

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

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

در این آزمایش تنوع ژنتیکی ۷۳ نمونه جو ایران از دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. الگوهای نواری بصورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیاز دهنده 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 ۰/۰۴۳ (جایگاه *Bmac0040*) تا ۰/۰۱۹ (جایگاه *Bmag0603*) و در گونه *H. spontaneum* از ۰/۰۹۱ (جایگاه *Bmac0415*) تا ۰/۰۸۰ (جایگاه *Hvm70*) متغیر بود. تجزیه خوش‌های با استفاده از ضرب دایس و الگوریتم UPGMA نمونه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل نمونه‌هایی از هر دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* که از ایران جمع آوری شده‌اند و گروه‌های دوم و سوم نیز به ترتیب شامل نمونه‌هایی از گونه‌های *H. vulgare* و *H. spontaneum* بود. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با نتایج حاصل از تجزیه خوش‌های همخوانی داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی تنوع در هر دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* مفید می‌باشند. جایگاه‌های *HvmLoH1A* و *Bmac00415* در گونه *H. spontaneum* و جایگاه‌های *Bmac0306* و *Bmac0040* در گونه *H. vulgare* برای بررسی تنوع در این گونه‌ها مناسب تشخیص داده شدند.

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

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

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: aminebrahimi63@yahoo.com)
- ۲- دانشیار پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۳- مری پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۴- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

تکراری کوتاهی (۲-۶ جفت باز) از DNA هستند (Litt and Luty, 1989). نحوه توارث همباز ریزماهواره‌ها، 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، RAPD و STS برای مکان‌یابی و نشانمند کردن ژن‌ها در گندم را مورد ارزیابی قرار دادند.

Banu Buyukunal و Akkaya (2001)، امکان استفاده از دو آغازگرهای ریزماهواره 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 (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، ریزماهواره‌ها بسیار چند شکل بوده و به همین دلیل به عنوان نشانگر مهمی در نقشه‌یابی ژنتیکی و مطالعات جمعیتی برای بسیاری از موجودات مورد توجه هستند. Kadri 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. متнос و هایز (Matus and Hayes, 2002) به منظور تعیین تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم جواز نشانگرهای SSR استفاده کردند و در مجموع ۶۸۷ آلل در ۴۲ جایگاه ژنی در ۱۴۷ ژنوتیپ شناسایی شدند. تعداد آلل‌ها از ۴ تا ۳۱ با میانگین ۱۶/۳ و PIC بین ۰/۰۸ تا ۰/۹۴ متغیر بود. بر اساس تجزیه خوش‌های، سطح بسیار بالای

مقدمه

جو زراعی متعلق به خانواده Poaceae می‌باشد که یکی از بزرگ‌ترین اجزای خانواده تک‌لپه‌ای‌ها است. جنس *Hordeum* شامل ۳۲ گونه و ۴۵ تاکسون می‌باشد (Bothmer et al., 1991). در سال‌های 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 پلاسم‌های گیاهی جهت حفظ و نگهداری تنوع ژنتیکی در بانک‌های ژن و ژرم پلاسم و همچنین برنامه‌ریزی به نژادی و استفاده از تغییرات ژنتیکی به منظور انتقال ژن (Omidbakhesh fard, 2005) اهمیت فراوانی دارد. برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد که از طریق صفات مورفو‌لوزیکی، بررسی شجره‌ها و نشانگرهای مولکولی میسر می‌شود. 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 پلاسم جدید در اصلاح گندم و بهبود برخی از خصوصیات و ایجاد تیپ‌های ایدآل گیاه نیز بسیار مهم می‌باشد (Pearce et al. 2000).

کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جماعت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازماندهی ژرم پلاسم و نمونه گیری موثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد (Abdmishani and Boshehri, 1992). جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفو‌لوزیک، بیوشیمیایی و استفاده می‌شود. در بین این روش‌ها، نشانگر-های DNA دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین نشانگرهای محسوب می‌شوند (Naghavi et al., 2004). ریزماهواره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (Simple Sequence Repeat) شامل توالی‌های دوگانه

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 الکتروفوروز ژل پلی اکریلامید واسرشت ساز ۶ درصد تفکیک و رنگ آمیزی با استفاده از نیترات 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 NTSYSpc 2.0 نرم افزار UPGMA رسم شد. از این نرم افزار برای ترسیم پراکنش نمونه‌ها در دو بعد اول تجزیه به مختصات اصلی Principal Coordinate Analysis; PCoA (Principle Component Analysis) نیز استفاده شد. محاسبه ضریب تشابه بر اساس رابطه ۱ انجام شد.

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

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

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

در این رابطه Pi فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل‌ها می‌باشد.

از تنوع در ارقام بومی و سطح پایینی از تنوع در ژرم پلاسم اصلاح شده مشاهده شد. آنها نتیجه گرفتند که نشانگرهای SSR اطلاعات بسیار مفیدی را برای گروه‌بندی ژرم پلاسم جو ارائه می‌دهد.

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 آغازگرهای روی کروموزم‌ها طوری انتخاب شد که روی هر کروموزوم حداقل دو نشانگر قرار گیرد (جدول ۲).

استخراج و تکثیر DNA

استخراج DNA از نمونه‌های برگی با اندکی تغییر انجام گرفت (Saghai-Marof et al., 1984). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، 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 کلریدمنزیم 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

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>	پجنورد Bojnourd	54	<i>H. spontaneum</i>	آذربایجان غربی W. Azarbaiejan
5	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	30	<i>H. spontaneum</i>	پجنورد Bojnourd	55	<i>H. spontaneum</i>	کermanشاه Kermanashah
6	<i>H. vulgare</i>	اصفهان Isfahan	31	<i>H. spontaneum</i>	پجنورد 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 Khozestan
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>	کوهکلیویه Kohkiloye	36	<i>H. spontaneum</i>	اراک Arak	61	<i>H. spontaneum</i>	لرستان Lorestan
12	<i>H. vulgare</i>	کوهکلیویه 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>	کوهکلیویه 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>	آذربایجان غربی W. Azarbaiejan
17	<i>H. vulgare</i>	ناشناخته Unknown	42	<i>H. spontaneum</i>	کرج Karaj	67	<i>H. spontaneum</i>	آذربایجان 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>	آذربایجان 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'	دماهی اتصال Annealing temp. (°C)
1	HVMLOH1A	CCTCCCCCTGATATGATAA	GTACAGACGGTTAATTGTCC	60
2	GMS001	CTGACCCTTGCTTAACATGC	TCAGCGTGACAAACAATAAAGG	62
3	Bmac0192	GGGTGGTGTGCTTAAAC	TCAACATTCTACTACCA	58
4	Bmag0603	ATACCATGATACATCACATCG	GGGGGTATGTACGACTAACTA	62
5	Bmac0316	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	ATCACTGCTGTGCCTAGC	56
6	GMS003	TTTCAGCATCACAGAAAGC	TTGCATGCATGCATACCC	54
7	HVM40	CGATTCCCCTTTCCCAC	ATTCTCCGCCGTCCACTC	58
8	EBmac0415	GAAACCCATCATAGCAGC	AAACAGCAGCAAGAGGAG	54
9	HvHVA1	CATGGGAGGGGACAACAC	CGACCAAACACGACTAAAGGA	62
10	HvWaxy4	AGTATCGCAGACGCTCAC	GTTATGTACTCGCTCGCTC	58
11	HVM20	CTCCACGAATCTCTGCACAA	CACCGCCTCCTTTAC	58
12	Bmag0013	AAGGGGAATAAAATGGGAG	TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	60
13	HVM70	CCGCCGATGACCTTCTC	ACCCACGACCTATGGCAC	58
14	Bmac0040	AGCCCGATCAGATTACG	TTCTCCCTTGGTCCTT	54
15	AF022725A	AGTATGGGAATTATTGG	GCTGCAAAGTATGACAATATG	58

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* میزان PIC از ۰/۸ (جایگاه *Bmag0603*) تا ۰/۱۹ (جایگاه *Bmac0040*) تا ۰/۱۹ (جایگاه *Bmac0415*) در گونه *H. spontaneum* از ۰/۹۱ (جایگاه *Bmac0415*) تا ۰/۰۴ (جایگاه *Hvm70*) متغیر بود. نشانگر هایی با PIC بالا به علت دارا بودن تعداد آلل بیشتر و فراوانی پایین آللها قابلیت تفکیک بالاتری دارند. جایگاههای *H. vulgare* و *H. spontaneum* در *Ebmac0415* و *HvmLoH1A* میانگین *Bmac0306* و *Bmac0040* در گونه *H. vulgare* بروای 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 ۰/۸۷ بدست آوردند. استرسوس و پایسک

نتایج و بحث

با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره در مجموع ۷۴ آلل در دو گونه *H. vulgare* و *H. vulgare* *spontaneum* تکثیر شد (جدول ۳). بیشترین تعداد آلل در گونه *H. vulgare* مربوط به جایگاه‌های *Hvm40* و *GMS003* 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

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 آلل‌ها	
	<i>H. spontaneum</i>	<i>H. vulgare</i>		کل	<i>H. spontaneum</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 ۰/۱۷۶، ۰/۸۶۴۸ 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 هر گونه بیشتر از تشابهات بین نمونه‌های بین دو گونه

(Struss and Plieske, 1998) نیز در بررسی و مقایسه نوع 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 برآورده 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 Similarity coefficient	کل		
	<i>H. spontaneum</i>	<i>H. vulgare</i>	Total
Min	حداقل	0.1176	0.15
Max	حداکثر	0.8648	0.81
Mea	میانگین	0.4558	0.43

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 می‌رفت، توجیه بخش کمتری از تغییرات توسط چند مؤلفه اولیه، دال بر توزیع مناسب نشانگرهای استفاده شده بر روی ژنوم می‌باشد (Ahkami *et al.* 2007).

نتایج تجزیه (PCoA) نیز تا حدودی نتایج تجزیه خوش‌ای را تائید کرد. گرچه هر دو روش تجزیه PCoA و تجزیه خوش‌ای، گروه‌بندی را انجام می‌دهند، اما تجزیه خوش‌ای بر اساس ۱۰۰ درصد اطلاعات نشانگری ولی PCoA بر اساس ۲۲ درصد (۱۰ PCoA1 و ۱۲ PCoA2) گروه‌بندی را انجام داد، بنابراین انتظار نمی‌رود ۱۰۰ درصد همخوانی بین آنها وجود داشته باشد. همانطور که مشاهده می‌شود 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 پلاسم جو از نشانگرهای SSR استفاده کردند. آنها عنوان کردند که تنوع و پراکنش گونه *H. spontaneum* از گونه *H. vulgare* *H. vulgare* بیشتر است.

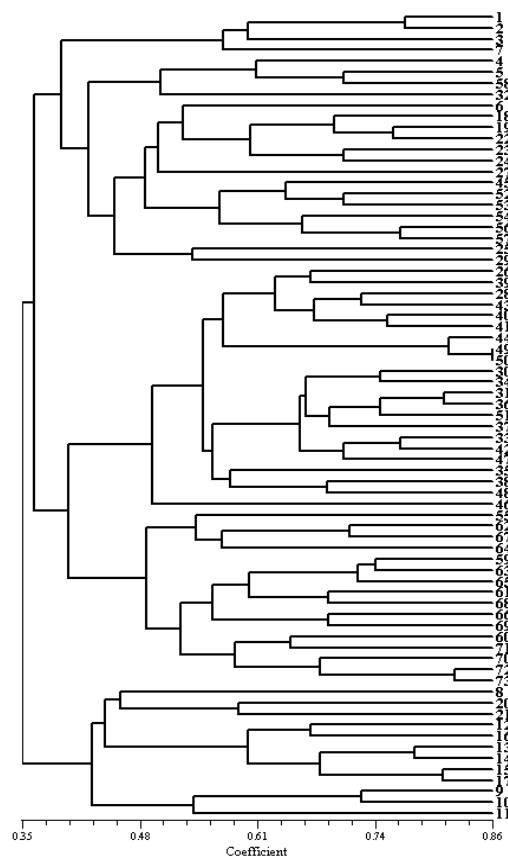
مواردی استثنایی از ارتباط بین پراکنش جغرافیایی و بادسته بندی‌ها در تجزیه خوش‌ای دیده شد (مثلاً نمونه‌های جمع آوری شده از نقاط جنوبی کشور با نمونه‌هایی که از مناطق شمالی و مرکزی جمع آوری شده بودند در یک گروه قرار گرفتند) که می‌تواند به دلایلی از جمله ناکافی بودن تعداد مکان‌های ژنی مورد مطالعه باشد (Dreisigacker *et al.*, 2004) و جابجایی ژرم پلاسم (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

است. در این آزمایش بیشترین، کمترین و میانگین درصد تشابه در بین نمونه‌های مربوط به دو گونه به ترتیب $0/7222$ ، $0/3549$ و $0/0571$ بدست آمد که کمتر از مقادیر بدست آمده در هر گونه می‌باشد.

نتایج تجزیه خوش‌ای 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 اکثراً 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 تزدیکی نمونه‌های مربوط به دو گونه در یک دسته، می‌تواند میان 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 افتد است، زیرا از یک منطقه جغرافیایی منشا گرفته‌اند. متوس و هایز (Matus and Hayes, 2002) و فنگ و همکاران (Feng *et al.*, 2006) نیز دریافتند که الگوی گروه‌بندی مرتبط با منشاء و پراکنش جغرافیایی گونه‌ها ارتباط دارد. گروه دو شامل نمونه‌های متعلق به گونه *H. spontaneum* (۳۸ نمونه به استثنای دو نمونه) بود. این نمونه‌ها اکثراً 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 $11/28$ و $9/63$ درصد از تغییرات نمونه‌ها را (که توسط نشانگرها مشاهده شد)، دربر می‌گیرند، به طوری که در نمودار دو بعدی در مجموع $20/91$ درصد تغییرات توجیه می‌شود. 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



شکل ۱- گروه بندی نمونه های 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 $0/32$ و $0/63$ مربوط به صفت تعداد گره بود و کمترین آنها به ترتیب $0/04$ و $0/13$ مربوط به صفت پیرون 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 $2R$ نشانگرها آگاهی بخش برای صفات کمی (درصد)

برای صفات تعداد گره، طول خوش، تعداد برگ، نشانگر B3 از آغازگر Bmag0603 دارای بیشترین R^2 بود. یعنی این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها

ژنتیکی جو در دامنه های زاگرس می باشد.

تعداد ۱۰ صفت کمی در کل نمونه ها در مزرعه اندازگیری شدند که تفاوت معنی داری بین و داخل نمونه از لحاظ صفات اندازه گیری شده وجود داشت.

شفاء الدین (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.

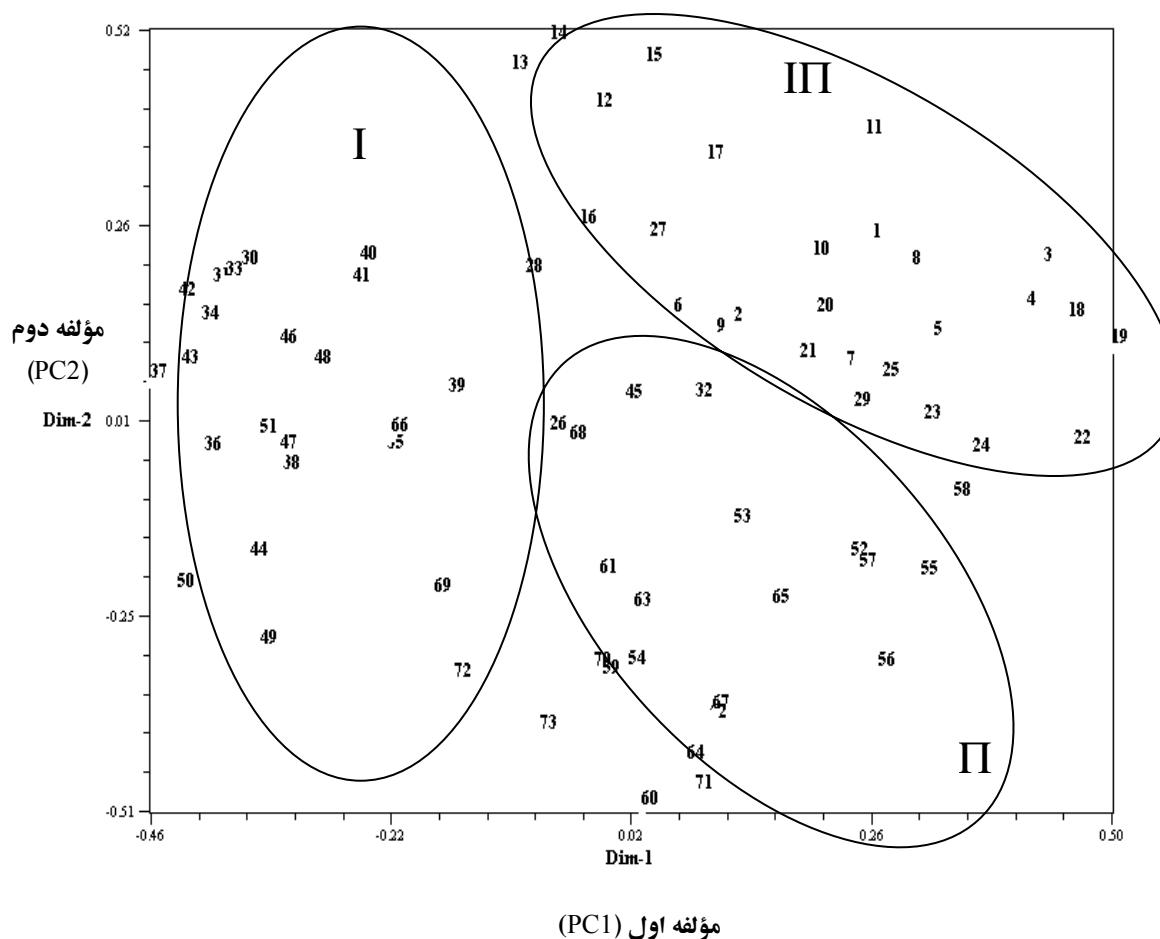
ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرها مولکولی با استفاده از ۱۰ صفت زراعی و نشانگرها مولکولی حاصل از ۱۵ جفت آغازگر روی نمونه ها مطاله شد.

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 لینکاری امیدوار بود (Rashidi *et al.* 2008). این نتایج نشان می‌دهند که چنانچه از آغازگرها بیشتری استفاده شود، می‌توان به پیدا کردن نشانگرهایی که دارای همبستگی بالایی با صفات مرتبط با عملکرد و اجزای عملکرد

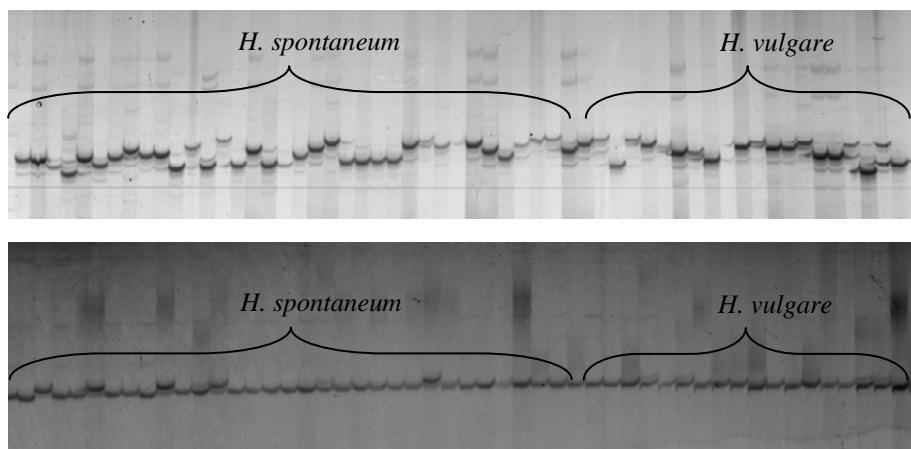
تغییرات بیشتری از صفات زراعی مورد بررسی را نشان می‌دهد.

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 PCoA 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
مربوط به آغازگر HvWaxy4 و B مرбوط 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

اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج که در تهیه تعدادی از
نمونه های جو با نگارندگان همکاری کردند، تشکر
می شود.

باشد، امید داشت.
سپاسگزاری
بدین وسیله از بخش غلات موسسه تحقیقات

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 barely 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 Schlötterer 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). Dendrogeram was constructed using dice similarity coefficient and UPGMA algorithm by software NTYSYS 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 *HvmLoHIA* 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 *HvmLoHIA* 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