

ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های دو گونه جو (*H. vulgare* L. و *H. spontaneum* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

Assessment of genetic diversity in accessions of two barely species (*H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L.) using SSR markers

امین ابراهیمی^۱، محمدرضا نقوی^۲، منیژه سبکدست^۳ و محسن مردی^۴

چکیده

ابراهیمی^۱، م. ر. نقوی^۲، م. سبکدست و م. مردی^۴. ۱۳۹۸. ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های دو گونه جو (*H. Spontaneum* L. و *H. vulgare* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. مجله علوم زراعی ایران. ۱۲ (۳) ۳۳۳-۳۴۵.

در این آزمایش تنوع ژنتیکی ۷۳ نمونه جو ایران از دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر ریزماهوره مورد ارزیابی قرار گرفت. الگوهای نواری بصورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیاز دهی شدند. برای رسم دندروگرام ابتدا ماتریس تشابه با روش دایس تشکیل و سپس دندروگرام با استفاده از الگوریتم UPGMA با نرم افزار NTSYSpc 2.0 رسم شد. همچنین از این نرم افزار برای رسم پراکنش نمونه‌ها در دو بعد اول تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز استفاده شد. بیشترین تعداد آلل در گونه *H. vulgare* مربوط به جایگاه‌های Bmac0316 و Hvm40 با ۸ آلل و کمترین آن مربوط به جایگاه Hvm70 با دو شکل بود. بیشترین تعداد آلل در گونه *H. spontaneum* مربوط به جایگاه Hvm40 (با ۹ آلل) و کمترین آن مربوط به جایگاه‌های Hvm70 و HvmLoH1A (با ۲ آلل) بود. میزان PIC در گونه *H. vulgare* از ۰/۸۰ (جایگاه Bmac0040) تا ۰/۱۹ (جایگاه Bmag0603) و در گونه *H. spontaneum* از ۰/۹۱ (جایگاه Bmac0415) تا ۰/۴۳ (جایگاه Hvm70) متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب دایس و الگوریتم UPGMA نمونه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل نمونه‌هایی از هر دو گونه *H. spontaneum* و *H. vulgare* که از ایران جمع آوری شده‌اند و گروه‌های دوم و سوم نیز به ترتیب شامل نمونه‌هایی از گونه‌های *H. spontaneum* و *H. vulgare* بود. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای همخوانی داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ریزماهوره برای بررسی تنوع در هر دو گونه *H. spontaneum* و *H. vulgare* مفید می‌باشند. جایگاه‌های HvmLoH1A و Ebmac0415 در گونه *H. spontaneum* و Bmac0306 و Bamc0040 در گونه *H. vulgare* برای بررسی تنوع در این گونه‌ها مناسب تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، جو، نشانگرهای ریزماهوره، *H. spontaneum* و *H. vulgare*.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۱/۷

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: aminebrahimi63@yahoo.com)

۲- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- مربی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

مقدمه

جو زراعی متعلق به خانواده *Poaceae* می باشد که یکی از بزرگ ترین اجزای خانواده تک لپه ای ها است. جنس *Hordeum* شامل ۳۲ گونه و ۴۵ تاکسون می باشد (Bothmer et al., 1991). در سال های اخیر به علت استفاده از ارقام اصلاح شده و یکنواختی کشت، تنوع ژنتیکی انواع مختلف گیاهان در معرض خطر قرار گرفته است، بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما-های گیاهی جهت حفظ و نگهداری تنوع ژنتیکی در بانک های ژن و ژرم پلاسما و همچنین برنامه ریزی به نژادی و استفاده از تغییرات ژنتیکی به منظور انتقال ژن اهمیت فراوانی دارد (Omidbakhsh fard, 2005). بر آورد تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه های اصلاحی و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد که از طریق صفات مورفولوژیکی، بررسی شجره ها و نشانگرهای مولکولی میسر می شود. افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات زراعی و استفاده بهینه از ذخایر ژنی مستلزم جمع آوری، نگهداری، توصیف و ارزیابی مواد ژنتیکی است. ایجاد تنوع ژنتیکی و ژرم پلاسما جدید در اصلاح گندم و بهبود برخی از خصوصیات و ایجاد تیپ های ایدآل گیاه نیز بسیار مهم می باشد (Pearce et al. 2000).

کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه های مورد نظر در برنامه های اصلاحی، امکان سازماندهی ژرم پلاسما و نمونه گیری موثر از ژنوتیپ ها را فراهم می سازد (Abdmishani and Boshehri, 1992). جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA استفاده می شود. در بین این روش ها، نشانگر-های DNA دقیق ترین و مطمئن ترین نشانگرها محسوب می شوند (Naghavi et al., 2004).

ریزماهوره ها یا توالی های تکراری ساده (Simple Sequence Repeat) شامل توالی های دو گانه

تکراری کوتاهی (۶-۲ جفت باز) از DNA هستند (Litt and Luty, 1989). نحوه توارث همباز ریزماهوره ها، سطح بالای پلی مورفیسم و سادگی کار باعث شده است که برای بسیاری از کاربردها مفید باشند (Kashi and Soller, 1999). کلاست کینا و همکاران (Khelestkina et al., 2002) کاربرد نشانگرهای SSR، STS و RAPD برای مکان یابی و نشانمند کردن ژن ها در گندم را مورد ارزیابی قرار دادند.

