

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ایرانی و غیر ایرانی جو با استفاده از نشانگرهای SSR

فرزان لاهوت^۱، مهرشاد زین‌العابدینی^{۲*}، جابر کریمی^۳، مریم شهبازی^۴، بهزاد صادق‌زاده^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۲. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

۳. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۴. استادیار، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم، مراغه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۲۶)

Assessment of genetic diversity of Iranian and non-Iranian barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) using SSR markers

Farzan Lahoot¹, Mehrshad Zeinolabedini^{2*}, Jaber Karimi³, Maryam Shahbazi², Behzad Sadeghzadeh⁴

1. M.Sc. of Agriculture Biotechnology, Shahed University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Shahed, Tehran, Iran

4. Assistant Professor, Dryland Agriculture Research Institute of Iran, Maragheh, Iran

(Received: June 30, 2016 - Accepted: Oct. 17, 2016)

Abstract

Genetic diversity is the best way to use available genetic potential for breeding programs in barley. In this study, genetic diversity of 63 Iranian and non-Iranian genotypes have been described. 29 out of 30 pairs microsatellite markers were polymorphic. A total of 225 alleles for different gene loci with an average of 2.7 per locus were identified. The highest number of alleles for Bmag0323, Hvm54 and EBmac679 (with 13 alleles) and the lowest number for the HVM0003 (with two alleles), respectively. The PIC amount and Shannon index value were variable ranging from 0.89 (for the EBmac679) to 0.21 (for the GBM1176) and from $I=2.46$ (for the Bmag0323) to $I=0.48$ (for the GBM1176), respectively. Genotype clustering was done using Neighbor-net and Cluster analysis was performed using Bayesian methods. The best number of sub-populations was identified 4 that were seen in most sub-populations genotypes originating from Iran. The results of clustering of Neighbor-net method showed good agreement with the model-based approach. The results showed that microsatellite markers well represented different genotypes of barley diversity. Also according to the results, native genotypes showed more diversity.

Keywords: Barley, Cluster analysis, Genetic diversity, Microsatellite marker.

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی بهترین راه برای استفاده از ظرفیت ژنتیکی موجود در گیاه جو جهت برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد. در این بررسی تنوع ژنتیکی ۶۳ ژنوتیپ ایرانی و غیر ایرانی جو تشریح شده است. از ۳۰ جفت نشانگر ریزماهوره استفاده شده، ۲۹ جفت چندشکلی مشاهده شد. در مجموع ۲۲۵ آلل برای مکان‌های ژنی مختلف با میانگین ۲/۷ برای هر آغازگر شناسایی گردید. بیشترین تعداد آلل برای جایگاه‌های Bmag0323، Hvm54 و EBmac679 (با ۱۳ آلل) و کم‌ترین تعداد برای جایگاه HVM0003 (با ۲ آلل) بود. میزان PIC از ۰/۸۹ تا ۰/۲۱ (برای جایگاه EBmac679) و مقدار شاخص شانون از $I=2.46$ (برای جایگاه Bmag0323) تا $I=0.48$ (برای جایگاه GBM1176) متغیر بود. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با روش Neighbor-net و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش Bayesian انجام گردید. در این روش بهترین تعداد زیر جمعیت ۴ عدد شناسایی شد که در اکثر زیرجمعیت‌ها ژنوتیپ‌های با منشاء ایران دیده شدند. نتایج گروه‌بندی حاصل از روش Neighbor-net با روش مبتنی بر مدل مطابقت زیادی نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ریزماهوره تنوع ژنوتیپ‌های مختلف جو را به‌خوبی نمایش می‌دهند. همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده، ژنوتیپ‌های بومی ایران نیز تنوع بالایی را از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: جو، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهوره.

مقدمه

گیاه جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) یکی از گیاهان مهم تیره غلات یا گندمیان (*Poaceae*) است که گونه‌های زراعی آن دیپلوئید ($2n=2x=14$) هستند (Bothmer et al., 2003). جو از اولین غلاتی است که حدود ده هزار سال پیش توسط انسان در منطقه بین‌النهرین^۱ اهلی شده است (Muñoz-Amatriaín et al., 2014). این گیاه از نظر تولید جهانی در رتبه چهارم بعد از گندم، برنج و ذرت قرار می‌گیرد. بیش از ۱۳۳ میلیون تن جو هر ساله در جهان تولید می‌شود که مورد استفاده عمده آن در تغذیه دام، طیور و صنعت می‌باشد (Zong-Yun et al., 2006). در سال‌های اخیر به علت استفاده از ارقام اصلاح شده و یکنواختی کشت، تنوع ژنتیکی انواع مختلف گیاهان در معرض خطر قرار گرفته است. علاوه بر این جایگزینی توده‌های بومی جو با ارقام اصلاح شده که سازگاری و تحمل کمتری در مقابل تنش‌های غیرزیستی دارند موجب از بین رفتن منابع ژنتیکی با ارزش برای تولید پایدار در شرایط تغییر اقلیم شده است (Naceur et al., 2012). بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسماهای گیاهی جهت حفظ و نگهداری تنوع ژنتیکی در بانک‌های ژن و ژرم پلاسما و مطالعه دقیق پتانسیل هر یک از ژنوتیپ‌های موجود می‌تواند در پیش‌برد برنامه‌های اصلاحی حائز اهمیت باشد (Soto-Cerda and Cloutier, 2012). همچنین ارزیابی تنوع ژنتیکی حاضر درون ارقام زراعی تاثیر مهمی در برنامه‌های اصلاح‌نیات و حفاظت از منابع ژنی خواهد داشت. ارزیابی اصولی تنوع مولکولی موجود در منابع ژنتیکی جو شرط لازم برای بهره‌برداری مؤثر جهت کارهای اصلاحی برای توسعه راهکارهای مطلوب حفاظت از تنوع ژنتیکی می‌باشد (Pandey et al., 2010).

برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی از نشانگرهای مبتنی بر DNA استفاده گسترده‌ای می‌شود (Staub et al., 1996). ریزماهورها از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که به‌علت ویژگی‌های منحصر به فرد مورد استقبال محققین قرار گرفته‌اند (Ramsay et al., 2000). نقشه کامل جو تاکنون شامل دست کم ۷۷۵ جایگاه ژنی ریزماهوره گزارش شده است (Varshney et al., 2007). شناسایی این نشانگرها به دلیل چندشکلی بالا، توارث پذیری، هم‌باز بودن و فراوانی در گیاه نشانگرهای موقفی برای دامنه وسیعی از کاربردها از جمله مشخص کردن میزان تغییرات تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما هستند (Struss and Plieske, 1998). همچنین این نشانگرها بطور موفقیت‌آمیزی در بسیاری از زمینه‌های تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و تجزیه و تحلیل QTL^۲ در گونه‌های مختلف گیاهان از جمله: پنبه، گندم، ذرت و غیره مورد استفاده قرار گرفته است (Basaki et al., 2011). در تحلیل ریزماهوره‌ای از تنوع ژنتیکی جو، الگوی تنوع ژنتیکی ۵۴ جمعیت و ۴۰ فرد جو خودرو در ایران با ۲۶ جفت نشانگر ریزماهوره مورد آنالیز قرار گرفت. در سطح جمعیتی، مقادیر بالایی از تنوع (۰/۷۱) با متوسط تعداد آلل ۶۰۹۲ آلل در هر مکان ژنی و چندشکلی بالایی به میزان متوسط ۰/۶۷ مشاهده شد (Khodayari et al., 2012). در این بررسی ۶۴ ژنوتیپ جو با استفاده از ۱۴ نشانگر SSR از نظر تنوع ژنتیکی مورد مطالعه قرار گرفتند که تعداد ۸۱ آلل چند شکل و ضریب چند شکلی (PIC) هر مکان ژنی بین ۰/۴۹ تا ۰/۸۹ محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که نشانگر ریزماهوره قادر است چند شکلی بالایی را نمایان سازد و از این رو ابزار مفیدی برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها، دسته‌بندی آن‌ها، ایجاد

ژنتیکی را ۰/۹۷ تا ۰/۱۲ با متوسط ۰/۵۷ گزارش شد. در این مطالعه به علت تنوع بالای ارقام وحشی نسبت به ارقام بومی، میانگین تعداد آلل ۸/۲ به دست آمد (Zong-Yun *et al.*, 2006). این آزمایش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های وحشی ایرانی و غیرایرانی جو با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره جهت استفاده در برنامه‌های به‌نژادی و مطالعات ژنتیکی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در پژوهش حاضر، بذر ۶۳ ژنوتیپ جو ایرانی و غیرایرانی از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور تهیه شد.

کلکسیون هسته و گزینش نشانگری محسوب می‌شود (Hajmansoor *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی ۴۳۰ رقم گندم نان با ۴۰ مکان ژنی SSR مورد بررسی قرار گرفت. برای ۴۰ مکان ژنی ریزماهواره ۵۴۲ آلل شناسایی شد که میانگین تعداد آلل‌های هر مکان ژنی ۱۳/۶ به دست آمد (Leišová *et al.*, 2007). در بررسی روابط ژنتیکی ۱۲ رقم جو از نشانگرهای SSR و RAPD استفاده شد که نشانگرهای SSR تنوع بسیار بالایی را نسبت به RAPD نشان دادند و ارقام به‌خوبی از یکدیگر تفکیک شدند (Karim *et al.*, 2010). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۶ گونه ژنوتیپ وحشی جو با استفاده از ۳۰ آغازگر SSR تعداد آلل را از ۲ تا ۱۶ و با میانگین ۷/۶ آلل به ازای هر جایگاه و میزان تنوع

جدول ۱. منشاء ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

| | | | | | | | | | | |
|----------|-----------|--------|---------|----------|-----------|-------|----------|---------|---------|-------|
| ایران | ایران | ایران | ایران | ایران | ایران | ایران | ایران | ایران | ایران | منشاء |
| ماکویی | میان‌دوآب | بجنورد | گرگان | گلپایگان | تربت جام | کرمان | قزوین | پاکستان | الجزایر | چین |
| انگلستان | اتیوپی | مصر | اسپانیا | روسیه | آذربایجان | ترکیه | ناشناخته | | | |

ارزیابی مولکولی

به‌منظور استخراج DNA ژنومی، نمونه برداری از گیاهچه‌های ۳ تا ۴ برگه‌ای و در مرحله ۴ تا ۵ برگه و از برگ‌های جوان و شاداب انجام شد. سپس DNA ژنومی با استفاده از روش دلاپورتا استخراج گردید (Dellaporta *et al.*, 1983). کیفیت و کمیت DNA استخراجی نیز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و روش طیف سنجی نانودراپ تعیین گردید.

آغازگرهای مورد استفاده و تنظیم شرایط PCR

در این تحقیق از ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره از نوع GBM، HVM، BMAG، EBMAC، BMAC، EBMAG و GBMS استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده در حجم ۱۰ نانوگرم در

میکرولیتر، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰U، ۰/۹ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۱/۲ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰X، ۰/۲ میکرولیتر تک پلیمرز با غلظت ۵U و ۵/۸ میکرولیتر آب دو بار استریل بود. چرخه حرارتی استفاده شده شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی که ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت تاج‌داون برنامه‌ریزی شده بود. به این‌صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و زمان آن نیز ثابت و ۳۰ ثانیه بود.

در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشته‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۴ درجه بود. همچنین زمان و دمای بسط رشته نیز به ترتیب ۱ دقیقه و ۷۲ درجه بود. محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل اکریل آمید واسرشته ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش نیترا ت نقره صورت گرفت.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ریزوماهواره جو مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

| Marker | Primer sequence | Linkage group | Repeat motif |
|-----------|--|---------------|--------------|
| WMC1E8 | TCATTCGTTGCAGATACACCAC TCAATGCCCTTGTTCCTGACCT | 1G | (AC)24 |
| GBM1204 | ATGATCCCACAACACCAACA TGCATGCTATCGTTCCTGTC | 1G | (GGTT)5 |
| Bmag0211 | ATCATCGATCTTGTATTAGTCC ACATCATGTCGATCAAAGC | 1G | (CT)16 |
| EBmac501 | ACTAAGTGCCATGCAAAG AGGGACAAAAATGGCTAAG | 1G | (AC)13 |
| Bmag0711 | GGAGAGTCACATATCAAGGAC CCACTCCTTCTCATACCTTTA | 2G | (GA)21 |
| Hvm54 | AACCCAGTAACACCGTCCTG AGTTCCTGACCCGATGTC | 2G | (GA)14. |
| Bmag378 | CTTTGTTTCCGTAGCATCTA ATCCAACTATAGTAGCAAAGCC | 2G | (AG)14 |
| Bmac0134 | CCAAGTGTGCTGATCTCG CTTCGTTGCTTCTTACCTT | 2G | (AC)28 |
| Bmag0225 | AACACACAAAAATATTACATCA CGAGTAGTTCCCATGTGAC | 3G | (AG)26 |
| HVM62 | TCGCGACCAGACGAGAAG AGCTAGCCGACGACGCAC | 3G | (GA)11. |
| HvLTPPB | TGCTGAGACGCTGAGTACGTTG CAAACCTCAGATTCTCTCAAAG | 3G | (AC)10 |
| Bmag0006 | TAAACCCCCCTCTAG TGCAGTTACTATCGCTGATTTAGC | 3G | (AG)17 |
| EBmac679 | ATGGAGCGGATTAGGAT CCCTATGTCATGTAGGAGATG | 4G | (AC)22 |
| EBmac0701 | ATGATGAGAATCTTACCC TGGCACTAAAGCAAAGAC | 4G | (AC)23 |
| Bmag0808 | TCATAGACTACGACGAAGATG TCTTTGGATGTGTGTTACTG | 4G | (GA)16 |
| HVM0003 | ACACCTTCCCAGGACAATCCATT AGCACGCAGAGCACCGAAAAAGTC | 4G | (AT)29. |
| HvLOX | CAGCATATCCATCTGATCTG CACCTTATTTATTGCCTTAA | 5G | (AG)9 |
| GBMS0119 | GCCAGTCAATCCAACCCTC GTGGCTATGATAGGAATAGCCG | 5G | (CA)22 |
| Bmag0323 | TTTGTGACATCTCAAGAACAC TGACAAACAAATAATCACAGG | 5G | (CT)24 |
| GBM1176 | TATACATCAGCGGGCCTTT CTCCAACCTCGCAAAGAGTC | 5G | (AT)8 |
| Bmag0613 | AAGAACACCATATGATCCAAC CTCCATGACTATGAGGAGAAG | 6G | (GA)17 |
| Bmac0040 | AGCCCGATCAGATTTACG TTCTCCCTTTGGTCCTTG ATGGTAGAGGTCCCAACTG | 6G | (AC)20 |
| Bmac0316 | ATCACTGCTGTGCCTAGC AGTATAACCAACAGCCGTCTA | 6G | (AC)19 |
| Bmag0496 | CTATAGCACGCCTTTGAGA ATTTCAATCCCAAAGGAGAC | 6G | (CT)20 |
| Bmag0120 | GTCACATAGACAGTTGTCTTCC CGTCACGCCACTCACCTC | 7G | (AG)15 |
| GBM1419 | CTTGAAGTCGGAACCCATGT CATTTCCACTTCAAAATATCC | 7G | (CTCAT)5 |
| Bmac0167 | CCAAAGTTTGAGTGCAGAC AGAGAAAAGAGAAATGTCACCA | 7G | (AC)20 |
| Bmac0031 | ATACATCCATGTGAGGGC TACACGCACTGAAAAGACGG | 7G | (AC)28 |
| GBM1405 | CTCGCTGCTGAGTTTGTCTG GGGTGATTTCCCAGGTTTTT | 3G | (CGCA)5 |
| GBM1413 | TTGAGAAAACCACACCCACA | 3G | (TCATA)6 |

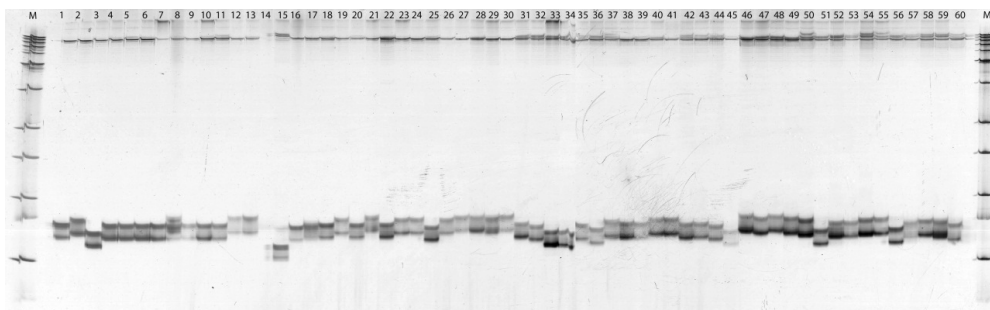
تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهای نواری به صورت صفر (نبودن نوار) و یک (بودن نوار) امتیازدهی شدند. به این صورت که در هر ردیف آلی به نمونه‌های دارای نوار امتیاز یک و بدون باند امتیاز صفر داده می‌شود. البته با توجه به استفاده از نشانگر وزنی، آل‌های ریزماهوره به صورت اندازه نیز امتیازدهی شدند تا در برخی از آنالیزها و نرم‌افزارها مورد استفاده قرار گیرد. برای هر جایگاه ریزماهوره تعداد آل تکثیر یافته و برای تعیین قدرت تمایز نشانگر پارامترهای محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، ضریب خویش‌آمیزی (FIS) و فراوانی آل غالب با استفاده از نرم‌افزار Power marker 3.25 محاسبه شد. برای محاسبه تعداد آل مؤثر (Ae) و شاخص شانون نیز از نرم‌افزار PopGene32 استفاده شد. در این مطالعه نمودار شبکه‌های فیلوژنتیک بین ژنوتیپ‌ها بر اساس ماتریس‌های فاصله ژنتیکی حاصل به روش

Neighbor-net با ضریب فاصله ژنتیکی Uncorrected-P و با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap و با استفاده از نرم‌افزار SplitsTree4 ترسیم شدند. به منظور دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط با استفاده از روش Bayesian و نرم‌افزار Structure ارزیابی ساختار جمعیت انجام شد (Pritchard *et al.*, 2003).

نتایج و بحث

از ۳۰ جفت نشانگر ریزماهوره، ۲۹ جفت چند شکلی نشان دادند. در مجموع ۲۲۵ آل چند شکل با الگوی نواری واضح و با میانگین ۷/۲ آل برای هر مکان ژنی محاسبه گردید. شکل ۱ الگوی نواری حاصل از جفت آغازگر Bmag0225 را نشان می‌دهد. بیش‌ترین تعداد آل برای جایگاه‌های Hvm54، Bmag0323 و EBmac679 به تعداد ۱۳ آل و کم‌ترین تعداد برای جایگاه‌های GBM1176 و HVM0003 با ۲ آل به دست آمد.



شکل ۱. الگوی نواری نشانگر Bmag0808 در تعدادی از نمونه‌های جو مورد آزمایش

با استفاده از ۴۵ نشانگر SSR مورد ارزیابی قرار گرفت که در مجموع ۲۲۵ آل با میانگین ۵ به ازای هر جایگاه تکثیر شدند (Shuorvazdi *et al.*, 2014). بالاترین فراوانی آل غالب در نشانگر GBM1176 برابر با ۰/۸۵ و کم‌ترین فراوانی آل غالب در نشانگر EBmac679 برابر با ۰/۱۳ مشاهده شد. این نتایج نشان‌دهنده این می‌باشد که تعداد آل مشاهده شده در هر جایگاه ژنی بر

در آزمایشی مشابه ۲۴۸ آل در ۳۵ جایگاه ریزماهوره در ۶۵ ژنوتیپ جو محاسبه شد (Zong-Yun *et al.*, 2006). در یک بررسی دیگر نیز ۱۶۵ آل با میانگین ۶/۱ آل در ۲۷ جایگاه SSR در ارزیابی ۱۰۷ ژنوتیپ جو گزارش کردند (Pandey *et al.*, 2004). در بررسی مشابهی نیز ۱۱۹ ژنوتیپ بومی جو از کشورهای مختلف و ۲۵ رقم تجاری و لاین اصلاحی

هتروزیگوسیتی و تنوع ژنی نیز به ترتیب $0.3/0$ و $0.78/0$ بود (Abdollahi-Sisi *et al.*, 2014). همچنین میانگین ضریب خویش آمیزی $FIS = -0.125/0$ به دست آمد که این مقدار منفی برای ضریب خویش آمیزی نشان دهنده مقدار هتروزیگوسیتی بالای نمونه‌ها می‌باشد که دلیل آن نیز وحشی بودن اکثر ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. از بررسی مقادیر به دست آمده می‌توان گفت که بین تعداد آلل‌ها و میزان هتروزیگوسیتی رابطه مستقیمی وجود دارد و با افزایش تعداد آلل، میزان هتروزیگوسیتی نیز افزایش می‌یابد.

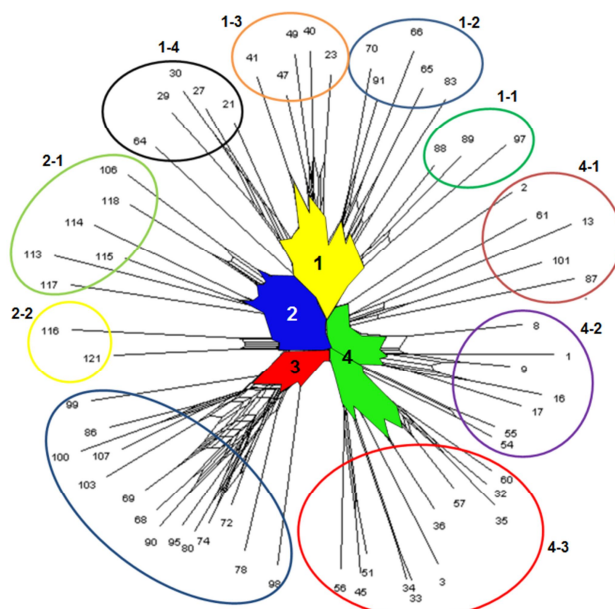
در تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش Neighbor-net، چهار گروه مجزا از ژنوتیپ‌ها و تعداد زیادی زیرگروه شناسایی شد (شکل ۱).

گروه اول شامل چهار زیر گروه بود. در زیر گروه اول ژنوتیپ‌هایی از ایران و آذربایجان در زیرگروه دوم ژنوتیپ‌های ایران، در زیرگروه سوم و چهارم ژنوتیپ‌های ایران و چین بودند. گروه دوم که از دو زیر گروه تشکیل شده، زیر گروه اول آن دارای نمونه‌هایی با منشا بومی ترکیه، ایران و ژنوتیپ‌های روسیه بودند. همچنین زیرگروه دوم این گروه نیز شامل ژنوتیپ‌های روسیه بود که تمام جوه‌های بومی با منشا روسیه در یک گروه (خوشه) قرار گرفتند. گروه سوم که شامل ۱۴ ژنوتیپ بود همگی منشاء ایرانی داشتند و در نهایت گروه چهارم با سه زیر گروه که زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های ایران، مصر و انگلستان بود. زیر گروه دوم هم ژنوتیپ‌هایی از پاکستان و اسپانیا و انگلستان را شامل شد و آخرین زیر گروه اکثراً منشاء ایرانی و چینی و یک ژنوتیپ از الجزایر و دیگری از آذربایجان را شامل شد. از نتایج جالب این گروه‌بندی، وجود ژنوتیپ‌هایی با منشاء ایران در تمام گروه‌ها و اکثر زیرگروه‌ها بود که آن‌هم به دلیل تنوع و گستردگی آب و هوایی در ایران و همچنین نشان دهنده تنوع ژنتیکی بسیار بالای نمونه‌های جو ایران است.

میزان فراوانی آلل غالب تأثیرگذار بوده به طوری که با کم بودن تعداد آلل‌های یک جایگاه ژنی فراوانی بین تعداد آلل کم‌تری توزیع می‌شود و فراوانی آلل غالب بیش‌تر می‌گردد. نشانگر Bmag0323 با مقدار $10.79/0$ بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر و نشانگر GBM1176 با مقدار $1.44/0$ کم‌ترین تعداد آلل مؤثر را داشتند. بیشینه بودن مقدار این آماره در نشانگر Bmag0323 بیانگر فراوانی یکسان آلل‌های موجود در این جایگاه و کمینه بودن این آماره در نشانگر GBM1176 بیانگر فراوانی زیاد یک آلل و نادر بودن بقیه آلل‌ها در نمونه‌هاست. نشانگر EBmac679، با 13 آلل بیش‌ترین مقدار PIC برابر با $0.89/0$ و نشانگر GBM1176 با 2 آلل چندشکل کم‌ترین مقدار PIC برابر با $0.21/0$ را دارا بودند. مقادیر بالای PIC نشان دهنده چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است (Ribeiro *et al.*, 2004). با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان گفت که نشانگرهای Bmag0323 و EBmac679 با بیش‌ترین مقدار PIC، بیش‌ترین شاخص چندشکلی را نشان می‌دهند و بیانگر وجود تعداد آلل‌های زیاد برای این نشانگرها است. بنابراین، این دو نشانگر بهتر از سایر نشانگرها می‌توانند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کنند. در حالی که نشانگر GBM1176 با کم‌ترین مقدار شاخص چندشکلی، توانایی جداسازی ژنوتیپ‌ها را با دقت بالا نداشته است. همچنین رابطه مستقیمی بین تعداد آلل، هتروزیگوسیتی و PIC دیده می‌شود. نشانگرهایی با مقادیر PIC بالا توانایی آشکارسازی تنوع بین آلل‌ها را داشته و می‌توانند به طور مؤثری برای نقشه‌یابی مولکولی و تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Kalivas *et al.*, 2011). میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار $He = 0.698/0$ و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با $Ho = 0.714/0$ بود. در بررسی تنوع ژنتیکی 35 ژنوتیپ جو با 44 جفت نشانگر ریزماهواره 268 آلل چند شکل با میانگین $7.44/0$ به ازای هر جایگاه تکثیر شد. متوسط PIC،

جدول ۳. اطلاعات تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ژرم پلاسما جو مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

| نام آغازگر | تعداد آلل | تعداد آلل مؤثر (Ne) | فراوانی آلل غالب | PIC | شاخص شانون (I) | هتروزیگوسیتی مشاهده شده | هتروزیگوسیتی مورد انتظار | ضریب خویش‌آمیزی (FIS) |
|------------|-----------|---------------------|------------------|------|----------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|
| EBmac501 | 10 | 6.32 | 0.233 | 0.81 | 1.99 | 1.000 | 0.837 | -0.182 |
| Bmag0711 | 5 | 2.87 | 0.445 | 0.59 | 1.15 | 0.978 | 0.657 | -0.478 |
| Hvm54 | 13 | 10.35 | 0.180 | 0.89 | 2.43 | 0.936 | 0.898 | -0.031 |
| Bmac0040 | 12 | 3.56 | 0.511 | 0.69 | 1.78 | 0.933 | 0.708 | -0.307 |
| Bmac0316 | 10 | 6.69 | 0.304 | 0.81 | 2.08 | 0.561 | 0.835 | 0.339 |
| Bmag0496 | 7 | 4.95 | 0.288 | 0.76 | 1.70 | 1.000 | 0.795 | -0.246 |
| Bmag0120 | 5 | 2.10 | 0.750 | 0.39 | 1.006 | 0.318 | 0.416 | 0.246 |
| GBM1419 | 8 | 4.97 | 0.266 | 0.78 | 1.75 | 1.000 | 0.809 | -0.226 |
| Bmac0167 | 6 | 4.52 | 0.282 | 0.74 | 1.56 | 0.695 | 0.781 | 0.120 |
| Bmag0323 | 13 | 10.79 | 0.181 | 0.88 | 2.46 | 0.909 | 0.898 | -0.0009 |
| GBM1176 | 2 | 1.44 | 0.855 | 0.21 | 0.48 | 0.244 | 0.247 | 0.022 |
| Bmag0613 | 8 | 5.37 | 0.314 | 0.77 | 1.78 | 0.697 | 0.798 | 0.137 |
| GBM1405 | 4 | 2.31 | 0.630 | 0.47 | 1.004 | 0.173 | 0.533 | 0.679 |
| GBM1413 | 4 | 3.08 | 0.402 | 0.63 | 1.23 | 0.951 | 0.692 | -0.363 |
| Bmac0031 | 11 | 3.96 | 0.393 | 0.73 | 1.59 | 0.659 | 0.763 | 0.146 |
| GBM1204 | 4 | 2.19 | 0.457 | 0.48 | 0.88 | 1.000 | 0.577 | -0.725 |
| Bmag0211 | 8 | 6.65 | 0.170 | 0.84 | 1.95 | 0.978 | 0.860 | -0.127 |
| WMC1E8 | 4 | 3.15 | 0.388 | 0.61 | 1.24 | 1.000 | 0.762 | -0.477 |
| HVM62 | 4 | 2.62 | 0.487 | 0.57 | 1.11 | 0.000 | 0.635 | 1.000 |
| HvLTPPB | 4 | 2.61 | 0.423 | 0.58 | 1.09 | 1.000 | 0.650 | -0.530 |
| Bmag0006 | 12 | 8.53 | 0.152 | 0.87 | 2.24 | 1.000 | 0.885 | -0.118 |
| Bmag378 | 6 | 4.82 | 0.282 | 0.74 | 1.65 | 0.974 | 0.778 | -0.239 |
| Bmac0134 | 6 | 2.56 | 0.478 | 0.59 | 1.13 | 0.869 | 0.649 | -0.328 |
| Bmag0225 | 9 | 6.59 | 0.223 | 0.84 | 2.02 | 0.148 | 0.860 | 0.830 |
| EBmac0701 | 7 | 5.79 | 0.250 | 0.79 | 1.83 | 0.571 | 0.821 | 0.315 |
| Bmag0808 | 11 | 8.73 | 0.193 | 0.85 | 2.25 | 1.000 | 0.872 | -0.134 |
| EBmac679 | 13 | 9.49 | 0.138 | 0.89 | 2.35 | 1.000 | 0.901 | -0.098 |
| GBMS0119 | 9 | 5.97 | 0.256 | 0.78 | 1.93 | 0.846 | 0.811 | -0.030 |
| HVM0003 | 2 | 1.60 | 0.818 | 0.25 | 0.56 | 0.000 | 0.295 | 1.000 |
| Mean | 7.26 | 4.85 | 0.392 | 0.66 | 1.54 | 0.714 | 0.698 | -0.125 |

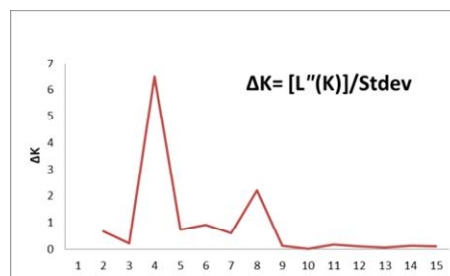


شکل ۱. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های جو با روش Neighbor-net

این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیش‌ترین پهنای رنگی آن کلاستر را دارا باشد. در کل ژنوتیپ‌های داخل هر کلاستر دارای احتمال عضویت بیش از ۰/۷ و به احتمال بیش از ۷۰ درصد به کلاستر خود تعلق دارند (Tondelli *et al.*, 2013). همچنین با توجه به نمودارهای رنگی (زیرجمعیت‌ها با رنگ‌های مختلف با شماره مشخص شده‌اند) تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های زیر جمعیت‌ها تا حدود زیادی یکنواخت و فاقد اختلاط ژنتیکی می‌باشند (زیرجمعیت اول یا قرمز کاملاً یکنواخت و فاقد اختلاط ژنتیکی می‌باشد). از این‌رو می‌توان دریافت که اکثر افراد مطالعه شده فراوانی آلی مشابه داشته‌اند، به‌طوری‌که فقط ۶ فرد از ۶۳ ژنوتیپ اختلاط ژنتیکی از خود نشان می‌دهند. این شکل اثبات می‌کند که تقریباً اکثر نمونه‌ها کاملاً در یک دسته مجزا قرار می‌گیرند و اختلاط ژنتیکی شدیدی در بین نمونه‌ها دیده نمی‌شود (شکل ۳).

در تمامی ۴ زیرجمعیت تشکیل شده ژنوتیپ‌های با منشاء ایرانی دیده شدند که نشان از تنوع ژنتیکی بالا در بین نمونه‌های ایرانی می‌باشد. توزیع این ژنوتیپ‌ها بدین صورت بود که ۲۶ درصد نمونه‌های زیر گروه اول، ۶۹ درصد نمونه‌های زیر گروه دوم، ۳۲ درصد نمونه‌های زیر گروه سوم و ۴۵ درصد نمونه‌های زیر گروه چهارم منشاء ایرانی داشتند. نتایج گروه‌بندی فوق بدین صورت است که در گروه اول (قرمز-زیر جمعیت شماره یک)، ژنوتیپ‌های بومی مناطق ایران (گرگان و کرمان)، انگلستان، روسیه، اسپانیا، چین و پاکستان قرار گرفته‌اند. در گروه دوم (سبز-زیر جمعیت شماره دو)، ژنوتیپ‌های بومی ایران به تعداد ۹ عدد و یک رقم تجاری ایرانی سه‌پند و ۳ لاین اصلاحی پیشرفته وجود دارد. گروه سوم (سرمه‌ای- زیر جمعیت شماره سه) شامل ۸ ژنوتیپ بومی ایران از نواحی میاندوآب، بجنورد، گرگان، گلپایگان و کرمان و کشورهای انگلستان، مصر، الجزایر، آذربایجان و چین و ۲ رقم تجاری روسیه و ترکیه

با توجه به خوشه‌بندی حاصل در روش Neighbor-net مشاهده می‌شود که بیشتر ژنوتیپ‌های بومی ایران و چین به‌علت تعداد زیاد و نیز تنوع اقلیمی در اکثر زیر خوشه‌ها پخش بودند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بسیار بالای ژنوتیپ‌های بومی این مناطق می‌باشد. در تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش مبتنی بر مدل، برنامه با فرض اینکه مدل تبار^۱ از نوع مخلوط^۲ و مدل فراوانی آلی از نوع پیوسته^۳ باشد، اجرا شد. همچنین فرض $K=1$ تا $K=15$ اجرا گردید (K نشان‌دهنده تعداد زیرجمعیت است) و سپس بر مبنای احتمالات ΔK و $\ln(\text{PD})$ به‌دست آمده از این مفروضات صحیح‌ترین تعداد زیرجمعیت مشخص شد. پایین‌ترین مقدار عددی $\ln(\text{PD})$ و بالاترین مقدار عددی ΔK نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته‌بندی جمعیت مورد مطالعه می‌باشد (Muñoz-Amatrián *et al.*, 2014). در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، $K=4$ بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده است (شکل ۲).



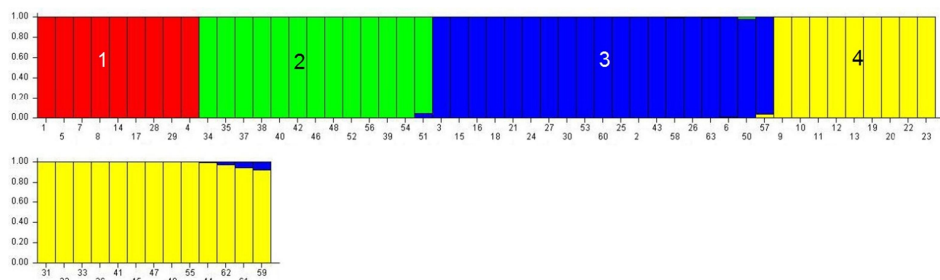
شکل ۲. منحنی ΔK جهت تعیین مقدار مطلوب K

هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد یا نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین این نمونه با زیرجمعیت‌های دیگر و اختلاط ژنتیکی آن فرد است. در

1. Ancestry model
2. Admixture
3. Correlated

ژنوتیپ‌های بومی چین در یک گروه و بقیه ژنوتیپ‌های بومی چین و ارقام تجاری منشاء غیر چین در گروه دیگری قرار گرفتند (Jia *et al.*, 2010). در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۲۲ ژنوتیپ جو که شامل ژنوتیپ‌های بومی، تجاری قدیم و جدید بودند، لاین‌های خالص و مقاوم به بیماری‌های جو با استفاده از ۴۰ نشانگر ریزماهوره مورد مطالعه قرار گرفتند. در تجزیه خوشه‌ای این ژنوتیپ‌ها به شش گروه منتسب شدند. یک گروه شامل ژنوتیپ‌های یک ردیفه و بقیه ژنوتیپ‌های دو ردیفه بود. بقیه ژنوتیپ‌های دو ردیفه نیز در گروه‌های دیگر قرار گرفتند. ارقام جدید اصلاحی و لاین‌های اینبرد نیز با هم در دو گروه مجزا قرار گرفتند و بقیه ژنوتیپ‌های بومی و تجاری قدیم با هم در سایر گروه‌ها قرار گرفتند (Leišová and Kučera, 2010). در مجموع مقایسه نتایج خوشه‌بندی حاصل از روش مبتنی بر مدل Bayesian با نتایج حاصل از کلاستر بندی با استفاده از روش Neighbor-net مطابقت بسیار بالایی را نشان می‌دهد.

به‌علاوه ۳ لاین اصلاحی پیشرفته بود. گروه چهارم (زرد- زیر جمعیت شماره چهار) شامل ۲۲ ژنوتیپ که ۱۲ ژنوتیپ بومی ایران از میاندوآب، قزوین، بجنورد و تربت جام و به ترتیب ۵ ژنوتیپ بومی چین و یک ژنوتیپ بومی آذربایجان بودند. در این گروه دو رقم تجاری روسیه و یک رقم ماکویی ایران و یک لاین اصلاحی پیشرفته قرار داشتند. در یک بررسی با استفاده از ۳۰ جفت نشانگر ریزماهوره، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بومی، لاین خالص و ارقام تجاری مورد بررسی قرار گرفت، که در نهایت ۷۰ آلل به‌دست آمد و ژنوتیپ‌ها در پنج گروه مجزا قرار گرفتند. ارقام تجاری، یک ژنوتیپ بومی و یک لاین خالص در یک گروه و بقیه ژنوتیپ‌های بومی در ۴ گروه دیگر قرار گرفتند (Kandemir *et al.*, 2010). همچنین در پژوهشی دیگر ۸۸ ژنوتیپ بومی و تجاری با منشاء چین و تجاری با منشاء غیر چین با ۳۳ جفت نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفت. در نتایج به‌دست آمده ژنوتیپ‌ها به دو گروه تقسیم شدند. ۹۰ درصد



شکل ۳. تجزیه ساختار جمعیت ژنوتیپ‌های جو با استفاده از روش مبتنی بر مدل

برخی صفات در این ژنوتیپ‌ها موجود نبود، می‌توان از ژنوتیپ‌های بومی برای جبران این کمبود بهره برد. همچنین می‌توان دریافت که جمعیت متشکل از ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای انجام مطالعاتی مانند تهیه نقشه‌های ارتباطی^۱ و یا به‌کارگیری در برنامه‌های به‌نژادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

نتایج آزمایش حاضر نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در نمونه‌های مورد مطالعه بود که نشانگرهای ریزماهوره نیز به‌خوبی این تنوع و تفاوت‌ها را نشان دادند، بویژه تنوع بالایی که در ژنوتیپ‌های بومی ایران ملاحظه شد که می‌توان از این تنوع برای برنامه‌های اصلاحی مختلف استفاده کرد. با توجه به ارزشمندی این ارقام، می‌توان از آن‌ها برای ایجاد جمعیت‌های پایه اصلاحی استفاده کرد و اگر تنوع در

1. Association mapping

از مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور که مواد گیاهی پژوهش حاضر را در اختیار گذاشتند و همچنین پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج جهت اجرای طرح و در نهایت دانشگاه شاهد، تهران قدردانی می‌شود.

شایان ذکر است که با توجه با نتایج به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای و درخت فیلوژنتیک، هرچه به مبدا و زیستگاه اصلی جو نزدیک می‌شویم، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده می‌شود.

سپاسگزاری

REFERENCES

- Abdollahi-Sisi N, Mohammadi SA, Alavi Kia SS, Sadeghzadeh B (2014) Allelic Diversity of SSR Markers in Barley Landraces and Lines." Seed and Plant Improvement Journal 30(2): 477-492.
- Basaki T, Choukan R, Khayam-Nekouei SM, Mardi M, Majidi E, Faraji S, Zeinalabedini M (2011) Association analysis for morphological traits in pomegranate (*Punica granatum* L.) using microsatellite markers. Mid. East J. Sci. Res. 9(3): 410-417.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1(4): 19-21.
- Haj Mansoor S, Bihanta MR, Nabipour A, Mohammadi A, Pirseyedi SM, Nikkhah HR (2010) Genetic Diversity in Barley Genotypes: II. Microsatellite Markers and Morphological Traits. 22. Seed and Plant Improvement Journal 26(2): 151-171.
- Jaiswal S, Pandey Sh P, Sharma S, Prasad R, Prasad LC, Verma RPS, Joshi AK (2010). Diversity in Indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars and identification of genotype-specific fingerprints using microsatellite markers. J. Genet 89: 46.
- Jia Q, Zhu JH, Wang JM, Yang JM (2010) Fusarium head blight evaluation and genetic diversity assessment by simple sequence repeats in 88 barley cultivars and landraces. Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium.
- Kalivas A, Xanthopoulos F, Kehagia O, Tsafaris AS (2011) Agronomic characterization, genetic diversity and association analysis of cotton cultivars using simple sequence repeat molecular markers. Genet. Mol. Res. 10(1): 208-217.
- Kandemir N, Yildirim A, Gündüz R (2010) Determining the levels of genetic variation using SSR markers in three Turkish barley materials known as Tokak. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 34(1): 17-23.
- Karim K, Rawda A, Hatem ChM, Mokhtar BN (2010) Analysis of Genetic diversity and relationships in local Tunisian barley by RAPD and SSR analysis. African Journal of Biotechnology 9(44): 7429.
- Khodayari H, Saeidi H, Roofgar A, Rahiminejad MR, Pourkheirandish M, Komatsuda T (2012) Genetic diversity of cultivated barley landraces in Iran measured using microsatellites. Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma. 2(4): 1-9.
- Leišová L, Kučera L (2010) The use of microsatellites to screen barley genotypes for resistance to net blotch. Proceedings of the 10th International Barley Genetics Symposium. Alexandria, Egypt 5-10 Apr. 2008, ICARDA.
- Leišová L, Kučera L, Dotlačil L (2007) Microsatellites as a tool to evaluate and characterise bread wheat core collection. Wheat Production in Stressed Environments, Springer, 771-778.
- Muñoz-Amatriáin M, Cuesta-Marcos A, Endelman JB, Comadran J, Bonman

- JM, Bockelman HE, Chao Sh, Russell J, Waugh R, Hayes PM (2014) The USDA barley core collection: genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies. *PLoS ONE* 9(4): e94688.
- Naceur AB, Chaabane R, El-Faleh M, Abdelly Ch, Ramla D, Nada A, Sakr M (2012) Genetic diversity analysis of North Africa's barley using SSR markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 10(1): 13-21.
- Pandey MP, Wagner C, Friedt W, Ordan F (2004) Assessment of genetic diversity of hull-less barley germplasm in the high altitude Himalayas of Nepal. *Theor. Appl.* 113: 715-729.
- Pritchard JK, Wen W, Falush D (2003) Documentation for STRUCTURE software: Version 2.
- Ramsay L, Macaulay M, Degli Iwanisovich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, Edwards KJ, Tuveson S, Morgante M, Massari A (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics*. 156(4): 1997-2005.
- Ribeiro-Carvalho C, Guedes-Pinto H, Igrejas G, Stephenson P, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace 'Barbela'. *Annals of Botany* 94(5): 699-705.
- Shuorvazdi A, Mohammadi SA, Norozi M, Sadeghzadeh B (2014) Molecular analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. *Plant Genetic Researches*: 14.
- Soto-Cerda B, Cloutier S (2012) *Genetic Diversity in Plants*. Mahmut Çalışkan: InTech.
- Staub JE, Serquen FC, Gupta M (1996) Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort. Science*. 31(5): 729-741.
- Struss D, Plieske J (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 97(1): 308-315.
- Tondelli A, Xu X, Moragues M, Sharma R, Schnaithmann F, Ingvaridsen Ch, Manninen O, Comadran J, Russell J, Waugh R (2013) Structural and temporal variation in genetic diversity of European spring two-row barley cultivars and association mapping of quantitative traits. *The Plant Genome*. 6(2).
- Varshney RK, Marcel T, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Nix RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics*. 114(6): 1091-1103.
- Von Bothmer R, Van Hintum Th, Knüpffer H, Sato K (2003) Diversity in barley (*Hordeum vulgare*), Elsevier.
- Zong-Yun F, Xian-Jun L, Zhang YZ, Hong-Qing L (2006) Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR markers. *Acta Genetica Sinica* 33(10): 917-928.