

## تنوع آللی نشانگرهای SSR در توده‌های بومی و لاین‌های اصلاحی جو

### Allelic Diversity of SSR Markers in Barley Landraces and Lines

نیر عبدالمهی سیسی<sup>۱</sup>، سیدابوالقاسم محمدی<sup>۲</sup>، سیدسیامک علوی کیا<sup>۳</sup>

و بهزاد صادق زاده<sup>۴</sup>

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، مراغه

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۳

#### چکیده

عبدالمهی سیسی، ن.، محمدی، س.ا.، علوی کیا، س.س. و صادق زاده، ب. ۱۳۹۳. تنوع آللی نشانگرهای SSR در توده‌های بومی و لاین‌های اصلاحی جو. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۴۹۲-۴۷۷.

گام اول در بهره‌برداری از توده‌های بومی گیاهان در برنامه‌های به‌نژادی، تعیین سطح تنوع و روابط ژنتیکی آن‌ها است. در این مطالعه، تنوع و روابط ژنتیکی ۱۴۴ ژنوتیپ جو شامل ۱۱۹ توده بومی و ۲۵ لاین اصلاحی با استفاده از ۳۲ جفت آغازگر SSR چند شکل بررسی شد. در مجموع ۱۴۳ آلل در محدوده ۲ تا ۱۲ آلل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تکثیر شد. میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه، برای لاین‌های اصلاحی ۳/۴۵، توده‌های بومی ۴/۴۱ و در مجموع ژنوتیپ‌ها ۴/۴۷ بود. متوسط میزان اطلاعات چند شکلی برای لاین‌های اصلاحی، توده‌های بومی و مجموع ژنوتیپ‌ها، به ترتیب ۰/۴۴، ۰/۵۳ و ۰/۵۳ برآورد شد. شاخص تنوع ژنی نای (Nei) یا تنوع هتروزیگوتی مورد انتظار دارای میانگین ۰/۵۹ و دامنه تغییرات بین ۰/۲۲ تا ۰/۸۷ بود. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از الگوریتم خوشه‌ای Minimum evolution method و ضریب فاصله Kimura 2-parameter model آن‌ها را به هشت گروه منتسب کرد. در تجزیه به بردارهای اصلی، سه بردار اول در مجموع ۷۱/۷۷٪ از تغییرات مولکولی کل بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند. آرایش ژنوتیپ‌ها براساس دو بردار اصلی اول، مطابقت بالایی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای داشت. نتایج نشان داد که نشانگرهای SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما جو و نیز انجام برنامه‌های به‌نژادی شامل جمع‌آوری و حفاظت مجموعه‌های بانک ژن ابزاری کارا هستند.

واژه‌های کلیدی: جو، توده‌های بومی، روابط ژنتیکی، نشانگرهای ریزوماهواره، تجزیه خوشه‌ای.

## مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) از اولین گیاهان زراعی اهلی شده (Zohary and Hopf, 2000) و یک غله اقتصادی مهم است که در رتبه چهارم غلات تولیدی جهان قرار دارد (Matus and Hayes, 2002). دانه جو اغلب در تغذیه دام و صنایع مالت و آبجوسازی استفاده می‌شود و مصرف آن در تغذیه انسان به دلیل مقدار فیبر قابل حل آن (بتا گلوکان) که باعث کاهش کلسترول خون می‌شود، در سال‌های اخیر افزایش یافته است (Baik and Ullrich, 2008).

کشاورزی مدرن و استفاده از ارقام اصلاح شده سبب کاهش تنوع ژنتیکی و رکود عملکرد در غلات شده است. علاوه بر این، جایگزینی توده‌های بومی با ارقام اصلاح شده که سازگاری و تحمل کمتری در مقابل تنش‌های غیرزیستی و زیستی دارند موجب از بین رفتن منابع ژنتیکی با ارزش برای تولید پایدار در شرایط تغییر اقلیم شده است (Newton *et al.*, 2010). در جو نیز مانند سایر گیاهان زراعی، اگر چه برنامه‌های اصلاحی سبب افزایش عملکرد و کیفیت محصول شده است، ولی کاهش چشمگیر تنوع ژنتیکی صفات مختلف در ژرم‌پلاسماهای به‌نژادی در مقایسه با توده‌های بومی، از پیامدهای بارز برنامه‌های به‌زراعی بوده است (Feschbeck, 2003). کوندون و همکاران (Condon *et al.*, 2008) با

مطالعه تاثیر برنامه‌های به‌نژادی بر تنوع آلی ژرم‌پلاسما جو گزارش کردند که طی سال‌های ۱۹۸۵ تا ۱۹۹۸، در ۷۰ جایگاه SSR (Simple Sequence Repeats) مورد بررسی متوسط تنوع آلی در جایگاه‌های SSR از ۵/۸۹ به ۲/۳۹ کاهش یافته است.

در سال‌های اخیر با توجه به تغییر اقلیم در اغلب مناطق جهان و نیاز به منابع ژنتیکی جدید، تلاش‌های زیادی برای جمع‌آوری، سازماندهی و بررسی خصوصیات توده‌های بومی گیاهان برای استفاده از ژن‌های مطلوب آن‌ها در ژرم‌پلاسماهای زراعی جهت تولید ارقام جدید و تولید پایدار انجام شده است (Newton *et al.*, 2010؛ Dotlacil *et al.*, 2010).

اولین گام در استفاده از توده‌های بومی در برنامه‌های به‌نژادی، تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط آن‌ها است. جهت برای تنوع و ساختار ژنتیکی ژرم‌پلاسما می‌توان از نشانگرهای مبتنی بر DNA به خصوص نشانگرهای ریزماهواره استفاده کرد. ژنومیوکاربوت‌ها در نواحی رمزکننده و غیررمزکننده شامل توالی‌های تکراری ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی مشهور به توالی‌های تکراری ساده (SSR) یاریزماهواره‌هاست و به علت بالا بودن میزان جهش در آن‌ها دارای نقش اساسی در تکامل و تنوع ژنوم هستند (Toth *et al.*, 2000). نشانگرهای ریزماهواره به دلیل چندشکلی و تکرارپذیری بالا، چند آلی بودن و امتیازدهی هم بارز

جو لخت متعلق به فلات تبت-کینگای در چین را با ۳۰ نشانگر SSR بررسی و در مجموع، ۱۳۲ آلل در ۲۲ مکان SSR چندشکل با تعداد ۲ تا ۱۵ آلل برای هر جایگاه گزارش کردند. در این پژوهش میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۶ تا ۰/۹۱ با متوسط ۰/۶۵ متغیر بود. کریم و همکاران (Karim *et al.*, 2009) در مطالعه روابط ژنتیکی توده‌های محلی جو تونسسی با نشانگرهای RAPD و SSR نشان دادند که نشانگرهای SSR چندشکلی و قدرت تفکیک بالایی در توده محلی نسبت به نشانگر RAPD دارند و تفکیک توده‌ها براساس داده‌های SSR با منشاء جغرافیایی آن‌ها مطابقت بیشتری داشت. ایوندیک و همکاران (Ivandic *et al.*, 2002) در ارزیابی ۳۹ ژنوتیپ جو وحشی جمع‌آوری شده از فلسطین، ترکیه و ایران با ۳۳ نشانگر SSR، متوسط تعداد آلل به ازای هر جایگاه و میانگین تنوع ژنی را به ترتیب ۱۲/۹ و ۰/۷۹ گزارش کردند. متوسط تعداد آلل برای ژنوتیپ‌های ایران، ترکیه و فلسطین به ترتیب ۵/۱، ۵/۵ و ۹/۵ برآورد شد که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای جوهای وحشی فلسطین در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها بود. بنمن و همکاران (Bonman *et al.*, 2011) در ۲۰۶ ژنوتیپ جو، متوسط تعداد آلل و PIC را در ۲۹ جایگاه ریزماهواره، به ترتیب ۱۲/۰۳ آلل و ۰/۷۳ به دست آورده و ژنوتیپ‌ها را براساس داده‌های مولکولی به چهار گروه اصلی منتسب کردند. هدف این پژوهش عبارت از بررسی و

مزیت زیادی را در مطالعه ساختار ژرمپلاسم دارند (Meszaros *et al.*, 2007)؛ (Matus and Hayes, 2002).

در جو نشانگرهای ریزماهواره در مطالعات مختلف برای بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار ژرمپلاسم اصلاحی و بومی استفاده شده‌اند. کومادران و همکاران (Comadran *et al.*, 2009) در بررسی تنوع ۱۹۲ ژنوتیپ جو شامل توده‌های بومی و ارقام اصلاح شده از نواحی مدیترانه‌ای با ۳۰ نشانگر (Expressed Sequence Tagged-SSR) EST-SSR و ۲۲ نشانگر SSR، در مجموع ۴۷۴ آلل با متوسط ۹/۱۱ آلل به ازای هر مکان تکثیر کردند. میزان اطلاعات چندشکلی در این مطالعه از ۰/۱۳ تا ۰/۵۰ متغیر بود و بر اساس داده‌های مولکولی ژنوتیپ‌ها به پنج گروه منتسب شدند که تا حدودی با منشاء جغرافیایی آن‌ها مطابقت داشت. مزاروس و همکاران (Meszaros *et al.*, 2007) با مطالعه کارآیی نشانگرهای RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) STS (Tagged Sites- Sequenced) و SSR در تعیین روابط ژنتیکی و تنوع ۳۸ ژنوتیپ جو گزارش کردند که نشانگرهای SSR با متوسط میزان اطلاعات چندشکلی (Polymorphic Information Content) برابر ۰/۷۲ قدرت تمایز بیشتری در مقایسه با دو نشانگر دیگر داشتند. پن و همکاران (Pan *et al.*, 2008) تنوع ژنتیکی ۶۴ توده بومی

دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید ۴ درصد غیر واسرشته‌ساز با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر در دستگاه ژل اسکن ۳۰۰۰ (شرکت Corbett Robotics استرالیا) تفکیک شدند. برای تعیین اندازه نسبی قطعات تکثیری در چاهک‌های ابتدا و انتهای ژل، نشانگر #MS0371 با اندازه قطعات ۵۰-۱۰۰۰ جفت باز بارگذاری شد.

الگوی نواری نشانگرهای چندشکل به صورت یک (وجود آلل) و صفر (عدم وجود آلل) (امتیازدهی غالب) و نیز به صورت همبازر امتیازدهی و برای هر جایگاه ریزماهواره تعداد آلل تکثیر یافته تعیین و فراوانی آللی برآورد شد. برای تعیین قدرت تمایز نشانگر، پارامترهای میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و تنوع ژنی (He) با فرمول‌های زیر، با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker (Liu and Muse, 2005) محاسبه شد.

$$H_e = 1 - \sum P_i^2 \text{ و } PIC = 1 - \sum p_i^2 - 2\sum p_i^2 p_j^2$$

گرفتند که برای تفکیک واریانس مولکولی ژنوتیپ‌ها به واریانس بین و درون گروهی از نرم‌افزار (Peakall and Smouse, 2010) GenAIEx6.41 استفاده شد. برای گروه‌بندی

مقایسه سطح تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بومی جو متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف و ارقام تجاری لاین‌های اصلاحی جو با استفاده از نشانگرهای SSR بود.

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ۶۹ توده بومی جو ایران، ۵۰ توده بومی از دیگر کشورها، ۹ لاین پیشرفته اصلاحی و ۱۶ رقم تجاری بود. استخراج DNA به روش CTAB (Saghai-Marooft *et al.*, 1984) انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد. برای ارزیابی مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از ۳۸ جفت آغازگر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۲-۵۵ درجه سانتی‌گراد (بسته به آغازگر) به مدت یک

برای تجزیه واریانس مولکولی (AVOMA) ابتدا ژنوتیپ‌ها براساس منشا جغرافیایی در پنج گروه، ارقام تجاری و اصلاحی و ژنوتیپ‌های بومی ایران، چین، مصر و سایر کشورها قرار

آلل با میانگین ۴/۴۷ آلل به ازای هر جایگاه در ژنوتیپ‌های جو تکثیر شد. بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگرهای BMAC0040 و EBMAC679 به ترتیب با ۱۲ و ۱۰ آلل بود. نشانگرهای GBM1400 و GBM1432، بیشترین فراوانی آلل شایع (آللی که در بین آلل‌های یک جایگاه، بیشترین فراوانی را دارد) به ترتیب با فراوانی ۰/۸۸ و ۰/۸۷ و نشانگر BMAC0063 کمترین فراوانی آلل شایع (۰/۱۶) را داشتند. میزان تنوع ژنی از ۰/۲۲ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۵۹ متغیر بود. بیشترین مقدار تنوع ژنی مربوط به نشانگرهای BMAC0040 و BMAC0063 (۰/۸۷) و کمترین آن مربوط به نشانگر GBM1400 (۰/۲۲) بود. مقادیر بالای تنوع ژنی قدرت بالای نشانگرها را در تمایز ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. نشانگرهایی با تنوع ژنی بالا می‌توانند به عنوان مجموعه نشانگرهای کارا در گزینش والدین هیبریدها، بررسی تنوع ژنتیکی، برنامه‌های حفاظت ژرم پلاسما و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی و آسیب‌پذیری ژنوتیپ‌ها استفاده شوند (Matus and Hayes, 2002). میزان اطلاعات چندشکلی در مجموع نشانگرهای SSR مورد استفاده، از ۰/۲ تا ۰/۸۶ با میانگین ۰/۵۳ متغیر بود. بیشترین میزان PIC به نشانگرهای BMAC0040 و BMAC0063 (۰/۸۶) و کمترین آن به نشانگر GBM1432 (۰/۲) اختصاص داشت. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر

ژنوتیپ‌ها، تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Minimum evolution method و ضریب فاصله تکاملی Kimura 2-parameter model با استفاده از نرم‌افزار 5.05 MEGA (Tamura *et al.*, 2011) انجام و بهترین نقطه برش دندروگرام بر مبنای مقادیر بوت استرپ (Bootstrap) تعیین شد. تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای انجام شد. جهت محاسبه تنوع ژنتیکی درون جمعیت و تعیین شاخص شانون از نرم‌افزار Pop Gene 1.31 استفاده شد (Yeh *et al.*, 1997).

## نتایج و بحث

اسامی و منشاء ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است.

### تنوع نشانگرهای ریزماهواره

از ۳۸ جفت آغازگر مورد بررسی، ۳۲ جفت الگوی نواری چندشکل و قابل امتیازدهی داشتند. اطلاعات مربوط به نشانگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. از این آغازگرها، سه آغازگر SCSSR7970، BMAG0378 و BMAC0040 دو جایگاه را در ژنوم جو تکثیر کردند که هر دو جایگاه حاصل از آغازگر اول چند شکل بود ولی با استفاده از دو آغازگر بعدی فقط یک جایگاه چند شکل تکثیر شد (شکل ۱). در مجموع، ۱۴۳

جدول ۱- اسامی و منشأ ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

Table 1. Name and origin of the studied barley genotypes

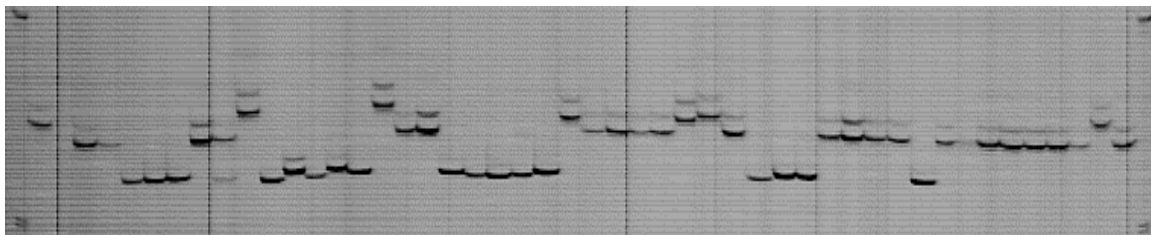
منشاء	کد بانک ژن	منشاء	کد بانک ژن	منشاء	کد بانک ژن
Origin	GB number	Origin	GB number	Origin	GB number
England	71411	Miyandoab	72466	Iran	72684
England	71411	Iran	72472	Iran	72689
Algeria	71426	Karand	72480	Iran	72703
Algeria	71426	Iran	72480	Iran	72712
Iran	71441	Iran	72488	Iran	72726
USA	71482	Gazvin	72494	China	72372
Russia	71530	Iran	72498	China	72382
Russia	71530	Iran	72498	Iran	72472
Spain	71538	Iran	72500	Iran	72472
Spain	71538	Bojnord	72520	Torbatejam	72482
Egypt	71557	Bojnord	72522	Iran/Azarbijan	72553
Egypt	71576	Bojnord	72524	Miyandoab	72588
Egypt	71576	Bojnord	72524	Iran	72646
Egypt	71576	Bojnord	72524	Iran	72646
Egypt	71591	Golpayegan	72545	Iran	72680
Egypt	71591	Golpayegan	72546	Iran	72680
Egypt	71608	USA	72550	Iran	72685
Egypt	71614	Iran/Azerbaijan	72557	Iran	72686
Egypt	71614	Iran/Azerbaijan	72557	Iran	72704
Egypt	71630	Tehran	72559	Iran	72715
Egypt	71630	Iran/Azerbaijan	72560	Iran	72715
Egypt	71657	Kerman	72562	Iran	72744
India	71663	Kerman	72562	Iran	72747
Ethiopia	71704	Gorgan	72565	Iran	CWB117-77
Russia	71850	Gorgan	72566	Iran	Tokak/Demir-2
Pakistan	71938	Gorgan	72566	Iran	Zarjau-80
Pakistan	71938	Gorgan	72566	Iran	AZE-ICB
China	72113	Kerman	72568	Iran	CWB117-5
China	72295	Kerman	72581	Iran	ICB01-1402
China	72295	Iran	72584	Iran	Alpha/Gumhuriyet
China	72295	Miyandoab	72587	ICARDA	Rihane-03
China	72322	Iran	72602	Iran	Makoee
China	72322	Iran	72611	Iran	Sahand
China	72322	Iran	72646	Iran	Abidar
China	72322	Iran	72647	ICARDA	Dayton/Ranney
China	72368	Iran	72647	ICARDA	Yea168
China	72368	Iran	72649	ICARDA	Denmark
China	72368	Iran	72650	Turkey	Obruk-86
China	72368	Iran	72653	Iran	GaraArpa
China	72372	Iran	72655	Unknown	EC79
China	72372	Iran	72664	Turkey	Bulbul
China	72397	Iran	72665	Russia	Dicktoo
China	72397	Iran	72666	Russia	Radical
China	72406	Iran	72668	Russia	Dobrynya
China	72406	Iran	72672	Unknown	EC80
China	72439	Iran	72673	Unknown	EC84
China	72439	Iran	72674	Unknown	ERB86
China	72439	Iran	72675	Unknown	ERB87

جدول ۲- نام، جایگاه کروموزومی و پارامترهای ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره چندشکل در ژنوتیپ‌های

جو

Table 2. Name, chromosomal location and genetic parameters of polymorphic microsatellite markers in barley genotypes

نشانگر	کروموزوم	تعداد آلل	فراوانی	تنوع ژنی	میزان اطلاعات
Marker	Locus	No. Allele	آلل شایع Major allele Frequency	Gene Diversity	چندشکلی PIC
HVM20	1H	2	0.79	0.33	0.27
BMAG504	1H	3	0.57	0.50	0.39
BMAC0063	1H	9	0.16	0.87	0.86
BMAG0211	1H	5	0.38	0.71	0.65
HVM36	2H	3	0.62	0.50	0.41
BMAG0378	2H	3	0.52	0.61	0.54
GBM1309	2 H	3	0.55	0.58	0.50
BMAC0134	2H	8	0.59	0.62	0.59
BMAG0518	2H	5	0.48	0.67	0.62
GBM1208	2H	3	0.39	0.66	0.59
EBMATC0039	2H	2	0.71	0.41	0.33
SCSSR08447	2H	3	0.69	0.47	0.42
GBM1159	3H	3	0.62	0.54	0.49
SCSSR10559	3H	5	0.52	0.66	0.62
GBMS0183	3H	5	0.48	0.69	0.65
EBMAC679	4H	10	0.23	0.85	0.84
SCSSR14079	4H	5	0.39	0.73	0.69
HVM40	4H	5	0.31	0.75	0.71
SCSSR18005	4H	3	0.49	0.53	0.43
BMAC0096	5 H	4	0.54	0.63	0.58
BMAC0113	5H	6	0.28	0.79	0.76
GBM1398	5H	2	0.80	0.33	0.27
SCSSR02503	5H	2	0.69	0.43	0.34
BMAC0040	6 H	12	0.24	0.87	0.86
EBMAC0624	6H	3	0.48	0.63	0.55
GBM1400	6H	3	0.88	0.22	0.21
HVM49	7H	7	0.38	0.70	0.65
HVM51	7H	2	0.61	0.48	0.36
GBM1432	7H	2	0.87	0.22	0.20
GBM1464	7H	6	0.51	0.67	0.63
SCSSR7970-2	7H	4	0.54	0.62	0.56
SCSSR7970-1	7H	5	0.59	0.56	0.49
Mean	میانگین	4.47	0.53	0.59	0.53
Mean, Landraces	میانگین توده‌های بومی	4.41	0.53	0.59	0.53
Other countries landrace:	توده بومی سایر کشورها	3.44	0.67	0.45	0.41
Egyptain landraces	توده بومی مصر	2.50	0.69	0.42	0.36
Chinise landraces	توده بومی چین	3.19	0.58	0.52	0.46
Iranian landraces	توده بومی ایران	4.28	0.54	0.57	0.51
Mean, Breeding lines	میانگین لاین‌های اصلاحی	3.38	0.64	0.49	0.43



شکل ۱- الگوی نواری نشانگر ریزماهواره EBMAC679 در تعدادی از ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه  
Fig. 1. Banding pattern of microsatellite marker EBMAC679 in some of the studied barley genotypes

آن‌ها، تعداد آلل برای نشانگرهای گروه‌های پیوستگی از ۱۳ (۳H) تا ۳۰ (۲H) آلل متغیر بود. نشانگرهای مربوط به گروه‌های پیوستگی ۶H بیشترین و ۵H کمترین تعداد آلل را به ترتیب با میانگین ۶ و ۳/۵ آلل داشتند. وارشنی و همکاران (Varshney *et al.*, 2010) در ارزیابی ۲۲۳ ژنوتیپ جو با ۴۵ جفت آغازگر SSR، بیشترین تعداد آلل را برای نشانگرهای گروه پیوستگی ۴H با متوسط ۹/۸۶ آلل و کمترین آن را با میانگین ۶/۶۷ برای نشانگرهای گروه پیوستگی ۵H گزارش کردند. الوچ و همکاران (Eleuch *et al.*, 2008) یک نمونه ۴۸ تایی جو را با ۲۲ نشانگر ریزماهواره بررسی کردند که در مجموع ۲۳۸ آلل با میانگین ۱۰/۸۱ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد و میانگین تنوع ژنتیکی و PIC به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۶۸ بود. پانیدی و همکاران (Pandey *et al.*, 2006) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۷ توده بومی جو متعلق به ارتفاعات نپال با ۴۱ نشانگر SSR، در مجموع ۲۲۷ آلل با میانگین ۵/۵۴ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر کردند و مقدار PIC از ۰/۰۲ تا ۰/۸۷ با میانگین

در یک جایگاه نشانگری است (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2004).

در توده‌های بومی، تعداد آلل از ۲ تا ۱۲ با متوسط ۴/۴۱ فراوانی آلل شایع از ۰/۲۲ تا ۰/۸۲ با میانگین ۰/۵۳ بود. شاخص تنوع ژنی نای (Nei) در محدوده ۰/۲۳ تا ۰/۸۹ با میانگین ۰/۵۸ و مقادیر PIC با متوسط ۰/۵۳ و دامنه ۰/۲۱ تا ۰/۸۸ برآورد شد. در لاین‌های اصلاحی، تعداد آلل با میانگین ۳/۴۵ در دامنه ۲ تا ۸ و فراوانی آلل شایع با متوسط ۰/۶۳ در محدوده ۰/۳۹ تا ۰/۹۱ متغیر بود. شاخص تنوع ژنی و PIC به ترتیب دارای دامنه تغییرات ۰/۷۲-۰/۱۷ و ۰/۶۷-۰/۱۵ و میانگین ۰/۵۰ و ۰/۴۴ بودند. براساس شاخص‌های موجود تنوع ژنتیکی بیشتری در توده بومی در مقایسه با لاین‌های اصلاحی وجود داشت.

مالیشوا-اتسو و همکاران (Malysheva-Otto *et al.*, 2006) در بررسی تنوع ژنتیکی ۹۵۳ توده جو جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR، در مجموع ۷۹۹ آلل با متوسط ۱۶/۷ آلل به ازای هر جایگاه گزارش کردند. در مطالعه



همبستگی منفی بین فراوانی آلل شایع و تنوع ژنی (۰/۹۶۹-) بود. به عبارت دیگر، نشانگرهایی با فراوانی آلل شایع کمتر، دارای بیشترین مقدار تنوع ژنی، PIC و تعداد آلل بوده و قدرت تمایز بالایی داشتند. به عنوان مثال، نشانگر BMAC0063 با فراوانی آلل شایع برابر با ۰/۱۶، دارای تنوع ژنی و PIC به ترتیب برابر با ۰/۸۷ و ۰/۸۶ بود. این نشان می‌دهد که با افزایش تعداد آلل و توزیع مناسب آلل‌ها، تنوع ژنی و PIC افزایش یافته است (Struss and Plieske, 1998). در مطالعه حاضر، هتروزیگوتی برای کلیه جایگاه‌های ریزماهواره مورد بررسی صفر بود که به دلیل خودگشن بودن جو است. کاندمیر و همکاران (Kandemir et al., 2010) نیز در مطالعه ۱۲۲ ژنوتیپ جو با ۳۰ نشانگر SSR میزان هتروزیگوتی را صفر گزارش کردند.

برای تجزیه واریانس مولکولی، ابتدا ژنوتیپ‌های بر اساس منشاء جغرافیایی، بومی و اصلاحی به گروه‌های مربوطه تفکیک شدند. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که واریانس درون و بین گروهی به ترتیب ۹۰ و ۱۰٪ واریانس مولکولی کل را تبیین کردند (جدول ۳). این نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای درون گروه‌ها به خصوص توده‌های بومی مربوط به کشورهای مختلف بود. برآورد تنوع ژنتیکی درون گروهی برای گروه‌های مختلف براساس شاخص شانون و تنوع ژنی نشان داد که توده‌های بومی ایران بیشترین شاخص شانون

۰/۵۰ متغیر بود. هادادو و همکاران (Hadado et al., 2010) در هفت جایگاه ریزماهواره، ۶۶ آلل با متوسط ۹/۴ آلل به ازای هر جایگاه در ۱۰۶ جو بومی ایتوپی گزارش کردند. آن‌ها تنوع بالایی درون جمعیت‌های بومی گزارش کردند و پتانسیل توده‌ها را از نظر دارا بودن آلل‌های مفید، مورد تاکید قرار دادند. میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرهای SSR در پژوهش حاضر (۰/۵۳) از میانگین گزارش شده توسط حمز و همکاران (Hamza et al., 2004) ۰/۴۵، ناصر و همکاران (Naceur et al., 2012) ۰/۵۰، باکیس و همکاران (Backes et al., 2009) ۰/۴۹ و پیلن و همکاران (Pillen et al., 2000) ۰/۳۸ بیشتر بود. در تحقیق حاضر، بیشترین کمترین میانگین تنوع ژنی را، به ترتیب نشانگرهای گروه‌های پیوستگی ۴H (۰/۷۲) و ۵H (۰/۵۴) داشتند. نشانگرهای گروه‌های پیوستگی ۴H و ۷H دارای بیشترین و کمترین مقدار PIC به ترتیب با مقادیر ۰/۶۷ و ۰/۴۸ بودند. تفاوت در خصوصیات نشانگرهای ریزماهواره از قبیل تعداد آلل، تنوع ژنی و میزان اطلاعات چندشکلی بین مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشا و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تعداد و ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتیدهای واحدهای تکراری باشد.

بین فراوانی آلل شایع و پارامترهای دیگر همبستگی منفی وجود داشت. بیشترین

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی در توده‌های بومی مختلف جو براساس داده‌های نشانگرهای ریزماهوره

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) in various barley landraces based on microsatellite marker data

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس برآورده شده	درصد واریانس برآورده شده
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Estimated variance	Percentage of variation
Between groups	بین گروهی 40	268.72	1.98	10%
Within groups	درون گروهی 139	2422.04	17.42	90%
Total	کل 143	2690.75	19.41	100%

(۱/۰۷) و تنوع ژنی نای (۰/۵۷) و ژنوتیپ‌های بومی مصر به ترتیب با ۰/۶۹ و ۰/۴۲ کمترین مقادیر این شاخص‌ها را داشتند (جدول ۴).

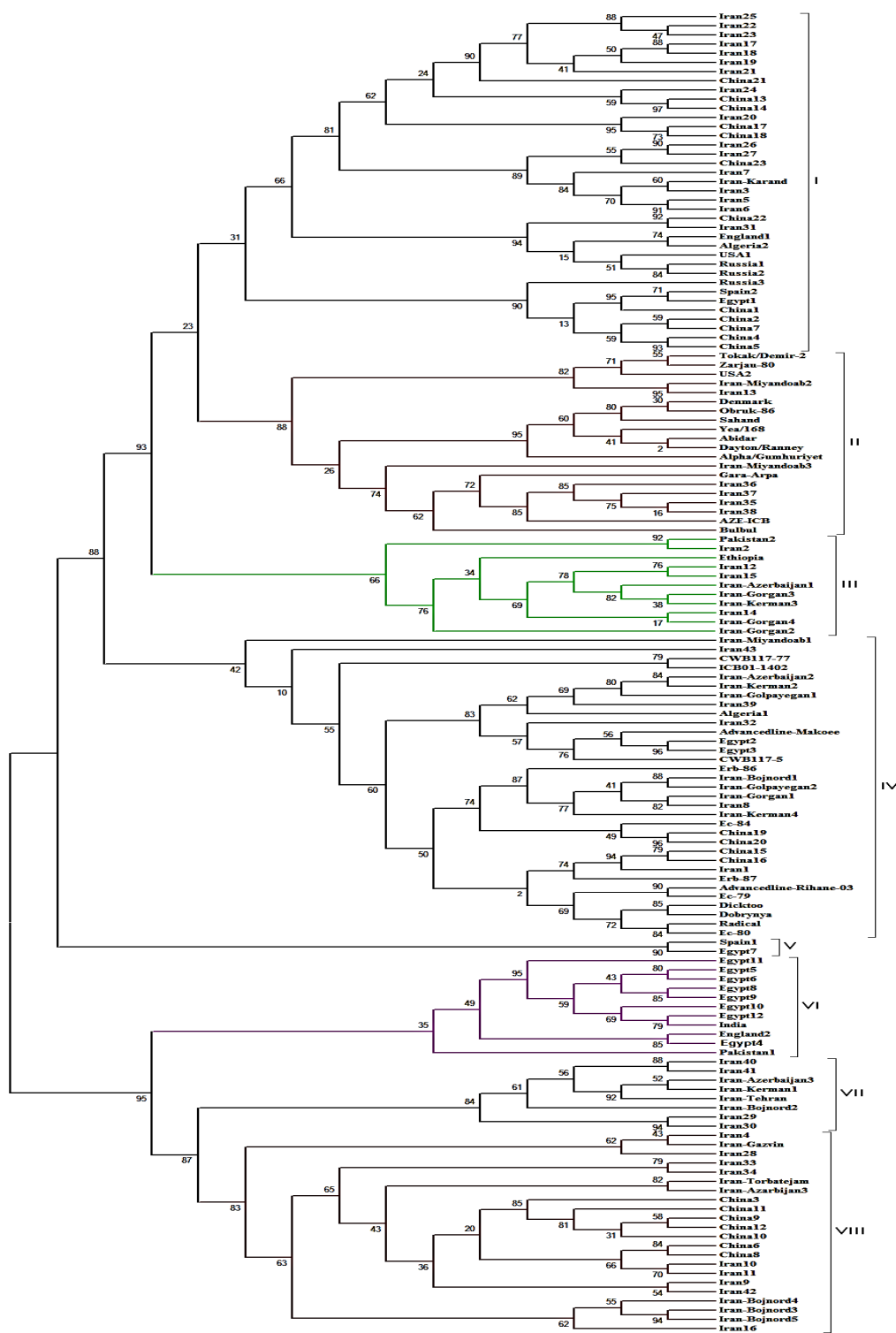
جدول ۴- شاخص‌های شانون و تنوع ژنی برای تعیین تنوع مولکولی درون گروه‌های جغرافیایی جو بر اساس داده‌های نشانگرهای ریزماهوره

Table 4. Shanon and Nei's gene diversity indices to determine molecular diversity within barley geographic groups based on microsatellite data

Index	شاخص	بومی سایر کشورها Landraces from other countries	بومی مصر Egyptian landraces	بومی چین Chinese landraces	ارقام تجاری و اصلاحی Breeding and commercial varieties	بومی ایران Iranian landraces
Shannon's index	شاخص شانون	0.83	0.69	0.91	0.87	1.07
SD	انحراف معیار	0.11	0.09	0.08	0.08	0.06
Nei's index	شاخص نی	0.45	0.42	0.52	0.49	0.57
SD	انحراف معیار	0.05	0.05	0.04	0.04	0.02

شامل ژنوتیپ‌های بومی روسیه، مصر، اسپانیا و پنج ژنوتیپ بومی چین بود. گروه دوم شامل ۱۲ لاین اصلاحی و ارقام تجاری و ژنوتیپ‌های بومی ایران (هفت ژنوتیپ) و آمریکا بود. در گروه سوم ژنوتیپ‌های بومی ایران، پاکستان و اتیوپی قرار داشتند که در بین توده‌های بومی ایران ژنوتیپ‌هایی با منشا گرگان، آذربایجان و کرمان وجود داشت. گروه چهارم شامل ۱۳ لاین اصلاحی و تجاری، ۱۳ ژنوتیپ بومی

تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Minimum evolution method و ضریب فاصله Kimura 2-parameter model ژنوتیپ‌های جو را به هشت گروه منتسب کرد (شکل ۲). گروه اول شامل سه زیر گروه بود. در زیر گروه اول ژنوتیپ‌های بومی ایران (۱۶ ژنوتیپ) و چین (شش ژنوتیپ) قرار داشتند. در زیر گروه دوم ژنوتیپ‌هایی از انگلستان، الجزایر، آمریکا و روسیه (دو ژنوتیپ) قرار داشت. زیر گروه سوم



شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو بر اساس داده‌های ریزماهوره و با استفاده از الگوریتم

Kimura 2-parameter model و ضریب فاصله

Fig. 2. Grouping of barley genotypes based on microsatellite data using Minimum evolution method algorithm and Kimura 2-parameter model distance coefficient