بانویو کیونال و آکایا (Banu Buyukunal and Akkaya, 2001)، امکان استفاده از دو آغازگرهای ریزماهوره چند شکل جو را در گندم مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق دو نشانگر بسیار چند شکل از جو جهت ارزیابی چند شکلی در گندم مورد استفاده قرار گرفت. بلوری مقدم (Belouri Moghadam, 2006) به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در هفت رقم جو زراعی از ۱۰ نشانگر SSR استفاده کرد و در مجموع ۶۵ آلل با میانگین ۹/۲ آلل در هر لوکوس یدست آورد. میزان PIC بین ۰/۸ تا ۰/۸۸ با میانگین ۰/۸۴ متغیر بود. مانگو و همکاران (Mango et al., 2001) نشان دادند که به علت قابلیت تغییر در تعداد واحدهای تکراری، ریزماهوره ها بسیار چند شکل بوده و به همین دلیل به عنوان نشانگر مهمی در نقشه یابی ژنتیکی و مطالعات جمعیتی برای بسیاری از موجودات مورد توجه هستند. کادری و همکاران (Kadri et al., 2009) با مطالعه ۱۴ ژنوتیپ جو بومی و زراعی با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر SSR، میانگین PIC و تعداد جایگاه آللی را به ترتیب ۰/۵۳ و ۲/۸۷ بدست آوردند. متوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) به منظور تعیین تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما جو از نشانگرهای SSR استفاده کردند و در مجموع ۶۸۷ آلل در ۴۲ جایگاه ژنی در ۱۴۷ ژنوتیپ شناسایی شدند. تعداد آلل ها از ۴ تا ۳۱ با میانگین ۱۶/۳ و PIC بین ۰/۰۸ تا ۰/۹۴ متغیر بود. بر اساس تجزیه خوشه ای، سطح بسیار بالایی

از تنوع در ارقام بومی و سطح پایینی از تنوع در ژرم پلاسما اصلاح شده مشاهده شد. آنها نتیجه گرفتند که نشانگرهای SSR اطلاعات بسیار مفیدی را برای گروهبندی ژرم پلاسما جو ارائه می دهد. در این آزمایش تنوع ژنتیکی نمونه‌های مختلف جمع آوری شده دو گونه جو (*H. spontaneum* و *H. vulgare*) از مناطق مختلف کشور با استفاده از نشانگر ریزماهواره مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مطالعه شده در این آزمایش شامل ۷۳ نمونه جو (۲۸ نمونه زراعی و ۴۵ نمونه وحشی) بود که از نقاط مختلف ایران جمع آوری شده بودند (جدول ۱).

آغازگرهای ریزماهواره

در این آزمایش از ۱۵ جفت آغازگر مطالعه شده توسط کاراکسیس و همکاران (Karakousis *et al.*, 2003) استفاده شد. نحوه پراکنش آغازگرها روی کروموزم‌ها طوری انتخاب شد که روی هر کروموزوم حداقل دو نشانگر قرار گیرد (جدول ۲).

استخراج و تکثیر DNA

استخراج DNA از نمونه‌های برگ با اندکی تغییر انجام گرفت (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر، یک میلی مول از dNTPs، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۱/۹۲ میکرولیتر کلرید منیزیم ۱۵ میلی مولار همراه با ۷/۲۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که به صورت Touch

Down برنامه ریزی شده بود، به این صورت 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 ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر) و با زمان ۳۰ ثانیه انجام شد، در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۴ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شدند. همچنین زمان و دمای بسط رشته نیز به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شدند. محصولات تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریلامید واسرشته ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ آمیزی با استفاده از نترات نقره بر اساس روش باسام و همکاران (Bassam *et al.*, 1991) با اندکی تغییر انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

الگوهای نواری بصورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیاز دهی شدند (شکل ۳). برای رسم دندروگرام ابتدا ماتریس تشابه با روش دایس تشکیل و سپس دندروگرام با استفاده از روش UPGMA با نرم افزار NTSYSpc 2.0 رسم شد. از این نرم افزار برای ترسیم پراکنش نمونه ها در دو بعد اول تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis; PCoA) نیز استفاده شد. محاسبه ضریب تشابه بر اساس رابطه ۱ انجام شد.

$$(1) \quad \text{ضریب تشابه} = \frac{2 \times \text{تعداد پاندهای مشترک در دو فرد}}{\text{تعداد کل پاندها}}$$

میزان اطلاعات چندشکل که نشان دهنده میزان چندشکلی یک نشانگر بوده و مقدار آن از صفر تا یک متغیر است، با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

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

در این رابطه P_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل‌ها می‌باشند.

جدول ۱- محل جمع آوری جوهای زراعی و وحشی مورد ارزیابی

Table 1. Collection sites of *H. vulgare* and *H. spontaneum* species

شماره نمونه No.	گونه Species	محل جمع آوری Collection site	شماره نمونه No.	گونه Species	محل جمع آوری Collection site	شماره نمونه No.	گونه Species	محل جمع آوری Collection site
1	<i>H. vulgare</i>	مازندران Mazandaran	26	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	51	<i>H. spontaneum</i>	میاندوآب Miandoab
2	<i>H. vulgare</i>	فارس Fars	27	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	52	<i>H. spontaneum</i>	چهارمحال Chaharmahal
3	<i>H. vulgare</i>	فارس Fars	28	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	53	<i>H. spontaneum</i>	آذربایجان شرقی E. Azarbaiejan
4	<i>H. vulgare</i>	فارس Fars	29	<i>H. spontaneum</i>	بجنورد Bojnourd	54	<i>H. spontaneum</i>	آذر بایجان غربی W. Azarbaiejan
5	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	30	<i>H. spontaneum</i>	بجنورد Bojnourd	55	<i>H. spontaneum</i>	کرمانشاه Kermanashah
6	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	31	<i>H. spontaneum</i>	بجنورد Bojnourd	56	<i>H. spontaneum</i>	فارس Fars
7	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	32	<i>H. spontaneum</i>	کرمانشاه Kermanashah	57	<i>H. spontaneum</i>	فارس Fars
8	<i>H. vulgare</i>	چهارمحال Chaharmahal	33	<i>H. spontaneum</i>	کرمانشاه Kermanashah	58	<i>H. spontaneum</i>	فارس Fars
9	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	34	<i>H. spontaneum</i>	کرمانشاه Kermanashah	59	<i>H. spontaneum</i>	خوزستان Khuzestan
10	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	35	<i>H. spontaneum</i>	کرمانشاه Kermanashah	60	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan
11	<i>H. vulgare</i>	کهنکیویه Kohkiloye	36	<i>H. spontaneum</i>	اراک Arak	61	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan
12	<i>H. vulgare</i>	کهنکیویه Kohkiloye	37	<i>H. spontaneum</i>	اراک Arak	62	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan
13	<i>H. vulgare</i>	چهارمحال Chaharmahal	38	<i>H. spontaneum</i>	اراک Arak	63	<i>H. spontaneum</i>	کهنکیویه Kohkiloye
14	<i>H. vulgare</i>	فارس Fars	39	<i>H. spontaneum</i>	فارس Fars	64	<i>H. spontaneum</i>	اصفهان Isfahan
15	<i>H. vulgare</i>	فارس Fars	40	<i>H. spontaneum</i>	فارس Fars	65	<i>H. spontaneum</i>	چهارمحال Chaharmahal
16	<i>H. vulgare</i>	لرستان Lorestan	41	<i>H. spontaneum</i>	قزوین Ghazvin	66	<i>H. spontaneum</i>	آذر بایجان غربی W. Azarbaiejan
17	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	42	<i>H. spontaneum</i>	کرج Karaj	67	<i>H. spontaneum</i>	آذر بایجان غربی E. Azarbaiejan
18	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	43	<i>H. spontaneum</i>	کرج Karaj	68	<i>H. spontaneum</i>	همدان Hamadan
19	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	44	<i>H. spontaneum</i>	قزوین Ghazvin	69	<i>H. spontaneum</i>	آذر بایجان غربی W. Azarbaiejan
20	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	45	<i>H. spontaneum</i>	کرج Karaj	70	<i>H. spontaneum</i>	ایلام Ilam
21	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	46	<i>H. spontaneum</i>	کرج Karaj	71	<i>H. spontaneum</i>	ایلام Ilam
22	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	47	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan	72	<i>H. spontaneum</i>	ایلام Ilam
23	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	48	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan	73	<i>H. spontaneum</i>	ایلام Ilam
24	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	49	<i>H. spontaneum</i>	ایلام Ilam			
25	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	50	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan			

جدول ۲- اسامی آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در آزمایش

Table 2. The names of the SSR primer pairs used in the experiment

شماره آغازگر Primer No.	اسم آغازگر Name of primer	توالی رفت Forward 3'→5'	توالی برگشت Reverse 5'→3'	دمای اتصال Annealing temp. (°C)
1	HVMLOH1A	CCTCCCCTCTGATATGATAA	GTACAGACGGTTTAATTGTCC	60
2	GMS001	CTGACCCTTTGCTTAACATGC	TCAGCGTGACAAACAATAAAGG	62
3	Bmac0192	GGGTGGTGTGCTTAAAC	TCAACATTCATACTACCACCA	58
4	Bmag0603	ATACCATGATACATCACATCG	GGGGGTATGTACGACTAATA	62
5	Bmac0316	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	ATCACTGCTGTGCCTAGC	56
6	GMS003	TTTCAGCATCACACGAAAGC	TTGCATGCATGCATACCC	54
7	HVM40	CGATTCCCCTTTTCCAC	ATTCTCCGCCGTCCACTC	58
8	EBmac0415	GAAACCCATCATAGCAGC	AAACAGCAGCAAGAGGAG	54
9	HvHVA1	CATGGGAGGGGACAACAC	CGACCAAAACGACTAAAGGA	62
10	HvWaxy4	AGTATCGCAGACGCTCAC	GTTATGTACTCGCTCGCTC	58
11	HVM20	CTCCACGAATCTCTGCACAA	CACCGCCTCTCTTTTAC	58
12	Bmag0013	AAGGGGAATCAAAATGGGAG	TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	60
13	HVM70	CCGCCGATGACCTTCTC	ACCCACGACCTATGGCAC	58
14	Bmac0040	AGCCCGATCAGATTTACG	TTCTCCCTTTGGTCCTTG	54
15	AF022725A	AGTATGGGGAATTTATTTGG	GCTGCAAAGTATGACAATATG	58

نتایج و بحث

با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره در مجموع ۷۴ آلل در دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* تکثیر شد (جدول ۳). بیشترین تعداد آلل در گونه *H. vulgare* مربوط به جایگاه‌های *GMS003* و *Hvm40* با هشت آلل و کمترین آن مربوط به جایگاه *Hvm70* با دو آلل بود. در گونه *H. spontaneum* بیشترین تعداد آلل در جایگاه *Hvm40* (با ۹ آلل) و کمترین آن در جایگاه‌های *Hvm70* و *HvmloH1A* (با دو آلل) مشاهده شد. میانگین کل تعداد آلل‌ها برای آغازگرها در دو گونه ۴/۵۶ بود. از آنجائیکه میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهواره، مناسب بودن هر جایگاه را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Röder et al, 1998)، بنابراین، آغازگرهایی با تعداد آلل بیشتر برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب‌تر می‌باشند.

در جدول ۳ میزان PIC کل و PIC برای هر کدام از دو

گونه برای هر آغازگر نشان داده شده است. بیشترین میزان PIC کل ۰/۸۵ مربوط به جایگاه *Ebmac0415* و کمترین آن ۰/۱۲ مربوط به جایگاه *Hvm70* بود. در گونه *H. vulgare* میانگین PIC از ۰/۸ (جایگاه *Bmac0040*) تا ۰/۱۹ (جایگاه *Bmag0603*) و در گونه *H. spontaneum* از ۰/۹۱ (جایگاه *Bmac0415*) تا ۰/۰۴ (جایگاه *Hvm70*) متغیر بود. نشانگرهایی با PIC بالا به علت دارا بودن تعداد آلل بیشتر و فراوانی پایین آلل‌ها قابلیت تفکیک بالاتری دارند. جایگاه‌های *HvmLoH1A* و *Ebmac0415* در گونه *H. spontaneum* و جایگاه‌های *Bmac0306* و *Bamc0040* در گونه *H. vulgare* برای بررسی تنوع در این گونه‌ها مناسب تشخیص داده شدند.

کادری و همکاران (Kadri et al., 2009) با مطالعه ۱۴ نمونه جو بومی و زراعی با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر SSR، میانگین PIC و تعداد جایگاه آللی را به ترتیب ۰/۵۳ و ۲/۸۷ بدست آوردند. استروس و پایسک

جدول ۳- میانگین میزان اطلاعات چندشکل و تعداد آلل برای هر جفت آغازگر در دو گونه جو (*H. vulgare* و *H. spontaneum*)

Table 3. PIC mean and number of alleles for each primer in two barely species (*H. vulgare* , *H. spontaneum*)

primer آغازگر	PIC		تعداد آلل ها Number of alleles		
	<i>H. spontaneum</i>	<i>H. vulgare</i>	کل Total	<i>H. spontaneum</i>	<i>H. vulgare</i>
HVMLOH1A	0.89	0.63	0.68	2	3
GMS001	0.73	0.65	0.79	4	4
Bmac0306	0.49	0.78	0.46	3	3
Bmag0603	0.62	0.19	0.39	3	4
Bmac0316	0.57	0.53	0.40	5	7
GMS003	0.69	0.64	0.59	6	8
HVM40	0.50	0.54	0.51	9	8
EBmac0415	0.91	0.62	0.85	4	4
HvHVA1	0.78	0.60	0.71	5	6
HvWaxy4	0.66	0.69	0.69	4	4
HVM20	0.65	0.56	0.58	4	5
Bmag0013	0.44	0.66	0.48	5	6
HVM70	0.04	0.24	0.12	2	2
Bmac0040	0.60	0.80	0.71	4	4
AF022725A	0.47	0.65	0.51	5	4
Mean	0.60	0.59	0.57	4.33	4.80
Total				4.56	

جغرافیایی به تدریج در گونه‌های وحشی و یا بومی پدید آمده است (Matus and Hayes, 2002). در آزمایش حاضر نیز تعدادی از آلل‌های منحصر به فرد یافت شد. تعداد آلل‌های منحصر به فرد در این آزمایش ۱۱ عدد بودند که از این تعداد ۹ آلل مربوط به *H. vulgare* و دو آلل مربوط به *H. spontaneum* بود. بیشترین، کمترین و میانگین درصد تشابه در گونه *H. spontaneum* به ترتیب ۰/۸۶۴۸، ۰/۱۱۷۶ و ۰/۴۵۵۸ بود. این مقادیر در گونه *H. vulgare* به ترتیب ۰/۸۱، ۰/۱۵ و ۰/۴۳ بوده است (جدول ۴).

میزان ضرایب تشابه در گونه‌های مورد مطالعه نشان دهنده این است که تشابهات نمونه‌های موجود در داخل هرگونه بیشتر از تشابهات بین نمونه‌های بین دو گونه

(Struss and Plieske, 1998) نیز در بررسی و مقایسه تنوع ژنتیکی نمونه‌های وحشی و زراعی جو، تنوع ژنتیکی بیشتری در نمونه‌های وحشی مشاهده کردند. آنها دلیل این اختلاف را می‌توان به تفاوت در نمونه مورد استفاده و یکنواختی بیشتر ارقام زراعی نسبت دادند.

تفاوت در تعداد آلل‌ها در دو گونه ممکن است بیانگر وجود آلل‌های منحصر به فرد در هر گونه باشد. آلل‌های منحصر به فرد آلل‌هایی هستند که در یک گونه وجود دارند و در گونه دیگر یافت نمی‌شوند. فراوانی زیاد این آلل‌ها می‌تواند بر این موضوع دلالت کند که یک میزان نسبتاً بالایی از جهش در جایگاه‌های SSR در یک گونه صورت گرفته یا در اثر ایزولاسیون

جدول ۴- ضریب تشابه برآورد شده در دو گونه جو (*H. vulgare* و *H. spontaneum*)

Table 4. Similarity coefficients estimated in the two barely species (*H. vulgare*, *H. spontaneum*)

ضریب تشابه		کل		
Similarity coefficient		<i>H. spontaneum</i>	<i>H. vulgaree</i>	Total
Min	حداقل	0.1176	0.15	0.0571
Max	حداکثر	0.8648	0.81	0.7222
Mea	میانگین	0.4558	0.43	0.3594

است. در این آزمایش بیشترین، کمترین و میانگین درصد تشابه در بین نمونه‌های مربوط به دو گونه به ترتیب ۰/۷۲۲۲، ۰/۰۵۷۱ و ۰/۳۵۴۹ بدست آمد که کمتر از مقادیر بدست آمده در هر گونه می باشد.

نتایج تجزیه خوشه ای نشان داد که نمونه‌ها در سه گروه اصلی قرار داشتند (شکل ۱). در گروه یک نمونه‌هایی (۲۳ نمونه) از هر دو گونه قرار گرفت که اکثرا از یک منطقه جغرافیایی خاص جمع آوری شده بودند. این نمونه‌ها بیشتر متعلق به مناطق مرکزی و شمالی کشور بودند. به طور کلی شباهت ژنتیکی و به دنبال آن نزدیکی نمونه‌های مربوط به دو گونه در یک دسته، می تواند مبین این باشد که این نمونه‌ها به احتمال زیاد در مواجهه با شرایط آب و هوایی مشابه، تغییرات ژنتیکی مشابهی در طول سالیان دراز در آنها اتفاق افتاده است، زیرا از یک منطقه جغرافیایی منشأ گرفته اند. متوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) و فنگ و همکاران (Feng et al., 2006) نیز دریافتند که الگوی گروه بندی مرتبط با منشأ و پراکنش جغرافیایی گونه‌ها ارتباط دارد. گروه دو شامل نمونه‌های متعلق به گونه *H. spontaneum* (۳۸ نمونه به استثنای دو نمونه) بود. این نمونه‌ها اکثرا از مناطق مرکزی و غرب کشور جمع آوری شده بودند. گروه سه شامل نمونه‌های مربوط به گونه *H. vulgare* (۱۲ نمونه) بود، که مربوط به مناطق غرب و شمال غرب بودند.

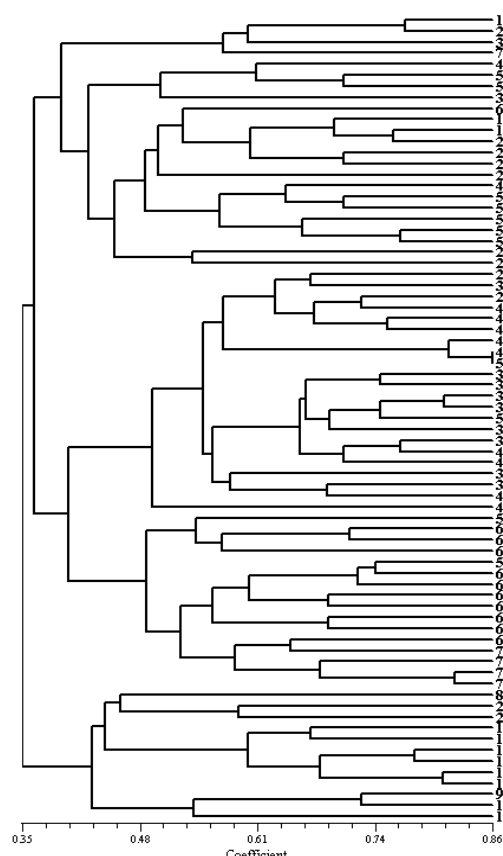
تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) (شکل ۲) نشان داد که مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب ۱۱/۲۸ و ۹/۶۳ درصد از تغییرات نمونه‌ها را (که توسط نشانگرها مشاهده شد)، دربر می گیرند، به طوری که در نمودار دوعبدي در مجموع ۲۰/۹۱ درصد تغییرات توجیه می شود. در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، بهتر است که نشانگرها 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. در این مطالعه نیز همان طور که انتظار می رفت، توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط چند مؤلفه اولیه، دال بر توزیع مناسب نشانگرهای استفاده شده بر روی ژنوم می باشد (Ahkami et al. 2007).

نتایج تجزیه (PCoA) نیز تا حدودی نتایج تجزیه خوشه ای را تأیید کرد. گرچه هر دو روش تجزیه PCoA و تجزیه خوشه ای، گروه بندی را انجام می دهند، اما تجزیه خوشه ای بر اساس ۱۰۰ درصد اطلاعات نشانگری ولی PCoA بر اساس ۲۲ درصد (PCoA1 ۱۲ درصد و PCoA2 ۱۰ درصد) گروه بندی را انجام داد، بنابراین انتظار نمی رود ۱۰۰ درصد همخوانی بین آنها وجود داشته باشد. همانطور که مشاهده می شود پراکنش نمونه‌ها در گونه *H. spontaneum* نسبت به *H. vulgare* بیشتر است. دلیل این موضوع شاید این باشد که گونه *H. spontaneum* وحشی است و کمتر تحت تاثیر گزینش قرار گرفته است. متوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) به منظور تعیین تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما جو از نشانگرهای SSR استفاده کردند. آنها عنوان کردند که تنوع و پراکنش گونه *H. spontaneum* از گونه *H. vulgare* بیشتر است.

مواردی استثنای از ارتباط بین پراکنش جغرافیایی و با دسته بندی‌ها در تجزیه خوشه ای دیده شد (مثلا نمونه‌های جمع آوری شده از نقاط جنوبی کشور با نمونه‌هایی که از مناطق شمالی و مرکزی جمع آوری شده بودند در یک گروه قرار گرفتند) که می تواند به دلایلی از جمله ناکافی بودن تعداد مکان‌های ژنی مورد مطالعه باشد (Dreisigacker et al., 2004) و جابجایی ژرم پلاسما (Shafaeddin, 2002) باشد.

از نتایج قابل توجه این آزمایش قرار گرفتن نمونه‌های جمع آوری شده از غرب و مرکز کشور در دسته بندی‌های متفاوت بود که نشان دهنده تنوع بسیار زیاد نمونه‌های غرب و مرکز کشور و به طور کلی تنوع



شکل ۱- گروه بندی نمونه‌های دو گونه جو (*H. vulgare* و *H. spontaneum*) با روش UPGMA بر اساس داده های ریز ماهواره
Fig. 1. Cluster analysis of two barely species (*H. vulgare* , *H.spontaneum*) using UPGMA method based on microsatellite data

بود. بیشترین میزان R^2 max و R^2 T به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۶۳ مربوط به صفت تعداد گره بود و کمترین آنها به ترتیب ۰/۰۴ و ۰/۱۳ مربوط به صفت بیرون زدگی پدانکل بود.

R^2 : میزان تغییراتی از صفت زراعی مورد نظر که بوسیله تغییرات نشانگر مورد نظر کنترل می شود.
 R^2 max: بیشترین R^2 مربوط به یک نشانگر برای صفات کمی (درصد)

R^2 T: مجموع کل ۲R نشانگرها آگاهی بخش برای صفات کمی (درصد)

برای صفات تعداد گره، طول خوشه، تعداد برگ، نشانگر B3 از آغاز گر Bmag0603 دارای بیشترین R^2 بود. یعنی این آغاز گر نسبت به سایر آغاز گرها

ژنتیکی جو در دامنه های زاگرس می باشد.

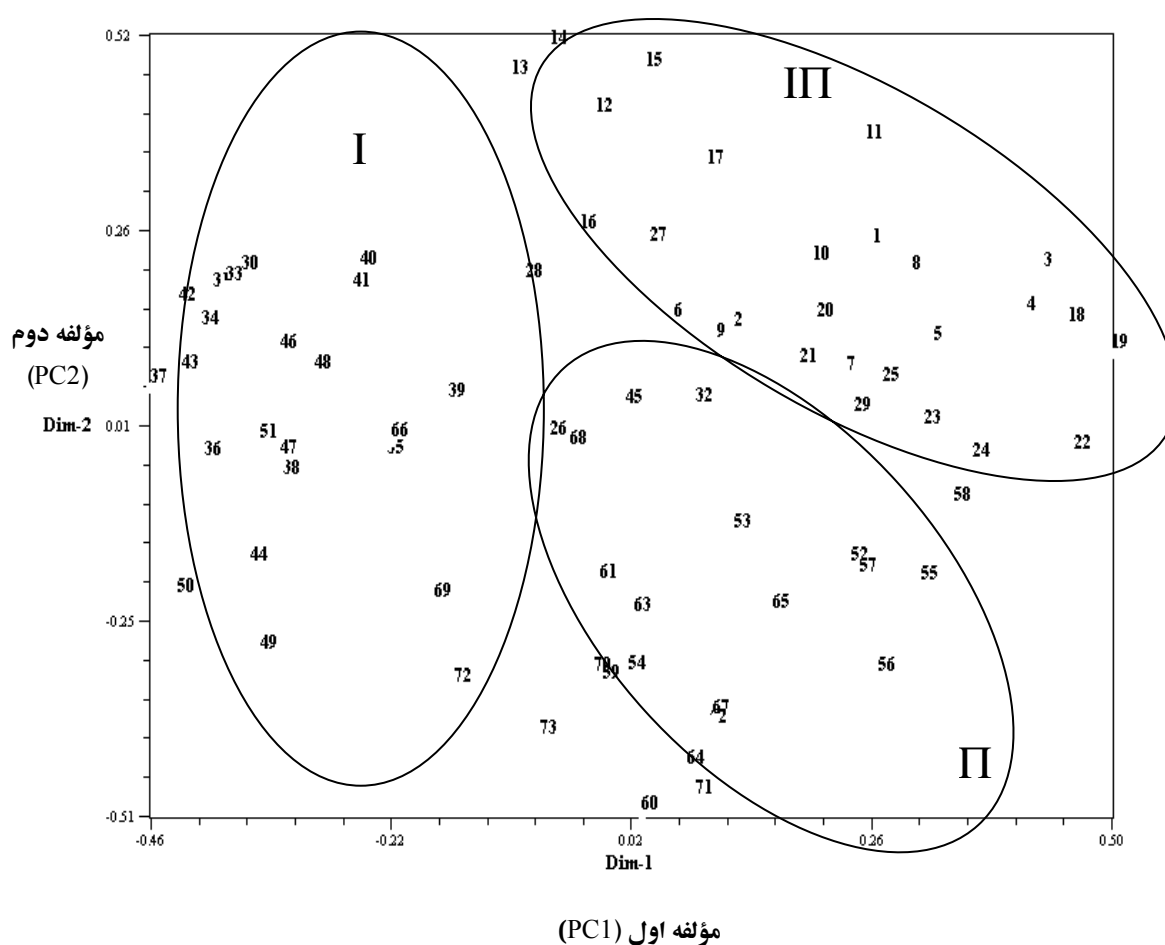
تعداد ۱۰ صفت کمی در کل نمونه ها در مزرعه انداز گیری شدند که تفاوت معنی داری بین و داخل نمونه از لحاظ صفات اندازه گیری شده وجود داشت. شفاء الدین (Shafaeddin, 2002) با بررسی ۴۲۴ نمونه جو بومی در بانک ژن گیاهی ایران نشان داد که تنوع زیادی بین نمونه ها از نظر صفات اندازه گیری شده وجود دارد.

ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی با استفاده از ۱۰ صفت زراعی و نشانگرهای مولکولی حاصل از ۱۵ جفت آغاز گر روی نمونه ها مطالعه شد. بیشترین تعداد نشانگر ۱۴ عدد برای صفت تعداد گره و کمترین تعداد نشانگر برای طول محور پدانکل ۳ عدد

است را تولید کرد. در حقیقت با توالی یابی نشانگرهای دارای میزان R^2 بالا می‌توان به یافتن ژن‌های کد کننده صفات مطلوب در گونه‌های وحشی و همچنین نشانگرهایی که دارای همبستگی فراوان با آن صفات هستند، جهت اشباع نقشه‌های لینکاژی امیدوار بود (Rashidi et al. 2008). این نتایج نشان می‌دهند که چنانچه از آغازگرهای بیشتری استفاده شود، می‌توان به پیدا کردن نشانگرهایی که دارای همبستگی بالایی با صفات مرتبط با عملکرد و اجزای عملکرد

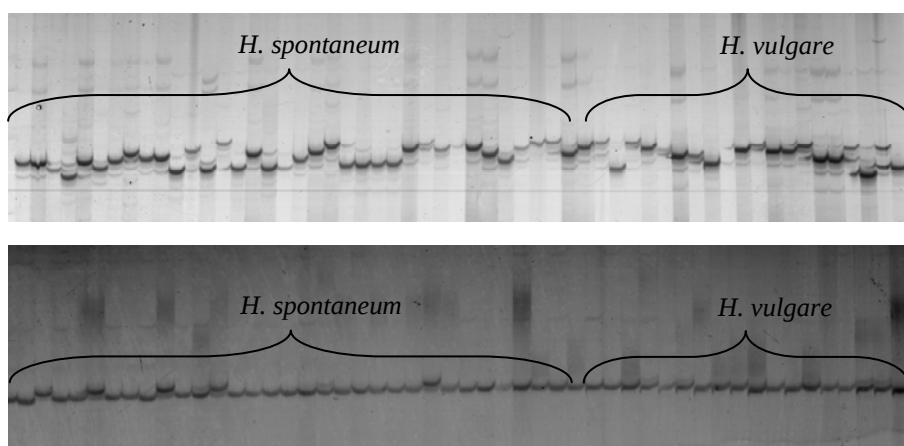
تغییرات بیشتری از صفات زراعی مورد بررسی را نشان می‌دهد.

به دلیل مشخص بودن جایگاه نشانگرهای SSR روی کروموزوم‌های مختلف می‌توان کروموزوم‌هایی که تغییرات زیادی از صفات زراعی مطلوب موجود در جوهای وحشی را کنترل می‌کنند را مشخص نمود و در آینده برای کارهای اصلاحی از آنها استفاده کرد. بدین معنی لاین‌های زراعی که برخی از کروموزوم‌های آنها بوسیله کروموزوم‌های گونه وحشی جایگزین شده



شکل ۲- نمودار دو بعدی تجزیه PCo A در نمونه‌های دو گونه جو (*H. vulgare*, *H. spontaneum*)

Fig. 2. Patterns of relationships among two barley species (*H.vulgare*, *H.spontaneum*) revealed by principal coordinate analysis



شکل ۳- نمونه ژل بدست آمده در این آزمایش
A مربوط به آغازگر HvWaxy4 و B مربوط به آغازگر Hvm70 می باشد
Fig. 3. Sample of SSR profile in *H. spontaneum* and *H. vulgare* accession
A: Represent primer HvWaxy4 and B: Represent primer Hvm70

باشد، امید داشت.
سپاسگزاری
بدین وسیله از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج که در تهیه تعدادی از نمونه های جو با نگارندگان همکاری کردند، تشکر می شود.

References

منابع مورد استفاده

- Abdmishani. C. and A. A Shahnejat- Bushehri. 1992. Advance plant breeding (Plant Biotechnology). Tehran University Publication. 2. pp: 352. (In Persian).
- Ahkami. A .M., M. R. Naghavi., M. Mardi, A. Hossienzadeh, M. pirsayedi, P. Petki, M. Kazemi Alamoti, I. Hashempour and M. A. Omidbakhsh. 2007. Study of genetic relatively in durum wheat (*Triticum durum*) using AFLP markers. Iran. J. Agric. Sci. 1: 25-35. (In Persian with English abstract).
- Banu Buyukunal Bal E. and M. S. Akkaya. 2002. Assessment of two highly polymorphic barley microsatellite markers for detecting polymorphism in wheat. Turk. J. Biol. 26: 9-12.
- Bassam B., J. G. Caetano-Anolles and P. M. Gressho. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
- Belouri Moghadam. M. R. 2006. Study of genetic diversity in barley using microsatellite markers. MSc. thesis. University of Mazandaran. (in Persian).
- Bothmer von R., N. Jacobsen., C. Baden., R. B. Jrgensen and I. Linde Laursen. 1991. An ecogeographical study of genus *Hordeum*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. pp: 127.
- Dreisigacker S., P. Zhang., M. L. Warburton , M. Van Ginkel , D. Hoisington , M. Bohn and A. E. Melchinger. 2004. SSR and pedigree analysis of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to

- different mega environments. Crop Sci. 4: 381-388.
- Feng Z.Y., X. J. LIU., Y. Z. Zhang and H. Q. Ling.** 2006. Genetic diversity analysis of Tibetan wild barley using SSR. Acta Genetica Sinica 33 (10): 917-928.
- Gupta P. K., S. Rustgi. and P. L. Kulwal.** 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospect. Plant Mol. Biol. 57: 461-485.
- Kadri K., R. Abdellawi, H. Cheikh-Mhamed.** 2009. Genetic diversity in barley genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis. Biol. Div. Conserv. 2/1: 27-35.
- Karakousis A., A. Barr. K. Chalmers, G. A. Bett, T. Holton , R. Henry, P. Lim and P. Langridge.** 2003. Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm. Aust. J. Agric. Res. 54: 1197-1210.
- Kashi Y. and M. Soller.** 1999. Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein D.B. and Schlotterer C (Eds). Microsatellites: Evolution and Application. 10-23. Oxford University Press, Oxford.
- Khelestkina E. K., E. G. Pestsova, E. Salina , M. S. Roder, V. S. Abruzova, S. F. Koval and A. Borner.** 2002. Genetic mapping and tagging of wheat Genes using RAPD, STS and SSR markers. Cell and Mol. Biol. Lett. 7: 795-802.
- Litt M. and J. A. Luty.** 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44: 397-401.
- Mango T., F. Carriero, R. A. Cifarelli, M. Gallitelli and F. Cellini.** 2001. Development of microsatellite markers in Durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp durum). Plant & Animal Genome IX Conference. Acta Genetica Sinica 33 (10): 917-928.
- Matus, I. A. and P. M. Hayes.** 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeat. Genome 45: 1095- 1106.
- Naghavi M. R., M. Mardi., H. A. Ramshini. and B. Fazelinasab.** 2004. Comparative analysis of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. Iran. J. Biotech. 2: 195 – 202. (In Persian with English abstract).
- Omidbakhsh Fard. M. A.** 2005. Study of genetic diversity in durum wheat using SSR marker. MSc. Thesis. Univ. of Tehran. pp. 91. (in Persian).
- Pearce, S. R., M. Knox., T. N. H. Ellis., A. J. Flavell and A. Kumar.** 2000. Pea Ty1-copia group retrotransposons: transitional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. Mol. Gen. Genet. 263: 898-907.
- Rashidi monfared, S., M. Mardi., A. Hossienzadeh. and M. R. Naghavi.** 2008. Association analysis of important agronomic traits to retrotransposon markers SSAPs in durum wheat accessions. Modern Genet. J. 3: 29-36.
- Röder M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M. H. Tixier, P. Leroy and M. W. Ganal.** 1998. A

microsatellite map of wheat. Genet. 149: 2007–2023.

Saghai-Maroof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allad. 1984. DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. National. Acad. Sci. USA. 81: 8014-8018.

Shafaeddin S. 2002. Genetic and geographical diversity of barley landraces from northern parts of Iran, according to the agronomic and morphological characters. Iran. J. Agric. Sci. 33: 568-581. (In Persian with English abstract).

Struss, D. and J. Plieske. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. Theor. Appl. Genet. 97: 308-315.

Assessment of genetic diversity in two accessions of barely species (*H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L.) using SSR markers

Ebrahimi, A.¹, M. R. Naghavi², M. Sabokdast³ and M. Mardi⁴

ABSTRACT

Ebrahimi, A. , M. R. Naghavi, M. Sabokdast and M. Mardi. 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. (In Persian)

Genetic diversity of 73 accessions of two barely species (*H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L.) was evaluated using 15 SSR pair primers. Patterns were scored by 0 (band absence) and 1 (band presence). Dendrogram was constructed using dice similarity coefficient and UPGMA algorithm by software NTSYS 2.02. Principle coordinate analysis was also performed. The highest number of polymorphic alleles in *H. vulgare* L. accessions were observed in gene loci *Bmac 0316* and *Hvm40* with eight alleles in each. The lowest number of polymorphic alleles in *H. vulgare* L. accessions were observed in gene locus *Hvm70* with two alleles. Moreover, the highest number of polymorphic alleles in *H. spontaneum* L. were observed in *Hvm40* locus with 9 alleles, while the lowest obtained in *Hvm70* and *HvmLoH1A* with two alleles, respectively. The highest PIC value in *H. vulgare* L. was 0.8 (gene loci *Bmac0040*) and the lowest 0.19 (gene loci *Bmag0603*). While, the highest and the lowest value of PIC in *H. spontaneum* L. ranged from 0.43-0.91. Cluster analysis using Dice similarity method and UPGMA algorithm, grouped all accessions in three main groups. Group one included populations from both of *H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L. species collected from Iran, while groups two and three included accessions of *H. spontaneum* L. and *H. vulgare* L., respectively. Results showed that SSR markers can be applied as reliable tool to evaluate genetic diversity between and within *H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L. species. Loci *HvmLoH1A* and *Ebmac0415* in *H. spontaneum* L. and loci *Bmac0306* and *Bamc0040* in *H. vulgare* L. can be used to estimate genetic diversity in these two barely species.

Keywords: Barley, Genetic diversity, SSR markers, *H. spontaneum* L. and *H. vulgare* L.

Received: September, 2009 Accepted: January, 2010

1- M.Sc. student, The University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: aminebrahimi63@yahoo.com)

2- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

3- Faculty member, The University of Tehran, Karaj, Iran

4- Faculty member, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran