBM۱۵۰۱	۰/۰	۲۶۴-۲۹۲	۷	۰/۶۸
	GBM۱۲۲۱	۱۶/۱	۱۱۶-۱۲۸	۶	۰/۷۱
	GBM۱۳۲۳	۳۱/۵	۱۱۴-۱۶۲	۱۱	۰/۷۶
	GBM۱۰۲۰	۶۵/۲	۲۳۴-۲۴۶	۵	۰/۵۲
	GBM۱۰۰۳	۸۶/۸	۱۸۹-۲۱۰	۷	۰/۵۷
	GBM۱۰۱۵	۱۱۵	۲۰۲-۲۶۶	۱۰	۰/۸۱
	GBM۱۰۱۸	۱۲۹/۸	۲۵۵-۲۶۷	۵	۰/۷۰
۵H	GBM۱۱۷۶	۲۲/۳	۲۸۲-۲۹۰	۵	۰/۶۶
	GBM۱۰۲۶	۵۳/۱	۲۰۶-۲۱۸	۷	۰/۶۸
	GBM۱۴۸۳	۸۴/۹	۱۶۵-۱۷۷	۴	۰/۴۲
	GBM۱۳۶۳	۱۳۸/۹	۱۱۷-۱۳۵	۴	۰/۴۵
	GBM۱۰۶۴	۱۸۱/۷	۲۸۲-۲۹۸	۴	۰/۵۹
۶H	GBM۱۰۲۱	۳۵/۶	۲۵۴-۲۷۸	۹	۰/۷۸
	GBM۱۰۷۵	۴۵/۳	۲۹۲-۳۱۲	۷	۰/۷۱
	GBM۱۲۱۲	۵۴/۲	۹۹-۱۰۸	۴	۰/۶۴
	GBM۱۰۶۳	۶۵/۲	۱۹۶-۲۲۴	۷	۰/۶۷
	GBM۱۲۵۶	۶۹/۲	۳۴۴-۳۵۸	۸	۰/۷۹
	GBM۱۰۰۸	۹۳/۸	۱۷۱-۱۸۳	۵	۰/۷۱
	GBM۱۴۰۴	۱۲۹/۵	۲۶۲-۲۷۴	۴	۰/۲۱
۷H	GBM۱۰۶۰	۱۳/۲	۲۰۴-۲۱۳	۴	۰/۵۳
	GBM۱۳۲۶	۲۶/۷	۱۰۸-۱۶۸	۱۲	۰/۷۰
	GBM۱۴۶۴	۴۱/۵	۱۲۴-۲۲۶	۲۱	۰/۸۷
	GBM۱۰۳۳	۵۶/۴	۲۶۴-۲۹۰	۸	۰/۶۱
	GBM۱۵۱۶	۷۱/۳	۹۴-۱۰۶	۷	۰/۶۹
	GBM۱۴۱۹	۹۰/۶	۹۰-۱۵۰	۱۲	۰/۷۳
میانگین				۷/۳۵	۰/۵۴

این روش بر آماره ΔK استوار است که شیب تابع احتمالی LnP(D) را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. مقدار PIC هریک از نشانگرهای SSR با روش استاندارد Anderson و همکاران (Anderson et al. 1993) محاسبه شدند.

توالی‌یابی و تجزیه ژن‌های کاندید

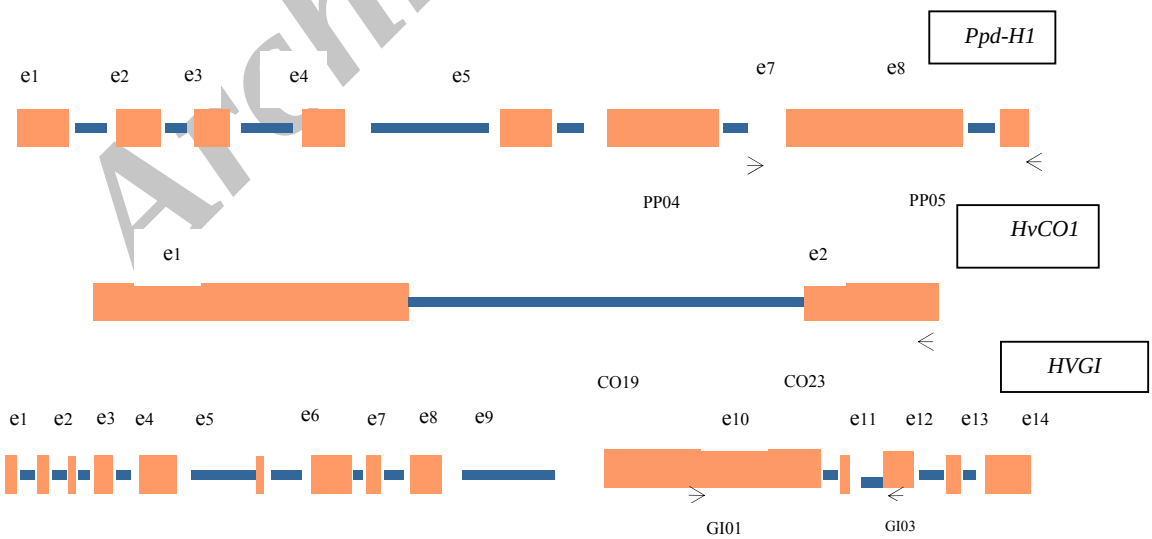
اطلاعات توالی ژنومی ژن‌های مورد مطالعه که در بانک ژنی (http://www.ncbi.nlm.nih .gov) موجود است برای طراحی آغازگرها و تکثیر قطعات استفاده شد. از آنجایی که در داخل هر کدام از ژن‌ها آغازگرهای مختلفی در اختیار قرار می‌گرفت انتخاب بهترین ترکیب آغازگر بر اساس تولید محصولات قوی PCR، کیفیت توالی‌یابی و میزان چند شکلی موجود در توالی

www.SID.ir

صورت می‌گرفت. بر این اساس بهترین ترکیب آغازگر برای تکثیر و توالی‌یابی ناحیه ژنی تحت پوشش انتخاب می‌گردید. جهت اطمینان از ناحیه ژنی تکثیر شده توالی‌ها با توالی مرجع موجود در بانک ژن ردیف یابی و استنباط می‌شد (جدول۲). آغازگرها طوری طراحی شدند که فواصل به طول ۸۸۰bp شامل اگزون ۷ تا اگزون ۸ از ژن *Ppd-H1*، ۸۴۱ bp شامل انتهای اینترون ۱ و اگزون ۲ و یک قسمت از UTR-۳′ از ژن *HvCO1* و ۸۵۰bp شامل قسمتی از اگزون ۱۰، اگزون ۱۱و قسمتی از اگزون۱۲ از ژن *HVGI* را پوشش دهند (شکل۱). محصولات PCR ابتدا خالص-سازی شده و سپس با کمک دستگاه Nanodrop تعیین غلظت شدند. مقدار ۱۰ نانوگرم از محصولات PCR برای توالی یابی استفاده شد. توالی یابی از هر دو انتهای قطعات PCR و با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس که در واکنش PCR استفاده شده بودند به کمک سیستم توالی‌یاب خودکار موئین (Applied Biosystems 3730/3730xl DNA Analyzer) با استفاده از پایان دهنده‌های BigDye انجام شد. این نکته را باید یادآوری کرد که به دلیل کیفیت پایین توالی، یکی از ارقام در تجزیه‌های بعدی برای ژن *HVGI* حذف گردید. ردیف یابی توالی‌های DNA و شناسایی نواحی SNP با استفاده از نرم‌افزار Bioedit v4.7.8 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit) صورت گرفت. تعداد ۲۰، ۱۳ و ۳ مکان چندشکل یا SNP به ترتیب در هر یک از ژن‌های *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HVGI* شناسایی شدند که مشخصات آن‌ها در (جدول ۴) آورده شده است. جهت تجزیه تنوع آللی، تمام ارقام به عنوان ژنوتیپ خالص و مقدار ناچیز غیر هموزیگوتی نیز به عنوان داده‌های گمشده در نظر گرفته شد. به منظور تجزیه آماری، نواحی indels به عنوان چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی در نظر گرفته شدند.

جدول ۲- جزئیات آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر PCR و توالی یابی ژن‌های کاندید زمان گلدهی درجو که بر اساس توالی‌های مرجع انتخاب شده‌اند. دمای اتصال آغازگرها به همراه اندازه قطعات تکثیر شده از هر ژن نیز مشخص شده‌اند.

ژن کاندید	نام آغازگر	توالی آغازگر(۳′-۵′)	توالی مرجع بانک ژن	دمای اتصال(°C)	اندازه محصول تکثیری (bp)
Ppd-H1	PP04	GTGCAAAGCATAATATCAGTGTCC	FJ515518	۶۱	۸۸۰
	PP05	GGCCAAAGACACAAGAATCAG			
HvCO1	CO19	TCGCTCCATACACAAAAATCTC	AF490467	۵۹	۸۴۱
	CO23	AGCATCGATTCGCTTGAAATAC			
HVGI	GI01	TGTCCTCCATCGTGAACAAAG	AY740524	۶۰	۸۵۰
	GI03	TCTCCACATCTTTTGACCTTCC			



شکل۱- ساختار ژنی *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HVGI* در جو. آغازگرها با علامت پیکان و نواحی اگزون با حرف e نشان داده شده‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

برای اندازه‌گیری تنوع نوکلئوتیدی (pi)، تنوع هاپلوتیپی (hd)، برآورد نوترکیبی Hudson و Kaplan (Rm) و آزمون Tajima(D) برای انحراف از تعادل موتاسیون- رانش (اثر گزینش) در سطح توالی ژن‌های کاندید از نرم افزارDnaSP v3 استفاده شد (Rozas et al. 1999;Hudson et al. 1985; Tajima. 1989). برای برآورد LD از آماره r^2 (مربع ضریب همبستگی) و بر اساس چند شکلی-های SNP که حداقل در دو رقم وجود داشتند استفاده شد (Hill et al. 1968). معنی‌داری هر LD با استفاده ازآزمون دوطرفه دقیق فیشر تعیین و مقادیر r^2 در مقابل فواصل بین نوکلئوتیدهای چندشکل به شکل نمودار با استفاده از نرم افزار TASSEL v2.01 انجام شد.

تجزیه ارتباطی صفت- هاپلوتیپ

تنها هاپلوتیپ‌هایی که حداقل در دو رقم وجود داشتند در تجزیه ارتباطی بکار رفتند. روشی که برای بررسی ارتباط هاپلوتیپ‌ها و زمان گلدهی استفاده شد روش Q+K بود که هر دو اطلاعات حاصل از K (ضریب خویشاوندی افراد) و Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند و معلوم شده که این روش در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه‌های ارتباطی روش برتری است (Yu et al. 2006). این روش در نرم افزار TASSEL v2.01 به صورت مدل خطی مختلط یا MLM قابل اجراست. مدل آماری به صورت زیر است (Yu et al. 2006): $y = X\beta + Zu + e$

در این مدل y بردار مقادیر BLUP، β بردار نامعلوم اثرات ثابت شامل نشانگر ژنتیکی (هاپلوتیپ) و ماتریس ساختار جمعیت (Q_{st}) و متغیرهای کمکی دیگر است. لازم به یاد آوری است که در این مطالعه تجزیه ارتباطی در دو حالت انجام گرفت. در حالت اول بردار β شامل دو اثر مذکور بود ولی در حالت دوم متغیر تیپ سنبله نیز به دلیل اهمیت آن در منابع به عنوان عامل احتمالی ایجاد ساختار در جمعیت به عنوان متغیر کمکی به بردار β اضافه شد (Haseneyer et al. 2010). بردار u بردار نامعلوم اثرات تصادفی ژنتیکی افزایشی افراد، X و Z ماتریس‌های تلاقی و e بردار مقادیر باقیمانده تصادفی هستند. بردارهای e و u دارای توزیع نرمال با میانگین صفر و واریانس $Var\begin{pmatrix}u\\e\end{pmatrix}=\begin{pmatrix}G & 0\\0 & R\end{pmatrix}$ فرض می‌شوند که در آن $G= K\sigma_a^2$ و σ_a^2 واریانس ژنتیکی افزایشی و K ماتریس ضرایب خویشاوندی افراد است. اثرات باقیمانده دارای واریانس یکنواخت فرض می‌شوند یعنی $R=I\sigma_e^2$ که در آن σ_e^2 واریانس مقادیر باقیمانده است. مقادیر σ_e^2 و σ_a^2 با استفاده از الگوریتم EM برآورد شدند (Laird et al. 1982). ماتریس‌های K و Qst به ترتیب با نرم افزارهای SPAGEDI و STRUCTURE و بر اساس نشانگرهای EST-SSR برآورد شدند (Evanno et al. 2005; Hardy et al. 2002). به منظور شناسایی اثرات متقابل احتمالی اپیستاتیک بین ژنی، مدلی با طبقه‌بندی دوطرفه در هر مرحله برای دو مکان ژنی با استفاده از نرم افزار SAS ۹/۱ برازش یافت. در صورت معنی‌دار بودن چنین اثری از میانگین‌های تصحیح شده هر مکان ژنی به صورت جداگانه برای مقایسات استفاده می‌شد و در صورت غیر معنی‌دار بودن عبارت اثر متقابل از مدل حذف و از میانگین‌های اصلی برای مقایسات استفاده می‌شد.

نتایج و بحث

تجزیه فنوتیپی

زمان گلدهی دامنه‌ای از ۹۳ تا ۱۲۲ و میانگین ۱۰۲/۶ روز پس از کاشت را در جمعیت نشان داد (جدول ۳). ارقام دو ردیفه نسبت به شش ردیفه تقریبا گلدهی زودتر داشتند ولی تغییرات کمتری نشان دادند. همچنین ارقام ایرانی به صورت برجسته دارای گلدهی زودتر بوده و تغییرات کمتری در مقایسه با ارقام خارجی نشان دادند. واریانس ژنتیکی بسیار معنی داری در این ژرم پلاسم مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱) و وراثت‌پذیری صفت نیز در جمعیت بسیار بالا بود (۸۴/۲۲ درصد).

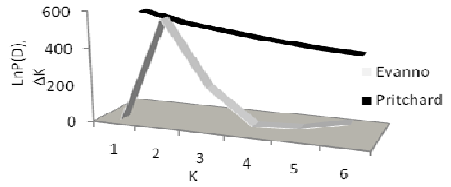
ساختار ژنتیکی جمعیت

تعیین ژنوتیپ جمعیت با ۴۲ نشانگر EST-SSR تعداد ۳۰۹ آلل و دامنه‌ای بین ۳ تا ۲۱ آلل در هر نشانگر را آشکار ساخت. مقادیر PIC نیز تغییراتی بین ۰/۲۱ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۵۴ در جمعیت نشان داد (جدول ۱). بیش از ۶۵ درصد از نشانگرهای SSR مقادیر PIC بین ۰/۴ و ۰/۷ را نشان دادند. روش بیز که در نرم افزار STRUCTURE برای تعیین تعداد کلاستر یا زیرجمعیت‌های

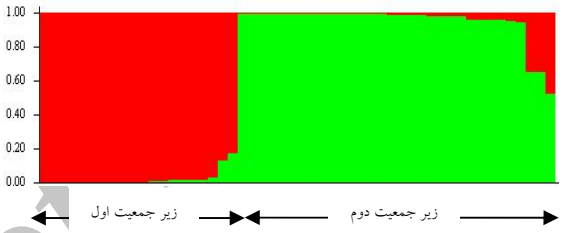
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- میانگین و دامنه تغییرات زمان گلدهی در ژرم پلاسم مورد مطالعه جو

ژرم پلاسم	تعداد	میانگین ± S_d	حداقل	حداکثر
کل	۵۲	۱۰۲/۶±۸/۸۶	۹۳	۱۲۲
دو ردیفه	۲۰	۱۰۱/۷±۹/۲۷	۹۳	۱۲۰
شش ردیفه	۳۲	۱۰۳±۸/۵۷	۹۳	۱۲۲
ایرانی	۲۷	۹۸ ±۶/۲۸	۹۴	۱۱۵
خارجی	۲۵	۱۰۷±۸/۵۵	۹۳	۱۲۲



شکل۲- مقایسه دو روش آماری استفاده شده برای تعیین تعداد زیرجمعیت (K).



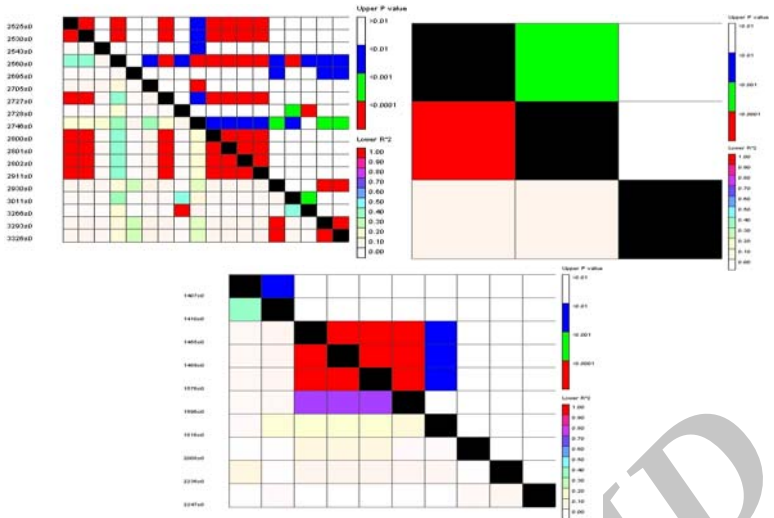
شکل۳- نمودار ساختار جمعیت جو که بر اساس ضرایب عضویت Q در نرم افزار STRUCTURE به دو زیرجمعیت فرعی تفکیک شده است.

احتمالی بکار می‌رود تنها تغییر بسیار جزئی در منحنی LnP(D) در مقدار K=۲ نشان داد و بنابراین تعیین زیرجمعیت‌های احتمالی در ژرم پلاسم امکان پذیر نبود. در مقابل، منحنی ΔK به صورت کاملاً واضح یک مقدار حداکثر را در K=۲ نشان می‌دهد که در آن شکستگی کاملاً روشن است (شکل۲). با در نظر گرفتن دو روش بکار رفته، ژرم پلاسم جو به احتمال بسیار قوی دارای دو زیرجمعیت بود و بنابراین مقادیر Qst برای K=۲ استخراج و برای مطالعات بعدی تجزیه ارتباطی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل۳). در K=۲ از بین ۲۷ رقم ایرانی تعداد ۱۸ رقم (۶۷ درصد) در زیرجمعیت اول و ۹ رقم (۳۳ درصد) در زیرجمعیت دوم گروه-بندی شدند. همچنین از بین ۲۵ رقم خارجی تعداد ۳ رقم (۱۲ درصد) در زیرجمعیت اول و ۲۲ رقم (۸۸ درصد) در زیرجمعیت دوم قرار گرفتند. از نظر تیپ سنبله دو ردیفه تعداد ۹ رقم (۴۵ درصد) در زیرجمعیت اول و ۱۱ رقم (۵۵ درصد) در زیرجمعیت دوم جای گرفتند. از نظر تیپ ۶ ردیفه نیز تعداد ۱۲ رقم (۳۷/۵ درصد) در زیرجمعیت اول و ۲۰ رقم (۶۲/۵ درصد) در زیرجمعیت دوم گروه‌بندی شدند. ملاحظه می‌شود که گروه‌بندی ارقام بر اساس مبداء ایرانی و خارجی در مقایسه با تیپ سنبله بیشتر در ارتباط است. به عنوان مثال اکثر ارقام خارجی در زیرجمعیت دوم قرار دارند. بنابراین تقسیم ژرم پلاسم به دو زیرجمعیت تا درجه زیادی بر اساس مبداء ارقام منطقی به نظر می رسد.

تنوع مولکولی و عدم تعادل پیوستگی(LD)

در توالی ژنی *Ppd-H1* تعداد ۱۷ مکان چندشکل و ۳ مکان indel یعنی معادل یک مکان در هر ۴۴ جفت باز شناسایی شدند (جدول۵). چند شکلی‌ها در نواحی اگزون قرار داشتند. تعداد چندشکلی‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها و تنوع نوکلئوتیدی در ارقام خارجی بیشتر از ارقام ایرانی و در شش ردیفه نیز بیشتر از دو ردیفه بود (جدول۴). فراوانی اکثریت مکان‌های SNP به غیر از مکان‌های s-۳۰۹۴ و s-۳۳۲۷ ($p<۰/۰۵$) در وضعیت تعادل قرار داشتند. تعداد ۱۰ هاپلوتیپ شناسایی شد که ۸ تای آن‌ها دارای فراوانی بیش از ۵ درصد بودند (جدول۵). اکثر ارقام ایرانی در گروه‌های هاپلوتیپی ۷، ۸، ۹ و ۱۰ قرار گرفتند. در هاپلوتیپ‌های ۵ و ۷ و ۱۰ فقط ارقام ۶ ردیفه وجود داشتند. بلوک‌های LD پراکنده‌ای در توالی این ژن مشاهده شد (شکل۴). میزان LD در بین مکان های SNP تقریباً متغیر بود (میانگین ۰/۲۸). در ناحیه اگزون متوسط LD (r^2=۰/۳) دو برابر ناحیه اینترون ژن بود (r^2=۰/۱۵). با توجه به (شکل۴) یک بلوک ۱۱۵ جفت بازی LD (بین s-۲۸۰۰ تا s-۲۹۱۱) در ناحیه اگزون اول وجود داشت (r^2=۱، $p<۰/۰۰۱$). مکان‌های s-۲۵۲۵، s-۲۵۳۰ و s-۲۷۲۷ نیز با همدیگر و با این بلوک در LD کامل بودند و در این فاصله مکان های s-۲۵۴۳، s-۲۶۹۵، s-۲۷۰۵ و s-۲۷۲۸ به صورت جداگانه تفرق می‌یابند. در توالی ژن *HvCO1* تعداد ۱۳ مکان چند شکل یا معادل یک SNP در هر ۶۴ جفت باز شناسایی شدند (جدول۴). تعداد ۱۷ هاپلوتیپ شناسایی شد که ۸ تای آن‌ها فراوانی بیش از ۵ درصد در ژرم پلاسم نشان دادند و از بین آن‌ها هاپلوتیپ‌های ۳ و۱۱ فقط در ارقام ایرانی وجود داشتند. توزیع ۸ هاپلوتیپ در بین ارقام دو و شش ردیفه تقریبا یکنواخت بود و هاپلوتیپ خاصی مشاهده نشد (جدول۶). بر خلاف *Ppd-H1* اکثر چندشکلی‌ها در نواحی اینترون و ´۳UTR و تنها یک مکان SNP در ناحیه اگزون قرار داشتند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۴- نمایش وسعت LD بین مکان های SNP در ژن های *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HVGI*. تنها مکان هایی که حداقل در دو واریته موجودند در این تجزیه در نظر گرفته شدند.خانه های پائیین قطر نشان دهنده درجه پیوستگی جفت مکان های چندشکل با معیار r^2 و خانه های بالای قطر نشان دهنده مقادیر p بر اساس آزمون دقیق فیشر هستند.

جدول ۴- برآورد های تنوع نوکلئوتیدی(Pi) ، تنوع هاپلوتیپی(Hd) ، اثر گزینش(D) و مقدار نوترکیبی(Rm) در ژنهای کاندید

ژن	تعداد چندشکلی	pi*۱۰-۳(±Sd)	Rm	D	تعداد هاپلوتیپ	hd(±Sd)
Ppd-H1						
کل(N=۵۲)	۲۰	۵/۶ (/۰۰۰۰۳۳)	۰	۰/۶۷	۱۰	۰/۸۸۲ (۰/۰۱۸)
اینترون	۰	۰	۰	۰	۰	۰
اگزون	۲۰	۵/۶ (/۰۰۰۰۳۳)	۰	۰/۶۷	۱۰	۰/۸۸۲ (۰/۰۱۸)
ایرانی	۱۳	۴/۸۴ (۰/۰۰۰۴۹)	۰	۰/۷۶	۷	۰/۸۵۳ (۰/۰۳۶)
خارجی	۱۵	۵/۴۶ (۰/۰۰۰۴۴)	۰	۰/۷۵	۸	۰/۸۵۸ (۰/۰۳۸)
دو ردیفه	۱۰	۴/۵ (۰/۰۰۰۳۵)	۰	۱/۳۵	۶	۰/۸۵۸ (۰/۰۳۶)
شش ردیفه	۱۶	۵/۲۵ (۰/۰۰۰۴۳)	۰	۰/۴۹	۸	۰/۸۰۶ (۰/۰۴۴)
HvCO1						
کل(N=۵۲)	۱۳	۴/۰۶ (۰/۰۰۰۲۶)	۳	۰/۵۵	۱۷	۰/۹۱۷ (۰/۰۱۷)
اینترون	۷	۵/۵۸ (۰/۰۰۰۴۵)	۲	۱/۵۶	۸	۰/۷۶۵ (۰/۰۳۴)
اگزون	۱	۰/۳۲ (۰/۰۰۰۱۷)	۰	-۰/۶۶	۲	۰/۱۱۱ (۰/۰۵۷)
۳' UTR	۵	۱۵/۷۲(۰/۰۰۲۱)	۱	-۰/۵۹	۶	۰/۶۳ (۰/۰۵۳)
ایرانی	۱۱	۴/۱۵ (۰/۰۰۰۳۴)	۲	۰/۶۶	۱۲	۰/۹۲(۰/۰۲۶)
خارجی	۱۳	۳/۸۸ (۰/۰۰۰۴۵)	۲	-۰/۲۷	۱۲	۰/۹۰۲ (۰/۰۳۵)
دو ردیفه	۱۰	۳/۹۶ (۰/۰۰۰۵۳)	۲	۰/۶۳	۱۳	۰/۹۵۳ (۰/۰۲۸)
شش ردیفه	۱۳	۳/۹۹ (۰/۰۰۰۲۷)	۱	۰/۱۲	۱۲	۰/۹۰۳ (۰/۰۲۶)
HvGI						
کل(N=۵۱)	۳	۰/۷۳ (۰/۰۰۰۱۴)	۰	-۰/۱۴	۳	۰/۴۹۱(۰/۰۵۲)
اینترون	۱	۱/۹(۰/۰۰۰۱۷)	۰	۱/۴۶	۲	۰/۴۶۶(۰/۰۴)
اگزون	۲	۰/۲۶(۰/۰۰۰۱۷)	۰	-۱/۱۶	۲	۰/۰۷۷(۰/۰۵)
ایرانی	۳	۰/۹۷ (۰/۰۰۰۲۲)	۰	۰/۱	۳	۰/۵۹۳ (۰/۰۵)
خارجی	۱	۰/۳۸ (۰/۰۰۰۱۱)	۰	۰/۳۸	۲	۰/۳۳۳ (۰/۰۹۷)
دو ردیفه	۱	۰/۶ (۰/۰۰۰۰۷)	۰	۱/۱۶	۲	۰/۵۰۵ (۰/۰۵۶)
شش ردیفه	۳	۰/۶۷ (۰/۰۰۰۲۵)	۰	-۰/۶۶	۳	۰/۳۴ (۰/۱)

جدول۵- مکان های چند شکل واقع در قطعه توالی یابی شده ژن *PpdH1* در ژرم پلاسم جو مورد مطالعه

| هاپلوتیپ | فراوانی | تعداد نمونه: ایرانی | خارجی | دو ردیفه | شش ردیفه | جایگاه ژنی مکان های چند شکل: ۵۰۲۶ | ۵۰۲۸ | ۵۰۴۵ | ۵۰۴۸ | ۵۰۶۵ | ۵۰۶۶ | ۵۰۷۸ | ۵۰۸۲ | ۵۰۸۳ | ۵۰۸۸ | ۵۰۹۲ | ۵۰۹۳ | ۵۰۹۴ | ۵۰۹۵ | ۵۰۹۶ | ۵۰۹۷ | ۵۰۹۸ | ۵۱۰۱ | ۵۱۰۲ | ۵۱۰۳ | ۵۱۰۴ | ۵۱۰۵ | ۵۱۰۶ | ۵۱۰۷ | ۵۱۰۸ | ۵۱۰۹ | ۵۱۱۰ | ۵۱۱۱ | ۵۱۱۲ | ۵۱۱۳ | ۵۱۱۴ | ۵۱۱۵ | ۵۱۱۶ | ۵۱۱۷ | ۵۱۱۸ | ۵۱۱۹ | ۵۱۲۰ | ۵۱۲۱ | ۵۱۲۲ | ۵۱۲۳ | ۵۱۲۴ | ۵۱۲۵ | ۵۱۲۶ | ۵۱۲۷ | ۵۱۲۸ | ۵۱۲۹ | ۵۱۳۰ | ۵۱۳۱ | ۵۱۳۲ | ۵۱۳۳ | ۵۱۳۴ | ۵۱۳۵ | ۵۱۳۶ | ۵۱۳۷ | ۵۱۳۸ | ۵۱۳۹ | ۵۱۴۰ | ۵۱۴۱ | ۵۱۴۲ | ۵۱۴۳ | ۵۱۴۴ | ۵۱۴۵ | ۵۱۴۶ | ۵۱۴۷ | ۵۱۴۸ | ۵۱۴۹ | ۵۱۵۰ | ۵۱۵۱ | ۵۱۵۲ | ۵۱۵۳ | ۵۱۵۴ | ۵۱۵۵ | ۵۱۵۶ | ۵۱۵۷ | ۵۱۵۸ | ۵۱۵۹ | ۵۱۶۰ | ۵۱۶۱ | ۵۱۶۲ | ۵۱۶۳ | ۵۱۶۴ | ۵۱۶۵ | ۵۱۶۶ | ۵۱۶۷ | ۵۱۶۸ | ۵۱۶۹ | ۵۱۷۰ | ۵۱۷۱ | ۵۱۷۲ | ۵۱۷۳ | ۵۱۷۴ | ۵۱۷۵ | ۵۱۷۶ | ۵۱۷۷ | ۵۱۷۸ | ۵۱۷۹ | ۵۱۸۰ | ۵۱۸۱ | ۵۱۸۲ | ۵۱۸۳ | ۵۱۸۴ | ۵۱۸۵ | ۵۱۸۶ | ۵۱۸۷ | ۵۱۸۸ | ۵۱۸۹ | ۵۱۹۰ | ۵۱۹۱ | ۵۱۹۲ | ۵۱۹۳ | ۵۱۹۴ | ۵۱۹۵ | ۵۱۹۶ | ۵۱۹۷ | ۵۱۹۸ | ۵۱۹۹ | ۵۲۰۰ | ۵۲۰۱ | ۵۲۰۲ | ۵۲۰۳ | ۵۲۰۴ | ۵۲۰۵ | ۵۲۰۶ | ۵۲۰۷ | ۵۲۰۸ | ۵۲۰۹ | ۵۲۱۰ | ۵۲۱۱ | ۵۲۱۲ | ۵۲۱۳ | ۵۲۱۴ | ۵۲۱۵ | ۵۲۱۶ | ۵۲۱۷ | ۵۲۱۸ | ۵۲۱۹ | ۵۲۲۰ | ۵۲۲۱ | ۵۲۲۲ | ۵۲۲۳ | ۵۲۲۴ | ۵۲۲۵ | ۵۲۲۶ | ۵۲۲۷ | ۵۲۲۸ | ۵۲۲۹ | ۵۲۳۰ | ۵۲۳۱ | ۵۲۳۲ | ۵۲۳۳ | ۵۲۳۴ | ۵۲۳۵ | ۵۲۳۶ | ۵۲۳۷ | ۵۲۳۸ | ۵۲۳۹ | ۵۲۴۰ | ۵۲۴۱ | ۵۲۴۲ | ۵۲۴۳ | ۵۲۴۴ | ۵۲۴۵ | ۵۲۴۶ | ۵۲۴۷ | ۵۲۴۸ | ۵۲۴۹ | ۵۲۵۰ | ۵۲۵۱ | ۵۲۵۲ | ۵۲۵۳ | ۵۲۵۴ | ۵۲۵۵ | ۵۲۵۶ | ۵۲۵۷ | ۵۲۵۸ | ۵۲۵۹ | ۵۲۶۰ | ۵۲۶۱ | ۵۲۶۲ | ۵۲۶۳ | ۵۲۶۴ | ۵۲۶۵ | ۵۲۶۶ | ۵۲۶۷ | ۵۲۶۸ | ۵۲۶۹ | ۵۲۷۰ | ۵۲۷۱ | ۵۲۷۲ | ۵۲۷۳ | ۵۲۷۴ | ۵۲۷۵ | ۵۲۷۶ | ۵۲۷۷ | ۵۲۷۸ | ۵۲۷۹ | ۵۲۸۰ | ۵۲۸۱ | ۵۲۸۲ | ۵۲۸۳ | ۵۲۸۴ | ۵۲۸۵ | ۵۲۸۶ | ۵۲۸۷ | ۵۲۸۸ | ۵۲۸۹ | ۵۲۹۰ | ۵۲۹۱ | ۵۲۹۲ | ۵۲۹۳ | ۵۲۹۴ | ۵۲۹۵ | ۵۲۹۶ | ۵۲۹۷ | ۵۲۹۸ | ۵۲۹۹ | ۵۳۰۰ | ۵۳۰۱ | ۵۳۰۲ | ۵۳۰۳ | ۵۳۰۴ | ۵۳۰۵ | ۵۳۰۶ | ۵۳۰۷ | ۵۳۰۸ | ۵۳۰۹ | ۵۳۱۰ | ۵۳۱۱ | ۵۳۱۲ | ۵۳۱۳ | ۵۳۱۴ | ۵۳۱۵ | ۵۳۱۶ | ۵۳۱۷ | ۵۳۱۸ | ۵۳۱۹ | ۵۳۲۰ | ۵۳۲۱ | ۵۳۲۲ | ۵۳۲۳ | ۵۳۲۴ | ۵۳۲۵ | ۵۳۲۶ | ۵۳۲۷ | ۵۳۲۸ | ۵۳۲۹ | ۵۳۳۰ | ۵۳۳۱ | ۵۳۳۲ | ۵۳۳۳ | ۵۳۳۴ | ۵۳۳۵ | ۵۳۳۶ | ۵۳۳۷ | ۵۳۳۸ | ۵۳۳۹ | ۵۳۴۰ | ۵۳۴۱ | ۵۳۴۲ | ۵۳۴۳ | ۵۳۴۴ | ۵۳۴۵ | ۵۳۴۶ | ۵۳۴۷ | ۵۳۴۸ | ۵۳۴۹ | ۵۳۵۰ | ۵۳۵۱ | ۵۳۵۲ | ۵۳۵۳ | ۵۳۵۴ | ۵۳۵۵ | ۵۳۵۶ | ۵۳۵۷ | ۵۳۵۸ | ۵۳۵۹ | ۵۳۶۰ | ۵۳۶۱ | ۵۳۶۲ | ۵۳۶۳ | ۵۳۶۴ | ۵۳۶۵ | ۵۳۶۶ | ۵۳۶۷ | ۵۳۶۸ | ۵۳۶۹ | ۵۳۷۰ | ۵۳۷۱ | ۵۳۷۲ | ۵۳۷۳ | ۵۳۷۴ | ۵۳۷۵ | ۵۳۷۶ | ۵۳۷۷ | ۵۳۷۸ | ۵۳۷۹ | ۵۳۸۰ | ۵۳۸۱ | ۵۳۸۲ | ۵۳۸۳ | ۵۳۸۴ | ۵۳۸۵ | ۵۳۸۶ | ۵۳۸۷ | ۵۳۸۸ | ۵۳۸۹ | ۵۳۹۰ | ۵۳۹۱ | ۵۳۹۲ | ۵۳۹۳ | ۵۳۹۴ | ۵۳۹۵ | ۵۳۹۶ | ۵۳۹۷ | ۵۳۹۸ | ۵۳۹۹ | ۵۴۰۰ | ۵۴۰۱ | ۵۴۰۲ | ۵۴۰۳ | ۵۴۰۴ | ۵۴۰۵ | ۵۴۰۶ | ۵۴۰۷ | ۵۴۰۸ | ۵۴۰۹ | ۵۴۱۰ | ۵۴۱۱ | ۵۴۱۲ | ۵۴۱۳ | ۵۴۱۴ | ۵۴۱۵ | ۵۴۱۶ | ۵۴۱۷ | ۵۴۱۸ | ۵۴۱۹ | ۵۴۲۰ | ۵۴۲۱ | ۵۴۲۲ | ۵۴۲۳ | ۵۴۲۴ | ۵۴۲۵ | ۵۴۲۶ | ۵۴۲۷ | ۵۴۲۸ | ۵۴۲۹ | ۵۴۳۰ | ۵۴۳۱ | ۵۴۳۲ | ۵۴۳۳ | ۵۴۳۴ | ۵۴۳۵ | ۵۴۳۶ | ۵۴۳۷ | ۵۴۳۸ | ۵۴۳۹ | ۵۴۴۰ | ۵۴۴۱ | ۵۴۴۲ | ۵۴۴۳ | ۵۴۴۴ | ۵۴۴۵ | ۵۴۴۶ | ۵۴۴۷ | ۵۴۴۸ | ۵۴۴۹ | ۵۴۵۰ | ۵۴۵۱ | ۵۴۵۲ | ۵۴۵۳ | ۵۴۵۴ | ۵۴۵۵ | ۵۴۵۶ | ۵۴۵۷ | ۵۴۵۸ | ۵۴۵۹ | ۵۴۶۰ | ۵۴۶۱ | ۵۴۶۲ | ۵۴۶۳ | ۵۴۶۴ | ۵۴۶۵ | ۵۴۶۶ | ۵۴۶۷ | ۵۴۶۸ | ۵۴۶۹ | ۵۴۷۰ | ۵۴۷۱ | ۵۴۷۲ | ۵۴۷۳ | ۵۴۷۴ | ۵۴۷۵ | ۵۴۷۶ | ۵۴۷۷ | ۵۴۷۸ | ۵۴۷۹ | ۵۴۸۰ | ۵۴۸۱ | ۵۴۸۲ | ۵۴۸۳ | ۵۴۸۴ | ۵۴۸۵ | ۵۴۸۶ | ۵۴۸۷ | ۵۴۸۸ | ۵۴۸۹ | ۵۴۹۰ | ۵۴۹۱ | ۵۴۹۲ | ۵۴۹۳ | ۵۴۹۴ | ۵۴۹۵ | ۵۴۹۶ | ۵۴۹۷ | ۵۴۹۸ | ۵۴۹۹ | ۵۵۰۰ | ۵۵۰۱ | ۵۵۰۲ | ۵۵۰۳ | ۵۵۰۴ | ۵۵۰۵ | ۵۵۰۶ | ۵۵۰۷ | ۵۵۰۸ | ۵۵۰۹ | ۵۵۱۰ | ۵۵۱۱ | ۵۵۱۲ | ۵۵۱۳ | ۵۵۱۴ | ۵۵۱۵ | ۵۵۱۶ | ۵۵۱۷ | ۵۵۱۸ | ۵۵۱۹ | ۵۵۲۰ | ۵۵۲۱ | ۵۵۲۲ | ۵۵۲۳ | ۵۵۲۴ | ۵۵۲۵ | ۵۵۲۶ | ۵۵۲۷ | ۵۵۲۸ | ۵۵۲۹ | ۵۵۳۰ | ۵۵۳۱ | ۵۵۳۲ | ۵۵۳۳ | ۵۵۳۴ | ۵۵۳۵ | ۵۵۳۶ | ۵۵۳۷ | ۵۵۳۸ | ۵۵۳۹ | ۵۵۴۰ | ۵۵۴۱ | ۵۵۴۲ | ۵۵۴۳ | ۵۵۴۴ | ۵۵۴۵ | ۵۵۴۶ | ۵۵۴۷ | ۵۵۴۸ | ۵۵۴۹ | ۵۵۵۰ | ۵۵۵۱ | ۵۵۵۲ | ۵۵۵۳ | ۵۵۵۴ | ۵۵۵۵ | ۵۵۵۶ | ۵۵۵۷ | ۵۵۵۸ | ۵۵۵۹ | ۵۵۶۰ | ۵۵۶۱ | ۵۵۶۲ | ۵۵۶۳ | ۵۵۶۴ | ۵۵۶۵ | ۵۵۶۶ | ۵۵۶۷ | ۵۵۶۸ | ۵۵۶۹ | ۵۵۷۰ | ۵۵۷۱ | ۵۵۷۲ | ۵۵۷۳ | ۵۵۷۴ | ۵۵۷۵ | ۵۵۷۶ | ۵۵۷۷ | ۵۵۷۸ | ۵۵۷۹ | ۵۵۸۰ | ۵۵۸۱ | ۵۵۸۲ | ۵۵۸۳ | ۵۵۸۴ | ۵۵۸۵ | ۵۵۸۶ | ۵۵۸۷ | ۵۵۸۸ | ۵۵۸۹ | ۵۵۹۰ | ۵۵۹۱ | ۵۵۹۲ | ۵۵۹۳ | ۵۵۹۴ | ۵۵۹۵ | ۵۵۹۶ | ۵۵۹۷ | ۵۵۹۸ | ۵۵۹۹ | ۵۶۰۰ | ۵۶۰۱ | ۵۶۰۲ | ۵۶۰۳ | ۵۶۰۴ | ۵۶۰۵ | ۵۶۰۶ | ۵۶۰۷ | ۵۶۰۸ | ۵۶۰۹ | ۵۶۱۰ | ۵۶۱۱ | ۵۶۱۲ | ۵۶۱۳ | ۵۶۱۴ | ۵۶۱۵ | ۵۶۱۶ | ۵۶۱۷ | ۵۶۱۸ | ۵۶۱۹ | ۵۶۲۰ | ۵۶۲۱ | ۵۶۲۲ | ۵۶۲۳ | ۵۶۲۴ | ۵۶۲۵ | ۵۶۲۶ | ۵۶۲۷ | ۵۶۲۸ | ۵۶۲۹ | ۵۶۳۰ | ۵۶۳۱ | ۵۶۳۲ | ۵۶۳۳ | ۵۶۳۴ | ۵۶۳۵ | ۵۶۳۶ | ۵۶۳۷ | ۵۶۳۸ | ۵۶۳۹ | ۵۶۴۰ | ۵۶۴۱ | ۵۶۴۲ | ۵۶۴۳ | ۵۶۴۴ | ۵۶۴۵ | ۵۶۴۶ | ۵۶۴۷ | ۵۶۴۸ | ۵۶۴۹ | ۵۶۵۰ | ۵۶۵۱ | ۵۶۵۲ | ۵۶۵۳ | ۵۶۵۴ | ۵۶۵۵ | ۵۶۵۶ | ۵۶۵۷ | ۵۶۵۸ | ۵۶۵۹ | ۵۶۶۰ | ۵۶۶۱ | ۵۶۶۲ | ۵۶۶۳ | ۵۶۶۴ | ۵۶۶۵ | ۵۶۶۶ | ۵۶۶۷ | ۵۶۶۸ | ۵۶۶۹ | ۵۶۷۰ | ۵۶۷۱ | ۵۶۷۲ | ۵۶۷۳ | ۵۶۷۴ | ۵۶۷۵ | ۵۶۷۶ | ۵۶۷۷ | ۵۶۷۸ | ۵۶۷۹ | ۵۶۸۰ | ۵۶۸۱ | ۵۶۸۲ | ۵۶۸۳ | ۵۶۸۴ | ۵۶۸۵ | ۵۶۸۶ | ۵۶۸۷ | ۵۶۸۸ | ۵۶۸۹ | ۵۶۹۰ | ۵۶۹۱ | ۵۶۹۲ | ۵۶۹۳ | ۵۶۹۴ | ۵۶۹۵ | ۵۶۹۶ | ۵۶۹۷ | ۵۶۹۸ | ۵۶۹۹ | ۵۷۰۰ | ۵۷۰۱ | ۵۷۰۲ | ۵۷۰۳ | ۵۷۰۴ | ۵۷۰۵ | ۵۷۰۶ | ۵۷۰۷ | ۵۷۰۸ | ۵۷۰۹ | ۵۷۱۰ | ۵۷۱۱ | ۵۷۱۲ | ۵۷۱۳ | ۵۷۱۴ | ۵۷۱۵ | ۵۷۱۶ | ۵۷۱۷ | ۵۷۱۸ | ۵۷۱۹ | ۵۷۲۰ | ۵۷۲۱ | ۵۷۲۲ | ۵۷۲۳ | ۵۷۲۴ | ۵۷۲۵ | ۵۷۲۶ | ۵۷۲۷ | ۵۷۲۸ | ۵۷۲۹ | ۵۷۳۰ | ۵۷۳۱ | ۵۷۳۲ | ۵۷۳۳ | ۵۷۳۴ | ۵۷۳۵ | ۵۷۳۶ | ۵۷۳۷ | ۵۷۳۸ | ۵۷۳۹ | ۵۷۴۰ | ۵۷۴۱ | ۵۷۴۲ | ۵۷۴۳ | ۵۷۴۴ | ۵۷۴۵ | ۵۷۴۶ | ۵۷۴۷ | ۵۷۴۸ | ۵۷۴۹ | ۵۷۵۰ | ۵۷۵۱ | ۵۷۵۲ | ۵۷۵۳ | ۵۷۵۴ | ۵۷۵۵ | ۵۷۵۶ | ۵۷۵۷ | ۵۷۵۸ | ۵۷۵۹ | ۵۷۶۰ | ۵۷۶۱ | ۵۷۶۲ | ۵۷۶۳ | ۵۷۶۴ | ۵۷۶۵ | ۵۷۶۶ | ۵۷۶۷ | ۵۷۶۸ | ۵۷۶۹ | ۵۷۷۰ | ۵۷۷۱ | ۵۷۷۲ | ۵۷۷۳ | ۵۷۷۴ | ۵۷۷۵ | ۵۷۷۶ | ۵۷۷۷ | ۵۷۷۸ | ۵۷۷۹ | ۵۷۸۰ | ۵۷۸۱ | ۵۷۸۲ | ۵۷۸۳ | ۵۷۸۴ | ۵۷۸۵ | ۵۷۸۶ | ۵۷۸۷ | ۵۷۸۸ | ۵۷۸۹ | ۵۷۹۰ | ۵۷۹۱ | ۵۷۹۲ | ۵۷۹۳ | ۵۷۹۴ | ۵۷۹۵ | ۵۷۹۶ | ۵۷۹۷ | ۵۷۹۸ | ۵۷۹۹ | ۵۸۰۰ | ۵۸۰۱ | ۵۸۰۲ | ۵۸۰۳ | ۵۸۰۴ | ۵۸۰۵ | ۵۸۰۶ | ۵۸۰۷ | ۵۸۰۸ | ۵۸۰۹ | ۵۸۱۰ | ۵۸۱۱ | ۵۸۱۲ | ۵۸۱۳ | ۵۸۱۴ | ۵۸۱۵ | ۵۸۱۶ | ۵۸۱۷ | ۵۸۱۸ | ۵۸۱۹ | ۵۸۲۰ | ۵۸۲۱ | ۵۸۲۲ | ۵۸۲۳ | ۵۸۲۴ | ۵۸۲۵ | ۵۸۲۶ | ۵۸۲۷ | ۵۸۲۸ | ۵۸۲۹ | ۵۸۳۰ | ۵۸۳۱ | ۵۸۳۲ | ۵۸۳۳ | ۵۸۳۴ | ۵۸۳۵ | ۵۸۳۶ | ۵۸۳۷ | ۵۸۳۸ | ۵۸۳۹ | ۵۸۴۰ | ۵۸۴۱ | ۵۸۴۲ | ۵۸۴۳ | ۵۸۴۴ | ۵۸۴۵ | ۵۸۴۶ | ۵۸۴۷ | ۵۸۴۸ | ۵۸۴۹ | ۵۸۵۰ | ۵۸۵۱ | ۵۸۵۲ | ۵۸۵۳ | ۵۸۵۴ | ۵۸۵۵ | ۵۸۵۶ | ۵۸۵۷ | ۵۸۵۸ | ۵۸۵۹ | ۵۸۶۰ | ۵۸۶۱ | ۵۸۶۲ | ۵۸۶۳ | ۵۸۶۴ | ۵۸۶۵ | ۵۸۶۶ | ۵۸۶۷ | ۵۸۶۸ | ۵۸۶۹ | ۵۸۷۰ | ۵۸۷۱ | ۵۸۷۲ | ۵۸۷۳ | ۵۸۷۴ | ۵۸۷۵ | ۵۸۷۶ | ۵۸۷۷ | ۵۸۷۸ | ۵۸۷۹ | ۵۸۸۰ | ۵۸۸۱ | ۵۸۸۲ | ۵۸۸۳ | ۵۸۸۴ | ۵۸۸۵ | ۵۸۸۶ | ۵۸۸۷ | ۵۸۸۸ | ۵۸۸۹ | ۵۸۹۰ | ۵۸۹۱ | ۵۸۹۲ | ۵۸۹۳ | ۵۸۹۴ | ۵۸۹۵ | ۵۸۹۶ | ۵۸۹۷ | ۵۸۹۸ | ۵۸۹۹ | ۵۹۰۰ | ۵۹۰۱ | ۵۹۰۲ | ۵۹۰۳ | ۵۹۰۴ | ۵۹۰۵ | ۵۹۰۶ | ۵۹۰۷ | ۵۹۰۸ | ۵۹۰۹ | ۵۹۱۰ | ۵۹۱۱ | ۵۹۱۲ | ۵۹۱۳ | ۵۹۱۴ | ۵۹۱۵ | ۵۹۱۶ | ۵۹۱۷ | ۵۹۱۸ | ۵۹۱۹ | ۵۹۲۰ | ۵۹۲۱ | ۵۹۲۲ | ۵۹۲۳ | ۵۹۲۴ | ۵۹۲۵ | ۵۹۲۶ | ۵۹۲۷ | ۵۹۲۸ | ۵۹۲۹ | ۵۹۳۰ | ۵۹۳۱ | ۵۹۳۲ | ۵۹۳۳ | ۵۹۳۴ | ۵۹۳۵ | ۵۹۳۶ | ۵۹۳۷ | ۵۹۳۸ | ۵۹۳۹ | ۵۹۴۰ | ۵۹۴۱ | ۵۹۴۲ | ۵۹۴۳ | ۵۹۴۴ | ۵۹۴۵ | ۵۹۴۶ | ۵۹۴۷ | ۵۹۴۸ | ۵۹۴۹ | ۵۹۵۰ | ۵۹۵۱ | ۵۹۵۲ | ۵۹۵۳ | ۵۹۵۴ | ۵۹۵۵ | ۵۹۵۶ | ۵۹۵۷ | ۵۹۵۸ | ۵۹۵۹ | ۵۹۶۰ | ۵۹۶۱ | ۵۹۶۲ | ۵۹۶۳ | ۵۹۶۴ | ۵۹۶۵ | ۵۹۶۶ | ۵۹۶۷ | ۵۹۶۸ | ۵۹۶۹ | ۵۹۷۰ | ۵۹۷۱ | ۵۹۷۲ | ۵۹۷۳ | ۵۹۷۴ | ۵۹۷۵ | ۵۹۷۶ | ۵۹۷۷ | ۵۹۷۸ | ۵۹۷۹ | ۵۹۸۰ | ۵۹۸۱ | ۵۹۸۲ | ۵۹۸۳ | ۵۹۸۴ | ۵۹۸۵ | ۵۹۸۶ | ۵۹۸۷ | ۵۹۸۸ | ۵۹۸۹ | ۵۹۹۰ | ۵۹۹۱ | ۵۹۹۲ | ۵۹۹۳ | ۵۹۹۴ | ۵۹۹۵ | ۵۹۹۶ | ۵۹۹۷ | ۵۹۹۸ | ۵۹۹۹ | ۶۰۰۰ | ۶۰۰۱ | ۶۰۰۲ | ۶۰۰۳ | ۶۰۰۴ | ۶۰۰۵ | ۶۰۰۶ | ۶۰۰۷ | ۶۰۰۸ | ۶۰۰۹ | ۶۰۱۰ | ۶۰۱۱ | ۶۰۱۲ | ۶۰۱۳ | ۶۰۱۴ | ۶۰۱۵ | ۶۰۱۶ | ۶۰۱۷ | ۶۰۱۸ | ۶۰۱۹ | ۶۰۲۰ | ۶۰۲۱ | ۶۰۲۲ | ۶۰۲۳ | ۶۰۲۴ | ۶۰۲۵ | ۶۰۲۶ | ۶۰۲۷ | ۶۰۲۸ | ۶۰۲۹ | ۶۰۳۰ | ۶۰۳۱ | ۶۰۳۲ | ۶۰۳۳ | ۶۰۳۴ | ۶۰۳۵ | ۶۰۳۶ | ۶۰۳۷ | ۶۰۳۸ | ۶۰۳۹ | ۶۰۴۰ | ۶۰۴۱ | ۶۰۴۲ | ۶۰۴۳ | ۶۰۴۴ | ۶۰۴۵ | ۶۰۴۶ | ۶۰۴۷ | ۶۰۴۸ | ۶۰۴۹ | ۶۰۵۰ | ۶۰۵۱ | ۶۰۵۲ | ۶۰۵۳ | ۶۰۵۴ | ۶۰۵۵ | ۶۰۵۶ | ۶۰۵۷ | ۶۰۵۸ | ۶۰۵۹ | ۶۰۶۰ | ۶۰۶۱ | ۶۰۶۲ | ۶۰۶۳ | ۶۰۶۴ | ۶۰۶۵ | ۶۰۶۶ | ۶۰۶۷ | ۶۰۶۸ | ۶۰۶۹ | ۶۰۷۰ | ۶۰۷۱ | ۶۰۷۲ | ۶۰۷۳ | ۶۰۷۴ | ۶۰۷۵ | ۶۰۷۶ | ۶۰۷۷ | ۶۰۷۸ | ۶۰۷۹ | ۶۰۸۰ | ۶۰۸۱ | ۶۰۸۲ | ۶۰۸۳ | ۶۰۸۴ | ۶۰۸۵ | ۶۰۸۶ | ۶۰۸۷ | ۶۰۸۸ | ۶۰۸۹ | ۶۰۹۰ | ۶۰۹۱ | ۶۰۹۲ | ۶۰۹۳ | ۶۰۹۴ | ۶۰۹۵ | ۶۰۹۶ | ۶۰۹۷ | ۶۰۹۸ | ۶۰۹۹ | ۶۱۰۰ | ۶۱۰۱ | ۶۱۰۲ | ۶۱۰۳ | ۶۱۰۴ | ۶۱۰۵ | ۶۱۰۶ | ۶۱۰۷ | ۶۱۰۸ | ۶۱۰۹ | ۶۱۱۰ | ۶۱۱۱ | ۶۱۱۲ | ۶۱۱۳ | ۶۱۱۴ | ۶۱۱۵ | ۶۱۱۶ | ۶۱۱۷ | ۶۱۱۸ | ۶۱۱۹ | ۶۱۲۰ | ۶۱۲۱ | ۶۱۲۲ | ۶۱۲۳ | ۶۱۲۴ | ۶۱۲۵ | ۶۱۲۶ | ۶۱۲۷ | ۶۱۲۸ | ۶۱۲۹ | ۶۱۳۰ | ۶۱۳۱ | ۶۱۳۲ | ۶۱۳۳ | ۶۱۳۴ | ۶۱۳۵ | ۶۱۳۶ | ۶۱۳۷ | ۶۱۳۸ | ۶۱۳۹ | ۶۱۴۰ | ۶۱۴۱ | ۶۱۴۲ | ۶۱۴۳ | ۶۱۴۴ | ۶۱۴۵ | ۶۱۴۶ | ۶۱۴۷ | ۶۱۴۸ | ۶۱۴۹ | ۶۱۵۰ | ۶۱۵۱ | ۶۱۵۲ | ۶۱۵۳ | ۶۱۵۴ | ۶۱۵۵ | ۶۱۵۶ | ۶۱۵۷ | ۶۱۵۸ | ۶۱۵۹ | ۶۱۶۰ | ۶۱۶۱ | ۶۱۶۲ | ۶۱۶۳ | ۶۱۶۴ | ۶۱۶۵ | ۶۱۶۶ | ۶۱۶۷ | ۶۱۶۸ | ۶۱۶۹ | ۶۱۷۰ | ۶۱۷۱ | ۶۱۷۲ | ۶۱۷۳ | ۶۱۷۴ | ۶۱۷۵ | ۶۱۷۶ | ۶۱۷۷ | ۶۱۷۸ | ۶۱۷۹ | ۶۱۸۰ | ۶۱۸۱ | ۶۱۸۲ | ۶۱۸۳ | ۶۱۸۴ | ۶۱۸۵ | ۶۱۸۶ | ۶۱۸۷ | ۶۱۸۸ | ۶۱۸۹ | ۶۱۹۰ | ۶۱۹۱ | ۶۱۹۲ | ۶۱۹۳ | ۶۱۹۴ | ۶۱۹۵ | ۶۱۹۶ | ۶۱۹۷ | ۶۱۹۸ | ۶۱۹۹ | ۶۲۰۰ | ۶۲۰۱ | ۶۲۰۲ | ۶۲۰۳ | ۶۲۰۴ | ۶۲۰۵ | ۶۲۰۶ | ۶۲۰۷ | ۶۲۰۸ | ۶۲۰۹ | ۶۲۱۰ | ۶۲۱۱ | ۶۲۱۲ | ۶۲۱۳ | ۶۲۱۴ | ۶۲۱۵ | ۶۲۱۶ | ۶۲۱۷ | ۶۲۱۸ | ۶۲۱۹ | ۶۲۲۰ | ۶۲۲۱ | ۶۲۲۲ | ۶۲۲۳ | ۶۲۲۴ | ۶۲۲۵ | ۶۲۲۶ | ۶۲۲۷ | ۶۲۲۸ | ۶۲۲۹ | ۶۲۳۰ | ۶۲۳۱ | ۶۲۳۲ | ۶۲۳۳ | ۶۲۳۴ | ۶۲۳۵ | ۶۲۳۶ | ۶۲۳۷ | ۶۲۳۸ | ۶۲۳۹ | ۶۲۴۰ | ۶۲۴۱ | ۶۲۴۲ | ۶۲۴۳ | ۶۲۴۴ | ۶۲۴۵ | ۶۲۴۶ | ۶۲۴۷ | ۶۲۴۸ | ۶۲۴۹ | ۶۲۵۰ | ۶۲۵۱ | ۶۲۵۲ | ۶۲۵۳ | ۶۲۵۴ | ۶۲۵۵ | ۶۲۵۶ | ۶۲۵۷ | ۶۲۵۸ | ۶۲۵۹ | ۶۲۶۰ | ۶۲۶۱ | ۶۲۶۲ | ۶۲۶۳ | ۶۲۶۴ | ۶۲۶۵ | ۶۲۶۶ | ۶۲۶۷ | ۶۲۶۸ | ۶۲۶۹ | ۶۲۷۰ | ۶۲۷۱ | ۶۲۷۲ | ۶۲۷۳ | ۶۲۷۴ | ۶۲۷۵ | ۶۲۷۶ | ۶۲۷۷ | ۶۲۷۸ | ۶۲۷۹ | ۶۲۸۰ | ۶۲۸۱ | ۶۲۸۲ | ۶۲۸۳ | ۶۲۸۴ | ۶۲۸۵ | ۶۲۸۶ | ۶۲۸۷ | ۶۲۸۸ | ۶۲۸۹ | ۶۲۹۰ | ۶۲۹۱ | ۶۲۹۲ | ۶۲۹۳ | ۶۲۹۴ | ۶۲۹۵ | ۶۲۹۶ | ۶۲۹۷ | ۶۲۹۸ | ۶۲۹۹ | ۶۳۰۰ | ۶۳۰۱ | ۶۳۰۲ | ۶۳۰۳ | ۶۳۰۴ | ۶۳۰۵ | ۶۳۰۶ | ۶۳۰۷ | ۶۳۰۸ | ۶۳۰۹ | ۶۳۱۰ | ۶۳۱۱ | ۶۳۱۲ | ۶۳۱۳ | ۶۳۱۴ | ۶۳۱۵ | ۶۳۱۶ | ۶۳۱۷ |

جدول ۶- مکان های چند شکل موجود در قطعه توالی یابی شده ژن *HvCO1* در ژرم پلاسم جو مورد مطالعه

		تعداد نمونه				جایگاه ژنی مکان های چند شکل											
						i۱						e۲		۳'UTR			
هاپلوتیپ	فراوانی	ایرانی	خلخالی	دو ردیفه	شش ردیفه	۱۴۰۷	۱۴۱۰	۱۴۵۵	۱۴۸۹	۱۵۷۶	۱۵۹۶	۱۸۱۶	۲۰۰۸	۳۲۰۷	۳۲۴	۳۳۸	۳۳۶	۳۳۷
AF490467						A	T	A	T	C	C	T	G	T	C	G	G	T
۱	۰/۰۵۷۶	۱	۲	۲	۱	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
۲	۰/۱۱۵	۱	۵	۳	۳	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
۳	۰/۰۷۷	۴	۰	۱	۳	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.
۴	۰/۰۱۹	۰	۱	۰	۱	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
۵	۰/۰۱۹	۰	۱	۱	۰	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
۶	۰/۱۵۳	۴	۴	۲	۶	.	.	C	C	A	T	C	.	.	.	.	.	G
۷	۰/۰۱۹	۰	۱	۰	۱	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	G
۸	۰/۱۷۳	۴	۵	۳	۶	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	G
۹	۰/۰۱۹	۰	۱	۱	۰	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
۱۰	۰/۱۱۵	۴	۲	۱	۵	.	.	C	C	A	T	C	.	.	.	.	.	.
۱۱	۰/۰۵۷	۳	۰	۲	۱	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.
۱۲	۰/۰۵۷	۲	۱	۱	۲	.	.	C	C	A	.	C	A	.	.	.	.	G
۱۳	۰/۰۴۳	۱	۰	۱	۲	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	G
۱۴	۰/۰۱۹	۰	۱	۰	۱	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	G
۱۵	۰/۰۱۹	۰	۱	۰	۰	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	G
۱۶	۰/۰۱۹	۰	۱	۰	۱	C	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.
۱۷	۰/۰۱۹	۰	۱	۰	۱	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

ازنمونه بانک ژنی **AF490467** به عنوان توالی مرجع استفاده شده است. i۱ ، اینترون اول و e۲ نشاندهنده اگزون دوم هستند علامت(.) نشاندهنده تشابه این جایگاه با توالی مرجع است.

جدول۷- مکان های چندشکل موجود در قطعه توالی یابی شده ژن *HvGI* در ژرم پلاسم جو مورد مطالعه

		تعداد نمونه				جایگاه ژنی مکان های چند شکل		
						e۱۰		i۱۱
هاپلوتیپ	فراوانی	ایرانی	خلخالی	دو ردیفه	شش ردیفه	۶۰۷۲	۶۲۱۰	۶۴۸۳
AY740524						T	G	G
۱	۰/۶۴۷	۱۴	۱۹	۸	۲۵	.	.	.
۲	۰/۳۱۴	۴	۱۲	۱۲	۴	.	.	C
۳	۰/۰۳۹	۲	۰	۰	۲	G	A	C

ازنمونه بانک ژنی **AY740524** به عنوان توالی مرجع استفاده شده است. i۱۱ ، اینترون اول و e۱۰ نشاندهنده اگزون دهم هستند. علامت(.) نشاندهنده تشابه این جایگاه با توالی مرجع است.

جدول۸- روابط بین تنوع در زمان گلدهی و تنوع هاپلوتیپی به همراه درصد واریانس ژنتیکی بیان شده در ژنهای *HvCO1*، *PpdH1* و *HvGI*

ژن	هاپلوتیپ	مدل۱: هاپلوتیپ+ Qst			مدل۲: هاپلوتیپ+ Qst+ تیپ خوشه		
		زمان گلدهی	p value	واریانس ژنتیکی ٪	زمان گلدهی	p value	واریانس ژنتیکی ٪
Ppd-H1	۱	۱۰۹/۴۲	۰/۵۴۹	۰/۶۹	۱۱۳/۴	۰/۴۰۵۵	۱/۳۴
	۲	۱۰۷/۶۱	۰/۴۷۸	۰/۹۶	۱۰۹/۱	۰/۴۵۷	۱/۰۷
	۳	۱۱۵/۱۵	۰/۰۱۸۲	۱۰/۱۲	۱۱۹/۲۹	۰/۰۰۵	۱۳/۹۵
	۵	۱۰۷/۶۱	۰/۳۱۲	۱/۹۴	۱۰۶/۱	۰/۳۷۶۶	۱/۵۱
	۶	۱۰۸/۲۹	۰/۰۱	۱۱/۹	۱۰۸/۷	۰/۰۱	۱۱/۸۵
	۷	۱۰۰/۴۷	۰/۰۹۳	۵/۲۵	۹۷/۷	۰/۱۰۵۹	۴/۹۶
	۸	۹۸/۴۵	۰/۲۸۱	۲/۲	۹۸/۴	۰/۲۹۹	۲/۰۸
	۹	۹۲/۱۴	۰/۰۶۰	۶/۵۵	۹۲/۹	۰/۰۷۱۸	۶/۱۲
HvCO1	۱	۱۰۹/۸۹	۰/۱۶۴۳	۳/۶۴	۱۱۱/۳۸	۰/۱۴۲۱	۴/۱۱
	۲	۱۰۹/۶۲	۰/۰۸۳۶	۵/۵۷	۱۱۰/۴۱	۰/۰۷۵۳	۵/۹۷
	۳	۱۰۳/۱۴	۰/۹۲۳۲	۰/۰۱۷۸	۱۰۲/۵۹	۰/۸۹۴۹	۰/۰۳۴
	۶	۱۰۱/۶۲	۰/۵۹۲۴	۰/۵۵	۱۰۱/۰۸	۰/۵۵۶۴	۰/۶۷
	۸	۱۰۳/۰۷	۰/۹۳۵۲	۰/۰۱۲۶	۱۰۲/۸۹	۰/۹۵۲۷	۰/۰۰۶۸
	۱۰	۹۵/۴۵	۰/۰۶۹۹	۶/۱	۹۴/۴۹	۰/۰۵۶۲	۶/۸۵
	۱۱	۱۰۰/۶۷	۰/۹۲۵۹	۰/۰۱۶۵	۱۰۱/۸	۰/۸۷۵۴	۰/۰۴۷
	۱۲	۱۰۴/۱۴	۰/۹۱۱۳	۰/۰۲۳۸	۱۰۴/۷	۰/۸۹۹۱	۰/۰۳۱
	۱۳	۹۸/۱۲	۰/۶۲	۰/۴	۹۵/۸۶	۰/۵۶	۰/۶
HvGI	۱	۱۰۵/۳۸	۰/۰۳۲۱	۸/۵۷	۱۰۵/۵۸	۰/۰۲۵۷	۹/۱۳
	۲	۹۸/۴۸	۰/۰۵۷	۵/۹۷	۹۸/۰۴	۰/۰۵۳	۶/۲۱
	۳	۹۶/۸۱	۰/۴	۰/۹	۹۷/۲۲	۰/۳۲	۱/۲

www.SID.ir

میزان تنوع نوکلئوتیدی در ´3UTR و تنوع هاپلوتیپی در ناحیه اینترون بیشتر بود. در ارقام ایرانی تعداد چند شکلی کمتر ولی تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی بیشتر از ارقام خارجی بودند (جدول۴). همچنین تعداد چندشکلی و تنوع نوکلئوتیدی در ارقام دو ردیفه کمتر و تعداد هاپلوتیپ‌ها و تنوع هاپلوتیپی بیشتر از ارقام شش ردیفه بودند (جدول۴). میزان LD بین مکان‌های SNP دارای متوسط r^2=۰/۲۷ بود. یک بلوک LD (r^2>۰/۸، p<۰/۰۰۱) در ناحیه اینترون به طول ۱۴۲ جفت باز (بین s-۱۴۵۵ تا s-۱۵۹۶) مشاهده شد (شکل۴). در ژن *HVGI* تعداد ۳ مکان چندشکل یا معادل یک SNP در هر ۲۸۳ جفت باز شناسایی شد که در مقایسه با دو ژن *Ppd-H1* و *HvCO1* این میزان چند شکلی بسیار پایین بود (جدول۴). برای این ژن تعداد ۳ هاپلوتیپ در ژرم پلاسم شناسایی شدند و تمام هاپلوتیپ‌ها در ارقام ایرانی وجود داشتند و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در ارقام ایرانی بیش از ارقام خارجی بود. ارقام شش ردیفه نیز هر سه هاپلوتیپ را نشان دادند. تنوع نوکلئوتیدی در ارقام شش ردیفه و تنوع هاپلوتیپی در ارقام دو ردیفه بیشتر بود (جدول۴). یک بلوک LD (r^2=۱، p<۰/۰۰۱) در ناحیه اگزون بین دو مکان s-۶۰۷۲ تا s-۶۲۱۰ به طول ۱۴۸ جفت باز وجود داشت. میزان LD به طور متوسط در بین جفت مکان‌های چند شکل دارای متوسط r^2=۰/۴ بود (شکل۴). اثر گزینش بر اساس مقادیر D برای ژن‌های *Ppd-H1* و *CO1* مثبت و برای ژن *HVGI* منفی بودند. مقدار منفی D نشان‌دهنده افزایش چندشکلی‌های نادر و مقدار مثبت نشان‌دهنده افزایش چندشکلی-های بینابین (تعادل) است. با این حال این مقدار برای هیچ یک از ژن‌ها معنی‌دار نشد (P>۰/۱). مقدارRm نیز نشان داد که در ژن *CO1* نوترکیبی بالایی نسبت به ژن‌های دیگر در تاریخچه تکامل این ژن روی داده است، فرآیندی که در گونه‌های خودگشن دارای احتمال کمتری است (جدول۴).

تجزیه ارتباطی

به منظور افزایش حساسیت، هاپلوتیپ‌هایی که حداقل در دو رقم مشاهده شدند در تجزیه ارتباطی منظور شدند. با در نظر گرفتن ساختار جمعیت (K=۲) روابط هاپلوتیپی معنی‌دار با زمان گلدهی برای دو ژن *Ppd-H1* و *HVGI* شناسایی شدند (جدول۸). نتیجه مهم دیگر که در این مطالعه حاصل شد عدم وجود اثر متقابل معنی‌دار اپیستاتیک بین ژن‌ها بود و بنابراین دلیلی برای تصحیح میانگین هاپلوتیپ‌ها برای اثر متقابل اپیستاتیک وجود نداشت (P>۰/۱). تنوع نوکلئوتیدی ژن *Ppd-H1* ۳۶/۲۵ درصد از واریانس ژنتیکی را توجیه کرد. هاپلوتیپ ۳ با میانگین گلدهی ۱۱۵/۱۵ روز و هاپلوتیپ ۶ با میانگین ۱۰۸/۲۹ روز در ژن *Ppd-H1* به طور معنی‌دار با گلدهی مرتبط بودند و تفاوت یک هفته‌ای را با هم نشان دادند. تفاوت بین این دو هاپلوتیپ فقط در مکان s-۲۶۹۵ است (جدول۵). یعنی حضور نوکلئوتید T در این مکان باعث گلدهی دیر هنگام و آلل جایگزین آن یعنی G باعث کاهش زمان گلدهی می‌شود. این مکان که در ناحیه اگزون ۸ قرار دارد قبلا نیز گزارش شده است (Turner et al. 2005). دو هاپلوتیپ مذکور تقریبا ۲۰ درصد واریانس ژنتیکی را توجیه می کنند. زمانی که متغیر کمکی تیپ سنبله نیز به عنوان عامل احتمالی ایجاد ساختار در ژرم پلاسم به مدل اضافه شد (مدل۲) آزمون معنی داری حساس‌تر شد (P<۰/۰۱)، یعنی درصد واریانس ژنتیکی کل به ۴۲/۸۷ و واریانس ناشی از هاپلوتیپ ۳ و ۶ به ۲۵/۷۹ درصد ارتقا یافت. هاپلوتیپ ۹ نیز ارتباط نسبتاً قوی ولی غیر معنی‌دار با گلدهی زودهنگام نشان داد (جدول۸). ژن *HvCO1* قادر به تمایز دو نوع تیپ گلدهی زود هنگام و دیرهنگام نبود هرچند روابط ضعیف و غیرمعنی‌دار مشاهده شد (جدول۸). تقریبا بیش از ۶۰ درصد هاپلوتیپ‌ها فنوتیپ بینابینی را نشان دادند. قوی‌ترین ارتباط مربوط به هاپلوتیپ ۱۰ بود که میانگین پایین‌تری داشت و بنابراین با گلدهی زود هنگام در ارتباط بود. درصد کل واریانس ژنتیکی در مدل اول ۱۶/۳۳ و مدل دوم ۱۸/۳۲ بود. در ژن *HVGI* هاپلوتیپ ۱ ارتباط معنی‌داری را با گلدهی دیرهنگام در هر دو مدل نشان داد. این هاپلوتیپ در مدل اول ۹/۴۶ و در مدل دوم ۱۰/۳۳ درصد از کل واریانس ژنتیکی را توجیه نمود. نکته قابل توجه اینکه بدون در نظر گرفتن ساختار جمعیت (Qst) در مدل، هاپلوتیپ‌های *Ppd-H1-9* و *HvCO1-2* ارتباط معنی‌داری با گلدهی نشان دادند. مراجعه به جداول ۵ و ۶ نشان می‌دهد که هاپلوتیپ *Ppd-H1-9* فقط در ارقام ایرانی و هاپلوتیپ *HvCO1-2* تنها در ارقام خارجی وجود دارند. بنابراین ارتباط آن‌ها به خاطر ایرانی یا خارجی بودن یعنی ساختار جمعیت، یک ارتباط دروغین می‌باشد که با در نظر گرفتن Qst اثرآن برطرف شده

Archive of SID
www.SID.ir

است. در این مطالعه رابطه تنوع آللی سه ژن کاندیدا در زمان گلدهی جو بررسی شد. با در نظر گرفتن روش ΔK دو زیرجمعیت در جمعیت شناسایی شد که تقریبا با مبداء ایرانی و خارجی در ارتباط بودند. از طرفی تقسیم ارقام به دو زیرجمعیت بر اساس نشانگرهای EST-SSR و افزایش واریانس ژنتیکی پس از اضافه نمودن تیپ سنبله به عنوان متغیر کمکی به روشنی گویای این مطلب است که این دو پارامتر در ساختار ژرم پلاسم جو دارای اهمیت چشمگیری هستند و بایستی در مطالعات تجزیه ارتباطی صفات کمی در جو مد نظر قرار گیرند زیرا احتمال پیوستگی‌های دروغین نشانگر با صفت را به طور موثر کاهش می‌دهند. در حالی‌که تنوع نوکلئوتیدی در نواحی اینترون سه ژن قابل قیاس بود، توالی‌های اگزونی به ویژه در *Ppd-H1* تنوع چشمگیری نشان دادند. نتیجه‌ای که منطبق با نتیجه گزارش شده توسط Stracke و همکاران بود (Stracke et al. 2009) که در آن تنوع نوکلئوتیدی و چند شکلی‌های عملکردی در ژن‌های *HvCO1* و *HvFT1* در مقایسه با *Ppd-H1* بسیار محدود بودند. ناحیه اگزون *Ppd-H1* متنوع است و با نقش گزارش شده خانواده ژنی *PRR* در آرابیدوپسیس منطبق است که در آن هر دو ژن 7 *PRR* (ارتولوگ *Ppd-H1*) و 5 *PRR* غنی از تنوع آللی بوده که امکان سازگاری وسیع این گونه را فراهم ساخته است (Michael et al. 2003). بسیاری از چندشکلی‌های نادر در *HvCO1* حضور دارند و این امر باعث ایجاد هاپلوتیپ‌های فراوان و در نتیجه تنوع نوکلئوتیدی کمتری شده است. تمام جهش‌های عملکردی که تا به حال در این ژن گزارش شده‌اند در یک یا دو ناحیه دمین قرار گرفته‌اند که بر اهمیت آن‌ها در زمان گلدهی تاکید دارد (Ben-Naim et al. 2006; Lagercrantz et al. 2000). از آنجایی‌که توالی‌یابی کامل نبود امکان دارد که تعدادی از مکان‌های چندشکل دیگر وجود داشته باشند که شناسایی نشده‌اند. تنوع هاپلوتیپی بالا در *HvCO1* را می‌توان تا حدود زیادی به وقوع پدیده نوترکیبی در این ژن نسبت داد که در مقایسه با دو ژن دیگر مقدار آن بر اساس Rm (جدول۴) بسیار چشمگیر است. هر چند که این پدیده در گونه خودگشنی مثل جو نادر است. Kuittinen et al. (2000) نوترکیبی در آرابیدوپسیس (با دگرگشنی ۰/۳ درصد) را به هتروزیس موجود در تعداد نادری از نتاج حاصل از دگرگشنی و گزینش برای افراد نوترکیب احتمالی در ۷ ژن مورد مطالعه نسبت دادند که در آنها هاپلوتیپ های نوترکیب مشاهده شده بود. به هر حال وجود هاپلوتیپ های نوترکیب نشان می دهد که این ژن می تواند یک نقطه مستعد (hot spot) برای نوترکیبی باشد. چندشکلی پایین *HVGI* در مقایسه با دو ژن دیگر را می توان به چند دلیل احتمالی نسبت داد. اول اینکه ژن *HVGI* در یک فاصله ۲/۹cM روی بازوی کوتاه کروموزوم ۳H به همراه ژن های مقاومت به ریزش خوشه *btr۱* و *btr۲* قرار گرفته است که در اهلی شدن جو دارای اهمیت بوده و تحت فشار بالای گزینش هستند (Komatsuda et al. 2004). دلیل دوم را می توان به استفاده محدودتر ژن های اجدادی در برنامه های اصلاحی توسط به نژادگران نسبت داد. دلیل سوم ممکن است به خاطر اندازه ژرم پلاسم باشد. اما دلیل چهارم را می توان با مراجعه به مقادیر D (جدول۴) استنباط کرد، مقدار D برای ژن *HVGI* منفی و برای دو ژن دیگر مثبت است پس طبق تئوری Tajima می توان گفت که در این ژن گزینش مثبت و در دو ژن دیگر گزینش از نوع متعادل حکمفرماست (Tajima 1989). این مطلب را می توان با توجه به (شکل۴) نیز نشان داد که چندشکلی های ناحیه اگزونی *HVGI* کاملا در LD هستند. ارقام دو ردیفه نسبت به شش ردیفه سطح پایین تری از تنوع و درجه بالاتری از گزینش (بر اساس مقدار D) را برای هر سه ژن نشان دادند که باز می تواند به دلایل فوق باشد. تنوع چشمگیر ارقام ایرانی در مقایسه با ارقام خارجی به خصوص در ژن های *HvCO1* و *HVGI* می تواند بیانگر کشورمان به عنوان یکی از مراکز مهم تنوع جو برای این ژن ها باشد. دقت بسیار بالای تجزیه ارتباطی وابستگی شدیدی به میزان LD دارد. در بسیاری از موارد این میزان به سطح ژن و حتی جفت باز تنزل می یابد. نتایج ما با میزان گزارش شده LD در سطح ژنوم (>۱۰cM) با استفاده از نشانگرهای AFLP توسط Kraakman et al. (2004) در تضاد است. هر چند که این گونه مطالعات بستگی به اثرات ساختار جمعیت، ناحیه ژنومی و نوع جمعیت مورد استفاده دارد ولی در مطالعه آن‌ها تنها از ارقام جدید اصلاح شده استفاده شده بود که تحت تاثیر فشار گزینشی بیشتری هستند. بنابراین برای نیل به نقشه‌یابی با وضوح بالا استفاده از جمعیت-های بومی و یا وحشی که کمتر تحت گزینش مصنوعی هستند

Archive of SID
www.SID.ir

بایستی مد نظر قرار گیرند (Stracke et al. 2009). برآوردهای LD در مطالعه ما براساس ژن های کاندید الگوهای متفاوتی را نشان داد. مقدار LD در ژن‌های *Ppd-H1* و *HvCO1* بسیار کمتر از مقدار آستانه و در ژن *HVGI* بیشتر بود. نقش عمده *Ppd-H1* در واکنش به طول روز در جو معلوم شده است (Turner et al. 2005). با توالی‌یابی ناحیه دومین CCT در این ژن مشخص شد که هاپلوتیپ ۳ دارای یک آلل مغلوب گلدهی دیرهنگام *ppd-H1* است در حالی‌که هاپلوتیپ ۶ حامل آلل غالب گلدهی زودهنگام *Ppd-H1* است و تعداد روز تا گلدهی در هاپلوتیپ غالب به میزان ۱۱/۸۵ درصد و معادل یک هفته کاهش یافت. بعلاوه این ژن دارای اثر پلیوتروپی بر روی ارتفاع بوته و اجزای عملکرد است که نتیجه اثر مستقیم زمان گلدهی است (Laurie et al. 1994). در مناطق با فصول رشد طولانی آلل گلدهی دیرهنگام به ارقام بهاره امکان می دهد که دوره رویشی و ظرفیت ذخیره‌ای خود را افزایش دهند. در مقابل آلل غالب *Ppd-H1* که در گونه وحشی یافت می‌شود احتمالا به عنوان راه‌کاری برای فرار از خشکی تکامل یافته است (Lister et al. 2009). همان طور که در این مطالعه نشان داده شد تفاوت بین آلل های مختلف در گلدهی مستقل از ترکیب آللی در ژن های دیگر است البته تصمیم در مورد اینکه آیا عدم اثر متقابل بین ژن ها در نتیجه تکامل مستقل ژن‌ها بوده و یا به خاطر نمونه برداری، مشکل است. اگر اثر متقابلی وجود نداشته باشد می‌توان گفت که گزینش برای آلل یک ژن در برنامه‌های به نژادی صرف‌نظر از ترکیب آللی ژن‌های دیگر امکان پذیر است. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع بالایی در ژرم پلاسم و به ویژه در ارقام ایرانی از نظر ژن‌های مورد مطالعه وجود دارد، وجود SNP گزارش شده (Turner et al. 2005) در بین ارقام یکی از نمونه‌های بارز تنوع در ژرم پلاسم مورد مطالعه و اهمیت آن از نظر تنوع در زمان گلدهی محسوب می‌شود و می‌تواند در برنامه‌های به نژادی برای زمان گلدهی مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه هاپلوتیپ‌هایی شناسایی شدند که ارتباط معنی‌داری با گلدهی زودهنگام و یا با گلدهی دیر هنگام در ژن‌های *Ppd-H1* و *HVGI* نشان دادند و باعث تسریع یک هفته‌ای یا تاخیر یک هفته‌ای در گلدهی می‌شوند، پس می‌توان با طراحی آغازگرهای مناسب از این آلل ها در برنامه های به نژادی برای زمان گلدهی و یا برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود. از طرفی با توجه عدم وجود اثر متقابل اپیستاتیک می‌توان آلل‌های مطلوب ژن‌های مختلف را در یک ژنوتیپ ترکیب نمود.

سپاسگزاری

از همکاری بسیار ارزنده موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به ویژه بخش تحقیقات غلات و بخش ژنتیک و ذخایر توارثی و همچنین موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی IPK آلمان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimising parental selection for genetic linkage maps. Genome.36: 181-186.

Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E(2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between *CONSTANS*-like proteins and DNA. Plant J 46: 462–476.

Buckler ES and Thornsberry JM (2002) Plant molecular diversity and applications to genomics. Curr Opin Plant Biol 5: 107-111.

Cockram J, Jones H, Leigh FJ, O'Sullivan D, Powell W, Laurie DA, Greenland AJ (2007) Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. J Exp Bot 58: 1231–1244.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Dunford RP, Griffiths S, Christodoulou V, Laurie DA (2005) Characterization of a barley (*Hordeum vulgare L.*) homologue of the Arabidopsis flowering time regulator *HVGI*. Theor Appl Genet 110: 925–931.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Mol Ecol 14: 2611–2620.

Greenup A, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B (2009) The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals. Ann Bot 103: 1165–1172.

Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laurie DA (2003) The evolution of *CONSTANS*-like gene families in barley (*Hordeum vulgare*), rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 131: 1855–1867.

Hardy, O. J., and X. Vekemans (2002) SPAGEDi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol Ecol Notes 2: 618-620.

Haseneyer, G., S. Stracke, C. Paul, C. Einfeldt, A. Broda, H.-P. Piepho, A. Graner & H.H. Geiger (2010) Population structure and phenotypic variation of a spring barley world collection set up for association studies. Plant Breeding. 129: 271-279.

Archive of SID
www.SID.ir

Hayes P, Szucs P (2006) Disequilibrium and association in barley: thinking outside the glass. Proc Natl Acad Sci USA 103: 18385–18386.
Hill WG, Robertson A (1968) Effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. Genetics 60: 615–628
Hudson RR, Kaplan NL (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. Genetics. 111: 147–164.
Jones H, Leigh FJ, Mackay I, Bower MA, Smith LMJ, Charles MP, Jones G, Jones MK, Brown TA, Powell W (2008) Population Based Re-sequencing Reveals that the Flowering Time Adaptation of Cultivated Barley Originated East of the Fertile Crescent. Mol Biol Evol 25(10): 2211-2219.
Komatsuda T, Maxim P, Senthil N, Mano Y (2004) High-density AFLP map of nonbrittle rachis 1 (btr1) and 2 (btr2) genes in barley (Hordeum vulgare L.). Theor Appl Genet 109: 986–995.
Kraakman, A. T., R. E. Niks,P.M.Van Den Berg,P.Stam and F. A.Van Eeuwijk (2004 Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. Genetics168: 435–446.
Kuittinen H, Aguade M (2000) Nucleotide variation at the chalcone isomerase locus in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 155: 863–872.
Lagercrantz U, Axelsson T (2000) Rapid evolution of the family of *CONSTANS* like genes in plants. Mol Biol Evol 17: 1499–1507.
Laird, N. M., and J. H. Ware (1982) Random-Effects Models for Longitudinal Data. Biometrics 38: 963-974.
Laurie DA, Prachett N, Bezant JH, Snape JW (1994) Genetic analysis of a photoperiod-response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare* (barley). Heredity 72: 619–627.
Lister DL, Thaw S, Bower MA, Jones H, Charles MP, Jones G, Smith LMJ, Howe CJ, Brown TA, Jones MK (2009) Latitudinal variation in a photoperiod response gene in European barley: insight into the dynamics of agricultural spread from 'historic'specimens. J Archaeol Sci 36:1092–1098.
Matus IA, Hayes PM (2002) Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. Genome 45: 1095–1106.
Michael TP, Salome PA, Yu HJ, Spencer TR, El Sharp, Mcpeek MA, Alonso JM, Ecker JR, Mcclung CR (2003) Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. Science 302: 1049–1053.
Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data.Genetics 155: 945–959.
Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. Bioinformatics 15: 174–175
Stracke S, Presterl T, Stein N, Perovic D, Ordon F, Graner A (2007) Effects of introgression and recombination on haplotype structure and linkage disequilibrium surrounding a locus encoding Bymovirus resistance in barley. Genetics 175: 805–817.
Stracke S., G. Haseneyer, J.-B. Veyrieras, H.-H. Geiger, S. Sauer, A. Graner & H.-P. Piepho(2009) Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of flowering time in barley. Theor Appl Genet 118(2): 259-273.
Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F,Coupland G (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. Nature 410: 1116–1120.
Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123: 585–595.
Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare L.*).Theor Appl Genet 106: 411–422.
Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA (2005) The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. Science 310: 1031–1034.
Yu J, Pressoir G, BriggsW, Vroh BI, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland J, Kresovich S,Buckler ES (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nat.Genet 38: 203-208.

Archive of SID
www.SID.ir