Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 103-111

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۱۱۱- ۱۰۳)

بررسی تنوع‌ژنتیکی ژنوتیپ‌های پوشینه‌دار و بدون‌پوشینه جو دیم با استفاده از نشانگر مولکولی SSR

احمد اسماعیلی[۱]*، بهناز طالبی[۲]، رضا دریکوند[۳]، محمدعلی ابراهیمی[۴] و طهماسب حسین‌پور[۵]
۱، استادیار گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ۲، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی‌کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۳، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، ۴، دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۵، مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، خرم آباد
(تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۵ـ تاریخ تصویب: ۹۲/۸/۳۰)

Study of Genetic Diversity among Hull-Less and Hulled Rain-Fed Barley Genotypes Using SSR Marker

A. ISMAILI[1]*, B. TALEBI[2], R. DRIKVAND[3], M.A. EBRAHIMI[4] AND T. HOSSEINPOUR[5]
Assistant Professor, Department of Crop Science and Plant Breeding, Lorestan University, Khorramabad, Iran, 2, Graduate of M.Sc., Payame Noor University, Tehran, Iran, 3, Assistant Professor, Department of Crop Science and Plant Breeding, Islamic Azad University Khorramabad branch, Khorramabad, Iran, 4, Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran, 5, Member of Scientific Board of Agriculture and Natural Resources Research Center of Lorestan Province, Khorramabad, Iran.
(Received: 5 May 2013 - Accepted: 23 Dec. 2013)

Abstract

In order to study of genetic diversity of barley genotypes, 14 pair's primers of SSR were used in 20 genotypes. After genomic DNA extraction and PCR reaction, Primers produce 266 polymorph bands and mean of polymorph band per primer was 19. The highest value of polymorphic information content (PIC) belonged to Hvm60 and Hvm20 primers (0.88 and 0.73, respectively) and the lowest value of PIC was belonged to Bmac0032 primer (0.32) and mean of PIC for all primers were 0.6. Jacard similarity coefficient was calculated and ranged from 0.3 to 0.96 among genotypes. The highest genetic similarity (0.96) belonged to genotypes no. 6 and 5 and the lowest (0.3) was belonged to genotypes no. 13 and 10. Clustering dendrogram based on UPGMA method classified genotypes to 5 main groups. Results of PCOA classification were similar to results of cluster analysis. Evaluation of genotypes by SSR molecular marker could discriminate two row and six row genotypes and also hulled and hulless genotypes. In other hand the similar parents in pedigree of some genotypes (e.g. between 3 and 12 and between 14 and 18) had an important effect on this classification. Results of this study revealed that this molecular marker has a valuable potential for evaluation and discrimination of barley genotypes.

Keywords: rain-fed barley, glume, polymorphic information content, SSR marker

چکیده

در این آزمایش تنوع ژنتیکی ۲۰ ژنوتیپ جو دیم با استفاده از ۱۴ جفت نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آغازگرها در مجموع ۲۶۶ باند چندشکل تولید نمودند که متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ۱۹ بود. میانگین PIC برای کل آغازگرها ۰/۶ به‌دست آمد و بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای Hvm60 و Hvm20 به‌ترتیب با مقادیر ۰/۸۸ و ۰/۷۳ و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر Bmac0032 با مقدار ۰/۳۲ بود. با محاسبه ضریب تشابه جاکارد، ارزش‌های تشابه بین ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از ۰/۳ تا ۰/۹۶ را داشتند. بیشترین تشابه ژنتیکی مربوط به ژنوتیپ‌های شماره ۶ (رقم زراعی ایذه) و شماره ۵ (لاین امید بخش) با ۰/۹۶ بود و کمترین تشابه مربوط به ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ (پوشینه‌دار و دو ردیفه) و شماره ۱۰ (پوشینه‌دار و شش ردیفه) با ۰/۳ بود. در این پژوهش دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS رسم شد. با ترسیم خط برش در فاصله ۰/۷۵، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۵ گروه اصلی قرار گرفتند. نتایج گروه‌بندی حاصل از تجزیه مختصات اصلی نسبتاً با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. تفکیک بر اساس داده‌های مولکولی SSR تا حدودی توانست ژنوتیپ‌های دو و شش ردیفه و همچنین ژنوتیپ‌های پوشینه‌دار و بدون‌پوشینه را از هم تفکیک نماید. همچنین وجود چند والد مشابه در شجره برخی ژنوتیپ‌ها (مثل ۳ و ۱۲ و یا ۱۴ و ۱۸) نیز در این گروه‌بندی تأثیر قابل توجهی داشت. در مجموع این نتایج مطالعه بر روی جو دیم با آغازگرهای SSR، نشان داد که این آغازگرها در گیاه جو کارایی بالایی دارند و نشانگرهای مورد استفاده توانستند تمامی ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی از هم جدا کنند.