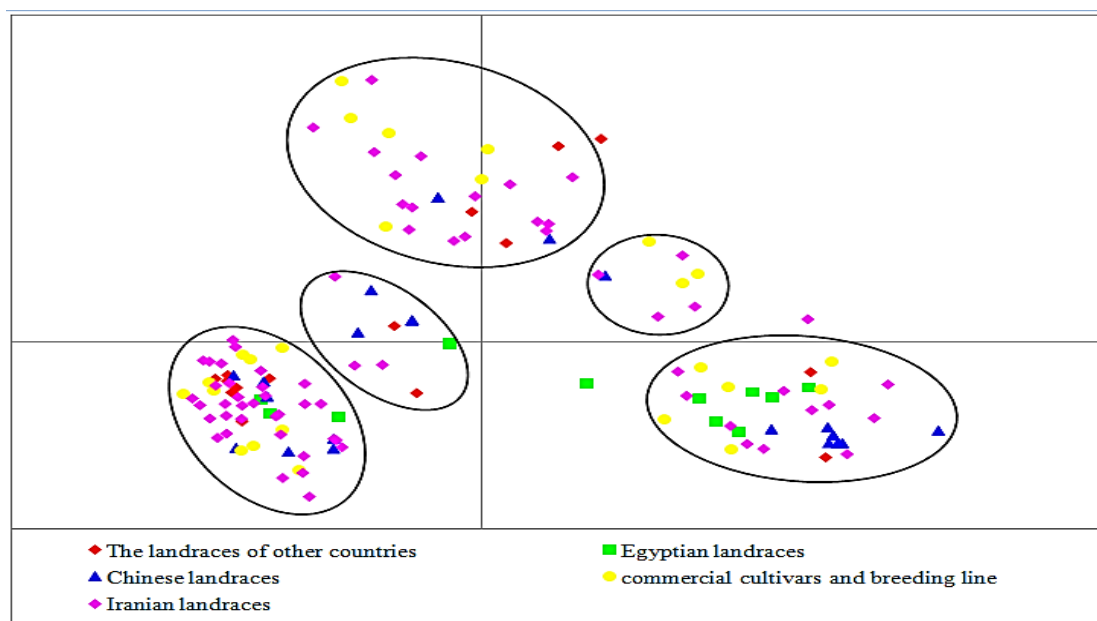
نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس دو بردار اصلی اول در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج تجزیه به بردارهای اصلی و تجزیه خوشه‌ای با هم مطابقت داشت. ملچینگر (Melchinger, 1993) در مقایسه سه روش تجزیه مختصات اصلی، تجزیه مولفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای و نقش آن‌ها در ارزیابی تنوع ژنتیکی در ذرت و جو بیان کرد که تجزیه مولفه‌های اصلی و تجزیه مختصات اصلی وقتی که سه مولفه اول بیشتر از ۲۵ درصد از تغییرات کل را تبیین می‌کند، توصیف صحیحی از روابط موجود بین گروه‌ها و ژنوتیپ‌ها را ارائه می‌دهند.

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود و نشانگرهای ریزماهواره به خوبی این تفاوت‌ها را نشان دادند. تنوع ژنتیکی بالا در توده‌های بومی ایران، بیانگر ژرم پلاسم و پشتوانه غنی برای برنامه‌های به‌نژادی جو در کشور است. ارزیابی فنوتیپی این توده‌ها از نظر صفات مختلف در جمعیت‌های ژنتیکی حاصل از این توده‌ها و شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل کننده آن‌ها، برنامه‌های به‌نژادی را از طریق روش‌های گزینش به کمک نشانگر تسریع خواهد کرد. وجود ژنوتیپ‌هایی یا ساختار ژنتیکی متنوع، استفاده از این ژنوتیپ‌ها را به عنوان والدین جمعیت‌های در حال تفرق برای تولید تنوع جدید و نیز مکان‌یابی ژن‌ها و QTLها را نیز امکان‌پذیر می‌کند.

ایران، چهار ژنوتیپ چین، دو ژنوتیپ مصری و دو ژنوتیپ الجزایر بود. در گروه پنج دو ژنوتیپ از اسپانیا و مصر قرار داشتند. اکثر ژنوتیپ‌های مصر (نه ژنوتیپ) در گروه شش واقع شدند همچنین در این گروه ژنوتیپ‌هایی از هند، پاکستان و انگلستان وجود داشتند. گروه هفت فقط شامل ژنوتیپ‌های بومی ایران بود. ۱۵ ژنوتیپ بومی ایران و ۷ ژنوتیپ چین در گروه هشت واقع شدند. با توجه به این گروه‌بندی می‌توان گفت ژنوتیپ‌های بومی ایران و چین در اکثر گروه‌ها پخش بودند در حالی که ژنوتیپ‌های بومی مصر تفکیک شده و از ۱۲ ژنوتیپ هشت ژنوتیپ در گروه شش واقع شد. لاین‌های اصلاحی و ارقام تجاری از بقیه ژنوتیپ‌ها تفکیک شده و در گروه‌های دو و چهار قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های بومی روسیه تفکیک و همگی در گروه اول واقع شدند.

از نتایج جالب توجه گروه‌بندی، قرار گرفتن ژنوتیپ‌های بومی ایران در اکثر گروه‌ها بود که این به دلیل گستردگی ایران از نظر شرایط آب و هوایی است و نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای توده‌های جو ایران است، به طوری که، توده‌های بومی ایران، بر اساس شاخص شانون و تنوع ژنی نای بیشترین تنوع درون گروهی را در مقایسه با سایر گروه‌ها داشتند.

در تجزیه به بردارهای اصلی، بردار اصلی اول تا سوم به ترتیب با ۳۷/۶۸، ۲۰/۶۱ و ۱۳/۴۸٪ و در مجموع ۷۱/۷۷٪ از تغییرات مولکولی کل بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند.



شکل ۳- پراکنش ژنوتیپ‌های جو بر اساس دو بردار اصلی حاصل از تجزیه به بردارهای اصلی با استفاده از داده‌های ریزماهواره

Fig. 3. Distribution of barley genotypes based on two principal coordinates resulted from principal coordinate analysis using microsatellite data

شده است. این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز و در آزمایشگاه ژنومیک و اصلاح نباتات مولکولی انجام شد.

