

مارکرهای آگاهی بخش، ISSR مرتبط با مقاومت به بیماری سفیدک پودری در نمونه‌های مختلف جو است به این امید که از نتایج حاصله بتوان در برنامه‌های اصلاح برای این بیماری استفاده نمود.

مواد و روش‌ها مواد گیاهی

جهت بررسی مقاومت جو نسبت به بیماری سفیدک پودری، ۳۴ ژنوتیپ (۲۱ ژنوتیپ زراعی از ارقام مرکز تحقیقات نهال و بذر کرج و ۱۳ ژنوتیپ از ارقام وحشی استان ایلام همراه با رقم حساس افضل)، در مقابل بیماری سفیدک پودری ارزیابی شدند تمامی ژنوتیپ‌ها (جدول ۱) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه ایلام در گلدان‌هایی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر کشت گردیدند.

تهیه مایع تلقیح، آلودگی مصنوعی و ارزیابی بیماری: اسپور قارچ با کاردک از روی برگ‌های رقم افضل جدا و در یک ارلن حاوی ۲۵۰ سی‌سی آب مقطر ریخته شد و با استفاده از همزن خوب مخلوط شدند. محلول از صافی عبور داده شد تا پوشش میسلومی قارچ و دیگر مواد مانند پوسته برگ جو، از آن جدا شود. اسپورهای قارچ با استفاده از لام هموسایتومتر به تعداد 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر شمارش گردید و سپس به حجم ۱ لیتر رسانیده شد. مایه‌کوبی در مرحله تورم سنبله، انجام گردید و سپس شرایط بهینه جهت رشد قارچ از نظر رطوبت و دما (رطوبت ۷۵ درصد و دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد) فراهم گردید. میزان آلودگی و سطح پیشرفت بیماری گیاهان در ۵ نوبت به فواصل ۲ روز با روش ساری و پرسکات (۲۱) در مقیاس ۰-۹ که بیان‌کننده ارتفاع نسبی بیماری یا پیشرفت آن از برگ‌های پایین به طرف سنبله است انجام گردید، با این روش مقیاس ۰-۳ مقاوم، ۴ نیمه مقاوم، ۵-۶ نیمه حساس و ۷ به بالا حساس در نظر گرفته شد. سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری AUDPC^۱ بر اساس فرمول (۱) مولد وان و همکاران (۱۸) محاسبه گردید.

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} (y_i + y_{i+1}) / 2 (t_i + t_{i+1})$$

در فرمول فوق n دفعات ارزیابی، y مقدار بیماری و t زمان (روز) است.

استخراج DNA ژنومی و تجزیه داده‌ها: از ژنو تیپ‌های کشت‌شده در گلخانه در مرحله دو تا سه برگگی نمونه‌های برگگی تازه جمع‌آوری و DNA ژنومی به روش CTAB بر اساس روش دوپل و همکاران (۵) استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با روش اسپکتروفوتومتری و ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین و به میزان ۱۰ نانوگرم در میکرو لیتر برای انجام واکنش PCR رقیق‌سازی شد. ۱۶ آغازگر ISSR انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

وسطح زیر منحنی بیماری (AUDPC) توسط مدل افزایش- غالبیت کنترل می‌شد که سهم اثرات غالبیت بیشتر بود همچنین نتایج آنها نشان داد که هر دو صفت توسط بیش از یک ژن کنترل می‌شوند.

فاضلی و همکاران (۱۱) گزارش نمودند که وراثت‌پذیری عمومی برای صفت تیپ آلودگی برگ پرچم در دو تلاقی جو به ترتیب ۶۸ و ۸۸٪ می‌باشد. ژوین گیلا و همکاران (۲۶) در تحقیقی که بر روی ارقام موتانت جو با مارکر ISSR و RAPD انجام دادند بیان داشتند که تمامی کلنی‌های مورد مطالعه به بیماری زنگ مقاوم و در برابر سفیدک پودری دارای مقادیر متفاوت حساسیت تا مقاومت بودند.

خدارحمی و همکاران (۱۶) با استفاده از روش تجزیه ارتباطی، ۵ نشانگر SSR مرتبط با سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و ۴ نشانگر مرتبط با ضریب آلودگی نهایی را در گندم برای مقاومت به زنگ زرد معرفی کردند. ایواندیک و همکاران (۱۴)، با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباطی، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیم‌های مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند. اوواسینا و همکاران (۲۰) با استفاده از ۴۰ آغازگر ریپید، ۷۰-۶۰ درصد آغازگرها چند شکل بودند که تنها ۷ آغازگر مرتبط با بیماری بودند.

با توجه به اهمیت بیماری، پاسخ ژنتیکی سایر غلات درمقابل بیماری سفیدک پودری مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۰). در این رابطه، آهنگر و همکاران (۱) در تحقیقی، بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و همچنین آنزیم فنیل آلانین آمونیا لاز را در گندم‌های حساس و مقاوم آلوده شده با سفیدک پودری بررسی نموده و نشان دادند که قارچ میکوریزا با القای مقاومت سیستمیک منجر به بیان زود هنگام و سریع گیاه گندم شده و با افزایش بیان ژن‌های دفاعی سبب القای مقاومت در آن می‌گردد. علاوه بر کاربرد مارکرهای آگاهی بخش ISSR در مطالعات، بررسی تنوع ژنتیکی جهت تخمین فاصله ژنتیکی و انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی یکی دیگر از مهمترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی است. ملک محمدی و همکاران (۲۸) با استفاده از مارکر ISSR تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ سویا را بررسی نمودند نتایج نشان داد که این نشانگر قابلیت تولید چند شکلی در بین ژنوتیپ‌های سویا را دارد. پهلوانی و همکاران (۲۹) ارتباط بین نشانگرهای مولکولی SSR و کیفیت دانه گندم را بررسی نمودند که نتایج نشان داد نشانگرهایی با محتوی چند شکلی و تنوع ژنتیکی بالاتر تفکیک و تمایز افراد نقش مهمی دارند.