واژه‌های کلیدی: جو دیم، پوشینه، اطلاعات چندشکلی، نشانگر مولکولی ریزماهواره

* نویسنده مسئول: احمد اسماعیلی
E-mail: ahmad_ismaili@yahoo.com

مقدمه

گیاه زراعی جو (*Hordeum vulgare* L.) در میان غلات بعد از گندم، برنج و ذرت از نظر سطح و تولید چهارمین محصول دنیا محسوب می‌شود. اما با توجه به این گیاه زراعی در شرایط متنوع آب و هوایی قابل کشت است، از نظر دامنه گسترش کشت مقام اول را داراست (Feug *et al*., 2006). بیش از ۱۳۳ میلیون تن جو هر ساله در جهان تولید می‌شود که مورد استفاده عمده آن در تغذیه دام، طیور و صنعت می باشد (Zong-Yun *et al*., 2006b). در ایران بعد از گندم، جو مهمترین گیاه زراعی می‌باشد و سطح برداشت شده جو کشور در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ حدود ۱/۶ میلیون هکتار برآورد شده که که ۵۸/۹ درصد سطح کل زیر کشت این گیاه به‌صورت دیم می‌باشد. مناطق عمده کشت دیم جو در کشور شامل استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، فارس، همدان، کردستان، زنجان، اردبیل، ایلام، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد، لرستان، مرکزی و خراسان می‌باشد. متوسط عملکرد جو در کشور ایران در شرایط دیم حدود ۱ تن و در شرایط آبی حدود ۳ تن در هکتار گزارش شده است. استان لرستان با داشتن حدود ۱۳۹ هزار هکتار بیشترین سطح کشت دیم را در میان استان‌های کشور دارد که حدود ۱۰ درصد کل سطح زیر کشت گیاه مذکور در کشور است (Anonymous, 2012). آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد میزان آن در ژرم‌پلاسم گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح‌نباتات به‌شمار می‌رود. در گیاهان مختلف نشانگرهای مورفولوژیکی، آیزوزایم‌ها، پروتئین‌های ذخیره‌ای و نیز نشانگرهای DNA برای بررسی تنوع و تعیین روابط ژنتیکی افراد استفاده شده‌اند ولی به‌علت محدودبودن تعداد نشانگرها و تأثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به‌عنوان ابزارهای مطمئن و مکمل برای تعیین سطح تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی استفاده می شوند (Zhangh *et al*., 2003). از نشانگرهای مبتنی بر DNA برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی از جمله جو استفاده گسترده‌ای می‌شود (Matus and Hayes, 2002). ریزماهواره‌ها از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که به‌علت ویژگی‌های منحصر به فرد مورد استقبال فراوان محققین قرار گرفته‌اند (Varshney *et al*., 2004). این نشانگرها به‌دلیل چندشکلی بالا، توارث‌پذیری، هم‌بارز بودن و فراوانی در گیاهان، نشانگرهای موفقی برای دامنه وسیعی از کاربردها از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گزینش به‌کمک نشانگر، مطالعات ژنتیک جمعیت، انگشت‌نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌نامه‌ها و مشخص‌کردن میزان تغییرات تنوع‌ژنتیکی در ژرم‌پلاسم هستند (Gutpa *et al*., 2003). توالی‌های احاطه‌کننده جایگاه‌های ریزماهواره‌ای، در داخل یک گونه یا در گونه‌های داخل یک جنس و به‌ندرت در جنس‌های خویشاوند حفاظت‌شده هستند و از آن ها می‌توان برای طراحی آغازگر به منظور تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره‌ای استفاده کرد (Ivandic *et al*., 2002). فراوانی ریزماهواره‌ها در ژنوم، سطح بالای تنوع آللی در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای و سهولت به‌کارگیری این نشانگرها، آن‌ها را از سایر نشانگرهای ژنتیکی متمایز ساخته است (Gutpa, 2002). در تحقیقی از ۵۲ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۳ رقم جو وحشی و ۵۶ رقم جو بومی (جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف چین) و یک رقم زراعی از این گیاه مهم زراعی انجام پذیرفت، در مجموع ۲۰۶ آلل در ۵۲ جایگاه ریزماهواره برای ۹۰ توده جو به‌دست آمد. تعداد آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره بین ۱ تا ۹ آلل با میانگین ۴ بود. متوسط میزان اطلاعات چندشکلی ۰/۷۴ گزارش شد که این میزان برای جوهای وحشی از صفر تا ۰/۸۱ با متوسط ۰/۵۴ و برای جوهای بومی در محدوده ۰ تا ۰/۹۷ با متوسط ۰/۴۹ متغیر بود (Feug *et al*., 2006). Ebrahimi *et al*., (2010) تنوع‌ژنتیکی ۷۳ نمونه جو ایران از دو گونه *H. spontaneum* و *H. vulgare* را با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و گزارش نمودند که نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی تنوع در هر دو گونه *H. Vulgare* و *H. spontaneum* سودمند هستند. Matus and Hayes, (2002) به‌منظور تعیین تنوع‌ژنتیکی ژرم‌پلاسم جو از نشانگرهای SSR استفاده کردند و در مجموع ۶۸۷ آلل در ۴۲ جایگاه‌ژنی در ۱۴۷ ژنوتیپ شناسایی شدند. تعداد آلل‌ها از ۴ تا ۳۱ با میانگین ۱۶/۳ و PIC بین ۰/۸۰ تا ۰/۹۴ متغیر بود. براساس تجزیه خوشه‌ای، سطح بسیار بالایی از تنوع در ارقام بومی و سطح‌پایینی از تنوع در ژرم‌پلاسم اصلاح‌شده، مشاهده شد. این محققین نتیجه گرفتند که نشانگرهای SSR اطلاعات بسیار مفیدی را برای گروه‌بندی ژرم‌پلاسم جو ارائه می‌دهند. Bothmer Von *et al*. (1991) به‌منظور بررسی تنوع‌ژنتیکی در هفت رقم جو زراعی، از ۱۰ نشانگر SSR استفاده کرد و در مجموع ۶۵ آلل با میانگین ۹/۲ آلل در هر لوکوس را گزارش نمودند، میزان PIC بین ۰/۸ تا ۰/۸۸ با میانگین ۰/۸۴ متغیر بود. این آزمایش به‌منظور بررسی تنوع‌ژنتیکی و روابط خویشاوندی،