#### سپاسگزاری

مواد گیاهی مورد استفاده از بانک ژن گیاهی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر توسط موسسه تحقیقات دیم کشور فراهم

#### References

- Backes, G., Orabi, J., Wolday, A., Yahyaoui, A., and Jahoor, A. 2009.** High genetic diversity revealed in barley (*Hordeum vulgare*) collected from small-scale farmer's fields in Eritrea. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 85-97.
- Baik, B. K., and Ullrich, S. 2008.** Barley for food: characteristics, improvement and renewed interest. *Journal of Cereal Science* 48: 233-242.
- Bonman, J. M., Gu, Y., Coleman-Derr, D., Jackson, E. W., and Bockelman, H. E. 2011.** Inferring geographic origin of barley (*Hordeum vulgare* L. sub sp. *vulgare*) accessions using molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 291-298.

- Comadran, J., Thomas, W. T. B., Van Eeuwijk, F. A., Ceccarelli, S., Grando, S., Stanca, A. M., Pecchioni, N., Akar, T., Al-Yassin, A., Benbelkacem, A., Ouabbou, H., Bort, J., Romagosa, I., Hackett, C. A., and Russell, J. R. 2009.** Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics* 119: 175-187.
- Condon, F., Charles Gustus, D., Rasmusson, C., and Kevi, D. S. 2008.** Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. *Crop Science* 48: 1027-1036.
- Dotlacil, L., Hermuth, J., Stehno, Z., Dvoracek, V., Bradova, J., and Leisova, L. 2010.** How can wheat landraces contribute to present breeding? *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding* 46: 70-74.
- Eleuch, L., Jilal, A., Grando, S., Ceccarelli, S., von Korff Schmising, M., Tsujimoto, H., Hajer, A., Daaloul, A., and Baum, M. 2008.** Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using simple sequence repeat markers. *Journal of Integrate Plant Biology* 50: 1004-1014.
- Fischbeck, G. 2003.** Diversification through breeding. pp. 29-52. In: von Bothmer, R., van Hintum, T., Knupffer, H., and Sato, K. (eds) *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Hadado, T. T., Rau, D., Bitocchi, E., and Papa, R. 2010.** Adaptation and diversity along an altitudinal gradient in Ethiopian barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces revealed by molecular analysis. *BMC Plant Biol* 10: 121-141.
- Hamza, S., Hamida, V. B., Rebai, A., and Harrabi, M. 2004.** SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. *Euphytica* 135: 107-118.
- Ivandic, V., Hackett, C. A., Nevo, E., Keith, R., Thomas, W. T. B., and Forster, B. P. 2002.** Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: Associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Molecular Biology* 48: 511-527.
- Kandemir, N., Yildirim, A., and Gunduz, R. 2010.** Determining the levels of genetic variation using SSR markers in Three Turkish barley materials known as Tokak. *Turkish Journal of Agriculture and Forests* 34: 17-23.
- Karim, K., Rawda, A., and Hatem, C. 2009.** Genetic diversity in barley genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis. *Bio Diversity*

- Conservation 2: 27-35.
- Liu, K., and Muse, S.V. 2005.** Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- Malysheva-Otto, L.V., Ganal, M.W., and Roder, M.S. 2006.** Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genet* 7: 1-14.
- Matus, I. A., and Hayes, P. M. 2002.** Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* 45: 1095-1106.
- Melchinger, A. E. 1993.** Use of RFLP markers for analyses of genetic relationships among breeding materials and prediction of hybrid performance. pp. 14-22. In: D. R. Buxton, (ed.), *Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Crop Science Congress*, Ames, IA., CSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Meszaros, K., Ildiko, K., Csaba, K., Judit, B., Laszlo, L., and Zoltan, B. 2007.** Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). *South African Journal of Botany* 73: 43-48.
- Naceur, A. B., Chaabane, R., El-Faleh, M., Abdelly, C., Ramla, D., Nada, A., Sakr, M., and Naceur, M. B. 2012.** Genetic diversity analysis of North Africa's barley using SSR markers. *Journal of Genetic Engineering Biotechnology* 10: 13-21.
- Newton, A. C., Akar, T., Baresel, J. P., Bebeli, P. J., Bettencourt, E., Bladenopoulos, K. V., Czembor, J. H., Fasoula, D. A., Katsiotis, A., Koutis, K., Koutsika-Sotiriou, M., Kovacs, G., Larsson, H., Pinheiro de Carvalho, M. A. A., Rubiales, D., Russell, J., Dos Santos, T. M. M., and VazPatto, M. C. 2010.** Cereal landraces for sustainable agriculture: A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30: 237-269.
- Pan, Z., Deng, G., Zhai, X., Long, H., Tang, Y., Qiang, X., and Yu, M. 2008.** Molecular analysis of cultivated naked barley (*Hordeum vulgare* L.) from Qinghai-Tibet Plateau in China using SSR markers. *Front. Agric. China* 2: 372-379.
- Pandey, M., Wagner, C., Friedt, W., and Ordon, F. 2006.** Genetic relatedness and population differentiation of Himalayan hulless barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces inferred with SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 715-729.
- Peakall, R., and Smouse, P.E. 2010. **GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research.** *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

- Pillen, K., Binder, A., Kreuzkam, B., Ramsay, L., Waugh, R., Forster, J., and Leon, J. 2000.** Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 652-660.
- Ribeiro-Carvalho, C., Guedes-Pinto, H., and Irgegas, G. 2004.** High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. *Annals of Botany* 94: 699-705.
- Saghai-Marooif, M.A., Solaiman, K., Tprgensen, R.A., and Allard, R.W. 1984.** Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 81: 8014-8018.
- Struss, D., and Plieske, J. 1998.** The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 308-315.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2011.** MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software, version 5.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Toth, G., Gaspari, Z., and Jurka, J. 2000.** Microsatellite in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.
- Varshney, R.K., Baum, M., Guo, P., and Grando, S. 2010.** Features of SNP and SSR diversity in a set of ICARDA barley germplasm collection. *Molecular Breeding* 26: 229-242.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B. J., Ye, Z. H., and Mao, J. X. 1997.** POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.*
- Zohary, D., and Hopf, M. 2000.** Domestication of plants in the world: The origin and spread of cultivated plants in west Asia, Europe and the Nile valley. Clarendon Press, Oxford, UK.



