"مجله علوم زراعی ایران"
جلد سیزدهم، شماره ۱ بهار ۱۳۹۰

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از نشانگرهای SSR و EST-SSR

Analysis of genetic diversity in barley genotypes using SSR and EST-SSR markers

احمد حیدری[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۲]، محمد مقدم[۳]، محمدرضا شکیبا[۴]، کاظم قاسمی گلعذانی[۵] و احمد یوسفی[۶]

چکیده

حیدری، ا.، س. ا. محمدی، م. مقدم، م. ر. شکیبا، ک. قاسمی گلعذانی و ا. یوسفی. ۱۳۹۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از نشانگرهای SSR و EST-SSR. **مجله علوم زراعی ایران. ۱۳ (۱) ۱۵۶-۱۴۶.**

تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها اساس شناسایی والدین مناسب برای اهداف اصلاحی مختلف بشمار می‌رود. در این راستا نشانگرهای مولکولی بطور موفقیت‌آمیز در ارزیابی تنوع ژنتیکی انواع گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این آزمایش، تنوع ژنتیکی ۳۵ لاین و رقم جو، با استفاده از ۱۹ جفت آغازگر SSR **و** EST-SSR **بررسی شد که در مجموع ۱۵۷ آلل چند شکل با میانگین ۷/۸۵ آلل به ازای هر جفت آغازگر تکثیر شد. کمترین تعداد آلل مربوط به نشانگر** Bmag581 **با دو آلل و بیشترین آن مربوط به نشانگر** Bmag134 **با ۱۵ آلل بود. میزان اطلاعات چند شکلی برای نشانگرهای مورد بررسی بین ۰/۱۵ تا ۰/۸۹ با میانگین ۰/۶۹ بود که بیشترین مقدار به نشانگر** Ebmac419 **و کمترین آن به نشانگر** Bmag581 **تعلق داشت. از نظر تنوع ژنی، دو نشانگر** Bmag581 **و** Ebmac419 **به ترتیب کمترین (۰/۱۷) و بیشترین (۰/۹) مقدار را داشتند. تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه منتسب کرد. بررسی درصد زنده‌مانی در مزرعه، میانگین درصد زنده‌مانی در آزمایشگاه ،** LT50 **و تراوش یونی ژنوتیپ‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های گروه دو در مقایسه با سایر گروه‌ها از مقاومت به سرمای کمتری برخوردار بودند. نشانگرهای مورد استفاده در این آزمایش توانستند ژنوتیپ‌های بسیار حساس به سرما را از بقیه ژنوتیپ‌ها تفکیک کنند.**

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، جو و نشانگرهای EST-SSR.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۵/۱۶

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: sa_mohammadi@yahoo.com)
۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۴- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۵- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
۶- پژوهشگر موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

مقدمه

جو یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است و از نظر تولید جهانی چهارمین غله بعد از گندم، برنج و ذرت محسوب می‌شود. بیش از ۱۳۶×۱۰^{۶} تن جو هر ساله در جهان تولید می‌شود که مورد استفاده عمده آن در تغذیه دام، طیور و صنعت می‌باشد (Zong-Yun *et al*., 2006b).

وجود تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی مواد گیاهی از نظر انتخاب ترکیب والدینی مناسب برای تولید جمعیت‌های مناسب، طراحی برنامه‌های اصلاحی موثر، پاسخ به گزینش طولانی مدت و کاهش آسیب پذیری ژنتیکی حائز اهمیت می‌باشد (Kresovich *et al*., 1995; Sorrells & Wilson, 1997; Troyer *et al*., 1998). در جو از صفات مورفولوژیکی (Nevo *et al*., 1979) و نشانگرهای مولکولی مانند پروتئین‌های ذخیره‌ای (Nevo *et al*., 1983)، ایزوزیم‌ها (Chalmers *et al*., 1992)، DNA ریبوزومی (Saghai-Maroof *et al*., 1984)، RFLP (Petersen *et al*., 1994)، RAPD (Baum *et al*., 1997)، AFLP (Pakniyat *et al*., 1997)، رتروترانسپوژن‌ها (Kalendar *et al*., 2000) و SSR (Forster *et al*., 1997) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شده است. به علت محدودیت تعداد نشانگرها و تاثیر عوامل محیطی و مراحل رشدی گیاه بر صفات مورفولوژیک و پروتئین‌ها، امروزه نشانگرهای مبتنی بر DNA به عنوان ابزارهای کارآمد و مکمل برای تعیین سطح تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Manifesto *et al*., 2001). ازبین نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای SSR به علت تکرارپذیری بالا، ماهیت چند آللی، توارث همبارز، فراوانی ژنومی بالا و توزیع تصادفی در ژنوم کاربرد فراوانی در مطالعات گیاهی دارند (Gupta and Varshney, 2000). اخیراً، دسترسی به اطلاعات توالی‌های تظاهر یافته نشانمند شده (EST) امکان تولید نشانگرهای ریزماهواره مبتنی برESTها را در تعدادی از گونه‌های گیاهی از جمله غلات فراهم کرده است. SSRهای مبتنی بر ESTها در مطالعه گونه‌های خویشاوند از پتانسیل بیشتری نسبت به نشانگرهای SSR برخوردارهستند. در حال حاضر بیش از ۱۰۰۰ نشانگر مبتنی بر EST/cDNA شامل ۵۸۹ RFLP، ۲۵۵ SNP و ۱۸۵ نشانگر SSR در جو موجود است. این نشانگرها ابزارهای مناسب برای انواع اهداف شامل تجزیه روابط شجره‌ای، مطالعه ارتباط نشانگر- صفت و مکان‌یابی‌های مقایسه‌ای در سایر غلات هستند. نتایج آزمایشات انجام شده امکان استفاده از این نشانگرها را در غلاتی مانند گندم، برنج، ذرت، سورگوم و چاودار و حتی گونه‌های دولپه‌ای نشان داده‌است (Gupta *et al*., 2003; Rajeev *et al*., 2004; Varshney *et al* ., 2004).

هو و همکاران (Hou *et al*., 2005) از نشانگرهای RAPD و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۶ ژنوتیپ جو استفاده کردند. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی برای نشانگر RAPD و ISSR به ترتیب ۰/۵۷۴ و ۰/۶۳۱ بود. در تجزیه RAPD، ۸۴ تا از ۱۰۹ نوار (۷۷/۰۶ درصد) چند شکل بودند. در تجزیه ISSR از مجموع ۱۰۷ نشانگرشناسایی شده، ۱۰۵ نشانگر چند شکلی نشان دادند. زانگ‌یان و همکاران (Zong-Yun *et al*., 2006b) رابطه فیلوژنتیک ۱۰۶ ژنوتیپ جو وحشی (شامل ۵۰ ژنوتیپ جو دو ردیفه وحشی (HS) *H. vulgare ssp. spontaneum*، ۲۹ رقم (HA) *H. vulgare ssp. agriocrithon* و ۲۷ رقم جو وحشی شش ردیفه *H. vulgare ssp. agriocrithon* Var. (HL) Langunculiforme) را با استفاده از ۳۰ نشانگر SSR بررسی کردند. براساس نتایج حاصله، کلیه ژنوتیپ‌های HS و HA در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. در حالی‌که ژنوتیپ‌های HL بین گروه‌های HS و HA (۱۴ ژنوتیپ در گروه HS و بقیه در گروه HA) تقسیم شدند. آنها گزارش کردند که ژنوتیپ‌های HL شکل بینابین ژنوتیپ‌های HS و HA می‌باشند. ماتوس و هایز

(Matus and Hayes, 2002) تنوع ژنتیکی سه گروه از ژرم‌پلاسم جو (زیر گونه *spontaneum*، زیر گونه *vulgare* و لاین‌های پیشرفته الیت) را با استفاده از نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار دادند. در ۱۴۷ ژنوتیپ مورد بررسی، مجموعا ۶۸۷ آلل در ۴۲ جایگاه تکثیر شد. تعداد آلل‌ها در هر جایگاه از ۴ تا ۳۱ با میانگین ۳/۱۶ آلل متغیر بود. در زیر گونه *spontaneum* میانگین تعداد آلل در هر جایگاه برابر با ۱۰/۳، در زیر گونه *vulgare*، ۸/۳ و در لاین‌های اصلاحی الیت ۵/۸ آلل برای هر جایگاه بود. میزان اطلاعات چند شکلی از ۰/۰۸ تا ۰/۹۴ متغیر بود. تجزیه مولکولی تنوع بالایی را در جمعیت اجدادی و همچنین در والدین جمعیت‌های در حال تفرق نشان داد، ولی سطح تنوع ژنتیکی در داخل ژرم‌پلاسم پیشرفته الیت پایین بود. ژنوتیپ‌های جمعیت اجدادی به چهار گروه اصلی تقسیم شدند و گروه بندی انجام شده با منشا جغرافیایی مطابقت داشت. والدین جمعیت‌های در حال تفرق به سه گروه اصلی منتسب شدند که این گروه‌بندی با منشا جغرافیایی، عملکرد دانه و عادت رشدی آنها مطابقت داشت. لاین‌های اصلاحی الیت نیز در سه گروه قرار گرفتند وگروه‌بندی حاصل با ویژگی دو ردیفه یا شش ردیفه بودن آنها مطابقت داشت.

اهداف این آزمایش عبارت از بررسی سطح تنوع ژنتیکی لاین‌ها و ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده در برنامه‌های به‌نژادی مقاومت به سرما و تعیین روابط ژنتیکی آنها برای شناسایی والدین مناسب جهت برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی ارزیابی شده شامل ۳۵ ژنوتیپ جو مورد استفاده در برنامه های اصلاح برای مقاومت به سرما بود که نام و شجره آنها در جدول ۱ ارائه شده است. این مواد توسط موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر تامین شدند.

ارزیابی فنوتیپی

به منظور ارزیابی بقای زمستانی، آزمایش مزرعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. ارزیابی آزمایشگاهی در قالب طرح کرت‌های خرد شده در سه تکرار در دماهای ۶-، ۱۰-، ۱۴-، ۱۶- و ۱۸- درجه سانتیگراد به عنوان عامل اصلی و رقم به عنوان عامل فرعی اجرا شد. ابتدا نمونه‌ها در سردخانه در دمای ۶- درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ساعت قرار داده شده و سپس دماهای مربوطه روی هر گروه نمونه اعمال شد. نمونه‌ها پس از مدت زمان لازم قرار گرفتن در دمای مربوطه، به مدت ۱۲ ساعت تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شده و سپس به گلخانه منتقل شدند. پس از تعیین درصد زنده‌مانی در هر دما، LT_{50} و تراوش یونی هر ژنوتیپ محاسبه شد.

ارزیابی مولکولی

DNA ژنومی از برگ‌های جوان ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش سقای معروف و همکاران (Saghai-Maroof *et al.*, 1984) استخراج شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین گردید. پس از تعیین غلظت نمونه‌های DNA، برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، غلظت نمونه به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد. برای تکثیر جایگاههای ریزماهواره از ۳۵ جفت (۲۲ جفت EST-SSR و ۱۳ جفت آغازگر SSR) استفاده گردید(Ramsay *et al.*, 2000) . واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۵-۵۲ درجه سانتیگراد (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه،

جدول ۱- شجره ارقام جو مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Pedigree of barley genotypes used in the present experiment

No . شماره	Genotype ژنوتیپ	Pedigree شجره
1	EC79-10	Walfajre/Miraj 1
2	EC79-13	Kmk//Rbr/Wa2196-68/3/EBC(A)
3	EC79-18	Lignee 131//4341 N/Ortolan
4	EC80-7	YEA389.3/YEA475.4
5	EC80-11	ALGER/(CI10117/CHOYO..
6	EC80-13	CERES//WI2192/EMIR/3/KAROON
7	EC81-11	Coss/OWB 71080-44-lH
8	EC81-13	Comp 89-9Cr-79-07/Atem//(Alpha/HC1905//Robur)/3/.
9	EC82-10	Arar/Productive
10	EC83-4	L.131/Gerbel//Ager-Ceres/3/(Scotia/Wa...)
11	EC83-5	Arar/L.1242
12	EC83-12	K-096M3
13	EC83-17	MAKOUEE//ZARJOW/80-5151
14	A1C84-7	Star/Dundy
15	A1C84-9	F2//Radical/Karat/3/Radical/4/Xemus
16	A1C84-12	Kozir/330
17	A1C84-14	Astrix(C)/3/Mal/OWB753328-5H//Perga/Boyer
18	A1C84-15	Monolit/Plaisant
19	A2C84-5	CWB117-77-9-7/Teran 78
20	A2C84-8	Legia/3/ARIZONA5908/ATHS//L.640
21	A2C84-11	Roho/Mazurka//Dyton
22	A2C84-12	Boyer(F356)126//Cem1413/Kt2085
23	A2C84-14	Cyclone/Arar
24	A2C84-18	Mal/OWB753328-5H//11840-76/3/Radical
25	A2C84-17	Monolit/Plaisant
26	Makouee	Makouee
27	CB74-2	CB74-2
28	Rihaneh	Rihane
29	KAVIR	Kavir
30	73M4-C	73M4-30
31	Schulyer	Schuyler
32	L.1242	L.1242
33	Aths	Aths
34	EM80-7	Rihane//Aths/Bc
35	EM80-9	LB.Iran/Una 8271//Gloria"S"/Come"s"-11M/3/Kavir

بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و در انتها یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات تکثیری با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش نیترات نقره صورت گرفت.

الگوهای نواری به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیاز دهی شدند. برای هر نشانگر تعداد آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بصورت a، b، c و نیز نامگذاری گردید. از این روش امتیازدهی برای محاسبه فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضرایب مبتنی بر فراوانی‌های آللی استفاده شد. برای هر جایگاه، پارامترهای میزان اطلاعات چندشکلی(PIC) و تنوع ژنی (D) از رابطه‌های ۱ و ۲ با استفاده از برنامه

PowerMarker (Liu and Muse, 2005) برآورد شدند.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2 p_i^2 p_j^2 \quad (۱)$$

$$D = 1 - \sum p_i^2 \quad (۲)$$

در این رابطه‌ها، p_i و p_j به ترتیب فراوانی آلل‌های i و j در یک جایگاه ریزماهواره می‌باشند. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها براساس ضریب Number of difference، با استفاده از نرم افزار MEGA3 (Kumar *et al.*, 2004) محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای نیز براساس الگوریتم Neihbour-Joining انجام گرفت.

نتایج و بحث

نوزده جفت آغازگر مورد استفاده الگوی‌های نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند (جدول ۲). نواری نشانگر Bmag211 EST-SSR برای تعدادی از ژنوتیپ‌های جو مورد ارزیابی در شکل یک ارائه شده است. آغازگر HVBM5/001-5/006 دو جایگاه را در ژنوم تکثیر کرد که ممکن است ناشی از مضاعف شدن این جایگاه ریزماهواره در ژنوم جو باشد. در مجموع ۱۵۷ آلل در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی با میانگین ۷/۸۵ آلل به ازای هر نشانگر تکثیر شدند. نشانگرهای Bmag134 و Ebmac419 به ترتیب با ۱۵ و ۱۴ آلل بیشترین تعداد آلل و نشانگر Bmag581 با دو آلل کمترین تعداد آلل را تولید کردند. زونگ یان و همکاران (Zong-Yun *et al.*, 2006a) ۲۴۸ آلل در ۳۵ جایگاه SSR در ۶۵ ژنوتیپ جو، پاندی و همکاران (Pandey *et al.*, 2004) ۱۶۵ آلل با میانگین ۶/۱ آلل در ۲۷ جایگاه SSR در ارزیابی ۱۰۷ ژنوتیپ جو و هامیدا و هامزا (Hamida and Hamza, 2004) با ارزیابی ۲۶ ژنوتیپ جو با استفاده از ۱۵ نشانگرSSR، میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه را ۳/۶ آلل گزارش کردند. علت تفاوت در تعداد آلل بین پژوهش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تعداد متفاوت ژنوتیپ‌ها و تفاوت در پایه ژنتیکی آنها باشد. از نظر تعداد آلل، نشانگرهای مربوط به گروه پیوستگی ۲H با میانگین ۱۰/۷۵ بیشترین و گروه پیوستگی ۷H با میانگین ۴/۵ دارای کمترین تعداد آلل بودند. یکی از دلایل این موضوع را می‌توان به انتخاب بیشتر نشانگرها از یک کروموزوم نسبت داد. وارشنی و همکاران (Varshney *et al.*, 2005) برای بررسی تنوع ژنتیکی جو از ۱۸۵ نشانگر SSR استفاده کردند که توزیع نشانگرها روی گروه‌های کروموزومی مختلف از ۲۱ (۷H) تا ۳۵ (۳H) متفاوت بود.

فراوانی آلل شایع (Common allele) (آللی که در بین کلیه آلل‌های مشاهده شده برای یک نشانگر، بیشترین فراوانی را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارد)، از ۰/۱۸ (Bmag134 و Ebma419) تا ۰/۹۱ (Bmag581) با میانگین ۰/۳۸ متغیر بود. بیشترین فراوانی آلل شایع مربوط به نشانگرهای Bmag581 و کمترین آن مربوط به دو نشانگر Bmag134 و Ebmac419 بود. عقیده بر این است که بقیه آلل‌ها از آلل شایع منشا گرفته‌اند. هتروزیگوتی مشاهده شده برای ژنوتیپ‌ها از صفر تا ۰/۲۳ با میانگین ۰/۰۱ متغیر بود. ژنوتیپ‌های جو بیشترین میزان هتروزیگوتی را در جایگاه Bmag125 نشان دادند. عدم وجود هتروزیگوتی در بیشتر نشانگرها ناشی از نحوه تولید مثل گیاه است. با توجه به اینکه جو یک گیاه خودگشن است، بنابراین، هتروزیگوتی در این گیاه کمتر می‌باشد. تنوع ژنی یا هتروزیگوتی مورد انتظار که احتمال متفاوت بودن دو آلل تصادفی از دو فرد را نشان می‌هد، در محدوده ۰/۱۷ تا ۰/۹۰ با میانگین ۰/۷۲ بود. بیشترین میزان تنوع ژنی به نشانگر Bmag134 (۰/۹۰) و کمترین آن به نشانگر Bmag581 (۰/۱۷) مربوط بود. تنوع ژنی در جو توسط استام و همکاران (Stam *et al.*, 2007) بین ۰/۰۳ تا ۰/۸۹ و توسط ایواندیک و همکاران (Ivandic *et al.*, 2002) بین ۰/۲۵ تا ۰/۷۹ گزارش شد. ماتوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) بیان کردند که مقادیر بالای تنوع ژنی توانایی نشانگرها را در تمایز ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد.

میزان اطلاعات چند شکلی در مجموع نشانگرهای

شکل ۱- الگوی نواری نشانگر Bmag211 در تعدادی از ژنوتیپ‌های جو مورد ارزیابی

Fig. 1. The banding pattern of Bmag211 marker in some of barley genotypes

جدول ۲- اطلاعات مربوط به نشانگرهای ریزماهواره چند شکل در ژنوتیپ‌های جو مورد ارزیابی

Table 2. The information related to polymorphic EST-SSR markers in the barley genotypes

نشانگر Marker	کروموزوم Locus	فراوانی آلل شایع Frequency	تعداد آلل Number	تنوع ژنی Gene diversity	هتروزیگوتی Heterozyg	میزان اطلاعات چند شکلی PIC
Bmag382	1H	0.29	5	0.75	0.00	0.71
HVHVA1	1H	0.45	4	0.63	0.00	0.55
Bmag211	1H	0.28	8	0.83	0.00	0.81
HVM40	2H	0.36	5	0.73	0.00	0.69
Bmag125	2H	0.31	13	0.81	0.23	0.79
HVM36	2H	0.27	11	0.86	0.00	0.86
Bmag134	2H	0.18	15	0.90	0.00	0.88
Ebmac415	2H	0.45	4	0.61	0.00	0.53
HVLTPPB	3H	0.39	5	0.67	0.00	0.61
Ebmac419	4H	0.18	14	0.89	0.00	0.90
Hvsf2/03R-F2/01F	4H	0.74	3	0.41	0.00	0.36
Ebmac701	4H	0.45	8	0.66	0.00	0.61
Bmag353	4H	0.33	12	0.84	0.00	0.82
HVBM5/043-5/035	5H	0.35	9	0.79	0.14	0.76
HVBM5/001-5/006-1	5H	0.39	7	0.77	0.00	0.74
HVBM5/001-5/006-2	5H	0.33	6	0.76	0.00	0.72
Bmag9	6H	0.35	8	0.77	0.21	0.74
Bmag18	6H	0.21	11	0.88	0.00	0.87
Bmag581	7H	0.91	2	0.17	0.00	0.15
HVM4	7H	0.42	7	0.75	0.00	0.71
Mean میانگین		0.38	7.85	0.72	0.03	0.69
SD انحراف معیار		.04	0.83	0.03	0.01	0.04

مورد استفاده بین ۰/۱۵ تا ۰/۹۰ با میانگین ۰/۶۹ متغیر بود (جدول ۲). بیشترین میزان PIC به دو نشانگر Ebmac419 (۰/۹) و Bmag134 (۰/۸۸) و کمترین میزان آن به نشانگر Bmag581 (۰/۱۵) اختصاص داشت. می‌توان گفت که دو نشانگر Ebmac419 و Bmag134 قدرت تمایز بالاتری را در این گروه از ژنوتیپ‌ها داشتند. میزان اطلاعات چند شکلی در مطالعه وارشنی و همکاران (Varshney *et al.*, 2005) ۰/۴۸، پیلن و همکاران (Pillen *et al.*, 2000) ۰/۴۶ و هامیدا و هامزا (Hamida and Hamza, 2004) ۰/۴۵ گزارش شده است. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک و تمایز بالای آن نشانگر می‌باشد (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2004).

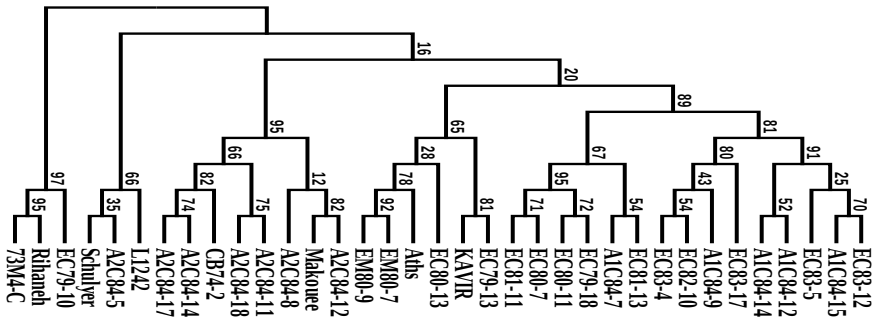
همانطوریکه ملاحظه می‌شود نشانگرهایی که دارای میزان اطلاعات چند شکلی بالایی بودند، تنوع ژنی بالایی نیز داشتند که این موضوع نشان دهنده همبستگی بین PIC و تنوع ژنی است.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها

تجزیه خوشه‌ای براساس الگوریتم Neibour Joining و ضریب فاصله Number of difference ژنوتیپ‌های جو را به پنج گروه منتسب کرد (شکل ۲). نتایج گروه‌بندی تا حد زیادی ارتباط بین تنوع مولکولی و صفات مرتبط با مقاومت به سرما (جدول ۳) را نشان داد. در این گروه‌بندی، ۱۲ ژنوتیپ با مقاومت به سرمای متوسط تا بالا در یک گروه قرار گرفتند. با وجود این، ژنوتیپ‌های EC83-12، A1C84-15، A1C84-14 و A1C84-9 از میانگین بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های این گروه از نظر مقاومت به سرما برخوردار بودند که در راس آنها ژنوتیپ شماره EC83-12 قرار داشت. به طور کلی، ژنوتیپ‌های این گروه دارای مقاومت بالاتری نسبت به گروه‌های ۲، ۳ و ۵ بود. شش ژنوتیپ EC80-13، EC79-13، Aths، EM80-7 و EM80-9 در گروه ۲ قرار گرفتند. این گروه نسبت به بقیه گروه‌ها از مقاومت به سرمای کمتری برخوردار بود و ژنوتیپ‌های حساس به سرما در این گروه واقع شدند. در گروه سوم هشت ژنوتیپ قرار داشت. ژنوتیپ‌های این گروه در مجموع مقاومت پایین‌تری نسبت به گروه اول و چهارم داشتند.

از ژنوتیپ‌های دارای مقاومت بالاتر در این گروه می‌توان سه ژنوتیپ A2C84-11، A2C84-14 و A2C84-18 را نام برد. گروه چهارم شامل سه ژنوتیپ A2C84-5، L.1242 و Schulyer بود. جدول ۳ موید این نکته است که این گروه از لحاظ صفات درصد زنده‌مانی در مزرعه و آزمایشگاه، تراوش یونی و LT_{50} از ارزش بالاتری برخوردار بود و در نتیجه می‌توان این گروه را در زمره گروه دارای مقاومت بیشتر به سرما در نظر گرفت. گروه پنجم نیز در بر گیرنده سه ژنوتیپ 73M4-C، Rihaneh و EC79-10 بود که از لحاظ میانگین صفات مختلف ارزش پایینی داشت و نسبت به دیگر گروه‌ها، بجز گروه دوم حساسیت بیشتری به سرما نشان داد.

در مجموع، به نظر می‌رسد که نشانگرهای مورد مطالعه توانسته‌اند ژنوتیپ‌های حساس‌تر به سرما را از بقیه ژنوتیپ‌ها تفکیک کنند. در نتیجه به نظر می رسد که از این نشانگرها می‌توان برای غربال اولیه ژنوتیپ‌ها و تمایز ژنوتیپ‌های بسیار حساس از بقیه استفاده کرد و نشانگرهای EST-SSR ابزار مناسبی برای تفکیک و شناسایی ارقام و ژنوتیپ های مختلف جو می‌باشند. نتایج این تحقیق می‌تواند در راستای برنامه ریزی اصلاحی به منظور ایجاد جمعیت‌های متنوع‌تر برای صفات و جایگاهای مختلف کروموزومی مد نظر قرار گیرد.



شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از الگوریتم Neighbour Joining و ضریب فاصله Number of difference

Fig. 2. Grouping of the barley genotypes using neighbour joining algorithm and number of difference distance

جدول ۳- میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه از نظر مقاومت به سرما در ژنوتیپ‌های جو

Table 3. Mean groups produced of cluster analysis cold tolerance in the barley genotypes

LT50 Lethal temperature (°C)	میانگین درصد زنده‌مانی در دماهای مختلف Average survival percentage in the different temperature	میانگین تراوش یونی در دماهای مختلف Average electrolyte leakage in the different temperatures	درصد زنده‌مانی در مزرعه Survival percentage in the field		
-16.31	52.72	66.77	77.92	(Group 1)	گروه ۱
-14.34	29.53	78.54	41.48	(Group 2)	گروه ۲
-16.30	48.96	70.13	84.46	(Group 3)	گروه ۳
-16.85	62.08	69.43	89.39	(Group 4)	گروه ۴
-15.93	48.33	73.38	70.31	(Group 5)	گروه ۵

علاوه براین، با مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از ارزیابی این ریزماهواره‌ها روی ارقام وحشی می توان روند انتقال و جریان ژنی از ارقام وحشی به ارقام زراعی را مورد بررسی قرار داد.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه ژنومیک و اصلاح نباتات مولکولی، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز و با اعتبار قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز انجام شد.

منابع مورد استفاده **References**

Baum, B. R., E. Nevo, D. A. Johnson and A. Beiles. 1997. Genetic diversity in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genet. Res. Crop Evol. 44: 147–157.

Chalmers, K. J., R. Waugh, J. Watters, B. P. Forster, E. Nevo, R. J. Abbott and W. Powell. 1992. Grain isozyme and ribosomal DNA variability in *Hordeum spontaneum* populations from Israel. Theor. Appl. Genet. 84: 313–322.

Forster, B. P., J. R. Russell, R. P. Ellis, L. L. Handley, D. Robinson, C. A. Hackett, E. Nevo, R. Waugh, D. C. Gordon, R. Keith and W. Powell. 1997. Locating genotypes and genes for abiotic stress tolerance in barley: a strategy using maps, markers and the wild species. New Phytol. 137: 141–147.

Gupta, P. K., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumer and H. S. Balyan. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Mol. Genet. Genomics, 270:315–323.

Gupta, P. K. and R. K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163–185.

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

Hou, Y. C., Z. H. Yan, Y. M. Wei and Y. L. Zheng. 2005. Genetic diversity in barley from west China based

on RAPD and ISSR analysis. Barley Genet. Newslett. 35: 9-22.

Ivandic, V., C. A. Hackett, E. Nevo, R. Keith, W. T. B. Thomas and B. Forster. 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.

Kalendar, R., J. Tanskanen, S. Immonen, E. Nevo and A. H. Schulman. 2000. Genome-evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6603–6607.

Kresovich, S., A. K. Szewe-McFadden, S. M. Bliek and J. R. McFerson. 1995. Abundance and characterization of simple- sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). Theor. Appl. Genet. 91: 206–211.

Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3. Integrated sofware for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment. Briefing in Bioinformatics, 5:150-163.

Liu, K. and V. Muse. 2005. PowerMarker: Integrated analysis of genetic marker data. Bioinformatics, 21: 2128-2129.

Manifesto, M. M., A. R. Schlatter, H. E. Hopp, E. Y. Suarez and J. Dubcivsky. 2001. Quantitative evaluation of diversity in wheat germplasm using molecular markers. Crop Sci. 41:682-690.

Matus, I. A. and P. M. Hayes. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. Genome 45: 1095-1106.

Nevo, E., A. Beiles, N. Storch, H. Doll and B. Andersen. 1983. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. Theor. Appl. Genet. 64:123–132.

