



"مقاله پژوهشی"

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی جو وحشی *H. Spontaneum* با استفاده از نشانگر مولکولی EST-SSR

هومن شیروانی^۱, علی اشرف مهرابی^۲, محسن فرشادفر^۳, هوشمند صفری^۴, علی آرمینیان^۵ و فواد فاتحی^۶

۱- دکتری اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران
۲- دانشیار بخش زیست فناوری سازمان تحقیقات جنگلها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، (نویسنده مسؤول): a.mehrabi@rifr.ac.ir

۳- دانشیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴- استادیار بخش تحقیقات جنگلها و مراتع، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران
۵- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۸
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲

صفحه: ۴۵ تا ۳۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی مرتبط با خزانه ژنی اولیه جو برای بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاحی بسیار حائز اهمیت است. جو زراعی (*H. vulgaris*) و جد زراعی آن (*H. spontaneum*) سیستم مدل عالی و اقتصادی برای بررسی، اکتشاف و بهره‌برداری ژنتیکی می‌باشد. در تحقیق پیش‌رو تنوع ژنتیکی ۱۱۴ توده بومی جو وحشی جمع‌آوری شده از غرب کشور، توسط نشانگر مولکولی EST-SSR مورد بررسی قرار گرفته است که هدف بررسی میزان تنوع ژنتیکی این ژنتیپ‌های بومی و ارزیابی کارایی این نشانگر در تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود در ژنتیپ‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا بهمنظور استخراج DNA بذر در گلدان کشت گردید، استخراج CTAB بدروش PCR تغییر یافته برای هر ژنتیپ انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکrolیتر انجام گرفت. محصول PCR جهت نمایان شده قطعات تکثیری در ڈل آکارز ۴ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد و رنگ Safe View تزریق گردید. بهمنظور انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری، داده‌های حاصل در قالب ماتریسی آماده شد و پارامترهای مرتبط با آغازگرها و جمعیت‌ها ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تعداد الی‌های تکثیر شده از ۲ تا ۴ ال برای نشانگرها متفاوت بود و آغازگرها مورد بررسی در مجموع ۴۰ ال در ژنتیپ‌ها مورد بررسی با میانگین ۲/۸۵ به ازای هر نشانگر تکثیر گردند. متوسط درصد چند شکلی برای آغازگرها مورد مطالعه برایر با ۹۶/۴۲ درصد بود. محتوى اطلاعات چند شکلی (PIC) از ۰/۳۹۷ تا ۰/۱۸۹ متغیر بود. نتایج نشان داد که بیشترین سطح تنوع در جمیعت‌های استان لرستان و کمترین تنوع در جمیعت‌های استان کردستان وجود دارد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشای ژنتیپ‌ها را در ۱۴ گروه قرار داد که بر اساس گروه‌بندی تنوع ژنتیکی تا حدودی با پراکنش چغرایی‌بیان تطبیق داشت. همچنین نتایج تجزیه به مخصوصات اصلی تا حدودی با تجزیه خوشای مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد تنوع خوبی در میان جمیعت‌های مورد بررسی وجود دارد. همچنین چند شکلی مناسب نیز در بین آغازگرها مشاهده گردید. آغازگرها GBM1221 با ۳ ال، GBM1461 با ۳ ال و SCSSR04163 با ۴ ال که بهترین چند شکلی را داشتند، به عنوان آغازگرها برتر به‌منظور استفاده در تحقیقات بعدی جو معرفی می‌گردد. وجود تنوع ژنتیکی بالا در جمیعت‌های طبیعی جو وحشی *H. spontaneum* می‌دهد که زرم پلاسم این گاه را می‌توان در رویشگاه‌های طبیعی حفاظت نمود. همچنین این تنوع منبع ارزشمندی برای شناسایی نشانگرها مولکولی آگاهی بخش برای صفات مختلف فتوتیپی است.

واژه‌های کلیدی: تنوع، جو وحشی، ساختار ژنتیکی، نشانگر مولکولی

مقدمه

فرد خود را توسعه و بروز دهنده (۴۹,۶٪). شناخت روابط ژنتیکی و مطالعه تنوع زرم پلاسم‌های موجود، به عنوان یک هدف با ارزش در اصلاح و بهبود راهکارهای حفاظت از گونه‌ها است. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های مختلف، در انتخاب افراد برای ورود ژن‌های مطلوب از زرم پلاسم‌های متنوع به درون پایه زراعی کمکی مؤثر است (۳۰,۱۳٪). از این رو چهت بهره‌برداری پایدار از منابع ژنتیکی و تدوین راهکارهای حفاظت مؤثر، دسترسی به دانش مناسب از سطوح والگوهای تنوع ژنتیکی ضروری می‌باشد (۲۶). شناخت تنوع زرم‌پلاسمی و روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، امری مهم در اجرای موفق برنامه‌های اصلاحی است. همچنین بررسی تنوع ژنتیکی درون زرم‌پلاسم‌ها، به‌منظور طبقه‌بندی قابل اعتماد ژنتیپ‌ها می‌تواند شناسایی ژنتیپ‌هایی را که برای هدف‌های اصلاحی خاص قابلیت بکارگیری دارند تسهیل نماید (۳۸,۳۲). به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی گیاهی چه در محیط طبیعی و چه در خارج از محیط طبیعی باید چهار مؤلفه تحقیق (نوع نشانگر مناسب، روش ایجاد نشانگر، ارزیابی نشانگر و روش آنالیز داده‌های بدست آمده) را به خوبی

جو (*Hordeum vulgare*) یکی از محصولات مهم ایران می‌باشد که در هر دو شرایط آبی و دیم کشت می‌گردد و از نظر سطح زیر کشت در بین محصولات زراعی بعد از گندم در رتبه دوم قرار داد. بر اساس آمارها حدوداً ۶۰٪ بصورت دیم و ۴۰٪ آبی کشت می‌شود. میانگین عملکرد این محصول بصورت دیم در ایران ۹۰۰ تا ۷۰۰ کیلو گرم در هكتار گزارش گردیده است (۲). جو زراعی آن (*H. vulgaris*) و جد زراعی آن (*H. spontaneum*) سیستم مدل عالی و اقتصادی برای اکتشاف و بهره‌برداری ژنتیکی می‌باشد. هر دو گونه، دیپلوبید و قابل تلاقی با یکدیگر بوده و مجموعه‌ای از ابزار ژنومیکس مشتمل بر نقشه‌های لینکازی، داده‌های QTL، EST‌ها، کتابخانه‌های BAC و آرایه‌ها برای تجزیه ژنم، که همولوگ ژنوم‌های A، B و D گندم هگزاپلوبید است، موجود می‌باشد (۱۶). نواحی غرب ایران، خاورمیانه و هلال حاصلخیز شامل مرکز تنوع جو وحشی می‌باشد (۲۷, ۳۰). تنوع ژنتیکی امکان سازگاری گونه‌ها را با شرایط متفاوت محیطی فراهم می‌کند و به گونه‌ها اجازه می‌دهد تا سازگاری‌های منحصر به

پژوهش‌های اکولوژیکی و تکامل جمعیت‌ها، انتخاب نشانگر همراه با صفت مورد نظر، خالص سازی مواد ژنتیکی و انجام مطالعات سیتوژنتیکی است (۴). نشانگرهای EST-SSR^۱ گروه مهمی از ریزماهواره محسوب می‌شوند که در نواحی کد کننده ژن قرار گرفته‌اند و منبع ارزشمندی در رابطه با عملکرد ژن‌ها به‌شمار می‌روند (۴۵:۴۷). اخیراً با افزایش سریع توالی‌های EST در پایگاه‌های اطلاعاتی، استخراج EST از SSR آسان‌تر شده و تا به امروز نشانگرهای EST-SSR به طور موققیت‌آمیز توسعه یافته و در گونه‌های گیاهی زیادی از جمله برنج، گندم، جو، سویا، پنبه، سیب زمینی شیرین، مرکبات و غیره به کاربرده شده‌اند. از آنجایی که EST-SSRها متعلق به بخش‌های بیان شده‌ی ژنوم هستند بنابراین چند شکلی معکس شده توسط این نشانگرها می‌تواند روابط بین گونه‌ها و واریته‌ها را با کارایی بالاتری مشخص کند (۴۶). فیضی و همکاران (۹) با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره QTL‌های موثر در افزایش غلاظت و محتوای عنصر روی در دانه جو را شناسایی کردند. در تحقیق پیش رو تنوع ژنتیکی ۱۱۴ توده بومی جو وحشی نشانگر مولکولی EST-SSR^۲ مورد بررسی قرار گرفته است که هدف بررسی میزان تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌های بومی و ارزیابی کارایی این نشانگر در تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر بر روی ۱۱۴ ژنوتیپ جو وحشی (*H. spontaneum*) جمع‌آوری شده از استان‌های غربی کشور که در حوزه زاگرس (کرمانشاه، کردستان، ایلام و لرستان) قرار داشتند انجام گرفت. ابتدا به‌منظور استخراج DNA بذور در گلدان کشت گردید (جدول ۱).

مشخص کرد. هدف به‌نژادگر از مطالعه تنوع ژنتیکی می‌تواند شناسایی هویت نمونه‌ها و تعیین شباهت ژنتیکی دو یا چند نمونه (مشابهت یا تفاوت دو یا چند نمونه از نظر ژنتیکی، تعیین زیر مجموعه‌های جدا شده از یک جمعیت واحد، وجود ارقام متراծ یا همنام به‌عنوان نمونه‌های موجود در بانک ژن، تعیین وقوع تبادلات ژنتیکی بین نمونه‌ها یا جمعیت‌ها در گذر زمان) باشد. با اطلاع از پتانسیل ژنتیکی ارقام، می‌توان ضمن حفظ خلوص ژنتیکی (۲۹)، روابط ژنتیکی آنان را برآورد و ریخته‌های ارثی را به‌صورت دقیق شناسایی کرد (۳۵). نشانگرهای ژنتیکی دارای کاربردهای زیادی در بررسی تنوع ژنتیکی، تسهیل اینتروگسیوون، انگشت نگاری ژنی، شناسایی ارقام، انتخاب دقیق والدین مناسب برای تولید دورگ‌های قوی، یافتن روابط خویشاوندی بین گونه‌ها و تجزیه و تحلیل های فیلوجنیکی می‌باشد (۳۶). نشانگرهای مولکولی عناصر زیستی هستند که به‌عنوان ابزاری ژنتیکی برای یافتن و مشخص کردن یک فرد، بافت، سلول، هسته سلولی، کروموزوم یا ژن بکار می‌روند. نشانگرهای مولکولی از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند درجه چندشکلی، غالب یا همبارز بودن، تعداد جایگاه‌های تجزیه شده در هر آزمایش، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی یابی DNA الگو و هزینه مورد نیاز با همدیگر متفاوتند (۵۰). نشانگرهای مولکولی DNA بدلیل برخورداری از ویژگی چندشکلی در سطح و نیز قابلیت آن‌ها برای بیان شدن در همه بافت‌ها و مراحل مختلف رشد گیاه، از پایداری بالایی برخوردارند (۳۳). چرا که این نشانگرها تحت تأثیر شرایط محیطی نیستند (۲۴). نشانگرهای ریزماهواره به عنوان یکی از مفیدترین ابزارهای مولکولی در حوزه ژنومیکس مطرح هستند و در توارث هم‌بارز، تکرارپذیری، اختصاصی بودن و برخورداری از کیفیت و کمیت لازم برخوردارند (۵۱، ۱۹، ۷). مهم‌ترین کاربرد ریزماهواره‌ها، مطالعه تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه ژنومی و نشانگری و نیز همسانه کردن ژنی و

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Specifications of genotypes used in this research

| شماره ژنوتیپ Genotype number | محل جمع‌آوری Gathering location | منطقه Region | شماره ژنوتیپ Genotype number | محل جمع‌آوری Gathering location | منطقه Region | شماره ژنوتیپ Genotype number | محل جمع‌آوری Gathering location | منطقه Region |
|---------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1 | Kermanshah | Mahidasht | 39 | Lorestan | Kuhdasht | 77 | Kurdistan | Saqez |
| 2 | Kermanshah | Kermanshah | 40 | Lorestan | Rumeshkan | 78 | Lorestan | Chaghavandi |
| 3 | Ilam | Dehloran | 41 | Lorestan | Zagheh | 79 | Kurdistan | Marivan |
| 4 | Ilam | Musian | 42 | Lorestan | Kuhdasht | 80 | Lorestan | Khorramabad |
| 5 | Kermanshah | Halashi | 43 | Kermanshah | Gilanegharb | 81 | Kurdistan | Baneh |
| 6 | Ilam | Shirvan | 44 | Lorestan | Dorud | 82 | Kermanshah | Paveh |
| 7 | Ilam | Darreh Shahr | 45 | Lorestan | Azna | 83 | Kermanshah | Ravansar |
| 8 | Ilam | Abdanan | 46 | Lorestan | Veyshan | 84 | Kurdistan | Divandarreh |
| 9 | Ilam | Darreh Shahr | 47 | Lorestan | Poldokhtar | 85 | Kurdistan | Bukan |
| 10 | Ilam | Ilam | 48 | Ilam | Sarableh | 86 | Kurdistan | Takab |
| 11 | Ilam | Darreh Shahr | 49 | Kurdistan | Kellaterzan | 87 | Kermanshah | Sonqor |
| 12 | Ilam | Dehloran | 50 | Kermanshah | Gwawar | 88 | Kermanshah | Kuzaran |
| 13 | Kurdistan | Zarrineh | 51 | Ilam | Mehran | 89 | Kurdistan | Sarvabad |
| 14 | Kurdistan | Saqez | 52 | Lorestan | Darb-e Gonbad | 90 | Kurdistan | Saqez |
| 15 | Kurdistan | Ziwiye | 53 | Lorestan | Khorramabad | 91 | Kurdistan | Palangan |
| 16 | Ilam | Abdanan | 54 | Kermanshah | Kerend-e Ghab | 92 | Kurdistan | Qorveh |
| 17 | Kurdistan | Deh Kalan | 55 | Lorestan | Kuhdasht | 93 | Kurdistan | Divandarreh |
| 18 | Ilam | Holeylan | 56 | Kermanshah | Gilanegharb | 94 | Kurdistan | Hasan Abad |
| 19 | Kurdistan | Qorveh | 57 | Lorestan | Dorud | 95 | Kermanshah | Harsin |
| 20 | Kermanshah | Javanrud | 58 | Kermanshah | Srmast | 96 | Ilam | Dehloran |
| 21 | Kermanshah | Tazeabadi | 59 | Lorestan | Dowreh | 97 | Kurdistan | Kamyaran |
| 22 | Lorestan | Khorramabad | 60 | Ilam | Lowmar | 98 | Kermanshah | Qasreshirin |
| 23 | Kurdistan | Marivan | 61 | Ilam | Shirvan | 99 | Ilam | Ilam |
| 24 | Kermanshah | Sarpol-e Zahab | 62 | Ilam | Malekshahi | 100 | Kurdistan | Chahardoli |
| 25 | Lorestan | Borujerd | 63 | Lorestan | Poldokhtar | 101 | Ilam | Shirvan |
| 26 | Kermanshah | Gahvareh | 64 | Ilam | Chagha Sabz | 102 | Kurdistan | Sarvabad |
| 27 | Kermanshah | Homeyl | 65 | Ilam | Malekshahi | 103 | Kermanshah | Kermanshah |
| 28 | Lorestan | Selseleh | 66 | Ilam | Abdanan | 104 | Lorestan | Kuhdash |
| 29 | Lorestan | Khorramabad | 67 | Kurdistan | Sanandaj | 105 | Kermanshah | Gilanegharb |
| 30 | Ilam | Holeylan | 68 | Ilam | Darreh Shahr | 106 | Ilam | Tulab |
| 31 | Kermanshah | Kangavar | 69 | Kurdistan | Abidar | 107 | Lorestan | Khorramabad |
| 32 | Kermanshah | Gilanegharb | 70 | Lorestan | Zagheh | 108 | Lorestan | Dorud |
| 33 | Kermanshah | Harsin | 71 | Lorestan | Azna | 109 | Ilam | Lowmar |
| 34 | Kurdistan | Bijar | 72 | Kurdistan | Muchesh | 110 | Ilam | Shirvan |
| 35 | Kermanshah | Harsin | 73 | Kermanshah | Homeyl | 111 | Kermanshah | Sahneh |
| 36 | Lorestan | Dorud | 74 | Kurdistan | Kamyaran | 112 | Kermanshah | Bisotun |
| 37 | Ilam | Malekshahi | 75 | Kermanshah | Eslamabad-e Ghab | 113 | Lorestan | Aligudarz |
| 38 | Kurdistan | Baneh | 76 | Lorestan | Kuhdasht | 114 | Lorestan | Poldokhtar |

سانتریفیوژ کوتاه صورت گرفت و به آرامی فاز مایع خالی شد (این مرحله دو بار تکرار شد) در پایان نیز تیوب‌ها در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شوند و بعد به هر تیوب میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه گردید. بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفوتومتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الکو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، $0.05\mu M$ dNTP $\times 20\mu M$ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار $1\times$) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۴۵ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۴۵ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود (۵۲ تا ۶۲ درجه). همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۴۳) برای هر ژنوتیپ در آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام شد. بعد از انتقال ۵۰ میلی‌گرم نمونه خرد شده با ازت مایع به تیوب، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۴ گرم $1/48$ Tris-HCl، $16/36$ گرم $NaCl$ ، $3/15$ گرم β -mercaptoethanol و $400\mu M$ EDTA) میکرولیتر در pH=۸ به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در حمام آبی با دمای $65^{\circ}C$ قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه گردید و به مدت ۶۰ دقیقه خوب بهم زده شد تا محلول داخل تیوب یکنواخت شود. پس از آن نمونه‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با $13000\times g$ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و فاز رویی به یک تیوب تمیز منقل گردید و به هر تیوب مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد-اضافه و به مدت دو ساعت در فریزر در دمای $-20^{\circ}C$ قرارداده شدند. سپس تیوب‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با $13000\times g$ دور سانتریفیوژ گردید و بعد از آن فاز مایع به آرامی خالی و به هر تیوب مقدار ۵۰۰ میکرولیتر اتانول 80% سرد اضافه و یک

ماتریس فاصله و تجزیه به مختصات اصلی و نرم افزار MEGA برای تجزیه کلاستر مورد ارزیابی قرار گرفت.

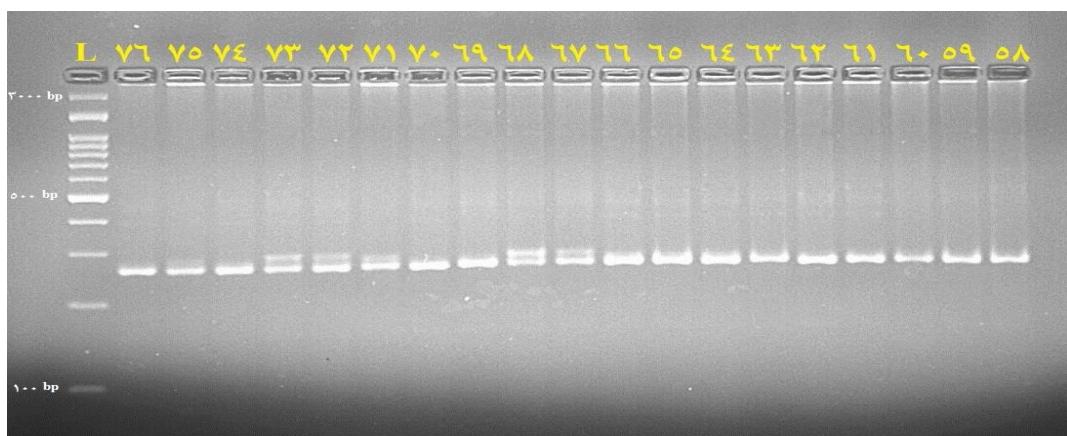
نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی ۱۱۴ ژنوتیپ جمع‌آوری شده از چهار استان غرب کشور با استفاده از ۱۴ نشانگر مولکولی EST-SSR مورد بررسی قرار گرفت. بهمنظور بررسی بهتر، پراکنش آغازگرها بصورتی انتخاب گردید که روی هر کروموزوم ۲ نشانگر قرار گیرد. تعداد ال‌های تکثیر شده از ۲ تا ۴ ال برای نشانگرها متفاوت بود. نشانگرهای SCSSR04163 و GBM1110، SCSSR18076، GBM1176، GBM1459 و GBM1212 کمترین تعداد ال را تولید نمودند (جدول ۲). گونگ و همکاران (۱۱) با استفاده از ۵۲ نشانگر SSR تنوع ژنتیکی ۸۹ ژنوتیپ جو را مورد بررسی قرار دادند و در پایان میانگین ال‌های تکثیر شده را ۴ گزارش کردند. شکل ۱ الگوی باندی برای برخی ژنوتیپ‌ها را با استفاده از آغازگر GBM1126 نشان می‌دهد. آغازگرها مورد بررسی در مجموع ۴۰ ال در ژنوتیپ‌های مورد بررسی با میانگین ۲/۸۵ به ازای هر نشانگر تکثیر کردند. گزارش‌های مختلف در خصوص تعداد ال‌های تکثیر شده در جو وجود دارد. در مطالعه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ جو وحشی و جو زراعی با استفاده از نشانگرهای SSR و EST-SSR که توسط ژنگ و همکاران (۵۲) انجام گرفت، میانگین تعداد ال‌های تکثیر شده برای لوكوس ۳/۱۴ گزارش گردید. علت تفاوت در تعداد ال بین پژوهش‌های متفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت ژنوتیپ‌ها، تعداد آغازگرها و تفاوت در پایه ژنتیکی آنها باشد (۳۹). ال‌های مشاهده شده در هر جایگاه ژنی بشدت تحت تاثیر اندازه نمونه بوده و به همین جهت این امکان وجود دارد که با آزمایشات گوناگون و تعداد نمونه متفاوت تعداد ال‌های مختلفی بدست آید.

آگارز ۴ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد و رنگ View استفاده شد. بهمنظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNA های تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز بارگزاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت. همچنین از دستگاه Gel Document Quantum ST4 جهت نمایان شده نوارها استفاده گردید. بهمنظور انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری، اطلاعات حاصل از ژل‌ها و الگوی تفرق نوارها در طی الکتروفورز، داده‌های حاصل در قالب ماتریسی (صفر عدم حضور باند و یک حضور باند) آماده شد. برای هر نشانگر تعداد ال‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بصورت a, b, c و d نیز نامگذاری شدند. پارامترهای مرتبط با ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها نظیر تنوع ژنی (Nei) (H)، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، هتروزیگوستی کل (Ht)، جریان ژنی (Nm) و شاخص تمایز ژنی (Gst)، شاخص تثبیت (Fst) با کمک نرم افزار PopGene v.1.32 شکلی (PIC) از طریق فرمول

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

با استفاده از نرم افزار Power Marker محاسبه گردید، در اینجا p برابر با مجموع نوارهای هر لوكوس برای کلیه ژنوتیپ‌ها است (۱۷). همچنین شاخص نشانگری (MI) از رابطه $MI = PIC \times N \times B$ بدست آمد که N تعداد کل باندها و β نسبت چندشکلی برای هر آغازگر بود (۳۴). شاخص نسبت چندگانه موثر (EMR) از رابطه $EMR = NPB \times \beta$ که از درصد چندشکلی (β) ضریر تعداد نوارهای چندشکل (NPB) بدست آمد (۲۲) و قدرت تفکیک (RP) از رابطه $RP = \sum IB$ محاسبه گردید. RP در رابطه $[IB - (0.5 \times Pi)] / 2$ و Pi نسبت افراد دارای نوار است (۱). در پایان نیز داده‌های حاصل، با استفاده از نرم افزارهای NTSYSpc 2.02e برای محاسبه آزمون مانتل، 6 DARwin جهت



شکل ۱- الگوی باندی برخی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از آغازگر GBM1126
Figure 1. Band pattern of some studied genotypes using GBM1126 primer

فراوانی را داشته باشد) در جدول ۲ برای هر آغازگر محاسبه گردیده است. نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی الی مربوط

میزان فراوانی ال‌های مختلف و فراوانی ال رایج (الی که در بین کلیه ال‌های مشاهده شده در یک نشانگر بیشترین

آغازگر ۳ SCSSR04163 مشاهده گردید که این نتایج با گزارشات گنج خانلو و همکاران (۱۰) و نامآور و همکاران (۲۸) مطابقت داشت.

به آغازگر GBM1212 در ال B (۰/۹۷) می‌باشد. همچنین کمترین میزان نیز در همین آغازگر و ال A مشاهده شد. فراوانی ال راچ از ۰/۴۹ تا ۰/۹۷ متغیر بود بنحوی که بیشترین فراوانی در آغازگر GBM1212 و کمترین میزان در

جدول ۲- فراوانی الهای تکثیر شده و ال رایج در آغازگرهای مورد بررسی

Table 2. Frequency of amplified alleles and common alleles in the studied primers

| (Primer) | A | B | C | D |
|------------|---------|---------|---------|--------|
| GBM1461 | 0.2368 | 0.636* | 0.1272 | |
| SCSSR04163 | 0.1754 | 0.2632 | 0.4956* | 0.0658 |
| GBM1459 | 0.9561* | 0.0439 | | |
| SCSSR03381 | 0.0395 | 0.9167* | 0.0439 | |
| GBM1110 | 0.0921 | 0.1623 | 0.636* | 0.1096 |
| SCSSR25691 | 0.0482 | 0.7851* | 0.1667 | |
| GBM1221 | 0.2456 | 0.557* | 0.1974 | |
| SCSSR20569 | 0.114 | 0.807* | 0.0789 | |
| GBM1176 | 0.0482 | 0.9518* | | |
| SCSSR18076 | 0.8509* | 0.1491 | | |
| GBM1212 | 0.0263 | 0.9737* | | |
| SCSSR05599 | 0.1404 | 0.7368* | 0.1228 | |
| GBM1126 | 0.0658 | 0.9079* | 0.0263 | |
| SCSSR15864 | 0.1667 | 0.6754* | 0.1579 | |

: ال و خشی Wild allel ;

نوکلئوتیدهای T و G که همبستگی مشتی با میزان چند شکلی دارد وابسته است (۳۷). میانگین شاخص نشانگری ۰/۷۵۱ بود که بیشترین میزان را نشانگر SCSSR04163 و کمترین میزان را نشانگر GBM1212 داشتند. این شاخص پتانسل هر آغازگر در تولید نوار بیشتر را نشان می‌دهد (۳۴). برای شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) آغازگرهای GBM1110 و SCSSR04163 بیشترین میزان را به خود اختصاص دادند. در شاخص تفکیک (RP) نیز ملاحظه شد که آغازگرهای SCSSR04163 و SCSSR18076 دارای بیشترین میزان و آغازگر GBM1212 دارای کمترین میزان بود. شاخص قدرت تفکیک (RP) معیار مناسبی برای انتخاب آغازگر مناسب می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تاثیرپذیری دارد (۱). میانگین آلل‌های موثر برای ۱۴ نشانگر بر اساس آغازگرهای مورد بررسی برابر ۱/۶۶ بود که بیشترین مقدار آن ۲/۸۵ برابر نشانگر SCSSR04163 و کمترین مقدار آن ۱/۰۵ برای آغازگر GBM1212 براورده گردید. تعداد آلل مؤثر رابطه مستقیمی با تنوع ژنی دارد و مقدار آن در محدوده ۲ تا ۹ می‌باشد. بنابراین، مقادیر اندک تعداد آلل‌ها و فراوانی نسبی آلل‌ها بستگی دارد (۵). شمسی فر و همکاران (۴۲) در بررسی تنوع ژنتیکی بrixی ارقام جو با استفاده از نشانگر مولکولی SSR میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی را ۰/۳۸ گزارش کردند. همچنین نامآور و همکاران (۴۸) دامنه PIC را بین ۰/۳۷ تا ۰/۸۱ در بررسی خود بر روی ژرم پلاسم بین الملی *H. spontaneum* با استفاده از نشانگر SSR گزارش کردند. متفاوت بودن میزان PIC در بررسی‌های صورت گرفته می‌تواند به دلایل مختلفی شامل، تفاوت در تعداد و نوع نشانگر، وحشی یا زراعی بودن گیاهان مورد بررسی و تعداد ژنتوتیپ‌های مورد مطالعه ارتباط داشته باشد (۸). همچنین میزان PIC به عوامل دیگری از جمله تعداد آلل در هر جایگاه، طول آغازگرهای مورد استفاده و میزان

میزان چند شکلی آغازگرها در نشانگرهای EST-SSR بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده تنوع بالا بین ژنتوتیپ‌ها است. متوسط درصد چند شکلی برای آغازگرهای مورد مطالعه برابر با ۹۶/۴۲ درصد بود. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از ۰/۳۹۷ تا ۰/۱۸۹ با میانگین ۰/۲۶ متغیر بود. بیشترین میزان PIC در آغازگرهای GBM1221 با ۳ ال، GBM1461 با ۳ ال و SCSSR04163 با ۴ ال مشاهده شد. با توجه به اینکه میزان PIC در این پژوهش کمتر ۰/۵۰ بود نشاندهنده این است که نشانگرهای انتخاب شده پراکندگی مناسبی در ژنوم ژنتوتیپ‌های مورد بررسی داشته‌اند (جدول ۳). محتوای اطلاعات چند شکل یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. این شاخص نشاندهنده توانایی نشانگر برای شناسایی چند شکلی درون یک جمعیت است که میزان آن به تعداد آلل‌ها و فراوانی نسبی آلل‌ها بستگی دارد (۵). شمسی فر و همکاران (۴۲) در بررسی تنوع ژنتیکی بrixی ارقام جو با استفاده از نشانگر مولکولی SSR میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی را ۰/۳۸ گزارش کردند. همچنین نامآور و همکاران (۴۸) دامنه PIC را بین ۰/۳۷ تا ۰/۸۱ در بررسی خود بر روی ژرم پلاسم بین الملی *H. spontaneum* با استفاده از نشانگر SSR گزارش کردند. متفاوت بودن میزان PIC در بررسی‌های صورت گرفته می‌تواند به دلایل مختلفی شامل، تفاوت در تعداد و نوع نشانگر، وحشی یا زراعی بودن گیاهان مورد بررسی و تعداد ژنتوتیپ‌های مورد مطالعه ارتباط داشته باشد (۸). همچنین میزان PIC به عوامل دیگری از جمله تعداد آلل در هر جایگاه، طول آغازگرهای مورد استفاده و میزان

جدول ۳- اطلاعات نشانگرهای EST-SSR مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاه جو وحشی (*H. Spontaneum*)
Table 3. Information on EST-SSR markers studied in assessing the genetic diversity of wild barley (*H. Spontaneum*) genotypes

| مکان کروموزومی Chromosomal locatio n | توع ژئی Nei (H) | شاخص اطلاعات کشون (I) | تعداد آللهای مشانون (Ne) | شاخص قدرت تفکیک موثر (EMR) | نسبت چندگانه شانگری موثر (MI) | محتوی چند شکلی (PIC) | درصد چندشکل (%PPL) | مکان های شناخته شده (Na) | تعداد آللهای مشاهده شده (N _a) | تولی آغازگر Primer sequence (5'-3') | نام آغازگر Primer name |
|--|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--|---|--------------------------------------|
| H1 | 0.5233 | 0.8913 | 2.0977 | 2.298 | 3.000 | 1.081 | 0.360 | 3.000 | 3.000 | TTTCAGCAGA CGCATGAAG | GBM1 461-F |
| H1 | 0.65 | 1.1836 | 2.8572 | 2.509 | 4.000 | 1.438 | 0.359 | 4.000 | 4.000 | AGAGATCGTACG AAAGAACAGC | SCSSR 04163-F SCSSR 04163-R |
| H2 | 0.0839 | 0.18 | 1.0916 | 1.982 | 2.000 | 0.184 | 0.192 | 2.000 | 2.000 | AACACATCCAT ACTTCCCCG | GBM1 459-F GBM1 459-R |
| H2 | 0.1562 | 0.3445 | 1.1852 | 2.158 | 3.000 | 0.613 | 0.204 | 3.000 | 3.000 | CAGGGACGTAC AATATTACCG | SCSSR 03381-F SCSSR 03381-R |
| H3 | 0.5487 | 1.045 | 2.2159 | 2.193 | 4.000 | 1.189 | 0.297 | 4.000 | 4.000 | CACCGAAGAAA ATCCACCAT | GBM1 110-F GBM1 110-R |
| H3 | 0.3535 | 0.6348 | 1.5469 | 2.228 | 3.000 | 0.735 | 0.245 | 3.000 | 3.000 | ACGAGCTGATA TCCTCACGAG | SCSSR 25691-F SCSSR 25691-R |
| H4 | 0.5905 | 0.9911 | 2.4417 | 2.053 | 3.000 | 1.192 | 0.397 | 3.000 | 3.000 | ACAGGCAATCC ACGTTACGG | GBM1 221-F GBM1 221-R |
| H4 | 0.3295 | 0.6211 | 1.4914 | 2.351 | 3.000 | 0.660 | 0.220 | 3.000 | 3.000 | TGCCTTGGTCTT GGTTGTA | SCSSR 20569-F SCSSR 20569-R |
| H5 | 0.0918 | 0.1933 | 1.1011 | 2.158 | 2.000 | 0.377 | 0.189 | 2.000 | 2.000 | ATCGAGCACCT ACGAACCC | GBM1 176-F GBM1 176-R |
| H5 | 0.4223 | 0.7582 | 1.731 | 2.421 | 3.000 | 0.859 | 0.286 | 3.000 | 3.000 | CACTAGTCGC GCATTG | SCSSR 18076-F SCSSR 18076-R |
| H5 | 0.2538 | 0.4212 | 1.3401 | 2.491 | 2.000 | 0.447 | 0.224 | 2.000 | 2.000 | GAGTCCACTGC TGCCCTG | GBM1 212-F GBM1 212-R |
| H6 | 0.0512 | 0.1217 | 1.054 | 0.105 | 1.054 | 0.095 | 0.190 | 0.500 | 1.000 | TGTTGCAAAGAA GCAAGGATG GGCGTTACTCT | SCSSR 05599-F SCSSR 05599-R |
| H6 | 0.4223 | 0.7582 | 1.731 | 2.421 | 3.000 | 0.859 | 0.286 | 3.000 | 3.000 | TCCTCATATAA CAGCAATGG | GBM1 126-F GBM1 126-R |
| H7 | 0.1707 | 0.3625 | 1.2058 | 2.228 | 3.000 | 0.634 | 0.211 | 3.000 | 3.000 | AGCAGATGATT CCCCAGATG GCCAACGGTGT | SCSSR 15864-F SCSSR 15864-R |
| H7 | 0.4911 | 0.8551 | 1.9649 | 2.158 | 3.000 | 1.012 | 0.337 | 3.000 | 3.000 | GCATAAACGGG TGTAGAGC | SCSSR 15864-F SCSSR 15864-R |
| Miangchin | 0.337 | 0.615 | 1.666 | 2.095 | 2.750 | 0.751 | 0.265 | 2.786 | 2.857 | 96.42% | Miangchin |

نسبت دامنه‌ای بین ۰/۵۶ تا ۰/۶۲ و با میانگین ۰/۵۹ داشت. اگر این نسبت بالا باشد نشاندهنده این است که جمیعت مورد نظر نسبت به سایر جمیعت‌ها از توزیع یکنواختی برخوردار می‌باشد که در نتایج به دست آمده جمیعت ایلام بیشترین یکنواختی را به خود اختصاص داده است، که این یکنواختی نشاندهنده این است که نسبت آللهایی که فراوانی برابر دارند به کل آللهای از سایر جمیعت‌ها بیشتر است و در جمیعت کرمانشاه این نسبت کمترین مقدار را دارد. میانگین شاخص اطلاعات شانون برای چهار جمیعت ۰/۵۸ و ۰/۵۸ می‌باشد که بیشترین مقدار آن برای جمیعت لرستان و کمترین مقدار آن برای جمیعت کردستان بود. شاخص اطلاعات شانون بیانگر تنوع ژنتیکی در درون جمیعت‌ها می‌باشد. همچنین بر اساس شاخص تنوع ژنتیکی نی تنوع ژنتیکی درون جمیعت‌ها از

میانگین آللهای مشاهده شده و ال مؤثر برای ۴ جمیعت بر اساس مناطق جمع‌آوری بذور به ترتیب برابر ۰/۷۶ ۰/۷۴ ۰/۶۷ ۰/۶۷ بود که بیشترین مقدار ال مؤثر ۰/۶۷ برای جمیعت لرستان و کمترین مقدار آن ۰/۵۹ برای جمیعت کردستان بود. در مطالعه نام‌آور و همکاران (۲۸) تعداد ال مؤثر از ۱/۶۰ تا ۵/۳۱ ۰/۵۹ همکاران گردید همچنین حاج منصور و همکاران (۱۴) میانگین گزارش ۰/۲۸ تا ۰/۶۴ تعداد ال مؤثر را در ۰/۲۳ رقم جو زراعی اعلام کرد. تفاوت در میان تعداد ال میانگین و ال مؤثر در هر مکان ۷٪ وجود اللهای نادر (اللهایی که دارای فراوانی کمتر از ۵٪ هستند) است که در یک یا چند ژنوتیپ وجود دارند یعنی مختص یک یا چند ژنوتیپ می‌باشند (۱۸). میزان یکنواختی هر یک از جمیعت‌ها از طریق محاسبه نسبت تعداد آللهای مؤثر به تعداد آللهای مشاهده شده تعیین گردید که این

کردستان بود (جدول ۴).

۰/۳۰۶ تا ۰/۳۳۹ بود بیشترین میانگین سطح این تنوع در جمیعت لرستان و کمترین میانگین سطح این تنوع در جمیعت

جدول ۴- میانگین پارامترهای ژنتیکی درون جمیعت‌های جو و حشی (*H. spontaneum*)Table 4. Mean genetic parameters within wild barley populations (*H. spontaneum*)

| جمیعت Populations | مشاهده شده (Na) | تعداد الالهای مؤثر (Ne) | شاخص اطلاعاتی شانون (I) | تنوع ژئی Nei (H) | درصد چندشکلی (%PPL) | Ne/Na |
|-------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|------------------|---------------------|-------|
| Kermanshah | 2.857 | 1.622 | 0.591 | 0.327 | 100 | 0.567 |
| Ilam | 2.714 | 1.699 | 0.603 | 0.339 | 100 | 0.626 |
| Kurdistan | 2.642 | 1.594 | 0.551 | 0.306 | 92.86 | 0.603 |
| Lorestan | 2.857 | 1.673 | 0.612 | 0.339 | 100 | 0.585 |
| Average | 2.767 | 1.647 | 0.5897 | 0.328 | 98.215 | 0.595 |

جمیعت‌ها می‌باشد که همبستگی منفی با تمایز ژن دارد (۱۲) اگر مقدار جریان ژنی کمتر از یک باشد جریان ژنی کم و اگر بیشتر از ۴ باشد جریان ژنی زیاد است (۲۱). در تحقیق حاضر جریان ژنی ۹/۶۰ به دست آمد این شاخص زمانی که از یک بالاتر باشد جمیعت‌ها در حال حفظ ارتباط ژنتیکی در طول زمان هستند و زمانی که کوچکتر از یک برآورد گردد جمیعت‌ها در طول زمان در حال واگرایی و دور شدن ژنتیکی هستند (۲۲). برای محاسبه تفرقه ژنتیکی در بین جمیعت‌ها از شاخص Fst استفاده شد که مقدار آن برای نشانگرها ۰/۰۲۵۴ محسوبه گردید. اوزنک و همکاران (۳۱) و کرم زاده و همکاران (۲۰) در بررسی تنوع ژنتیکی جوهای وحشی از شاخص Fst استفاده کردند.

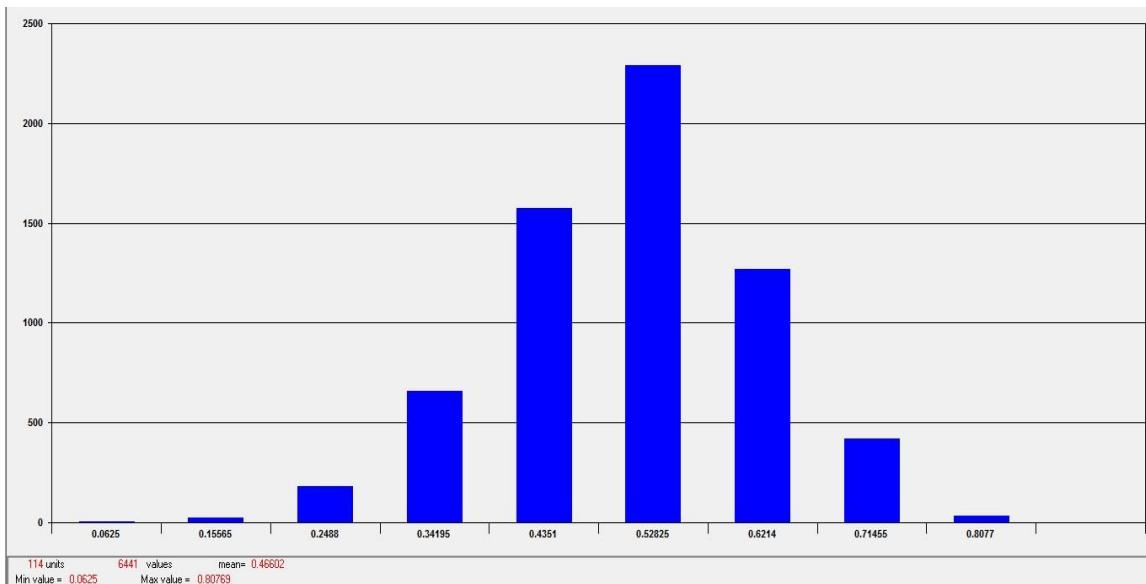
میانگین تنوع ژنتیکی درون (Hs)، بین (Dst) و کل (HT) به ترتیب ۰/۳۲۹، ۰/۰۸۵ و ۰/۳۴۸ بود (جدول ۵). نتایج نشان داد که مقدار Dst کمتر از Hs بود، این امر می‌تواند به دلیل تنوع زیاد در درون جمیعت‌های هر منطقه باشد. ضریب تمایز ژنی (Gst) معیاری آماری از تفرقه ژنی است و دامنه آن از صفر تا یک متغیر است (۲۴) که به منظور بررسی تمایز بین جمیعت‌ها استفاده شد. در مطالعه حاضر Gst ۰/۰۲۵۴ بود. در مطالعه جمیعت‌ها اگر مقدار این شاخص بالا باشد نشاندهنده این است که تمایز بین جمیعت‌ها پایین بوده است و بیشترین ت نوع مربوط به درون جمیعت‌ها است این در حالی است که در تحقیق حاضر تمایز ژنتیکی پایینی مشاهده گردید. جریان ژنی (Nm) به عنوان شاخص حرکت و انتقال ژن‌ها در داخل و بین

جدول ۵- تنوع ژنتیکی در جمیعت‌های مورد بررسی جو و حشی (*H. spontaneum*)Table 5. Genetic diversity in the studied populations of wild barley (*H. spontaneum*)

| Fst | Nm* | Gst | DST | Hs | Ht | تعداد نمونه Samples |
|-------|-------|-------|--------|-------|-------|---------------------|
| 0.025 | 9.604 | 0.025 | 0.0085 | 0.329 | 0.384 | 114 |

این ژنتیپ‌ها احتمالاً دارای اختلاف ژنومی بالایی هستند. کمترین فاصله را ژنتیپ لومار و شیروان از استان ایلام (۰/۰۶۲) داشتند. بالا بودن میزان شباهت این ژنتیپ‌ها نشاندهنده قرابت بالای آنها از لحاظ یکسانی اجداد و ژنوم‌ها از لحاظ نشانگرهای ریزماهواره مورد آزمایش می‌باشد. همچنین نمودار توزیع فراوانی نشان داد که بیشترین فاصله در بین ژنتیپ‌ها در محدوده ۰/۰۵۲۸ و کمترین فاصله در ۰/۰۶۲ می‌باشد (شکل ۲). زنگ و همکاران (۵۲) و شاختره و همکاران (۴۱) در بررسی تنوع ژنتیکی ژنتیپ‌های جو وحشی با استفاده از ماتریس تشابه فاصله ژنتیکی میان ژنتیپ‌ها را بررسی نمودند.

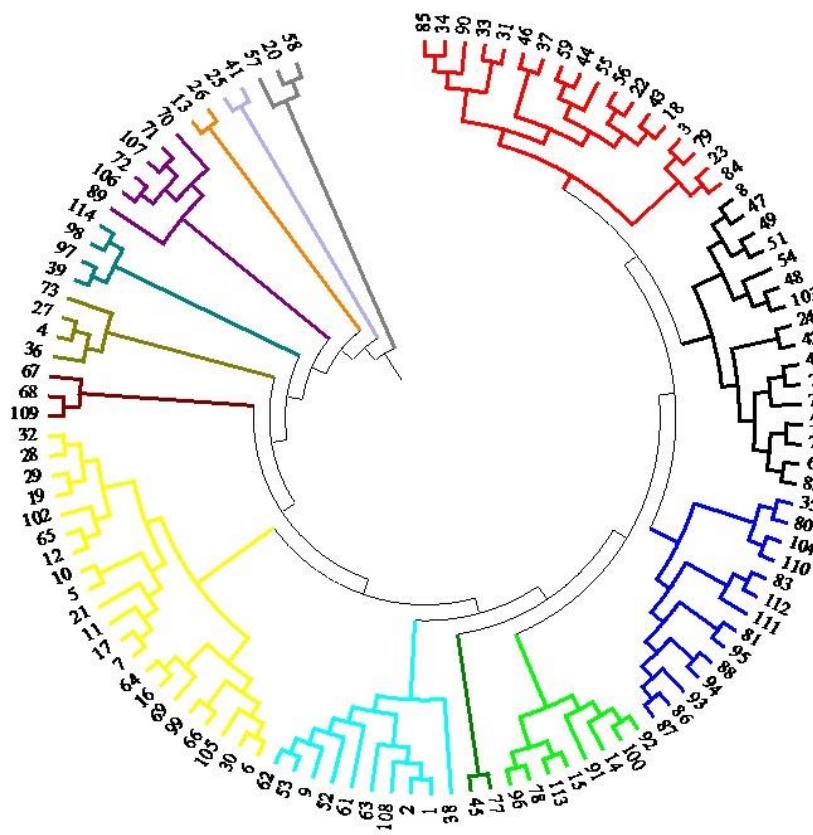
برای استفاده از ذخایر ژنتیکی، اطلاع از فاصله ژنتیکی جمیعت‌ها الزامی است، زیرا تلاقی بین جمیعت‌های با همولوژی بیشتر موفق‌تر می‌باشد. عبارت دیگر هرچه فاصله ژنتیکی جمیعت‌ها بیشتر باشد هتروزیس بیشتری میتوان مشاهده کرد (۱۵). تشابه ژنتیکی ژنتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب جاکارد محاسبه گردید و ماتریس عدم تشابه برای این ژنتیپ‌ها تشکیل گردید. نتایج نشان داد فاصله میان ژنتیپ‌ها از ۰/۰۶۲ تا ۰/۰۸۷ متفاوت بود (جدول اضافه نشده است). بیشترین فاصله را ژنتیپ‌های رومشکان-لرستان با بانه-کردستان (۰/۰۸۷) داشت. کم بودن شباهت بین دو ژنتیپ از لحاظ نشانگرهای مولکولی نشاندهنده این است که



شکل ۲- نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی بین ژنتوتیپ‌های مورد بررسی
Figure 2. Sample of the distribution of the frequency of genetic distances between the studied genotypes

همکاران (۵۲) تنوع ژنتیکی ژنتوتیپ‌های جو وحشی و زراعی را با استفاده از نشانگرهای SSR و EST-SSR ارزیابی قرارداد و در پایان ژنتوتیپ‌ها را به ۸ گروه تفکیک کردند همچنین بیان شد که ژنتوتیپ‌های جو وحشی دارای تنوع بسیار بالاتری از ژنتوتیپ‌های جو زراعی بودند. همانطور که در دندروگرام رسم شده مشخص است برخی از ژنتوتیپ‌های موجود در هر کلاستر از یک منطقه خاص جمجمه اوری شده‌اند. شاخاتر و همکاران (۴۱) در تحقیقات خود بر روی *H. spontaneum* بر اساس تجزیه خوشای گزارش کردند که ژنتوتیپ‌های موجود در هر گروه از یک منطقه بودند. در مواردی نیز عدم ارتباط بین پراکنش جغرافیایی و با گروه‌بندی ژنتوتیپ‌ها در تجزیه خوشای دیده شد که می‌تواند به دلیل ناکافی بودن تعداد مکان‌های تکثیر شده در این ژنتوتیپ‌ها باشد. در مطالعه ابراهیمی و همکاران (۸) عدم ارتباط میان گروه‌بندی ژنتوتیپ‌های *H. spontaneum* و پراکنش جغرافیایی ژنتوتیپ‌ها گزارش شد.

میزان انطباق دندروگرام‌های ترسیم شده با ماتریس ضرایب عدم تشابه از طریق همبستگی کوفنتیک اندازه‌گیری شد. ضرایب کوفنتیک بین ماتریس‌های عدم تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده با الگوریتم UPGMA محاسبه گردید. نتایج نشان داد بیشترین ضریب مربوط به ماتریس عدم تشابه جاکارد با میزان ۰/۸۱ بود که بر همین اساس تجزیه خوشای صورت گرفت. در مطالعه اری و همکاران (۳) نیز از ضریب تشابه جاکارد برای خوشی بندی ژنتوتیپ‌ها استفاده شد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشای در شکل ۴ ارائه شده است. همچنانکه ملاحظه می‌گردد ژنتوتیپ‌ها در ۱۴ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ۱۶ ژنتوتیپ، گروه دوم ۱۶ ژنتوتیپ، گروه سوم ۱۴ ژنتوتیپ، گروه چهارم ۸ ژنتوتیپ، گروه پنجم ۲ ژنتوتیپ، گروه ششم ۱۰ ژنتوتیپ، گروه هفتم ۲۱ ژنتوتیپ، گروه هشتم ۳ ژنتوتیپ، گروه نهم ۴ ژنتوتیپ، گروه دهم ۴ ژنتوتیپ، گروه یازدهم ۶ ژنتوتیپ، گروه دوازدهم ۲ ژنتوتیپ، گروه سیزدهم ۲ ژنتوتیپ و گروه چهارم ۳ ژنتوتیپ بود. زنگ و



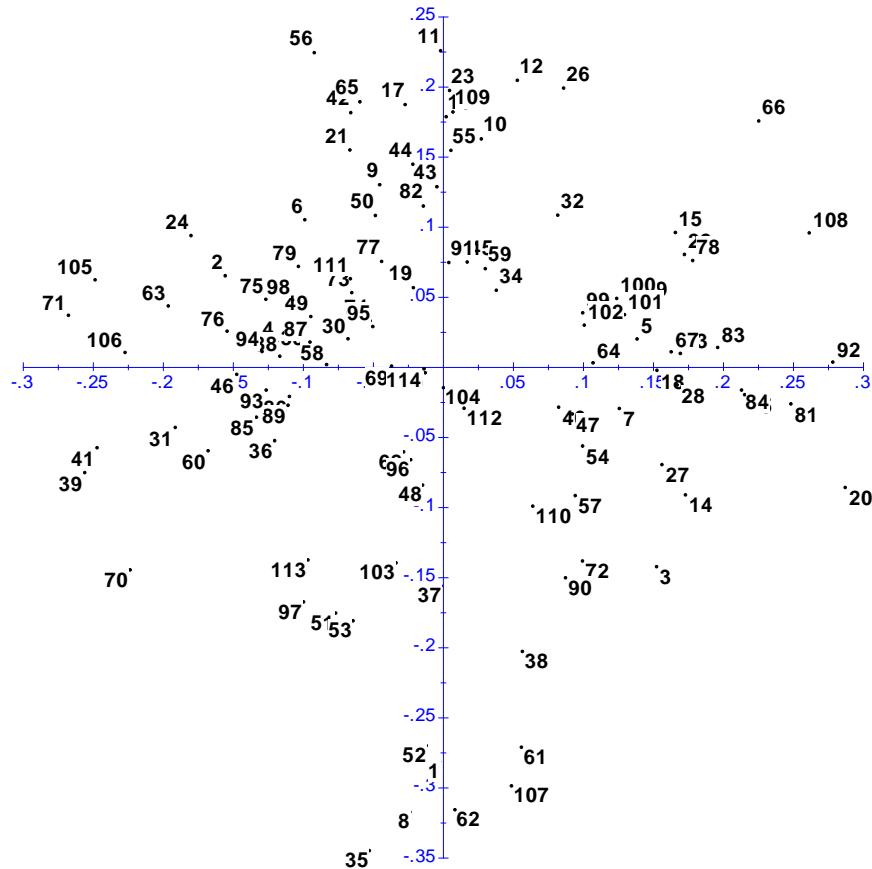
شکل ۳- دندروگرام حاصل از گروه‌بندی ژنتیپ‌های جو وحشی *H. Spontaneum* به روش UPGMA

Figure 3. Dendrogram from grouping of wild barley genotypes of *H. Spontaneum* by UPGMA method

نتایج تجزیه خوشای تا حدودی مطابقت داشت بنحوی که ژنتیپ‌هایی که دارای بیشترین تشابه در ماتریس تشابه بودند و در تجزیه خوشای نیز در کنار یکدیگر قرار گرفته بودند، در تجزیه به مختصات اصلی نیز تا حدی در کنار یکدیگر قرار گرفتند. دلیل این موضوع این است که تجزیه خوشای بر اساس ۱۰۰٪ اطلاعات حاصل از نشانگرها صورت گرفته در حالی که برای تجزیه به مختصات اصلی گروه‌بندی بر اساس ۳۶/۴۶ صورت گرفته است بنابراین انتظار نمی‌رود که با یکدیگر تطابق کامل داشته باشند.

بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای ژنتیپ‌ها انجام شد، که نتایج نشان داد محور مختصات‌های اول و دوم به ترتیب ۲۰/۱۵ و ۱۶/۳۱ درصد از واریانس موجود را توضیح دادند و در مجموع ۳۶/۴۶ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید که میتوان گفت آغازگرهای مورد بررسی در این تحقیق بطور نسبی در سطح ژنوم گیاه پراکنده هستند و در ناحیه یا نواحی از ژنوم متمرکز نشده‌اند (۲۶). بر اساس مختصات‌های اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنتیپ‌ها رسم گردید (شکل ۴)، که این دیاگرام با

Factorial analysis: Axes 1 / 2



شکل ۴- نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی ژنوتیپ‌های جو وحشی *H. Spontaneum*
Figure 4. Two-dimensional graph analysis of the main coordinates of wild barley genotypes of *H. Spontaneum*

براساس مناطق ژئو نشان می‌دهد، استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقي نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی در جهت هتروزیس بهمنظور پرورش‌های اصلاحی استفاده نمود. خویشاوندان وحشی، دامنه پراکنش وسیعی داشته و از صفات منحصر به فرد و مطلوبی برخوردار می‌باشد، از این رو شناسایی این تنوع، ارزیابی خصوصیات کمی و کیفی این ذخایر تواری و بررسی آنها از لحاظ مقاومت به تنش‌های زندگی و غیر زندگی در به کارگیری برنامه‌های اصلاحی نقش ارزشمندی دارد. با توجه به اینکه گونه وحشی (*H. spontaneum*) با گونه زراعی تلاقي پذیر بوده راه حلی مناسب برای انتقال ژن‌های مطلوب است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSAF) با شماره گزنت ۹۸۰۱۳۹۴۳ انجام شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی می‌تواند به وسیله مکانیسم‌های مختلف از قبیل جهش، نوترکیبی ژنتیکی، مهاجرت، جریان ژئی، رانده‌شدنگی ژنتیکی و گزینش به وجود آید. از آنجا که تنوع مبنای گزینش است، می‌توان این تنوع را در گیاهان وحشی جستجو کرد. با استفاده از نشانگر-EST SSR همانطور که مشاهده شد تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود داشت با توجه به اطلاعات بدست آمده از آغازگرهای GBM1221 در مجموع پیشنهاد می‌گردد با توجه به شاخص‌های محاسبه شده از آغازگرهای GBM1461 و SCSSR04163 که میزان بالایی از چند شکلی را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسم‌های جو در تحقیقات بعدی استفاده گردد. بیشترین فاصله را ژنوتیپ‌های رومشکان-لرستان با بانه-کردستان (۰/۸۰۷۸) داشتند که از نظر فاصله جغرافیایی نیز فاصله دوری با یکدیگر دارند. هیبریداسیون بین جمعیت‌ها با فاصله ژنتیکی زیاد می‌تواند یک روش مناسب برای برنامه‌های اصلاحی در این گیاه باشد. از آنجایی که نشانگر مولکولی EST-SSR تنوع را

منابع

- Altintas, S., F. Toklu, S. Kafkas, B. Kilian, A. Brandolini and H.O. Zkan. 2008. Estimating Genetic Diversity in Durum and Bread Wheat Cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL Markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- Anonymous. 2005. Barley Cultivation in Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture Publications. Tehran, Iran (In Persian).
- Arya, L., M. Verma, S.K. Singh and R.P.S. Verma. 2019. Spatio-temporal genetic diversity in Indian barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties based on SSR markers. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 57: 545-552.
- Babaian Jolodar, N.A., N. Mori and C. Nakamora. 2005. Transferability of hexaploid wheat (*Triticum Aestivum*) microsatellite markers to hexaploid and tetraploid wheat species Iranian. *Journal of Agriculture*, 3: 219-227.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, 32: 314-331.
- Boyle, T. 2000. Criteria and indicators for the conservation of genetic diversity. In: Young A, Boshier D, Boyle T (Eds.) *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Publishing, Victoria, Australia, 239-250.
- Chai, L., M. K. Biswas, H. Yi, W. Guo and X. Deng. 2013. Transferability, olymorphism and effectiveness for genetic mapping of the Pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) EST-SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 155: 85-91.
- Ebrahimi, A., M. Naqvi, M. Sabokdast and M. Mardi. 2010. Evaluation of genetic diversity in samples of two species of barley *H. vulgare* and *H. spontaneum* L. using microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 12(3): 333-48 (In Persian).
- Feizi, M., M. Solouki, B. Sadeghzadeh, B. Fakheri and SA. Mohammadi. 2019. QTL Mapping for Higher Seed Zn Concentration and Content in Baley using SSR Markers. *Journal of Crop Breeding*, 11(30): 67-58 (In Persian).
- Ganjkhanlu, A., M. Moghadam, S.A. Mohammadi, M. Shiba, K. Ghasemi Golazani and A. Yousefi. 2012. Study of atmospheric genetic diversity using microsatellite markers and correlation analysis for frost tolerance traits. *Journal of Seedlings and Seeds*, 28(1): 101-114 (In Persian).
- Gong, X., S. Westcott, C. Li, G. Yan, R. Lance and D. Sun. 2009. Comparative analysis of genetic diversity between Qinghai-Tibetan wild and Chinese landrace barley., *Genome* 52: 849-861
- Grant, V. 1991. *The Evolutionary Process: A critical Study of Evolutionary Theory*. Columbia University Press, NewYork.
- Grime, J. 2002. Benefits of plant diversity to ecosystems: immediate, filter and founder effects. *Journal of Ecology*, 86: 902-910.
- Haj Mansour, Sh., M. Bi Hemmat, A.S. Nabipour, M. Abdullah, S.M. Mohammadi and H. Nikkhah. 2010. Study of genetic diversity in barley genotypes : II. Microsatellite markers and morphological traits. *Journal of Seedlings and Seeds*, 26(2): 150-171 (In Persian).
- Hasan, M., N. Odat, I. Qrunfleh, Y. Shakhatreh and S. Saifan. 2018. Microsatellite analysis of genetic diversity and population structure of Jordanian barley (*Hordeum vulgare* L.) reveals genetic polymorphism and divergence associated with inflorescence type. *Research on Crops*. 19: 86-96.
- Hayes, P.M., A. Castro, L. Marquez-Cedillo, A. Corey, C. Henson, B.L. Jones, J. Kling, D. Mather, I. Matus, C. Rossi and K. Sato. 2003. Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In R. Von Bothmer et al. (Ed.) *Diversity in barley (*Hordeum vulgare*)*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 300 p.
- Hou, Y., Z. Yan and Y. Wei. 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. *Genetics Newsletter*, 35: 9-22.
- Ithadpour., M, M. Fattahi Moghaddam and Z. Zamani. 2012. Investigation of genetic diversity of wild and commercial plum specimens using SSR molecular marker. *Horticultural Sciences of Iran*, 43(2): 199-210 (In Persian).
- Jugran, A.K., I.D. Bhatt, R.S. Rawal, S.K. Nandia and V. Pande. 2013. Atterns of morphological and genetic diversity of Valeriana jatamansi Jones in different habitats and altitudinal range of West Himalaya, India. *Flora*, 208: 13-21.
- Karamzadeh, F. 2019. Genetic Diversity of Reversible Crossbreeding Families from Molecular and Wild Crossbreeding with Molecular Markers, M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 90 p (In Persian).
- Kumar, A., P. Mishra, S.C. Singh and V. Sundaresan. 2013. Efficiency of ISSR and RAPD markers in genetic divergence analysis and conservation management of *Justicia adhatoda* L., a medicinal plant. *Plant. System Evol*, 300: 1409-1420.
- Kumar, M., G.P. Mishra, R. Singh, J. Kumar, P.K. Naik and Sh.B. Singh. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD Markers for Comparative Analysis of Genetic Diversity among Different Apricot Genotypes from Cold Arid Deserts of Trans-Himalayas. *physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3): 225-236.
- Low, A., S. Harris and P. Ashton. 2004. *Ecological genetics: design, analysis and Application*. Black-Well Publishing. Oxford.
- Manifesto, M.M., A.S. Schlatter, H.E. Hopp, E.Y. Suarez and J. Dubcovky. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. *Crop Science*, 41: 682-690.
- Matus, I.A. and P.M. Hayes. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasms assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45: 1095-1106.
- Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
- Morrel, P.L. 2011. *Hordeum*. pp. 309-320, In: C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*,

28. Nam Avar, A., Z. Tahmasebi, A. Moghaddam, F. Fatehi, Z. Yousefi and B. Zaraei. 2016. Investigation of genetic diversity of a sample of wild barley germplasm (*Hordeum spontaneum*) using SSR molecular marker. Cereal Research, 6(2): 202-214 (In Persian).
29. Nandakumar, N., A.K. Singh, R.K. Sharma, T. Mohapatra, K.V. Prabhu and F.U. Zaman. 2004. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. Euphytica, 136: 257-264.
30. Nevo, E. and G. Chen. 2011. Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. Plant, Cell and Environment, 33: 670-685.
31. Ozkan, H., S. Kafkas, M.S. Ozer and A. Brandolini. 2005. Genetic relationships among South-East Turkey wild barley populations and sampling strategies of *Hordeum spontaneum*. Theoretical and Applied Genetics, 112: 12-20.
32. Pazouki, L., M. Mardi, P. Salehi Shanjani, M. Hagidimitriou, S.M. Pirseyedi, M.R. Naghavi, D. Avanzato, E. Vendramin, S. Kafkas, B. Ghareyazie, M.R. Ghaffari and S.M. Khayam Nekoui. 2010. Genetic diversity and relationships among Pistacia species and cultivars. Conservation Genetics, 11: 311-318.
33. Poczai, P., I. Varga, M. Laos, A. Cseh, N. Bell, J.P. Valkonen and J. Hyvonen. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. Plant Methods, 9(1): 6.
34. Powell, W., M. Morgante, C. Ander, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingy and A. Rafalaski. 1996. The comparision of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Molecular breeding, 2: 225-238.
35. Raggi, L., E. Bitocchi, L. Russi, G. Marconi, T.F. Sharbel, F. Veronesi and E. Albertini. 2015. Understanding genetic diversity and population structure of a Poa pratensis worldwide collection through morphological, Nuclear and Chloroplast Diversity Analysis. Public Library of Science (PLoS One), 10: e0124709
36. Ren, N. and M.P. Timko. 2001. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. Genome, 44(4): 559-571.
37. Roder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy, and M.W. Galan. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007-2023.
38. Salehi Shanjani, P., M. Mardi, L. Pazouki, M. Hagidimitriou, D. Avanzato, S. M. Pirseyedi, M. R. Ghaffari and S. M. Khayam Nekoui. 2009. Analysis of the molecular variation between and within cultivated and wild Pistacia species using AFLPs. Tree Genetics and Genomes, 5: 447-458.
39. Salem, K.F.M., R.K. Varshney, M.S. Roder and A. Borner. 2010. EST-SSR based estimates on functional genetic variation in barley (*Hordeum vulgare* L.) collection from Egypt. Genetic Resources and Crop Evolution, 57: 515-521.
40. Satya, P., M. Karan, S. Jana, S. Mitra, A. Sharma, P.G. Karmakar and D.P. Ray. 2015. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. *Gaudich.*), a premiumtextile fiber producing species. Meta gene, 3: 62- 70.
41. Shakhatreh, Y., N. Haddad, M. Alrababah, S. Grando and S. Ceccarelli. 2009. Phenotypic diversity in wild barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum* (C. Koch) Thell.) accessions collected in Jordan. Genetic Resources and Crop Evolution, 57:131-146.
42. Shamsifar, S., R. Mirfakhraie and K. Haghpanah. 2021. Study on Genetic Diversity of some Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars Using SSR Marker and Physiological Traits, Froctun and Ion Leakage under Late Spring Cold Stress. Journal of Crop Breeding, 12(34): 199-209 (In Persian).
43. Torres, AM., N.F. Weeden and A. Martin. 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. Theoretical and Applied Genetics, 85: 935-945.
44. Trindade, H., I. Sena, S. Goncalves and A. Romano. 2012. Genetic diversity of wild populations of *Tuberaria major* (Cistaceae), an endangered species endemic to the Algarve region (Portugal), using ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology, 45: 49-56.
45. Varshney, R.K., P. Langridge and A. Graner. 2007. Application of genomics for molecular breeding of wheat and barley. Advances in Genetics, 58: 122-155.
46. Wang, H.Y., Y.M. Wei, Z.H. Yan and Y.L. Zheng. 2007. EST-SSR DNA polymorphism in durum wheat (*Triticum durum* L.) collections. Journal of Applied Genetics, 48: 35-42.
47. Wang, P., L. Yang, E. Zhang, Z. Qin, H. Wang, Y. Liao, X. Wang and L. Gao. 2017. Characterization and development of EST-SSR markers from a cold-stressed transcriptome of centipede grass by Illumina paired-end sequencing. Plant Mol. Biol. Rep. 35: 215-223.
48. Weir, S. 1990. Genetic data analysis: Methods for Discrete Population Genetic data. Sunderland, Sinauer Associates. Inc. Publishers, Massachusetts.
49. White, T.L., W.T. Adams and D.B. Neale, Forest Genetics, CABI Publishing, Cambridge, Massachusetts, USA 702 p, 2007.
50. Xu, Y., 2010. Molecular Plant Breeding. Cabi Publishing. Wallingford, Oxfordshire, Cambridge, UK
51. Ya-ming, G., X.U. Sheng-chun, M. Wei-hua, L. Ze-yun, H. Qizan, Z. Gu-wen and D. Ju. 2011. Genetic Diversity Analysis of Faba Bean (*Vicia faba*L.) Based on EST-SSR Markers. Agricultural Sciences in China, 10: 838-844.
52. Zhang, M., W. Mao, G. Zhang and F. Wu. 2014. Development and characterization of polymorphic EST-SSR and genomic SSR markers for Tibetan annual wild barley. PLoS One, 9: 1-10.

Evaluation of Genetic Diversity of *H. Spontaneum* wild Barley Populations using EST-SSR Molecular Marker

Hooman Shirvani¹, Ali Ashraf Mehrabi², Mohsen Farshadfar³, Hooshmand Safari⁴, Ali Arminian⁵ and Foad Fatehi²

1- PhD Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran

2- Associate Professor of Biotechnology, Forests and Rangelands Research Organization, Tehran Agricultural and Natural Resources Research and Training Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran, (corresponding author: a.mehrabi@rifr.ac.ir)

3- Associate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor of Forests and Rangelands Research Department, Agricultural Research and Training Center and Kermanshah Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Kermanshah, Iran

5- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran

Received: 18 May, 2022 Accepted: 3July, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: The genetic diversity of wild species associated with the early barley gene pool is crucial for exploitation in breeding programs. Barley (*H. vulgaris*) and its ancestor (*H. spontaneum*) are excellent and economical model systems for genetic research, exploration and exploitation. In the study of the genetic diversity of 114 native barley populations collected from the west of the country, the EST-SSR molecular marker has been used to aim at the degree of genetic diversity of these native genotypes and evaluate the efficiency of these native genotypes and evaluate Is. There is genetic diversity in genotypes.

Material and Methods: First, seeds were cultured in pots for DNA extraction. DNA extraction was performed by modified CTAB method for each genotype. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a volume of 20 µl. The PCR product was injected in 4% agarose gel with 1% TBE reaction buffer and Safe View dye to show the strips. In order to perform statistical analysis, the data were prepared in the form of a matrix and the parameters related to primers and populations were evaluated.

Results: The number of amplified alleles varied from 2 to 4 alleles for markers and the studied primers reproduced a total of 40 alleles in the studied genotypes with an average of 2.85 per marker. The average percentage of polymorphisms for the studied primers was 96.42%. The content of polymorphic information (PIC) ranged from 0.397 to 0.189. The results showed that there is the highest level of diversity in the populations of Lorestan province and the lowest level of diversity in the populations of Kurdistan province. The dendrogram obtained from the cluster analysis of genotypes was divided into 14 groups, which according to the grouping of genetic diversity were partially adapted to the geographical distribution. Also, the results of the analysis to the original coordinates were somewhat consistent with the cluster analysis.

Conclusion: The results showed that there was good diversity among the studied populations. Also, suitable polymorphisms were observed among the primers. The primers GBM1221 with 3 alleles, GBM1461 with 3 alleles and SCSSR04163 with 4 alleles, which had the best polymorphism, are introduced as superior primers for use in future atmospheric research. The presence of high genetic diversity in natural populations of *H. spontaneum* wild barley indicates that the germplasm of this plant can be preserved in natural habitats. This diversity is also a valuable resource for identifying molecular markers informative for different phenotypic traits.

Keywords: Diversity, Genetic structure, Molecular markers, Wild Barley