ارزیابی تنوع ژنتیکی و فنوتیپی جو در مقابل پاتوتیپ عامل بیماری سفیدک پودری در طراحی برنامه‌های اصلاحی بسیار ضروری هست، لذا شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با بیماری سفیدک پودری انتخاب گیاهانی که توانایی ژنتیکی مقاومت به بیماری را در مراحل مختلف رشد گیاه دارند امکان‌پذیر می‌سازد. هدف اصلی این تحقیق شناسایی

1- Area under Disease Progress Curve (AUDPC)

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های زراعی و وحشی جو و عکس‌العمل فنوتیپی آنها در مقابل بیماری سفیدک پودری
Table 1. Characteristic of wild and cop genotypes of Barley and there phenotypic responses to powdery mildew disease

ردیف	نام علمی گیاه	نام رقم	فنوتیپ	ردیف	نام علمی گیاه	نام رقم	فنوتیپ
۱	<i>H. vulgare</i>	کویر ۵۷	S	۲۰	<i>H. bulbosum</i>	4	S
۲	<i>H. vulgare</i>	ترکمن ۵۹	MR	۲۱	<i>H. bulbosum</i>	7	S
۳	<i>H. vulgare</i>	فجر ۳۰	MR	۲۲	<i>H. spanteneum</i>	850	SS
۴	<i>H. vulgare</i>	جنوب ۵۱	SS	۲۳	<i>H. spanteneum</i>	1260	S
۵	<i>H. vulgare</i>	ارس ۵۵	R	۲۴	<i>H. spanteneum</i>	978	S
۶	<i>H. vulgare</i>	صحرا ۵۰	R	۲۵	<i>H. vulgare</i>	836	S
۷	<i>H. vulgare</i>	یوسف	MR	۲۶	<i>H. vulgare</i>	1275	SS
۸	<i>H. vulgare</i>	بهمن ۴۳	R	۲۷	<i>H. spanteneum</i>	837	S
۹	<i>H. vulgare</i>	نیمروز	R	۲۸	<i>H. spanteneum</i>	2	S
۱۰	<i>H. vulgare</i>	دشت ۵۸	R	۲۹	<i>H. bulbosum</i>	8	S
۱۱	<i>H. vulgare</i>	بهرخ	SS	۳۰	<i>H. spanteneum</i>	1226	S
۱۲	<i>H. vulgare</i>	ریحان ۰۳	MR	۳۱	<i>H. spanteneum</i>	1667	S
۱۳	<i>H. vulgare</i>	ریحان	S	۳۲	<i>H. spanteneum</i>	5	S
۱۴	<i>H. vulgare</i>	زهک	MR	۳۳	<i>H. spanteneum</i>	813	S
۱۵	<i>H. vulgare</i>	نیک ۴۶	R	۳۴	<i>H. vulgare</i>	806	S
۱۷	<i>H. vulgare</i>	ریحان ۴۸	S				
۱۸	<i>H. vulgare</i>	ماکویی ۴۲	S				
۱۹	<i>H. vulgare</i>	کارون ۵۷	S				

(S) حساس، (Ss) نیمه حساس، (MR) نیمه مقاوم، (R) مقاوم

داده‌های حاصل برای صفت AUDPC نرمال بوده ولی داده‌های صفت شدت بیماری نرمال نبودند که برای نرمال کردن داده‌ها تبدیل جذری به کار برده شد. با انجام اسپورپاشی، ارقام مقاوم کمترین واکنش را در فواصل دوره‌های اندازه‌گیری، نسبت به بیماری نشان دادند و ارقام نیمه مقاوم در روزهای اول مقداری حساسیت نشان دادند و به تدریج کاهش یافت. بیشترین میزان AUDPC پس از طی دوره‌های اندازه‌گیری، مربوط به رقم حساس افضل به میزان ۹/۸۶ بود و ژنوتیپ‌های ۲۳، ۲۲، ۲۰، ۲۹، ۲۸ و ۲۷ علاوه بر رقم حساس افضل، به ترتیب بیشترین مقدار AUDPC را به میزان ۹/۸، ۹/۷، ۹/۵، ۹/۴، ۹/۲۲ و ۹/۲ را داشتند که از ژنوتیپ‌های حساس بودند و ضرورت بررسی‌های بیشتر را پس از ارزیابی مشاهده‌ای نشان می‌داد. کمترین میزان AUDPC مربوط به ژنوتیپ‌های ۵ و ۶ به میزان ۱/۱۳ بود که از ارقام مقاوم بودند.

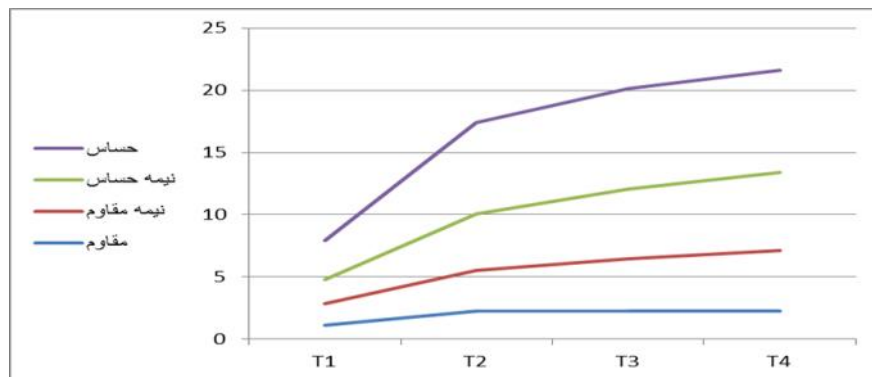
نمودار حاصل برای AUDPC نشان داد که ارقام مقاوم کمترین مقدار پیشرفت بیماری را در فواصل پنج دوره اندازه‌گیری برای پیشرفت بیماری نشان می‌دهند و ارقام حساس بیشترین پیشرفت آلودگی را نسبت به سایر ارقام نشان دادند (شکل ۱). داده‌های AUDPC حاصل برای ژنوتیپ‌ها بر اساس روش وارد با نرم‌افزار MINITAB خوشه‌بندی شدند. دندروگرام حاصل (شکل ۲) ژنوتیپ‌ها را در سطح آماری ۰/۰۵ در فاصله ۲۹/۱۴ به چهار خوشه تقسیم‌بندی نمود، که خوشه یک شامل ژنوتیپ‌های حساس بودند و خوشه ۲ شامل ژنوتیپ‌های ۱۲، ۹، ۱۱، ۸، ۲۶، ۳، ۴، ۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۳ و ۳۱ که نیمه‌مقاوم تا حساس بودند. خوشه ۳ شامل ژنوتیپ‌های ۷، ۲۰، ۳۳، ۲۲ و ۳۵ بودند که همگی در برابر قارچ عامل بیماری سفیدک پودری حساسیت نشان داده و درصد بالایی از آلودگی را نشان دادند. خوشه ۴ شامل ژنوتیپ‌های ۵، ۶، ۱۰، ۱۴، ۱۵ بود که همگی در برابر عامل بیماری از خود مقاومت نشان دادند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (Baiorad) در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR10X به میزان ۲ μL، 2 Mgcl2 mM20 به میزان ۱/۸ میکرولیتر، dNTP 1mM به میزان ۰/۴ میکرولیتر، آنزیم Taq پلیمرز 5U به میزان ۰/۳ میکرولیتر و ۱۲ نانوگرم از هر آغازگر انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه زمانی ۴ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ چرخه اولیه به صورت تاچ داون (به طوری که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای واقعی در نظر گرفته شد و به ازای هر چرخه، ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاهش یافته تا به دمای اتصال واقعی برسد) و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای توصیه شده برای هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه (جهت اتصال آغازگرها) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد.

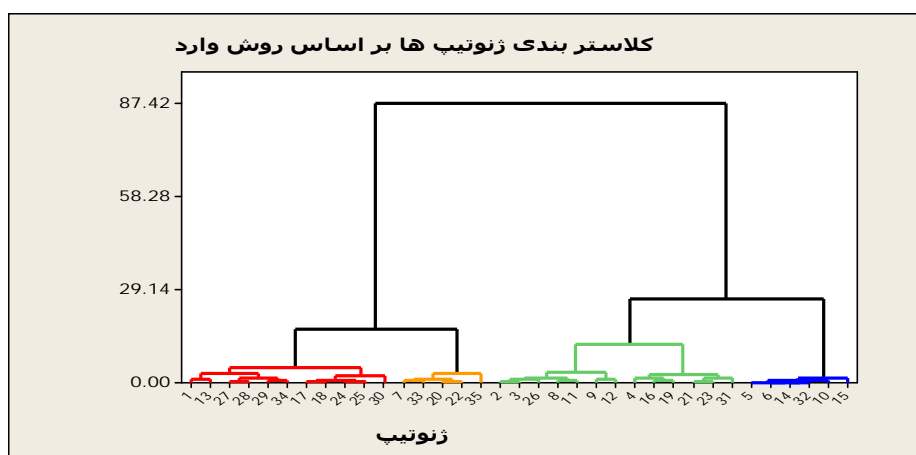
پس از امتیازدهی الگوهای باندهای به صورت صفر (عدم حضور) و یک (حضور) و ارزیابی فنوتیپی ژنوتیپ‌ها از نظر واکنش به پیشرفت بیماری در گلخانه، برای شناسایی نشانگرهای مرتبط و پیوسته با صفت تحمل به بیماری سفیدک پودری جو، تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام با در نظر گرفتن مکان‌های نشانگری به عنوان متغیر مستقل و داده‌های فنوتیپی به عنوان متغیر وابسته انجام گرفت. جهت بررسی صحت ال‌های آگاهی‌بخش، تجزیه تابع تشخیص انجام شد. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای MINITAB 17 و GenALEX 6.41 انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی‌های فنوتیپی: میزان سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در مرحله بلوغ (AUPDC) محاسبه گردید.



شکل ۱- نمودار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) برای ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه در چهار زمان پس از اسپور پاشی
Figure 1. Area Under Disease Progress Curve (AUDPC) for studies genotypes at Four times after sporulation



شکل ۲- دندوگرام سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی ژنوتیپ‌ها بر اساس روش وارد
Figure 2. Dendrogram of area under disease progress curve of genotypes based on Ward method

که در روش ISSR، آغازگرها مکمل نواحی ریزماهورهای می‌باشند که در یوکاریوت‌ها در سراسر ژنوم پراکنده‌اند بنابراین استفاده از این روش می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را فراهم کند (۱۰). ژوین گیلا و همکاران (۲۶) از بین ۱۱۳ جایگاه رپید و ۱۵۳ جایگاه ISSR تولیدشده، تنها ۵۳/۸-۸۵/۷ درصد قطعات چندشکلی نشان دادند. دامنه الی برای کل آغازگرهای مورد استفاده از ۱۰۰ الی ۱۵۰۰ جفت باز (bp) متغیر بود. در این سیستم نشانگری بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به آغازگر LBMB-B با میزان ۰/۴۴ و کمترین محتوای چندشکلی متعلق به آغازگر ۱۵ با مقدار ۰/۱۷ بود. متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی در این آغازگرها به میزان ۰/۳۲ مشاهده شد (جدول ۲). تعداد زیاد مکان‌های تکثیرشده در این آزمایش نشان می‌دهد که تعداد کمی از نشانگرهای ISSR با میزان اطلاعات چندشکل بالا، می‌تواند تعداد زیادی نمونه و جمعیت‌های مختلف جو را تفکیک کند. قبلاً نیز تحقیقات مختلفی کارایی بالای نشانگرهای ISSR را در مطالعات مرتبط با تنوع ژنتیکی و روابط تکاملی را در گونه‌های گیاهی مختلف نشان داده است (۱۷، ۱۵، ۳).

ژنوتیپ‌های ۵، ۶، ۱۰، ۱۴، ۱۵ در برابر قارچ عامل بیماری سفیدک پودری از خود مقاومت نشان دادند که همگی آنها از ارقام زراعی بودند. میزان AUDPC در ارقام وحشی در مقایسه با ارقام زراعی بیشتر بود که نشان‌دهنده حساسیت ارقام وحشی است و نمونه‌های گونه *H. bulbosum* نسبت به *H. spanteneum* در برابر عامل بیماری حساس‌تر بودند. از جمله ارقامی که در مطالعه حاضر در مرحله گیاه بالغ از خود مقاومت نشان داد رقم زراعی ارس بود که از آن می‌توان در برنامه‌های اصلاحی به‌عنوان والد دهنده جهت تولید ارقام مقاوم استفاده نمود. مشیری در بررسی‌هایی که بین سال‌های ۱۳۷۳-۱۳۶۶ روی ۱۷ رقم جو انجام داد مشاهده کرد که تنها دو رقم ارس و استار به سفیدک پودری مقاومت نشان دادند (۱۹).

نتایج ارزیابی‌های مولکولی: ارزیابی مولکولی با استفاده از ۱۶ آغازگر ISSR روی DNA ژنومی ۳۴ ژنوتیپ جو انجام شد. در مجموع ۱۲۵ آلل تکثیر شد که از این تعداد ۱۲۴ آلل (۹۹/۲ درصد آلل‌ها) به‌عنوان چند شکل تشخیص داده شدند. متوسط تعداد آلل‌های تولیدشده برای هر آغازگر، ۷/۹۳ بود. چندشکلی بالای حاصل در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای نشانگر ISSR نسبت داد. از آنجایی

جدول ۲- وضعیت تکثیر آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژنوم ۳۴ ژنوتیپ جو مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. The amplification status of the primers used in genome amplification of 34 barley genotypes used in this research

اندازه قطعات	PIC	درصد پلی مورفیسم	تعداد الل های پلی مورفیسم	تعداد الل	دمای اتصال	توالی پرایمر	نام پرایمر
۱۰۰-۱۰۰۰	۰/۳۸۵	۱۰۰	۱۰	۱۰	۵۳	(AG)7ACYA	UBC836
۲۰۰-۱۰۰۰	۰/۳۲	۱۰۰	۹	۹	۵۵	(GA)8YC	UBC841
۲۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۰۱	۱۰۰	۱۰	۱۰	۵۲	(AC)8G	ISSR10
۲۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۱	۱۰۰	۹	۹	۵۲	(AC)8AT	12
۳۰۰-۱۰۰۰	۰/۲۸	۱۰۰	۸	۸	۴۵/۷	(AC)8C	826
۲۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۱	۱۰۰	۱۰	۱۰	۵۳	(TC)8RT	UBC853
۴۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۹	۱۰۰	۸	۸	۵۳	(GA)8YT	UBC840
۵۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۳	۱۰۰	۹	۹	۵۰	(GA)8A	UBC812
۵۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۱۷	۱۰۰	۶	۶	۳۵/۷	(GA)8C	811
۴۰۰-۱۵۰۰	۰/۳۴	۱۰۰	۸	۸	۴۱/۸	GACAGACAGAGACATT	LBMB-B
۳۰۰-۱۰۰۰	۰/۲۹	۱۰۰	۷	۷	۵۲	(AC)8C	ISSR04
۴۰۰-۱۰۰۰	۰/۴۴	۱۰۰	۶	۶	۴۱/۷	GACAAAGACAGACAGTC	LBMB-C
۳۰۰-۱۵۰۰	۰/۲۱	۸۰	۴	۵	۳۹	(AG)8G	809
۳۰۰-۱۰۰۰	۰/۱۷	۱۰۰	۷	۷	۵۴	(AC)8TG	15
۱۰۰-۱۰۰۰	۰/۳۸	۱۰۰	۷	۷	۵۰	(AG)8AA	134
۳۰۰-۸۰۰	۰/۴	۱۰۰	۶	۶	۵۴	(GA)9C	144

R=(A و G) ، Y=(C و T)

به بیماری سوختگی برگ گندم نمود و از بین نشانگرها تنها نشانگر OPH20 توانست یک باند پلی مورفیک در ناحیه ۱۲۰۰bp در ارقام مقاوم ایجاد کند که این باند در ارقام حساس مشاهده نشد. خدارحمی و همکاران (۱۶) با استفاده از روش تجزیه ارتباط، ۵ نشانگر SSR مرتبط با سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و ۴ نشانگر مرتبط با ضریب آلودگی نهایی را در گندم برای مقاومت به زنگ زرد معرفی کردند.

آهنگر و همکاران در مطالعاتی (۲،۱) به بررسی ژنتیکی پاسخ گیاه گندم به بیماری سفیدک پودری نمودند. در مطالعه اول، بیان ژن‌های مرتبط با بیماری زایی و همچنین آنزیم فنیل آلانین آمونیا لاز را در مقابل سفیدک پودری بررسی نموده و نشان دادند که قارچ میکوریزا با القای مقاومت، با افزایش بیان ژن‌های دفاعی سبب القای مقاومت در آن می‌گردد.

در مطالعه دوم (۲) با در معرض قرار دادن دو رقم حساس و مقاوم گندم بنام‌های فلات و تجن در مقابل سفیدک سطحی، و بررسی بیان ژن‌های مورد نظر نشان دادند که میزان بیان ژن‌های مورد نظر در ارقام، پس از آلودگی روند افزایشی داشت. بطوری که در هر دو رقم حساس و مقاوم، بیشترین میزان بیان ژن‌ها ۲۴ ساعت پس از آلودگی بوده تا از نفوذ و استقرار هاستوریوم قارچ در میزبان ممانعت نماید. لذا چنین ژن‌هایی در کنار ژن‌های اصلی، باعث تشدید و حفظ مقاومت می‌شوند. بیان چنین ژن‌هایی با افزایش زمان بعد از آلودگی کاهش یافته و در برهمکنش عامل بیماری و گیاه نقش اساسی دارند.

در بین این ۱۶ آغازگر، آغازگرهای UBC836 و UBC853 بیشترین تعداد آلل در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر را داشتند. آغازگر 809 نیز با ۵ آلل کمترین تعداد آلل را برخوردار اختصاص دادند. به منظور تعیین ارتباط بین صفت تحمل به بیماری (فنونتیپ) با داده‌های مولکولی و شناسایی نشانگرهایی که بالقوه قابلیت پیوستگی با این صفت را دارند از روش رگرسیون گام به گام استفاده شد.

از بین ۱۲۴ آلل آغازگر بین‌ریزماهورهای استفاده شده در این تحقیق، ۶ آلل همبستگی معنی‌داری با این چهار گروه فنوتیپی از نظر میزان تحمل به بیماری نشان دادند. اولین آلل (دارای بالاترین همبستگی) که وارد مدل رگرسیون شده، آلل مربوط به آغازگر 12 با اندازه ۱۰۰۰bp بوده و به ترتیب آلل‌های بعدی مربوط به آغازگرهای UBC840 با اندازه ۱۰۰۰bp و 826 با اندازه ۳۰۰bp و LBMB با اندازه ۷۰۰bp و 826 با اندازه ۱۰۰۰bp می‌باشند. نشانگرهای مذکور را می‌توان به عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با تحمل به بیماری سفیدک پودری جو جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود. آلل‌های شماره ۲۰، ۳۰، ۸۹ فقط در ارقام مقاوم و نیمه مقاوم مشاهده شدند و آلل‌های ۳۹، ۵۹، ۸۹ در ارقام نیمه حساس و حساس دیده شدند (جدول ۳). نتایج این تحقیق در تأمین اطلاعات اولیه برای انتخاب گیاهان دارای سطوح مناسب مقاومت و انتخاب در مراحل اولیه (گیاهچه) از طریق نشانگرهای مرتبط مفید می‌باشد.

اصلاحی (۸) در مطالعه‌ای با استفاده از ۷ نشانگر RAPD اقدام به تفکیک ارقام مقاوم و حساس در ۳ رقم گندم نسبت

جدول ۳- گزینش ال‌های آگاهی‌بخش آغازگرهای ISSR با استفاده از رویه آماری رگرسیون

Table 3. Selection of informative ISSR markers using regression statistical procedure

نام آغازگر	شماره آلل	اندازه آلل	ضریب رگرسیون	آماره T	سطح معنی‌داری (P-Value)
12	۳۰	۱۰۰۰bp	۰/۵۲	۳/۸۸	.
UBC840	۵۹	۱۰۰۰bp	۰/۴۸	۵/۵۸	.
826	۴۶	۳۰۰bp	۰/۴	۳/۴۴	۰/۰۰۲
ISSR10	۲۰	۱۵۰۰bp	۰/۹۴	۳/۶۱	۰/۰۰۱
LBMB-B	۸۹	۷۰۰bp	۰/۳۶	۳/۰۴	۰/۰۰۵
826	۳۹	۱۰۰۰bp	۰/۲۲	۲/۳۷	۰/۰۲

$$y = -7.249 + 2.891M_1 + 1.038M_2 + 0.629M_3 + 0.886M_4 + 9.524M_5 + 4.531M_6$$

در این معادله y متغیر وابسته (ژنوتیپ‌ها)، 0 عرض از مبدأ، $1, 2, 3, 4, 5, 6$ به ترتیب ضرایب تابع برای ال‌های آگاهی‌بخش مربوط به نشانگرهای M_1 (۱۴)، M_2 (UBC840) و M_3 (826) و M_4 (ISSR10) و M_5 (LBMB-B) و M_6 (826) می‌باشد. مقدار تابع بدست آمده برای میانگین هر یک از گروه‌ها به ترتیب ۲/۶۹، ۲/۷۴ و ۱/۶۹- و ۱/۱۹- بوده که تفاوت معنی‌داری با هم داشته و صحت ال‌های آگاهی‌بخش مرتبط با تحمل به بیماری را با احتمال بسیار بالایی تأیید می‌نماید (جدول ۵).

در این مطالعه صفت تحمل به بیماری سفیدک پودری در ۳۴ ژنوتیپ زراعی و وحشی جو مورد بررسی قرار گرفته و با استفاده از ۶ آلل مرتبط با تحمل به بیماری سفیدک پودری در ۵ آغازگر ISSR طبقه‌بندی شدند. حال، با استفاده از آنالیز تشخیص می‌توانیم تابعی را ترسیم نماییم که به وسیله آن بتوان گروه‌ها را از نظر تحمل به بیماری از یکدیگر تفکیک نموده و همچنین صحت این آلل‌های آگاهی‌بخش را نیز مشخص نماید. ماتریس ساختاری (جدول ۴)، همبستگی‌های درون گروهی ترکیبی بین متغیرهای جدا شده (گروه‌ها از نظر میزان تحمل) و توابع را نشان می‌دهد. با توجه به این ساختار، می‌توان معادله تابع تشخیص را به صورت زیر نوشت:

$$y = 0 + 1M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4 + 5M_5 + 6M_6$$

جدول ۴- ماتریس ساختاری ضرایب تابع تشخیص کانونیک

Table 4. Structural matrix of canonical detection function coefficient

نام آغازگر	شماره آلل	اندازه آلل	ضرایب تابع
12	۳۰	۱۰۰۰bp	۲/۸۹۱
UBC840	۵۹	۱۰۰۰bp	۱/۰۳۸
826	۴۶	۳۰۰bp	۰/۶۲۹
ISSR10	۲۰	۱۵۰۰bp	۰/۸۸۶
LBMB-B	۸۹	۷۰۰bp	۹/۵۲۴
826	۳۹	۱۰۰۰bp	۴/۵۳۱

(Constant)=-7.249 عرض از مبدأ

جدول ۵- مقدار تابع تشخیص کانونیک ارزیابی شده برای میانگین گروهها

Table 5. The value of the canonical detection function evaluated for the mean of the groups

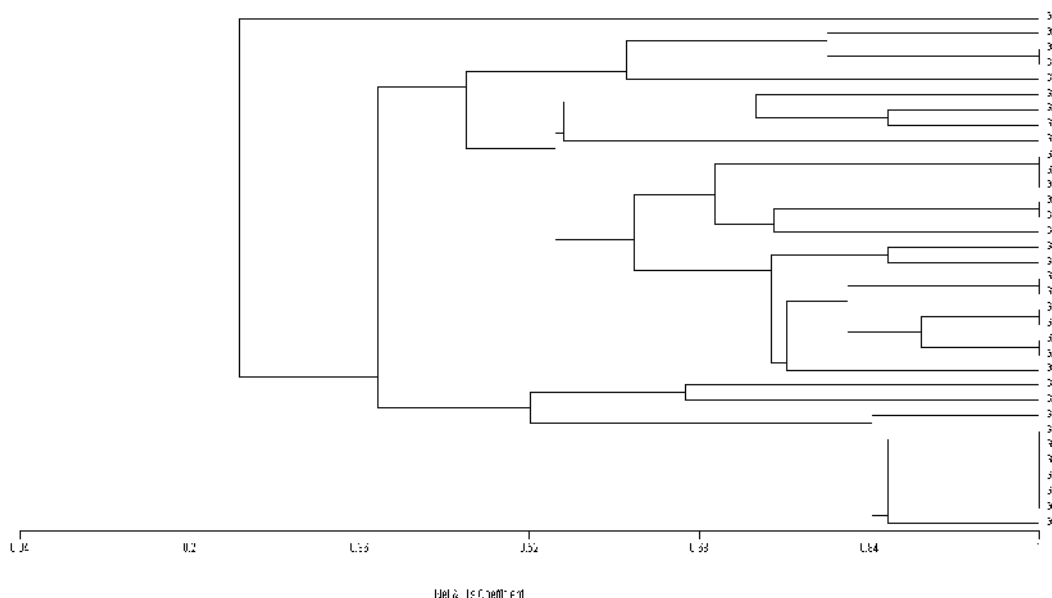
مقدار تابع	گروهها
۲/۶۹	مقاوم
۲/۷۴	نیمه مقاوم
-۱/۶۹	نیمه حساس
-۱/۱۹	حساس

جداگانه قرار گرفته‌اند (شکل ۳). این گروه‌بندی نشان می‌دهد که الل‌های آگاهی‌بخش مرتبط با تحمل به بیماری سفیدک پودری به درستی توانایی تفکیک ژنوتیپ‌ها را بر اساس فنوتیپ دارند.

مقایسه سطوح تنوع بین تحقیقات مختلف مشکل است زیرا تعداد الل‌های شناسایی شده در هر جایگاه، میزان تنوع ژنتیکی نمونه‌ها و تعداد ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تحقیقات مختلف متفاوت است با این حال آغازگرهای انتخاب شده علاوه بر نشان دادن تنوع آلی، نتایج مفیدی از نظر تنوع و وابستگی نشانگر به مقاومت و حساسیت ژنوتیپ‌ها نشان دادند.

برای بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد استفاده از نظر میزان تحمل به بیماری، از ماتریس عدم تشابه دایس و الگوریتم نزدیکترین همسایه جهت خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد. در این نوع روش تجزیه‌ای از شش نشانگر آگاهی‌بخش مرتبط با تحمل به بیماری برای گروه‌بندی ۳۴ ژنوتیپ گیاه جو استفاده شد. در خوشه به‌دست آمده، ژنوتیپ‌های ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۵ در بررسی‌های فنوتیپی مقاومت نشان داده بودند در یک گروه و ژنوتیپ‌های ۲، ۳، ۷، ۱۴ و ۱۲ که نیمه مقاوم بودند در گروه دیگر واقع شدند علاوه بر این‌ها ژنوتیپ‌های نیمه حساس و حساس در گروه

UFGM1



شکل ۳- گروه‌بندی ۳۴ ژنوتیپ زراعی و وحشی جو با استفاده از دندروگرام تهیه شده الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه و ماتریس عدم تشابه جاکارد بر اساس ۶ آغازگر ISSR آگاهی‌بخش مرتبط با تحمل به بیماری

Figure 3. Clustering of 34 wild and crop barley genotypes using nearest neighboring algorithms and Jaccards dissimilarity matrix based on 6 informative ISSR markers related to disease-tolerant

نیمه حساس تفکیک نمودند. در نتیجه این آلل‌ها به عنوان آلل‌های آگاهی‌بخش مرتبط با تحمل به بیماری سفیدک در گیاه جو شناسایی شدند. بر اساس تابع تشخیص خطی حاصل از آلل‌های آگاهی‌بخش، این ژنوتیپ‌ها به چهار گروه مقاوم، نیمه مقاوم، نیمه حساس و حساس تفکیک شدند که با نتایج بررسی فنوتیپی ژنوتیپ‌های در شرایط گلخانه‌ای مطابقت داشت. به‌طور کلی می‌توان با استفاده از ۶ آغازگر که توانایی تکثیر لوکوس‌های آگاهی‌بخش را دارند گیاهان را در مراحل مختلف گیاهچه ای مورد غربالگری قرار دارد که کمک شایانی به به‌هنگام‌گران در کوتاه کردن زمان و کاهش هزینه می‌نماید.

بهترین روش برای شناسایی و جداسازی ارقام با سطوح متفاوت تحمل به بیماری سفیدک پودری در حال حاضر مطالعه تفاوت‌های موجود در سطح DNA شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده‌ی صفات، به‌عنوان تکنیکی بسیار مفید، جهت شناسایی این تفاوت‌ها می‌باشد. در این مطالعه ارتباط بین صفت تحمل به بیماری و ۱۲۴ آلل تکثیر شده بررسی شد، با استفاده از روش رگرسیون گام به‌گام، شش قطعه ژنومی با اندازه ۱۰۰۰bp، ۷۰۰bp، ۱۵۰۰bp، ۳۰۰bp، ۱۰۰۰bp، ۱۰۰۰bp به ترتیب مربوط به آغازگرهای ۱۲ و UBC840 و LBMB-B و 826 و 826 و ISSR10 به‌عنوان آلل‌های مرتبط با تحمل به بیماری شناسایی شدند. این قطعات ارقام مقاوم و نیمه مقاوم را از ارقام حساس و

منابع

- Ahangar, L., V. Babaei-zad, G.A. Ranjbar, H. Najafi-Zarini and A. Biabani. 2014. Expression profile of defense-related genes in susceptible and resistant wheat cultivars in response to powdery mildew infection. *Novin Genetics Journal*, 10: 33-46 (In Persian).
- Ahangar, L., V. Babaei-zad, G.A. Ranjbar, H. Najafi-Zarini and A. Biabani. 2012. Study on expression of Phenylalanine ammonia-lyase and pathogenesis-related genes in wheat symbiont with endomycorrhizal fungus *Piriformospora Indica* after infection with powdery mildew. *Plant diseases Journal*, 50: 369-384 (In Persian).
- Azizi, H., A. Burnouse, B. Abdollahi Mandoulakani and R. Darvishzadeh. 2012. Study of genetics structure and diversity in cultivated alfalfa populations (*Medicago sativa*) using ISSR markers. *Modern Genetics Journal*, 4: 61-69.
- Behdad, E. 2006. *Phytopathology and Important Plant Diseases in Iran*. Ghom, Iran: Atre-Etrat Pub. 785 pp (In Persian).
- Condon, F.C., C.R. Gustus. Donald and K.P. Smith. 2008. Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. *Crop Science*, 48: 1027-1036.
- Czembor, J.H. 2000. Powdery mildew resistance in selection from Moroccan barley landraces. *Phytoparasitica*, 28: 65-78.
- Doyle, J.J and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Eslahi, M. 2014. Using RAPD Markers in the separation of wheat varieties resistant and susceptible to leaf spot disease of wheat Spray. *Journal of Plant Pathology*, 3: 15-22.
- Farshadfar, M., S.H. Fareghi, EA. Farshadfar and A.A. Jafari. 2008. Evaluation of the genetic diversity of alfalfa using morphological and chemical indices. *Journal of rangeland and forest research and genetic modification of plants*, 16: 13-1.
- Fabriki, O.S., M. Shamsbakhsh. M.J. Jalali and A. Jafari. 2009. Genetic diversity in indigenous masses of Iranian Melon (*Cucumis melo* L.) using the micro-satellite markers (ISSR). *Iranian Journal of Bioogy*, 22: 271-281.
- Fazeli, A., N.A. Babaeian Jelodar, M.R. Naghavi, E. Khodadadi, M. Chardoli, B. Zarei and E. Sedaghatfar. 2013. Evaluation of infection type and inheritance of resistance to powdery mildew in two crosses in barley. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 3: 1-9.
- Hacquard, S., B. Kracher, T. Maekawa, S. Vernaldi, P. Schulze-Lefert and E.V.L.V. Themaat. . 2013. Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of Amrica (PNAS)*, 110: 2219-2228.
- Hayes, P.M. 1992. Economic trait loci (Quantitative Trait Loci-QTL) analysis progress report. North American Barley Genome Mapping. Project (NABGMP). *Barley Genetics Newsletter*, 21: 30-31.
- Ivancic, V., C.A. Hackett, E. Nevo, R. Keith, W.T.B. Thomas and B.P. Forster. 2002. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Molecular Biology*, 48: 511-527.
- Jun, T.H., K. Van, M.Y. Kim, S.H. Lee and D.R. Walker. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 62: 179-191.
- Khodarahmi, M., S.A. Mohammadi and M.R. Jalal Kamali. 2009. Identification of informative marker for yellow rust resistant related cultivars. The 6th national biotechnology congress of Iran. 13-15 Aug, Milad tower conference hall, Tehran, Iran.
- Li, Q., Q.C. Liu, H. Zhai, D.F. Ma, X. Wang, X.Q. Li and Y.P. Wang. 2008. Genetic diversity in main parents of sweet potato in china as revealed by ISSR Markers. *Acta Agronomical Sinicia*, 34: 972-977.
- Moldovan, V., M. Moldovan and R. Kadar. 2005. Assessment of winter wheat cultivars for resistance to Fusarium head blight //Ann. *Wheat Newslett*, 51: 97-98.
- Moshiri, Sh. 1995. Determination resources barley resistance to some diseases common in Khorasan. Abstract of 12th of Iranian plant protection. Karaj, 53 pp.
- Ovesna, J., L. Kucera, R. Bockova and V. Holubec. 2002. Characterization of powdery mildew resistance donors within *Triticum boeoticum* accessions using RAPDs. *Plant Breed*, 38: 117-124.

21. Peseraklu, S., H. Soltanlou, S.S. Ramezanzpour, A.A. Nasrollahnezhad, M. Kalateh and Sh. Kia. 2012. Evaluation of genetic diversity of barley powdery mildew disease on some of barley genotypes. 12th Iranian Crop Science Congress, 1-4.
22. Jørgensen, J.H. 1988. *Erysiphe graminis*, powdery mildew of cereals and grasses. Adv. Plant. Pathology, 6: 137-157.
23. Saari, E.E. and J.M. Prescott. 1975. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease. Plant Disease Reporter, 59: 377-380.
24. Younis, R.A.A., O.M. Ismaeil and S.S. Soliman. 2008. Identification of Sex-specific DNA Markers for Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Using RAPD and ISSR Techniques. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4: 278-284.
25. Virk, P.S., B.V. Ford-Lloyd, M.T. Jackson, H.S. Pooni, T.P. Clemeno and H.J. Newbury. 1996. Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. Third International Rice Genetics Symposium, Manila, Philippines, 307-316.
26. Zvingila, D., V. Vaitkuniene, J. Patamsts, A. Leisrurmaite, M. Stanlute, L. Balciuniene., T. Cesniene, V. Kleizaite, R. Siuksta and R. Rancelis. 2012. DNA polymorphisem and agronomic traits of revertants from barley (*Hordeum vulgare* L.) mutant tw. Žemdirbyst =Agriculture, 99: 139-148.
27. Zaccardelli, M., S. Gnocchi, M. Carelli and C. Scotti. 2003. Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bioagronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breeding, 122: 61-65.
28. Malekmohamadi, Z., H. Sabori, A. Biabani and E. Hezarjaribi. 2016. Study of Genetic Diversity of Soybean (*Glycine max*) using ISSR Markers. Journal of crop breeding, 8: 124-133 (In Persian).
29. Pahlavani, S., A. Izanloo, S. Parsa and M.G. Ghaderi. 2016. Association between Grain Quality Traits and SSR Molecular Markers in Some Bread Wheat Genotypes. Journal of Crop Breeding, 8: 25-36 (In Persian).

Identification of Informative ISSR Marker Linked to Resistance to Powdery Mildew in Barley (*Hordeum vulgare*) at Adult Growth Stage

Masoumeh Ahmadi¹, Arash Fazeli² and Ali Arminian³

1 and 3- Graduated M.Sc. Student and Assistant Professor, Ilam University
2- Assistant Professor, Ilam University, (Corresponding author: a.fazeli@ilam.ac.ir)
Received: June 27, 2015 Accepted: February 16, 2016

Abstract

Powdery mildew (*Blumeria graminis f. Sp. Hordei*) is one of the most destructive foliar diseases in barley that cause yield reduction worldwide. DNA molecular markers can be used to study the genetic diversity and better understanding of genetic predisposition to disease resistance to powdery mildew in barley at early growth stage. Selection of resistance and tolerance need to identify molecular markers associated with disease. In present study, genetic and phenotypic variations and also molecular markers linked to tolerance to powdery mildew in 34 of cultivated and wild barley genotypes were investigated. Using 16 ISSR markers in total amplified 125 alleles that 124 (99.27%) of that were identified as polymorphic alleles. Number of amplified alleles ranged from 5 to 10 with an average 7.93 was different for each primer. Polymorphic Information Content (PIC) were varied from 0.17 (15) to 0.44 (LBMB-B) and also Molecular Index (MI) varied from 0.84 (primer No. 809) to 3.85 (UBC836). Resistance and susceptible genotypes show the highest genetic distance, however, resistance and tolerant genotypes show the lowest genetic distance. Multiple regression analysis (stepwise) between trait resistances amplified 125 alleles identified six fragments 1000 bp (primer No. 826), 700 bp (LBMB), 1500 bp (ISSR10), 300 bp (primer No. 826), 1000 bp (UBC840) and 1000 bp (primer No. 12), respectively. Results indicated that ISSR markers are suitable for screening of barley germplasm tolerant to powdery mildew disease.

Keywords: Barley, Genetic diversity, ISSR markers, Powdery mildew, Resistance