لاین‌ها و ژنوتیپ‌های پوشینه‌دار و بدون‌پوشینه جو دیم با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مطالعه شده در این آزمایش شامل۲۰ نمونه پوشینه‌دار و بدون‌پوشینه جو دیم که از مرکز تحقیقات کشاورزی مرکز لرستان تهیه شد. نام و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ درج شده‌است. این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه زراعت و اصلاح‌نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان اجرا گردید. در این آزمایش از ۱۴ جفت آغازگر استفاده شد که انتخاب آن‌ها براساس نتایج تحقیقات قبلی و با توجه به معیار میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و درصد تنوع ژنی بالا صورت گرفت (جدول۲). استخراج DNA ژنومی بر اساس روش تغییریافته CTAB که به روش DArT (Jaccoud *et al*., 2001) شناخته شده است، انجام گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸درصد تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۵ میکرولیتر با اجزای ۶ میکرولیتر DNA الگو ۵۰ نانوگرم، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10x از نوع Complete PCR buffer، ۰/۳ میلی‌مولار dNTPS، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب که غلظت ۱ پیکومول دارند، ۱/۵ واحد آنزیم Taqپلی‌مراز و آب دو بار تقطیر انجام شد. مراحل اجرای واکنش به‌ترتیب اشاره شده انجام گردید: چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه حرارتی که شامل مرحله واسرشته‌سازی چرخه‌ای در دمای ۹۴ به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۶۲- ۵۴ (با توجه به دمای گرادیانت هرآغازگر) به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط چرخه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۳۰ ثانیه و در نهایت دما و زمان بسط رشته به‌ترتیب ۷۲ درجه و ۵ دقیقه در نظر گرفته شدند. پس از انجام مراحل تکثیر به هر نمونه ۳ میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی ژل رد اضافه شد و الکتروفورز محصولات تکثیرشده با استفاده از ژل آگارز ۳/۵ درصد به‌مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۹۴ انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: الگوهای نواری به‌صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیازدهی شدند. از نتایج حاصل برای محاسبه ماتریس تشابه براساس ضریب تشابه جاکارد و در انتها از این ماتریس تشابه (جدول ۴) برای تجزیه کلاستر با نرم‌افزار NTSYS.pc بر اساس روش UPGMA استفاده شد.

جدول۱- نام/شجره ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق

ردیف Row	نام/شجره Name/Pedigree	مشخصات ژنوتیپ‌ها Special genotypes	
۱	Mahor	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۲	Viringas/3/H.Sponta.21-3/Arar84/W12269/4H	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۳	DD-21/4/Aliso/C130.9.2//HB602/3/NALA/SO/ya	دو ردیفه	بدون‌پوشینه
۴	Atahualpa/Tarida	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۵	W13159/6/ANCA/2469/TOGI/3/SHYRI/4/ATACO/5/A	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۶	Izeh	شش‌ردیفه	پوشینه‌دار
۷	W131180/4/aliso/c139.902//HB602/3/MLO/SHY	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۸	Atahualpa/DD-21	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۹	Caimr/F6NB2/KHOMES	شش‌ردیفه	پوشینه‌دار
۱۰	BKFMAGUELONE1604/3/APRO//SV.02109/MARI/U/GIZA	شش‌ردیفه	پوشینه دار
۱۱	PETUNIA1/8/POST/COPAL/5/GLORIA	شش‌ردیفه	بدون پوشینه
۱۲	DD-21	دو ردیفه	بدون پوشینه
۱۳	BF891M-59//ACC#116131-COII#8901-44-GIZO	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۴	ATAHVALPA/5/ALGER/CERES//SIS/3/ER/APM/4/W12197	شش‌ردیفه	پوشینه‌دار
۱۵	Atahulpa/Barque	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۶	Soufara-02/RM1508/POR/W12269/41/AML-O2/ARABI/ ABIADNER/APM	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۷	ALANDA/ZAFARA/ATHUALPA/5/LIGNEE527/CHNO1/ GU/STORE/4/RHNO8/3/DEIIALLON/106/PL71/STRAIN205	شش‌ردیفه	پوشینه‌دار
۱۸	ALGER/Ceres/SIS/3/En/APM/4/W12197/MAZURKA	دو ردیفه	پوشینه‌دار
۱۹	ATAHULPA/IPA99	شش‌ردیفه	پوشینه‌دار
۲۰	2HE DARII2/NDBII2//MORA/5/B1-BAR//MARI	دوردیفه	پوشینه‌دار

جدول ۲- نام و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

شماره آغازگر Primer No.	اسم آغازگر Name of primer	توالی رفت Forward sequence	توالی برگشت Reverse sequence	دمای اتصال Annealing Temp. (°C)	منبع Reference
1	Bmag 0211	5ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC3´	5ACATCATGTCGATCAAAGC3´	55/9	Heidari *et al.*, 2011
2	Bmag 0225	5AACACACCAAAAATATTACATCA3	5´CGAGTAGTTCCCATGTGAC3´	61/6	Heidari *et al.*, 2011
3	Hvm 20	5CTCCACGAATCTCTGCACAA3´	5CACCGCCTCCTCTTTCAC3´	61/6	Ebrahimi *et al.*, 2010
4	Hvm40	5CGATTCCCCTTTTCCCAC3´	5ATTCTCCGCCGTCCACTC3´	55/9	Heidari *et al.*, 2011
5	Hvm74	5AGGAAGTCATTGCGTGAG3´	5TGATCAAGAATGATAACATGG3´	55/9	Ebrahimi *et al.*, 2010
6	Hvm60	5CAATGATGCGGTGAACTTTG3´	5CCTCGGATCTATGGGTCCTT3´	55/9	Ebrahimi *et al.*, 2010
7	Hvm54	5AACCCAGTAACACCGTCCTG3´	5AGTTCCCTGACCCGATGTC3´	54/7	Heidari *et al.*, 2011
8	Hvm36	5´TCCAGCCGAATTTCTTG3´	5AGTACTCCGACACCACGTCC3´	55/9	Jun-mei *et al.*,2010
9	Hvm 33	5ATATTAAAAAAGGTGGAAAGCC3´	5CACGCCCTCTCCCTAGAT3´	61/6	Ebrahimi *et al.*, 2010
10	Bmac 0134	5CCAACTGAGTCGATCTCG3´	5CTTCGTTGCTTCTCTACCTT3´	55/9	Jun-mei *et al.*,2010
11	Bmac 0032	5CCATCAAAGTCCGGCTAG3´	5GTCGGGCCTCATACTGAC3´	54/7	Ganjkhanloo *et al.*,2010
12	Bmac 0040	5AGCCCGATCAGATTTACG3´	5CGAGTAGTTCCCATGTGA3´	54/7	Heidari *et al.*, 2011
13	Ebmac 679	5ATTGGAGCGGATTAGGAT3´	5CCCTATGTCATGTAGGAGATG3´	55/9	Ganjkhanloo *et al.*,2010
14	Bmag 0223	5 ´TTAGTCACCCTCAACGGT 3´	5 ´CCCCTAACTGCTGTGATG 3´	55/8	Heidari *et al.*, 2011

نتایج و بحث

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای‌پلی‌مراز روی ژل الکتروفورز تفکیک گردید (شکل ۱) و پس از بررسی کلیه نتایج حاصله، دیده شد چهارده جفت آغازگر مورد استفاده الگوهای نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند (جدول۳). در مجموع ۳۹۴ آلل در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی با میانگین ۲۸/۲ به ازای هر نشانگر تکثیر شدند. از کل تعداد آلل‌ها، بیشترین تعداد مربوط به آغازگرهای Hvm60 و Hvm20با ۵۴ و ۴۳ عدد و کمترین تعداد مربوط به آغازگرهای Bmag0223 و Bmac0032 با ۲۰ عدد بود. از آنجایی‌که میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره، مناسب‌بودن هر جایگاه را برای تخمین تنوع زنتیکی نشان می‌دهد، بنابراین آغازگرهایی با تعداد آلل بیشتر برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر به‌نظر می‌رسند. Zong-Yun *et al.*, (2006a)، ۲۴۸ آلل در ۳۵ جایگاه SSR در ۶۵ ژنوتیپ جو، Pandey *et al.*, (2004)، ۱۶۵ آلل با میانگین ۶/۱ آلل در ۲۷ جایگاه SSR در ارزیابی ۱۰۷ ژنوتیپ جو گزارش کردند. Hamida and Hamza, (2004) با ارزیابی ۲۶ ژنوتیپ جو با استفاده از ۱۵ نشانگر SSR، میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه را ۳/۶ آلل گزارش کردند. نشانگرهای مورد استفاده در این تحقیق با توجه به میانگین تعداد آلل به ازای هر نشانگر که ۲۸/۲ به‌دست آمد در مقایسه با پژوهش‌هایی که قبلاً انجام شده و به آن‌ها اشاره شد، جهت تخمین تنوع‌ژنتیکی در گیاه جو مناسب به‌نظر می‌رسند. علت تفاوت در تعداد آلل در بین پژوهش‌های مختلف می‌تواند به‌دلیل تعداد متفاوت ژنوتیپ‌ها و تفاوت در پایه ژنتیکی آن‌ها باشد. از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که برخی از آغازگرها در بعضی از ژنوتیپ‌ها هیچ نواری را تکثیر نمی‌کنند؛ به‌عنوان مثال دیده شد که آغازگر Hvm36 در ژنوتیپ‌های شماره ۱۷ و ۳ هیچ باندی را تولید نکرد.

جدول۳- تعداد باندها و میزان اطلاعات چندشکلی هر کدام از آغازگرهای اختصاصی SSR

نام آغازگر Name of primer	کل باندها Total bands	میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)
Bmag0211	27	0.45
Bmag0225	25	0.43
Hvm20	43	0.73
Hvm40	33	0.55
Hvm36	20	0.35
Hvm33	25	0.58
Bmac0134	28	0.64
Bmac0032	20	0.32
Ebmac679	25	0.41
Bmag0223	20	0.35
Hvm60	54	0.88
Hvm54	21	0.33
Bmac0040	28	0.40
Hvm74	25	0.45
Total	394	0.50

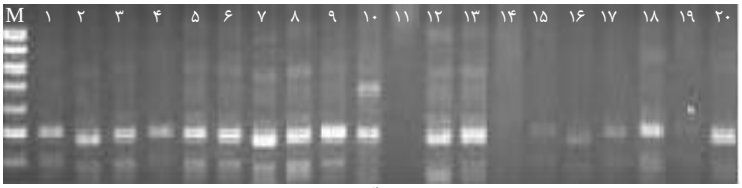
با توجه به کیفیت مناسب DNA الگو و همچنین چند بار تکرار آزمایش، به نظر می‌رسد که در ژنوتیپ‌های مذکور وقوع جهش در یک یا دو طرف ناحیه تکرارشونده مانع از چسبیدن پرایمرها و تکثیر ناحیه بین دو آغازگر شده است. میزان اطلاعات چندشکلی در مجموع نشانگرهای مورد استفاده بین ۰/۸۸ و ۰/۳۲ با میانگین ۰/۶ متغیر بود. بیشترین PIC مربوط به آغازگرهای Hvm60 و Hvm20 به‌ترتیب با مقادیر ۰/۸۸ و ۰/۷۳ بود و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر Bmac0032 با مقدار۰/۳۲ بود (جدول ۳). می‌توان گفت که دو نشانگر Hvm60 و Hvm20 قدرت تمایز بالاتری را در این گروه از ژنوتیپ‌ها داشتند. میزان اطلاعات چندشکلی در مطالعه Stam *et al.*, (2007) ۰/۴۸، Peterson *et al.*, (1994) ۰/۴۶ و Hamida and Amza, (2004) ۰/۴۳، Kadri *et al.*, (2009) ۰/۵۳ گزارش گردید. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر می‌باشد (Varshney *et al.*, 2004). تشکیل ماتریس تشابه و گروه‌بندی براساس داده‌های نشانگرهای SSR با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام و دندروگرام آن رسم شد (جدول ۴ و شکل۲). ارزش‌های تشابه بین ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از ۰/۳ تا ۰/۹۶ را داشتند. میانگین تشابه ژنوتیپها ۰/۶۳ بود. بیشترین تشابه ژنتیکی مربوط به ژنوتیپ‌های شماره ۶ (رقم زراعی ایذه) و ۵ (لاین امیدبخش) با ۰/۹۶ بود و کمترین تشابه مربوط به ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ (پوشینه‌دار) و ۱۰ (پوشینه‌دار) با ۰/۳ مشاهده شد. ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های شماره ۳ و ۱۱، ۳ و ۱۲، ۱۱ و ۱۲ که همگی جو دانه لخت هستند به‌ترتیب برابر ۰/۶، ۰/۷۲ و ۰/۸۵ بود. دیده می‌شود که ژنوتیپ ۳ شباهت بیشتری به ژنوتیپ ۱۲ در مقایسه با ژنوتیپ ۱۱ دارد که این موضوع علاوه بر اینکه هر دو دوردیفه هستند، به اشتراک والدین جدی آن‌ها در چند نسل هم می‌تواند مرتبط باشد. مقایسه بین ضریب تشابه‌ژنتیکی و خصوصیات ظاهری (پوشینه‌دار و بدون‌پوشینه، شش‌ردیفه و دو ردیفه) ژنوتیپ‌های ذکرشده نشان از تطابق تشابه‌ژنتیکی و تشابه ظاهری این ژنوتیپ‌ها دارد، لذا علاوه بر تشابه‌ژنتیکی از خصوصیات ظاهری هم می‌توان به‌عنوان یک اهرم جهت تمایز و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده نمود.

نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه در ۵ گروه قابل ارائه است (شکل ۲).

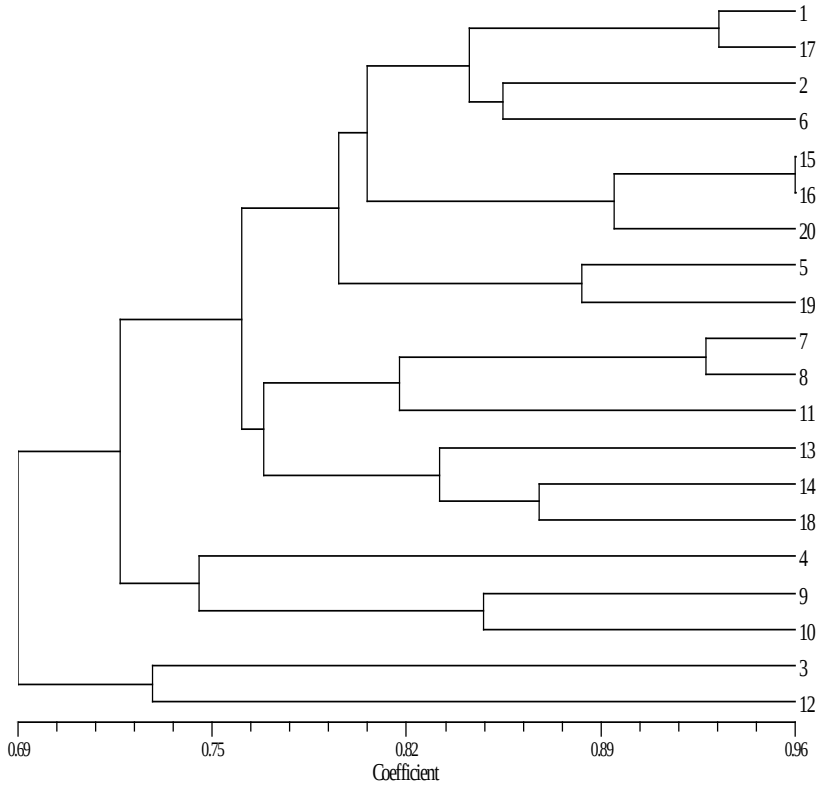
گروه اول: شامل ۱۵ ژنوتیپ (۱۷، ۱، ۲، ۶، ۱۵، ۱۶، ۲۰، ۵، ۱۹، ۷، ۸، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۸) می‌باشد، در این گروه با توجه به جدول ماتریس تشابه، بیشترین شباهت (۰/۹۶) بین ژنوتیپ‌های شماره ۵ و ۶ که هر دو پوشینه‌دار هستند، وجود داشت. با ترسیم خط برش در فاصله ۰/۸ این گروه به دو زیرگروه تفکیک شده که عبارتند از: زیر گروه اول که خود دارایدو زیرمجموعه می‌باشد. در زیرمجموعه اول ژنوتیپ‌های

جدول۴- ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های جو

ردیف	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1																			
2	0/86	1																		
3	0/61	0/83	1																	
4	0/77	0/8	0/83	1																
5	0/84	0/77	0/81	0/81	1															
6	0/95	0/85	0/92	0/85	0/96	1														
8	0/63	0/7	0/8	0/76	0/74	0/82	0/86	1												
9	0/68	0/6	0/7	0/6	0/66	0/75	0/76	0/7	1											
10	0/66	0/8	0/73	0/76	0/6	0/7	0/8	0/65	0/65	1										
11	0/7	0/6	0/6	0/6	0/61	0/66	0/55	0/65	0/6	0/75	1									
12	0/77	0/7	0/73	0/7	0/77	0/82	0/69	0/73	0/7	0/73	0/85	1								
13	0/75	0/75	0/85	0/78	0/73	0/84	0/76	0/71	0/75	0/3	0/75	0/82	1							
14	0/72	0/73	0/83	0/8	0/74	0/82	0/82	0/76	0/73	0/8	0/75	0/83	0/92	1						
15	0/8	0/82	0/71	0/82	0/84	0/84	0/76	0/71	0/67	0/83	0/83	0/82	0/73	0/78	1					
16	0/72	0/88	0/73	0/8	0/73	0/79	0/7	0/65	0/65	0/81	0/76	0/69	0/83	0/73	0/83	1				
17	0/68	0/73	0/63	0/73	0/66	0/67	0/73	0/7	0/6	0/69	0/8	0/7	0/71	0/8	0/78	0/8	1			
18	0/68	0/66	0/63	0/73	0/77	0/75	0/69	0/76	0/73	0/61	0/65	0/76	0/57	0/66	0/82	0/65	0/73	1		
19	0/72	0/76	0/73	0/83	0/7	0/75	0/78	0/73	0/56	0/76	0/75	0/66	0/67	0/76	0/85	0/69	0/76	0/7	1	
20	0/81	0/86	0/83	0/93	0/88	0/89	0/78	0/76	0/6	0/76	0/7	0/76	0/78	0/8	0/89	0/84	0/8	0/8	0/83	1



شکل ۱- الکتروفورز ژل محصول PCR ژنوتیپ‌های جو با آغازگرHvm40. نشانگر اندازه مورد استفاده ۱۰۰bp می‌باشد.



شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو دیم مورد آزمایش با استفاده از ضریب تشابه جاکارد براساس داده‌های نشانگرهای ریزماهواره

شماره ۱، ۱۷، ۲، ۶، ۱۵، ۱۶ و ۲۰ قرار می‌گیرند که تمامی ژنوتیپ‌هایی این گروه نیز پوشینه‌دار هستند. در زیرمجموعه‌ی دوم ژنوتیپ‌های شماره ۵ و ۱۹ قرار گرفته‌اند که هر دو این ژنوتیپ‌ها نیز پوشینه‌دار هستند. *زیر گروه دوم* خود به دو زیر مجموعه قابل تقسیم است. اولین زیرمجموعه شامل ژنوتیپ‌های شماره ۷، ۸ و ۱۱ بوده که ژنوتیپ‌های شماره ۷ و ۸ پوشینه‌دار و دو ردیفه هستند و زیرمجموعه دوم شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱۳، ۱۴ و ۱۸ می‌باشند که هر سه ژنوتیپ پوشینه‌دار و ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ و ۱۸ دو ردیفه هستند.

گروه دوم: ژنوتیپ شماره ۴ در این گروه قرار گرفت؛ این ژنوتیپ بیشترین شباهت (۰/۹۳) را با ژنوتیپ شماره ۲۰ نشان‌داد که بیانگر شباهت ژنتیکی بالای آن‌ها می‌باشد. این دو ژنوتیپ شش‌ردیفه و پوشینه‌دار هستند.

گروه سوم: شامل ژنوتیپ‌های شماره ۹ و ۱۰ می‌باشد که هر دو شش‌ردیفه و پوشینه‌دار هستند و با یکدیگر ۰/۶۵ تشابه دارند که درصد نسبتاً بالایی می‌باشد.

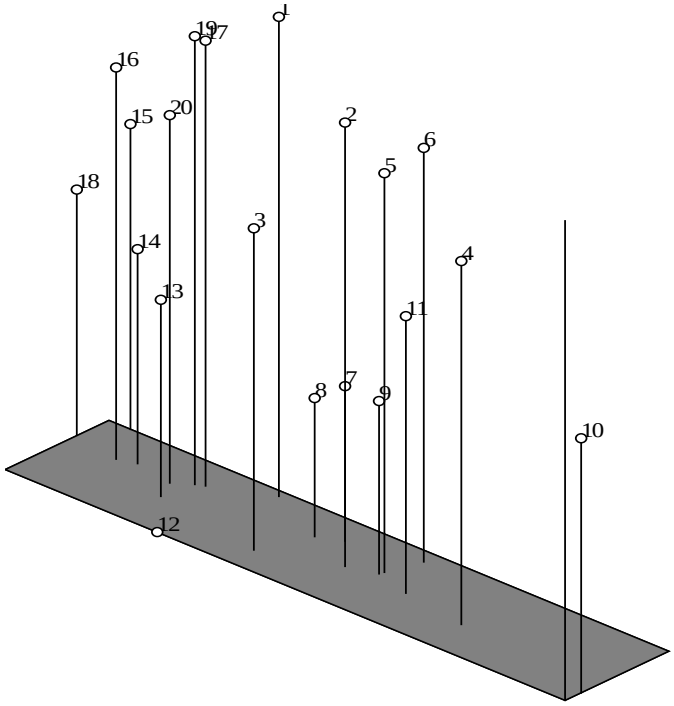
گروه چهارم: ژنوتیپ شماره ۳ در این گروه قرار گرفت که بیشترین شباهت (۰/۹۲) را با ژنوتیپ شماره ۶ نشان داد که درصد نسبتاً بالایی محسوب می‌شود.

گروه پنجم: شامل ژنوتیپ شماره ۱۲ می‌باشد که بیشترین شباهت (۰/۸۵) را با ژنوتیپ ۳ داشت و هر دو این ژنوتیپ‌ها دو ردیفه و بدون‌پوشینه هستند.

به‌طور کلی شباهت ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها که در یک گروه قرار دارند، می‌تواند مبین این باشد که این نمونه‌ها به احتمال زیاد تحت تأثیر شرایط آب و هوایی مشابه، تغییرات ژنتیکی مشابه در طول سالیان زیاد در آن‌ها اتفاق افتاده‌است. Matus and Hayes, (2002) نیز دریافتند که الگوی گروه‌بندی مرتبط با منشاء و پراکنش جغرافیایی گونه‌هاست.

موضوع دیگری که در خصوص شباهت این ژنوتیپ‌ها باید در نظر گرفته شود وجود والدین مشابه در شجره برخی ژنوتیپ‌ها می‌باشد. ملاحظه می‌گردد که قسمت قابل توجهی از شجره دو ژنوتیپ بدون‌پوشینه ۳ و ۱۲ مشترک هستند. بنابراین یکی از دلایلی که این دو ژنوتیپ در تجزیه گروه‌بندی در دو گروه کاملاً نزدیک به هم قرار گرفته‌اند می‌تواند به شجره مشترک آن‌ها مربوط باشد. حال آن‌که ژنوتیپ شماره ۱۱ که بدون‌پوشینه است به‌دلیل داشتن شجره متفاوت با دو ژنوتیپ فوق در فاصله دورتری از آن‌ها قرار گرفته است. همچنین در زیر گروه دوم از گروه اول ژنوتیپ‌های ۴ و ۱۸ قرار گرفته‌اند که هر دو دارای چندین والد مشابه در شجره هستند و در زیر گروه اول از همین گروه ژنوتیپ‌های ۱۵ و ۱۹ و ژنوتیپ‌های ۲ و ۱۶ دارای یک جد مشابه در شجره هستند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل تشابه برخی ژنوتیپ‌ها داشتن والد یا والدین مشترک است و این امر موجب شده توالی‌های مشترکی در آن‌ها توسط آغازگرها تکثیر شود.

تجزیه به مختصات اصلی کاربرد زیادی در تجزیه تنوع ژنتیکی دارد. میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل است و به‌صورت درصد بیان می‌شود. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) (شکل ۳) نشان داد که مؤلفه‌های اول و دوم به‌ترتیب ۶۸ و ۶/۵ درصد از تغییرات نمونه‌ها را در برمی‌گیرند. این دو مؤلفه در مجموع ۷۴/۵ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند. در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، بهتر است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسب در سطح ژنوم داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را تا حدودی پوشش دهند. بنابراین اگر نشانگر از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها لازم است.



شکل ۳- نمودار مربوط به پراکندگی ۲۰ ژنوتیپ جو دیم با آزمون تجزیه مختصات اصلی

در این مطالعه نیز توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط دو مؤلفه اولیه، دال بر توزیع مناسب نشانگرهای استفاده شده بر روی ژنوم می‌باشد. در نمودار تجزیه مختصات اصلی ژنوتیپ‌های شماره ۱۳،۱۴،۲۰،۱۶،۱۵،۱۹،۱۸و۱۷ که همگی پوشینه‌دار هستند در موقعیت نسبتاً نزدیکی نسبت به یکدیگر قرار گرفتند. ژنوتیپ شماره ۱۲ که دو ردیفه می‌باشد در فاصله دورتری قرار گرفت و ژنوتیپ‌های شماره ۴ و۱۰ که دوردیفه و پوشینه‌دار هستند جدا از یکدیگر و سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشند. این نتایج بیانگر این است که گروه‌بندی حاصل از تجزیه مختصات اصلی نسبتاً با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مطابقت دارد. برای نشان‌دادن میزان همبستگی میان ماتریس ورودی (داده‌های مولکولی) و ماتریس خروجی، ضریب همبستگی کوفنتیک برای داده‌های مولکولی محاسبه شد و عدد ۰/۷۹ به‌دست آمد که نشان می‌دهد ۰/۷۹ ماتریس ورودی به

دندروگرام منتقل شده‌است. ضریب کوفنتیک به‌دست آمده نشان می‌دهد همبستگی بالایی بین داده‌ها وجود ندارد. در مجموع به‌نظر می‌رسد هرچند که ژنوتیپ‌های بدون‌پوشینه به‌طور کامل در یک گروه قرار نگرفتند و نیز ژنوتیپ‌های دوردیفه و شش‌ردیفه کاملاً از یکدیگر تفکیک نشدند، ولی نشانگرهای موردمطالعه دارای توانایی نسبتاً بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌های شش‌ردیفه و دو ردیفه و بدون‌پوشینه و پوشینه‌دار از یکدیگر می‌باشند. لذا از این نشانگرها می‌توان برای غربال اولیه ژنوتیپ‌ها و تمایز ژنوتیپ‌های با ظاهر مشابه از بقیه ژنوتیپ‌ها استفاده نمود و ابزار مناسبی برای تفکیک و شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف جو می‌باشند. با توجه به اینکه اطلاعات ژنتیکی به‌دست‌آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، بنابراین برای انتخاب ژنوتیپ برتر دارای ارزش بالایی هستند. نتایج این تحقیق می‌تواند در جهت برنامه‌ریزی اصلاحی به‌منظور ایجاد جمعیت‌های متنوع‌تر مدنظر قرار گیرد. انتخاب و استفاده از تعداد بیشتری آغازگر SSR با پراکنش کروموزومی بالا جهت پژوهش‌های کاربردی آتی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از بخش اصلاح بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان به خاطر همکاری در تهیه بذور ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش و همچنین دانشگاه پیام نور تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Anonymous (2012) Agricultural statistics: crop production of 2011-2012. Information and communications technology center of ministry of Jihad-e-Agriculture. Available at: http://dpe.agri-jahad.ir/statistics.

Bothmer Von R, Jacobsen N, Baden C, Jrgensen RB, Linde Laursen I (1991) An ecogeographical study of *Hordeum* genus. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. pp: 127.

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

Ebrahimi A, Naghavi MR, Sabokdast M, 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(3) 333-345.

Feug ZY, Liu XJ, Zhang YZ, Ling HQ (2006) Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR markers. Acta Genetica Sinica.

Gutpa PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumer N, Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat .Mol. Genet. Genomics. 270:315-323.

Gutpa PK (2002) Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. Theor. Appl. Genet., 105: 413-422.

Heidari A, Mohammadi SA, Moghadam M, Shakiba MR, Ghasemi Golezani K, Ysefi A (2011) Assessment of genetic diversity barley genotypes using SSR and EST-SSR markers. Iranian Journal of Crop Sciences. 13(1): 146-156.

Hamida WB, Hamza S (2004) SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. Euphytica 135: 107-118.

Ivandic V, Hackett CA, Nevo ER, Keith WT, Thomas B, Forster B (2002) Analysis of sequence repeats (SSR) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. Plant Mol. Biol. 48: 511-527.

Jaccoud D, Peng K, Feinstein D and Kilian A (2001) Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Research 29: 25-31.

Kadri A, Zarai Z, Chobba IB, Bekir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R (2009) Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. J. Med. Plants Res., 5: 6502-6508.

Matus IA, Hayes PM (2002) Genetic diversity in three groups of barley germplasms assessed by simple sequence repeats. Genome. 45: 1095-1106.

Pandey MP, Wagner C, Friedt W, Ordan F (2004) Assessment of genetic diversity of hull-less barley germplasm in the high altitude Himalayes of Nepal. Theor. Appl.

Genet.113:715-729.

Petersen L, Ostergard H, Giese H (1994) Genetic diversity among wild and cultivated barley as revealed by RFLP. Theor. Appl. Genet. 89:676-681.

Stam BK, Bothmer A, Dayteg R, Rashal C, Tuvesson S, Weibullj S (2007) Genetic diversity changes and relationships in spring barley germplasm of Nordic and Blatic areas as shown by SSR markers. Genet. Res. Crop Evol. 16: 749-758.

Varshney RK, Granera A and Sorrellsb ME (2004) Genetic microsatellite markers in plants: Features and application. Trend Biotech. 23:48-55.

Zhangh, De-Xing, Godfry MH (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Mol. Ecology. 12: 563-584.

Zong-Yun F, Li-Li Z, Yi-Zhang Z, Hong-Qing L (2006a) Genetic and mapping of genetic microsatellites in barley (*Hordeum vulgare* L.) Plant Breed. 41:153-159.

Zong-Yun F, Xian-Jun L, Yi-Zhang Z, Hong-Qing L (2006b) Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR marker. Acta Genetica Sinica, 33: 917-923.