Nevo, E., D. Zohary, A. H. D. Brown and M. Haber. 1979. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Israel. Evolution, 33: 815–833.

Pakniyat, H., W. Powell, E. Baird, L.L. Handley, D. Robinson, C. M. Scrimgeour, E. Nevo, C.A. Hackett, P.D.S. Caligari and B.P. Forster. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. Genome 40: 332–341.

Pandey, M. P., C. Wagner, W. Friedt and F. Ordan. 2004. Assessment of genetic diversity of hull-less barley germplasm in the high altitude Himalayas of Nepal. Theor. Appl. Genet. 113: 715-729.

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

Pillen, K., A. Binder, B. Kreuzkam, L. Ramsay, R. Waugh, J. Förster and J. Eon. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use to differentiate German barley cultivars. Genetics 101: 652-660.

Rajeev, K., A. G. Varshney and M. E. Sorrells. 2004. Genic microsatellite markers in plants: Features and application. Trend Biotech. 23: 48-55.

Ramsay, L., M. Macaulay, S. degli Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K. J. Edwards, S. Tuvesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmiroli, T. Sjakste, M. Ganal, W. Powell and R. Waugh. 2000. A Simple Sequence Repeat-Based Linkage Map of Barley. Genetics 156: 1997–2005.

Ribeiro-Carvalho, C., H. Guedes-Pinto and G. Igregas. 2004. High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. Ann. Bot. 94: 699-705.

Saghai-Maroof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014– 8018.

Sorrells, M. E. and W. A. Wilson. 1997. Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement. Crop Sci. 37: 691–697.

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

Troyer, A. F., S. J. Openshaw and K. H. Knittle. 1998. Measurementof genetic diversity among popular commercial corn hybrids.Crop Sci. 28: 481–485.

Varshney, R. K., U. Hahnel, T. Thiel, N. Stein, L. Altschmied, P. Langridge and A. Graner. 2005. Genetic and mapping of genic microsatellites in barley (*Hordeum vulgare L.*). Plant Breed. 41: 153-159.

Zong-Yun, F., Z. Li-Li, Z. Yi-Zhang and L. Hong-Qing 2006a. Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated six-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. Genet. Mol. Biol. 29:330-338.

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

Analysis of genetic diversity in barley genotypes using SSR and EST-SSR markers

Heidari, A.[1], S. A. Mohammadi[2], M. Moghaddam[3], M. R. Shakiba[4], K. Ghasemi Golezani[5] and A. Youssefi[6]

ABSTRACT

Heidari, A., S. A. Mohammadi, M. Moghaddam, M. R., Shakiba, K. Ghasemi Golezani and A. Yousefi, A. 2011. Analysis of genetic diversity in barley genotypes using SSR and EST-SSR markers. **Iranian Journal of Crop Sciences. 13 (1) 146-156. (In Persian).**

Determination of genetic diversity level and genotype relationships is fundamental for identification of desirable parents to be used in different breeding programs. Molecular markers have been successfully used for analysis of genetic diversity in various crops. Genetic diversity among 35 lines and genotypes of barley was studied using 19 pairs of SSR and EST-SSR primers. Totally 157 alleles were produced with an average of 4.06 alleles per locus. Bmag581 with two and Bmag134 with 15 alleles had the lowest and highest allele number, respectively. Polymorphic information content ranged from 0.15 (Bmag518) to 0.89 (Ebmac419) with an average of 0.69. The markers Bamg581 and Ebmac419, had the lowest (0.17) and the highest (0.90) gene diversity, respectively. Cluster analysis based on molecular data assigned the genotypes into five groups. Group 2 genotypes showed low level of tolerance to cold and contained sensitive genotypes. In general, it seems that the studied markers were able to differentiate the most cold sensitive barley genotypes from the rest.

Key Words: Barley, Cluster analysis, EST-SSR markers and Genetic diversity.

Received: March, 2009 Accepted: August, 2010
1- Former MSc. student, Tabriz Univeristy, Tabriz, Iran
2- Prof., Tabriz Univeristy, Tabriz, Iran (Corresponding author) (Email: sa_mohammadi@yahoo.com)
3- Prof., Tabriz Univeristy, Tabriz, Iran
4- Prof., Tabriz Univeristy, Tabriz, Iran
5- Prof., Tabriz Univeristy, Tabriz, Iran
6- Researcher, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran