



مطالعه تنوع ژنتیکی برخی ارقام جو (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از نشانگر ریزماهواره و صفات فیزیولوژیک رنگیزه‌های گیاهی و پرولین تحت تنفس سرمای دیررس بهاره

کوثر حق پناه^۱, سید رضاقلی میرفخرایی^۲, مصطفی خدادادی^۳ و سحر شمسی فر^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس
۲- استادیار گروه ژنتیک و بیوتادی، دانشگاه تربیت مدرس، (نویسنده مسؤول) Abdhoorza@modares.ac.ir
۳- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج
تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۹
صفحه: ۱۹۹ تا ۲۰۹

چکیده

گیاهان اغلب در معرض طیف وسیعی از تنفس‌های غیرزیستی قرار می‌گیرند که این تنفس‌ها اثرات نامطلوبی بر بقاء، رشد، کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی دارند. سرما یکی از این تنفس‌ها است که نوع سرمای دیررس بهاره آن، می‌تواند کشت غلات را در طول دوره زایشی با خسارت بزرگی مواده سازد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر تنفس سرمای بهاره روی صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنفس، شامل اسیدآمینه پرولین و رنگیزه‌های گیاهی (کلروفیل a, کلروفیل b, کارتنوئید) در مرحله زایشی بود. بدین منظور آزمایشی در شرایط کنترل شده (گلخانه) با مدل تجزیه مرکب بر پایه طرح کاملاً تصادفی که شامل چهار محیط (سطوح دمایی شاهد +۸°C, +۲۰°C, +۲۰°C و ۰°C) و ۲۰ رقم جو زراعی در سه تکرار، در دانشگاه کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۹۵-۹۶ انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که سطوح تنفس سرما، رقم و اثر متقابل رقم در سرما برای تمامی صفات در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود. ارقام متحمل به سرما، میزان پرولین (رقم جلگه)، رنگیزه‌های گیاهی (یوسف و نیک) بالاتری را در سطوح مختلف تنفس سرما داشتند. جهت تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام تجزیه خوش‌های به روی Ward با استفاده از ضریب مریع فاصله اقلیدسی انجام و ارقام مورب برسی در سطوح شاهد و تنفس شدید (-۲۰°C) هر کدام به پنج گروه تقسیم شدند که ارقام متحمل در یک گروه قرار گرفتند. برای برسی تنوع ژنتیکی در بخش مولکولی از ۱۲ جفت آغازگر چندشکل ریزماهواره استفاده شد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی برابر ۰/۳۸ بود. ارقام با ضریب تشابه دایس و رویش تجزیه خوش‌های با مدل UPGMA گروه‌بندی شدند و ۲۰ رقم جو زراعی در چهار گروه قرار گرفتند. نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از تجزیه رگرسیون گام به گام، حاکی از ارتباط بالای (بالاترین ضریب تبیین، EBmac037 EBmag0337) با صفت پرولین، نشانگر ۰/۲۹ (R²=۰/۲۹) با صفات کلروفیل a و کلروفیل b، نشانگر ۰/۳۷ (R²=۰/۳۷) با صفت کارتنوئید بود.

واژه‌های کلیدی: تنفس سرمای بهاره، تنوع ژنتیکی، جو، نشانگر ریزماهواره

حتی معتدل سرد کشور می‌شود. سرمای بهاره یکی از تنفس‌هایی است که هر ساله خسارات قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشور به خصوص در بخش غلات تحمیل می‌کند (۲۰). دمای پایین به عنوان یکی از خطرات عمدی کشاورزی و یکی از عوامل مهم محدودیت حیات و توزیع جغرا斐ائی گیاهان در بسیاری از مناطق جهان است. در غیر این صورت به عنوان تنفس دمایی، می‌تواند به مرگ گیاه نیز منجر شود (۷). کلروفیل برگ یکی از مهم‌ترین ساختهای نشان‌دهنده فشارهای محیطی وارد بر گیاه شناخته شده است. مقدار کلروفیل در گیاهان تحت تنفس کاهش یافته و باعث تغییر در جذب نور و در نتیجه کاهش کل جذب نور توسط گیاه می‌شود (۱۱). میزان فتوسنتز و محتوای کلروفیل در گیاهان در اثر تنفس شدید سرما آسیب جدی می‌بیند و کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد، که علت آن تغییرات اجزاء پروتئین و لیپیدهای غشای تیلاکوئید در اثر تنفس سرماست (۲۲). استفاده از محلول‌های سازگار توان سازش‌پذیری گیاهان را در برابر تنفس افزایش می‌دهد، ضمن آن که ضرری هم برای گیاه ندارد. از مهم‌ترین محلول‌های سازگار می‌توان قندهای محلول و قندهای نامحلول و اسیدآمینه‌های چهارگانه مانند پرولین، آمینه‌های سه‌گانه و

مقدمه

امروزه نزدیک به ۷۰٪ سطح زیر کشت محصولات کشاورزی به غلات اختصاص یافته است. تقریباً نیمی از نیازهای غذایی انسان به ویژه در آسیا به طور مستقیم از غلات تأمین می‌گردد. جو زراعی با نام علمی *Hordeum vulgare* L., با سطح زیر کشت جهانی حدود ۵۰ میلیون هکتار و تولید حدود ۱۳۳ میلیون تن در سال از نظر سطح زیر کشت دومین محصول مهم زراعی دنیا بعد از گندم می‌باشد. بر اساس جدیدترین آمار سطح زیر کشت جو در سال زراعی ۹۷-۹۶ در ایران برابر ۱/۴ میلیون هکتار و تولید حدود ۵/۱۰ میلیون تن در سال و سطح زیر کشت جو آبی برابر ۵/۹۷ هزار هکتار و مقدار تولید آن حدود دو میلیون و سی هزار تن گزارش شده است (۲). بر اساس آمار موجود در کشور، حدود ۶۶٪ اراضی دیم و ۵۱٪ اراضی آبی زیر کشت گندم و جو، در مناطق سردسیر کوهستانی واقع شده‌اند. مناطق سردسیر کشور تا ارتفاعی بیش از چهار هزار متر از سطح دریا گسترش داشته و متوسط حداقل مطلق درجه حرارت در طی یک دوره طولانی کمتر از ۱۹°C می‌باشد. آمار بلند مدت نشان می‌دهد که کاهش ناگهانی دما به ویژه در اوخر زمستان و یا اوایل بهار باعث خسارت به زراعت گندم و جو در اکثر مناطق سرد و

ضدغونی با هیپوکلریت سدیم $\% ۵$ (v/v) به مدت چهار روز در دستگاه جوانهزنی قرار گرفتند (دما ۲۵°C و رطوبت ۷۰%). بعد از اینکه جوانهها به اندازه ۲cm رسیدند، پتریدیشها به مدت شش هفته در دمای ۳۰°C جهت بهاره‌سازی به یخچال انتقال داده شدند. بعد از پایان زمان مقرر کشت گیاهچه‌ها در گلدانها صورت گرفت. پس از دو ماه که بوته‌های جو به مرحله زایشی (خوش رفتن) رسیدند، معادل مقیاس زادوکس (۳۳)، برابر ۴۸ الی ۶۰ ، جهت اعمال تنش سرمایی مذکور به اتاقک سرما منتقل شدند. جهت تعیین غلظت رنگیزه‌های گیاهی از روش Lichtenthaler استفاده شد (۱۸) و درنهایت نمونه‌برداری از برگ پرچم گیاهان شاهد و گیاهان تحت تنش، ۲۴ ساعت بعد از اعمال تنش سرمایی صورت گرفت. غلظت کلروفیل a⁺, b⁻, مجموع آن‌ها و کارتونوئیدها بر حسب وزن تازه از طریق روابط زیر به دست آمد.

$$\text{رابطه (۱-۳)} \quad \text{Ca} = 16.72\text{A}_{665} - 9.16\text{A}_6$$

$$\text{رابطه (۲-۳)} \quad \text{Cb} = 34.09\text{A}_{652} - 15.28\text{A}_{665}$$

$$\text{رابطه (۳-۳)} \quad \text{Ca+b} = 1.44\text{A}_{665} - 24.93\text{A}_{652}$$

$$\text{رابطه (۴-۳)} \quad c = (1000\text{A}_{470} - 1.63\text{Ca} - 104.96\text{Cb})/221$$

به منظور سنجش پرولین بعد از اعمال تنش سرمایی بهاره و با استفاده از نمونه برگ تازه یا منجمد شده روش Bates مورد استفاده قرار گرفت (۴) و بر اساس فرمول زیر و بر حسب $\mu\text{g.g}^{-1}$ تعیین گردید.

$$\text{M} = \frac{(\mu\text{g Proline/ml} \times \text{ml Toluen})}{(115/17 \mu\text{g/mol}) / (\text{g of sample} / 5)}$$

به منظور استخراج DNA از بافت برگی، از هر رقم تعداد ۱۵ عدد بذر درون گلدانها کاشته شدند. به محض اینکه ارتفاع گیاهچه‌ها به حدود $۱۰ - ۱۵\text{ cm}$ رسیدند (مرحله سه تا چهار برگی و قبل از خشی شدن برگ‌ها)، نمونه‌برداری از برگ ارقام مختلف صورت گرفت. استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (۲۶). پس از انتخاب آغازگرهای SSR و اکتشاف زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر به ترتیب شامل آب دوبار تقطیر (DDW) به میزان $۳/۵$ میکرولیتر، مستر میکس (Mastermix)، ۲ میکرولیتر پرایمرهای پیرو و پیشو و ۱ میکرولیتر DNA نمونه مورد نظر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، اتصال آغازگرهای در دمای ۹۴°C به مدت ۱۵ دقیقه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت $۶۰ - ۴۵$ دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. محصولات تایید شده حاصل از اکتشاف زنجیره‌ای پلیمراز، به منظور تعیین چندشکلی و میزان تنواع بین ارقام با ولتاژ ۸۵ و به مدت $۵ - ۴۵$ دقیقه روی ژل متافور-آگارز بارگذاری و بعد از اتمام الکتروفورز با استفاده UV از دستگاه Gel document از ژل تحت اشعه UV عکس‌برداری انجام شد. از نرم‌افزارهای NTSYS-PC

ترکیبات سولفونیومی را نام برد (۲۶). پرولین اسید‌آمینه‌ای است که افزایش غلظت آن فراوان ترین و عمومی‌ترین پاسخی است که به محض ایجاد تنش حدث می‌گردد (۳۰). پرولین علاوه بر تنظیم اسمزی به عنوان محافظ در برابر تنش نیز عمل می‌کند. بدین ترتیب که به طور مستقیم و غیرمستقیم با ماکرومولکول‌ها اثر متقابل داشته و از این طریق به حفظ شکل و ساختار طبیعی آن‌ها در برابر شرایط تنش کمک می‌کند (۱۶). به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی این امکان را فراهم می‌سازند که بررسی تنوع ژنتیکی مستقیماً در سطح DNA انجام گیرد. بنابراین نشانگرهای مولکولی می‌توانند به عنوان ابزار تکمیلی برای تأیید یا عدم تأیید وجود تنوع ژنتیکی در میان لاین‌های مشتق شده از جو مورد استفاده قرار گیرند. نشانگرهای مبتنی بر DNA به دلیل فراوانی بالا، عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی، مرحله رشد، نوع بافت و اندام و چندشکلی بالا، کارآیی بیشتری دارند (۱۳). در سال‌های اخیر، نشانگر SSR به دلیل چندشکلی زیاد، تکرارپذیری بالا، فنوتیپ هم‌بارز، فراوانی بالا، توزیع تصادفی در کل ژنوم کاربرد فراوانی را در مطالعات ژنتیکی و اصلاح نباتات به خود اختصاص داده‌اند (۲۱). در یک بررسی به تنوع ژنتیکی ۳۵ رقم جو با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و رابطه این نشانگرهای ریزماهواره و رابطه این نشانگرهای ریزماهواره با برخی صفات وابسته به تحمل بیخ‌زدگی پرداخته شد (۹). در تحقیقی تنوع ژنتیکی ۳۵ رقم جو با ۴۴ جفت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت که تعداد ۲۶۸ آلل چندشکل با میانگین ۶ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد (۱). تجزیه و تحلیل چندمتغیره ابزاری کارا جهت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در کلکسیون نمونه‌های گیاهی، تعیین سهم هر صفت از تنوع کل انتخاب ژنوتیپ‌ها برای استفاده در یک برنامه اصلاحی، تعیین روابط بین اجزای عملکرد و ساختارهای مورفو‌لوژیک، تعیین اجزای اصلی عملکرد، تعیین ارتباط بین تنوع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی و کاهش ابعاد داده‌ها می‌باشد (۳۴, ۳۲, ۲۵, ۵). در این راستا، پژوهش حاضر به ارزیابی تحمل به تنفس سرمایی بهاره ارقام جو زراعی از طریق اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک (کلروفیل a, کلروفیل b, کلروفیل a+b, کارتونوئید و پرولین) پس از آزمون‌های سطوح دمایی ($+۲$, ۰ , -۲) می‌پردازد. هم‌چنین از اهداف دیگر این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم جو زراعی با استفاده از داده‌های مولکولی و در نهایت بررسی ارتباط صفات فیزیولوژیک با نشانگرهای مولکولی است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با مدل تجزیه مرکب در مکان بر پایه طرح کاملاً تصادفی که شامل ۲۰ رقم جو (بهمن، دشت، فجر، ۳°C ، زرجه، زهک، خاتم، جلگه، صحرا، جنوب، نصرت، بهار، یوسف، ریحان، گوهران، والفتح، کویر، نیمروز، ریحان، ۳°C ، مکویی، نیک) با چهار تیمار سرمایی با الگوبرداری از شرایط سرمایی دیررس بهاره از طبیعت در سه سطح ($+۲$, ۰ , -۲) و تیمار شاهد $+۸^{\circ}\text{C}$ (۲۷) و سه تکرار در دانشکده کشاورزی تربیت مدرس در سال $۹۵ - ۹۶$ انجام شد. ابتدا بذور بعد از

بيانگر وجود تنوع ژنتيکي از نظر صفات اندازه گيري شده است (جدول ۱). وجود تنوع ژنتيکي مؤثر در تحمل به تنش سرمای بهاره برای انتخاب ارقام متحمل به تنش با عملکرد بالا و درک بهتر ساز و کارهای فيزيولوژيکي مرتبط با تحمل به تنش سرمای ديررس در جو می تواند بسیار مفید باشد. همچنین بين محظطهای موردن بررسی اختلاف معنی داری مشاهده گردید. و اثر متقابل رقم در محیط نیز برای اکثر صفات معنی دار شد.

اختلاف معنی دار آماری بين ارقام بيانگر وجود تنوع ژنتيکي بالا بين مواد گیاهی موردن ارزیابی و احتمالاً مکانیسم های متفاوت بين آن ها در واکنش به تنش سرمای ديررس است که می توانند در انتخاب والدین مناسب و تولید جمعیت های در حال تفرق جهت مکان یابی محل های ئی مورد استفاده قرار گیرند. معنی دار شدن اثر متقابل ژنتیک در محیط بيانگر پاسخ های متفاوت ژنتیک در محیط های مختلف است.

XLSTAT و GENALEX اطلاعات چندشکلی، تجزیه خوشای و رسم دندروگرام استفاده شد. بهمنظور اندازه گيري صفات فيزيولوژيک، با توجه به اينکه يكى از مفروضات تجزیه و تحليل واريانس آن است که خطاهای باید دارای توزيع نرمال باشند، ابتدا آزمون نرمال بودن توزيع اشتباه آزمایشي دادهها برای هر کدام از صفات و سپس تجزیه های آماری بر روی دادهها انجام گرفت. تجزیه واريانس تک و چند متغیره انجام شد و سپس مقابله ميانگين با روش LSD صورت گرفت. تجزیه خوشای ارقام به روش وارد و با استفاده از مربع فاصله اقليدي برای متغیرهای استاندارد شده با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واريانس مرکب صفات مورد مطالعه اختلاف معنی داری ($p < 0.001$) را بين ارقام نشان داد که

جدول ۱- ميانگين مربعات (MS) ارقام جو در شرایط تنش سرمای ديررس برای صفات فيزيولوژيک
Table 1. Mean squares of barley cultivars under late cold stress for physiological traits

ميانگين مربعات							
پروولين	كارتونيد	كل	كلروفيل a	كلروفيل b	درجه آزادی	محيط	
.۰/۰۰۵**	۷/۷۳**	۱۶/۰۵۸**	۱/۵۵۸**	۷/۶۲۰**	۳	محيط	
.۰/۰۰۱۴*	.۰/۰۳۴ns	.۰/۰۹۸ns	.۰/۰۰۲	.۰/۰۸۸ns	۸	تکرار درون محيط	
.۰/۰۰۳۶**	.۰/۷۶۸**	۲/۳۹۸**	.۰/۳۷۷**	۱/۷۴۸**	۱۹	ژنتیک	
.۰/۰۰۳۸**	.۰/۲۰۷**	۱/۲۴۶**	.۰/۱۱۳**	.۰/۷۰۵**	۵۷	ژنتیک در محيط	
.۰/۰۰۰۶۹	.۰/۰۵۲	.۰/۳۳۲	.۰/۰۱۴	.۰/۲۶۳	۱۵۲	خطا	
۱/۳	۹/۸۳	۸/۴۹	۹/۷۹	۹/۱۲		ضربي تغييرات (%)	

**، * به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و عدم معنی داری ns

بهتری نسبت به ارقام حساس از تولید و اثرات منفی انواع (ROS) اکسیژن فعال جلوگیری کرده و با داشتن فتوسترن و انرژی بیشتر باعث افزایش تحمل نسبت به تنش سرما شود (۱۰). اثر تنش سرمای بهاره بر میزان پروولین بدین صورت بود که بعد از اعمال سطوح تنش، تغییرات مقادیر پروولین ارقام از سطح شاهد به طرف -3°C - از روند ثابتی برخوردار نبوده و نوسان داشت. به طور کلی بالاترین میزان پروولین در سطح دمای تنش -3°C - مربوط به رقم جلگه و کمترین میزان پروولین در این سطح تنش مربوط به رقم جلگه و کمترین میزان (جدول ۲). بنابراین از این ارقام می توان به عنوان ارقام متحمل و حساس برای صفت پروولین در اثر تنش سرمای ديررس نام برد. گزارش های بسياری در رابطه با تجمع پروولین در گیاهان در پاسخ به تنش های متنوع محیطی از قبیل خشکی، سرما و دمای بالا وجود دارد (۳۱). پژوهش ها نشان می دهد که سترن پروتئین به آسانی به وسیله تنش آب جلوگیری شده ولی هیدرولیز پروتئین تسریع می گردد. یکی از موادی که از این هیدرولیز بوجود می آید پروولین می باشد. بعد از تنش، غلظت افزایش یافته پروولین، کاهش سریعی نشان می دهد و غلظت آمونیم افزایش می باشد. بعد از پایان تنش، پروولین در چرخه کربن گروه آمینی خود ارقام به تنش سرمای بهاره وجود دارد (۳۲).

مقایسه ميانگين اثر متقابل نشان داد که ارقام تحمل کننده سرما از میزان رنگیزه های گیاهی و پروولین بيشتری برخوردار هستند. بر این اساس، ارقام جلگه، یوسف و نیک دارای تحمل بيشتر و در مقابل ارقام نیمروز، خاتم و والفر جنسیت بيشتری نسبت به سرما داشتند (جدول ۲). برای صفت رنگیزه های گیاهی با کاهش دما یک روند رو به کاهش در مقدار کلروفیل های برگ سرما دیده، مشاهده شد. این امر احتمالاً به دلیل تفاوت در قدرت حفظ و جلوگیری از کاهش مقدار آب نسبی سلول های برگ می باشد که با کاهش دما، مقدار آب نسبی سلول های برگ و میزان کلروفیل در سلول های برگ به تدریج افزایش می یابد. به نظر می رسد که تحمل سرما در دمای -3°C - که با افزایش میزان رنگیزه های گیاهی مشاهده می شود ناشی از مجموعه ای از عوامل مختلف است که احتمالاً متأثر از نقش تنظیم کننده ژن های نموی نظیر بهاره سازی است که باعث افزایش تحمل به سرما در گیاه می شود. در مطالعه ای که روی بهاره سازی انجام گرفت، ارقامی که نیاز بيشتری به دوره بهاره سازی داشتند به علت این که دوره بيشتری در فاز رویشی قرار دارند و ژن های مربوط به سرما در مرحله رویشی بیان می شوند تحمل به افزایش می یابد (۱۹). ارقام متحمل به تنش می تواند مقدار کلروفیل خود را حفظ کرده و با استفاده از مکانیسم دفاعی

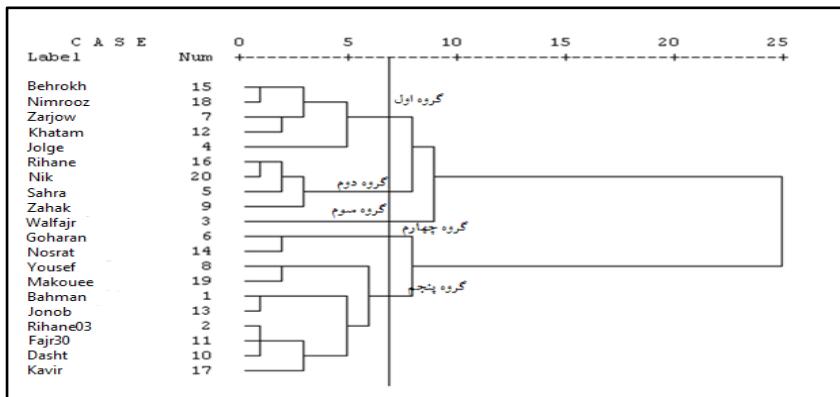
جدول ۲- مقایسه میانگین ۲۰ رقم مورد مطالعه بر اساس صفات مختلف در چهار سطح تنش دمایی

Table2. Mean comparison of 20 studied cultivars based on different traits in four temperature stress levels

پرولین ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)				کارتوتئید (mg.g^{-1})				کلروفیل کل (mg.g^{-1})				کلروفیل b (mg.g^{-1})				کلروفیل a (mg.g^{-1})				صفات
(-۲°C)	(-۰°C)	(+۲°C)	(+۸°C)	(-۲°C)	(-۰°C)	(+۲°C)	(+۸°C)	(-۲°C)	(-۰°C)	(+۲°C)	(+۸°C)	(-۲°C)	(-۰°C)	(+۲°C)	(+۸°C)	(-۲°C)	(-۰°C)	(+۲°C)	(+۸°C)	
-۰/۷۳۵۱	-۰/۷۰۰۷	-۰/۷۴۹۸	-۰/۷۴۳	۱/۶۴۹۶	۲/-۸۳۹	۳/۱۶۷۹	۲/۷۳۱۸	۶/۶۷۶۲	۸/۲۲۹۶	۷/۵۱۹۴	۷/۰۸۹۴	۱/۲۹۱۱	۱/۸۱۹۴	۱/۳۶۷۳	۱/۳۴۲	۵/۳۸۵۱	۶/۴۱۰۲	۶/۱۵۲۱	۵/۷۴۷۴	بهمن
-۰/۷۵۳	-۰/۷۲۱۴	-۰/۷۵۴۲	-۰/۷۴۳۵	۱/۹۷۳۷	۲/۷۳۴۷	۲/۳۷۲۸	۲/۱۷۹۶	۶/۷۵۸۲	۷/۷۲۸۷	۹/۲۳۸۸	۷/۲۲۷۸	۱/۲۱۱۳	۱/۵۲۸۹	۱/۸۷۴۲	۱/۳۵۴۲	۵/۵۴۶۹	۶/۱۹۹۸	۷/۴۶۴۶	۵/۸۷۳۵	ریحان
-۰/۷۶۱۵	-۰/۷۲۵۴	-۰/۷۵۴	-۰/۷۶۲۲	۱/۳۲۸۴	۲/۶۵۶۴	۱/۷۶۳۵	۱/۷۲۵۲	۵/۸۴۶	۶/۸۲۹۹	۵/۲۷۹	۶/۲۷۱۴	۰/۸۸۴۸	۱/۲۵۰۷	-۰/۸۶۱۳	۱/۰۱۶۵	۴/۹۶۱۲	۵/۵۷۹۲	۴/۴۱۷۷	۵/۲۵۴۹	الفجر
-۰/۷۶۹۵	-۰/۷۲۷۷	-۰/۷۵۶۵	-۰/۷۴۶۷	۱/۶۹۶	۲/۵۲۴۳	۲/۱۰۲۸	۱/۸۶۷۱	۶/۷۶۸۱	۸/۰۳۲۲	۶/۶۰۱۴	۶/۳۱۷۴	-۰/۷۷۲۷	۱/۵۳	۱/۱۳۲۳	۱/۰۳۱۹	۵/۱۰۴۲	۶/۴۰۲۲	۵/۴۶۹۱	۵/۲۸۵۵	چله
-۰/۷۸۳۳	-۰/۷۵۰۷	-۰/۷۴۷۱	-۰/۷۴۱۳	۲/-۰۱۳	۲/۶۸۴۳	۲/۶۷۰۱	۲/۴۸۱۴	۶/۱۳۷۹	۷/۹۳۷۸	۶/۳۹۹۱	۶/۵۴۸۸	۱/۰۰۷۷	۱/۵۴۵۸	۱/۰۵۶۸	۱/۲۲۰۹	۵/۱۳۰۳	۶/۳۹۱۹	۵/۳۴۲۲	۵/۳۲۸	صحراء
-۰/۷۸۰۹	-۰/۷۵۳۷	-۰/۷۵۶۸	-۰/۷۲۲۷	۱/۶۵۲۲	۲/۴۹۲۶	۲/۶۲۳۱	۲/۵۷۲۴	۶/۵۸۶۲	۷/۰۴۹	۶/۳۰۷۷	۷/۱۰۷۶	۱/۰۵۳۲	۱/۲۰۳۹	۱/۱۶۲۷	۱/۱۹۶۱	۵/۵۳۳۱	۵/۸۹۱	۵/۱۴۴	۵/۹۱۱۵	گوهران
-۰/۷۳۶۷	-۰/۷۲۴۶	-۰/۷۵۳۵	-۰/۷۳۰۵	۱/۴۲۲۳	۲/۱۲۷۶	۲/۵۴۹	۱/۰۵۶۸	۵/۴۱۷۶	۷/۷۳۱	۸/۰۸۰۱	۵/۶۲۱۷	-۰/۸۱۶۸	۱/۵۱۱۴	۱/۵۶۸۴	-۰/۸۹۲۵	۴/۶۰۰۸	۶/۲۱۹۶	۶/۵۱۱۷	۴/۷۲۹۲	زرجو
-۰/۷۵۷۲	-۰/۷۵۳۲	-۰/۷۳۸	-۰/۷۳۷۵	۱/۸۴۰۴	۲/۳۹۳۶	۲/۴۴۶۹	۲/۰۳۰۳	۷/۲۴۴۴	۶/۶۹۰۳	۶/۵۵۸۲	۷/۴۶۵۶	۱/۶۲۱۹	۱/۱۷۹۴	۱/۲۲۲۲	۱/۶۹۷	۵/۶۲۲۵	۵/۵۱۰۹	۵/۳۳۶	۵/۷۶۸۶	یوسف
-۰/۷۵۹۱	-۰/۷۴۴۹	-۰/۷۶۴۱	-۰/۷۱۳۷	۲/۱۵۲۴	۲/۶۳۸۳	۲/۶۲۶۲	۲/۳۴۱۸	۵/۸۷۶۷	۶/۶۹۷۲	۷/۳۰۶۱	۶/۱۹۳۷	-۰/۸۲۳۳	۱/۲۰۷	۱/۳۱۸۳	-۰/۹۱۳۶	۵/۰۱۴۳	۵/۴۸۷۵	۵/۹۸۷۸	۵/۲۸۰۱	زهک
-۰/۷۴۲۷	-۰/۷۲۳۲	-۰/۷۵۱۵	-۰/۷۴۶۸	۱/۷۶۱	۲/۷۱۵۱	۲/۵۷۹۴	۲/۰۴۶۴	۶/۵۹۰۲	۷/۱۹۷۲	۷/۱۵۴۳	۷/۴۹۲۵	۱/۲۳۱۴	۱/۶۹۱۷	۱/۴۹۹۱	۱/۳۱۹۱	۵/۳۵۸۸	۵/۵۰۵۶	۵/۷۰۵۲	۶/۱۷۳۴	دشت
-۰/۷۵۷۹	-۰/۷۴۲۸	-۰/۷۵۱۹	-۰/۷۴۱۸	۲/۱۲۴۴	۳/۱۰۸	۲/۸۰۰۲	۲/۶۳۷۸	۷/۱۷۸۲	۸/۱۸۸۸	۷/۷۵۹	۷/۴۴۵۷	۱/۱۲۲۷	۱/۱۷۹۵	۱/۴۷۳	۱/۲۸۱۸	۶/۰۵۵۵	۶/۴۴۶۳	۶/۲۸۶۱	۶/۱۶۴۹	فجر
-۰/۷۳۸۹	-۰/۷۴۶	-۰/۷۵۱۵	-۰/۷۳۹۸	۱/۶۵۰۷	۲/۸۵۴۲	۱/۹۶۶۹	۱/۷۵۲	۴/۷۹۳	۷/۸۳۳	۶/۷۷۹۵	۴/۹۲۹۳	-۰/۵۸۶۲	۱/۳۵۱۵	۱/۰۵۱۹	-۰/۶۶۳۶	۴/۲۰۶۹	۶/۴۸۱۵	۵/۷۲۷۶	۴/۲۶۵۷	خاتم
-۰/۷۴۲۸	-۰/۷۱۶۴	-۰/۷۵۰۵	-۰/۷۵۱۹	۲/۲۵۳۶	۲/۸۳۳۳	۱/۶۶۴۴	۲/۴۷۹۱	۶/۹۵۶۸	۷/۹۷۷۱	۵/۷۱۴۳	۷/۱۳۶۲	۱/۳۶۹۵	۱/۴۳۳۹	۱/۰۶۷۱	۱/۳۹۸۹	۵/۵۸۷۳	۶/۰۴۳۲	۴/۶۴۷۳	۵/۷۳۷۳	جنوب
-۰/۷۵۹۲	-۰/۷۲۲۲	-۰/۷۶۴۰	-۰/۷۴۳۳	۱/۶۴۷۷	۲/۴۴۵۱	۲/۶۴۷	۳/۰۸۰۹	۶/۷۹۳۱	۷/۳۰۴۸	۷/۲۶۲۷	۷/۷۸۷	۱/۱۸۲۳	۱/۱۶۵۳	۱/۰۳۰۶	۱/۳۹۳۶	۵/۶۱۰۸	۶/۹۵۷۲	۶/۳۹۳۴	۶/۰۵۷۲	نصرت
-۰/۷۵۹۶	-۰/۷۳۹۱	-۰/۷۶۱۴	-۰/۷۳۴۹	۱/۸۰۵	۲/۶۰۸۴	۲/۰۶۵۷	۲/۰۱۹۶	۵/۲۳۸۱	۶/۵۳۳۴	۵/۷۷۲۲	۵/۴۹۲۶	-۰/۷۶۹۵	۱/۱۴۷۳	۱/۰۲۲۱	-۰/۸۳۳۸	۴/۴۶۸۶	۵/۳۸۶۱	۴/۷۵۰۲	۴/۶۵۸۸	پرخ
-۰/۷۶۱۸	-۰/۷۳۳۹	-۰/۷۵۰۸	-۰/۷۳۰۵	۱/۹۴۹۹	۲/۲۶۷۴	۲/۶۵۱۸	۲/۲۸۴۶	۵/۰۲۳۲	۷/۱۱۷۶	۶/۶۰۸	۵/۰۴۰۹	-۰/۸۱۳۲	۱/۰۵۷۲	۱/۰۵۷۳	-۰/۸۷۹۵	۴/۷۱	۵/۵۸۰۴	۵/۵۵۲۴	۴/۶۶۶۵	ریحان
-۰/۷۶۶۷	-۰/۷۴۳۵	-۰/۷۶۴۸	-۰/۷۴۶۷	۲/۲۲۱۳	۲/۹۴۷۹	۳/۱۸۲۳	۲/۸۰۸۷	۶/۸۰۶۷	۷/۴۳۷۶	۷/۶۸۶۵	۷/۰۹۹۳	۱/۱۱۳۷	۱/۴۱۲۹	۱/۴۱۲۸	۱/۲۴۱۳	۵/۶۹۲۹	۶/۰۲۴۷	۶/۲۷۳۶	۵/۸۵۸	کویر
-۰/۷۳۱۵	-۰/۷۳۸۵	-۰/۷۴۸۵	-۰/۷۳۳۸	۱/۸۷۳۶	۲/۹۳۸۹	۲/۴۰۱۳	۲/۱۴۷۸	۵/۶۸۲۲	۷/۰۹۵۹	۸/۱۰۶۶	۶/۰۵۶	-۰/۸۴۲۲	۱/۱۳	۱/۳۹۵۶	-۰/۹۶۱	۴/۸۴	۵/۹۶۵۹	۶/۷۱۰۹	۵/۰۹۸	نیمروز
-۰/۷۶۸۱	-۰/۷۲۰۵	-۰/۷۶۴۳	-۰/۷۵۳۹	۱/۵۶۹۶	۲/۵۱۶۲	۲/۴۸۴۳	۲/۱۳۸۲	۶/۹۲۹۴	۷/۰۹۶	۷/۴۱۳۵	۷/۰۵۷۷	۱/۰۲۰	۱/۱۹۶۸	۱/۳۱۲	۱/۴۵۳۱	۵/۷۲۴۴	۵/۸۹۹۲	۶/۱۰۱۴	۶/۱۰۴۵	ماکویی
-۰/۷۴۵	-۰/۷۴۱۸	-۰/۷۶۵۱	-۰/۷۳۷۹	۲/۳۴۰۲	۳/۱۷۵۳	۲/۶۲۶۹	۲/۰۵۷۲	۵/۶۰۳	۸/۱۱۰۴	۶/۶۹۹۶	۶/۲۳۶	-۰/۶۹۴	۱/۱۴۵	۱/۱۳۴۱	-۰/۸۰۱۴	۴/۹۵۹	۶/۶۶۰۴	۵/۵۶۵۵	۵/۴۳۴۶	نیک
۰/۰۴۶				۰/۱۰۹				۰/۲۷۴				۰/۰۵۶				۰/۲۴۴				LSD 5%
۰/۰۳۵				۰/۰۸۳				۰/۲۰۸				۰/۰۴۳				۰/۱۸۵				LSD 1%

گروه‌ها به عنوان تکرار در نظر گرفته شدند. نتایج تجزیه بیانگر بیشترین اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) بین گروه‌ها از نظر برخی صفات مورد بررسی بود. همچنین از تابع تشخیص نیز برای تعیین صحت محل برش استفاده شد. در تجزیه خوش‌ای برای سطح دمایی شاهد ($+8^{\circ}\text{C}$), ارقام در پنج گروه توزیع شده‌اند که برای مقدار پرولین گروه سوم، برای کلروفیل^a، کلروفیل کل و کارتنتوئید گروه چهارم و برای کلروفیل^b گروه پنجم بالاترین مقدار را احراز نموده‌اند (شکل ۱).

تجزیه خوش‌ای
تجزیه خوش‌ای براساس روش "وارد" و با استفاده از ضربی مربع فاصله اقلیدسی و بر اساس صفات مورد مطالعه در دو سطح دمایی (شاهد و تنفس شدید -2°C) - انجام شد. بر این اساس ارقام مورد بررسی در سطح دمایی شاهد در پنج گروه قرار گرفتند. به منظور مقایسه میانگین گروه‌ها از نظر صفات اندازه‌گیری شده، تجزیه واریانس چند متغیره بر پایه طرح کاملاً تصادفی نامتعادل برای کلیه گروه‌های ممکن انجام شد به طوری که گروه‌ها به عنوان تیمار و ارقام درون

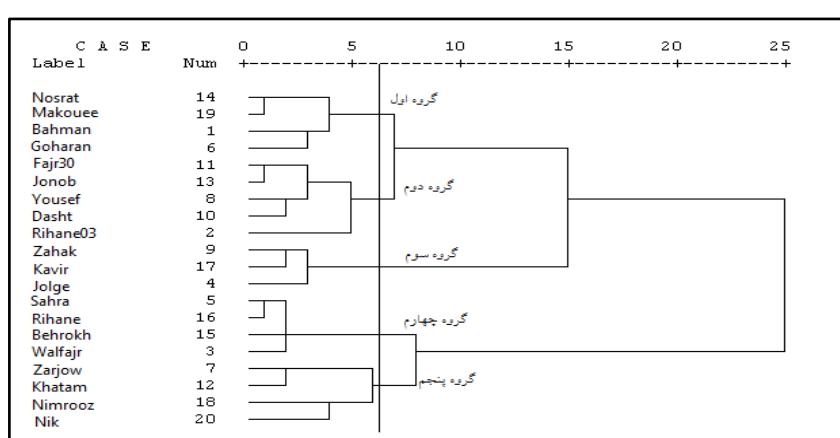


شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌ای ۲۰ رقم جو زراعی بر مبنای روش Ward تحت شرایط شاهد ($+8^{\circ}\text{C}$) برای صفات فیزیولوژیکی

Figure1. Dendrogram obtained from cluster analysis of 20 barley cultivars based on Ward method under control conditions ($+8^{\circ}\text{C}$) for physiological traits.

دوم، آن است که معنی‌داری یک صفت منجر به "جداسازی مطلوب گروه‌ها" می‌شود ولی این بدان معنی نیست که مواردی از صفات که معنی‌دار نشدند نتوان از آن‌ها در بهره‌برداری‌ها برای برنامه‌های بهنژادی استفاده کرد. نمودار مربوط به تجزیه خوش‌ای برای آخرین سطح تنفس (-2°C) نشان می‌دهند که صفات پرولین، کلروفیل^a، کلروفیل^b و کلروفیل کل توانسته‌اند پنج گروه تشکیل یافته در سطح تنفس آخر را با دقت بیشتر مقایسه کنند (شکل ۲).

بر این اساس مشاهده می‌شود که در گروه چهارم، ارقامی قابل شناسایی هستند برای صفات کلروفیل^a، کلروفیل کل و کارتنتوئید وضعیت بهتری را نشان می‌دهند و قطعاً در بعضی از برنامه‌های بهنژادی که با بررسی اجزای کلروفیل انجام شود، کاندیدهای مطلوبی خواهند بود. در خصوص معنی‌داری یک صفت در تجزیه واریانس در یک سطح دمایی و عدم معنی‌داری در سطح دمایی دیگر، در واقع شرایط محیطی دخالت دارند و این امر نمی‌تواند غیرعادی تلقی شود. نکته



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌ای ۲۰ رقم جو زراعی بر مبنای روش Ward تحت شرایط تنفس شدید (-2°C) برای صفات فیزیولوژیکی

Figure2. Dendrogram obtained from cluster analysis of 20 barley cultivars based on Ward method under severe stress conditions (-2°C) for physiological traits

از بین ۱۴ جفت نشانگر ریزماهواره، ۱۲ جفت آن توانستند الگوی نواری چندشکل و قابل امتیازدهی را ایجاد کنند، جهت ارزیابی تنوع مولکولی روی ۲۰ رقم جو زراعی استفاده گردید. پس از انجام واکنش PCR جهت تعیین میزان چندشکلی و میزان تنوع مخصوص PCR بر روی ژل متافور - آگارز %۳ بارگذاری شد و در نهایت امتیازدهی صفر و یک به ترتیب به غیاب و حضور آلل های هر لوکوس مارکری تعلق گرفت. تعداد ۲۹ آلل در بررسی حاضر به کمک آغازگرهای ریزماهواره تکثیر شدند (جدول ۳).

بررسی ارقام مطلوب در بخش تجزیه خوشبای در دمای تنش (۲۰°C)، نشان می دهد که صفت پرولین که در گروه سوم بالاترین مقدار را به خود اختصاص داده است، شامل ارقامی است (جلگه، کویر و زهک) که بالاترین میزان این صفات را دارند که می تواند تأییدی بر صحبت نتایج قبلی باشد. برای رنگیزه های گیاهی شامل سه فرم کلروفیل (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) گروه دوم شامل بالاترین میزان این صفات بود که ارقام یوسف و فجر که در نتایج قبل بیشترین میزان این صفات را داشتند، در این گروه جای دارند.

جدول ۳- مکان کروموزومی، تعداد آلل و محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرهای SSR برای ۲۰ رقم جو
Table3. Chromosomal location, number of alleles and polymorphism information content of SSR markers for 20 barley cultivars

رشانگر	مکان کروموزومی	تعداد آلل	شاخص شانون	محوای اطلاعات چندشکلی	فراوانی آلل رایج	تعداد آلل موثر	محدوده اندازه (باندها) (bp)
Bmag0120	VH	۲	-۰.۶۴	-۰.۴۵	-۰.۶	۱/۸۲۳۶	۲۲۶-۲۷۰
Bmag0603	۳H	۲	-۰.۶۸	-۰.۴۸۷۵	-۰.۵۵	۱/۹۵۱۶۵	۱۱۲-۱۸۸
Bmag0006	۳H	۳	-۰.۳۵	-۰.۲۵۵	-۰.۸۵	۱/۲۶۳۲	۱۵۸-۲۳۰
EBmac0684	۵H	۱	-۰.۴۲	-۰.۲۵۵	-۰.۸۵	۱/۳۳۲۳	۱۷۲-۱۸۴
EBmac0602	۶H	۳	-۰.۵۸	-۰.۴۹۱۷	-۰.۶	۱/۶۶۴۷	۱۹۶-۲۴۰
HVM20	۱H	۲	-۰.۲۶	-۰.۱۸	-۰.۹	۱/۱۶۲۵	۱۵۰-۱۷۲
Bmag0189	VH	۱	-۰.۶۹	-۰.۴۹۵	-۰.۴۵	۱/۹۸۰۲	۱۵۱-۱۸۵
EBmac0679	۴H	۴	-۰.۶۲	-۰.۴۲۷۵	-۰.۴۵	۱/۷۵۷۱	۱۲۰-۱۷۰
Bmag0518	۲H	۳	-۰.۶	-۰.۴۱	-۰.۵	۱/۷۵۵۱	۱۴۰-۲۳۰
EBmac0775	۴H	۳	-۰.۴۹	-۰.۴۵	-۰.۸۵	۱/۵۸۴۰۷	۱۳۸-۱۶۰
Bmag0337	۵H	۳	-۰.۶۱	-۰.۴۲۵	-۰.۷	۱/۷۴۹۰۷	۱۳۰-۱۶۸
Bmag0375	۴H	۲	-۰.۵۹	-۰.۴	-۰.۳	۱/۶۶۲۰۵	۱۳۵-۱۵۰
میانگین	-	۲/۴۲	-۰.۵۴	-۰.۳۸	-۰.۶۳	۱/۶۴	-

۴۴ جفت آغازگر ریزماهواره، ۲۶۸ آلل چندشکل با میانگین ۷/۴۴ به ازای هر جایگاه تکثیر گردند. که متوسط PIC در این بررسی برابر ۰/۳۴ بود (۹). از طرف دیگر شاخص شانون معیار مهم دیگری برای ارزیابی کارایی نشانگر و تعیین چندشکلی است. میانگین شاخص شانون ۵/۵ براورد شد و بیشترین و کمترین مقدار آن به نشانگر Bmag0198 (۰/۶۹) و Hvm20 (۰/۲۶) تعلق داشت. از این رو می توان دریافت که هر چه شاخص شانون بیشتر باشد، تنوع ژنتیکی بالاتری در بین ارقام مورد بررسی مشاهده می شود. دامنه تعداد آلل موثر از ۱/۱۶ برای نشانگر20 Hvm20 تا ۱/۹۸ برای نشانگر Bmag0189 متغیر بود. میانگین تعداد آلل موثر برابر ۱/۶۴ براورد شد. تعداد آلل موثر نشاندهنده حضور تعداد آلل هایی است که می توانند در یک مکان ژئی در جمعیت وجود داشته باشند. تعداد آلل موثر از محاسبه تعداد آلل و فراوانی آنها به دست می آید. در مطالعه ای بر روی گیاه جو بیشترین تعداد آلل موثر با مقدار ۱۰/۷۹ متعلق به نشانگر Bmac0323 و کمترین تعداد آلل موثر مربوط به نشانگر GBM1176 با مقدار ۱/۴۴ براورد گردید (۱۷). در این مطالعه فراوانی آلل رایج (آلی) که بیشترین فراوانی را بین آلل های یک جایگاه دارد، از ۰/۳ (Bmag0375) تا ۰/۹ (Hvm20) با میانگین ۰/۶۳ متفاوت بود. مقایسه دو پارامتر PIC و فراوانی آلل رایج در جایگاه های ریزماهواره نشان داد که نشانگرهایی با PIC بالا، فراوانی آلل رایج کمتری

نتایج بخش مولکولی میانگین کل آلل های مشاهده شده به ازای هر لوکوس ۲/۴۲ به دست آمد، که بیانگر کارا بودن نشانگرهای ریزماهواره است. بیشترین تعداد آلل، مربوط به جایگاه EBmac0679 و برابر چهار آلل و کمترین تعداد آلل مربوط به نشانگرهای EBmac0684 و Bmag0189 با یک آلل بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) شاخصی است که به وسیله آن می توان به ارزش یک نشانگر برای نشان دادن چندشکلی درون جمعیت پی برد. PIC یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها بوده و معیار دقیقی است که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه عمل می کند (۶). متوسط PIC بدست آمده برای ۱۲ جفت نشانگر ۰/۳۸ بود. بیشترین مقدار PIC به نشانگر Bmag0189 با مقدار ۰/۴۹۵ و کمترین میزان آن مربوط به نشانگر Hvm20 با میزان ۰/۱۸ تعلق داشت (جدول ۳). در نهایت می توان بیان کرد که نشانگر Bmag0189 با داشتن بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در این مطالعه به عنوان بهترین نشانگر جهت آنالیز تنوع ژنتیکی شناسایی شد. این در حالیست که نشانگر Hvm20 با کمترین مقدار شاخص چندشکلی، توانایی جداسازی ارقام را با دقت بالا نداشت. در پژوهشی با مطالعه ۱۴ نمونه جو بومی و زراعی با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر SSR، میانگین PIC و تعداد آلل را به ترتیب ۰/۵۳ و ۰/۸۷ بدست آورند (۱۴). همچنین در بررسی ۳۵ رقم جو براساس

EBmac0679 و EBmac0602 را با دو صفت (کارتنتوئید و پروولین) در شرایط شاهد، ارتباط معنی‌دار شش نشانگر Bmag0006، Bmag0375، Bmag0603، Bmag0375، Bmag0602 و EBmac0602 را با دو صفت در شرایط تنش 2°C ، ارتباط معنی‌دار شش نشانگر ۱۸ Bmag0518، EBmac0684، Bmag0337، Bmag0602، Bmag0375، EBmac0679 و EBmac0602 را با چهار صفت مورد بررسی در شرایط 0°C (صفر درجه سانتی‌گراد) و ارتباط معنی‌دار چهار نشانگر (Bmag0120، Bmag0006، Bmag0337 و Bmag0375) را با دو صفت در دمای تنش -2°C - نشان دادند (جدول ۴). در سطح دمایی شاهد برای تمامی صفات مذکور، بیشترین ضریب تبیین مربوط به نشانگر Bmag0375 به میزان 0.37 بود. در سطح دوم دمایی (3°C) بیشترین ضریب تبیین پروولین بود. در سطح دوم دمایی (0.43) مربوط نشانگر Bmag0337 برای صفت فیزیولوژیک پروولین به دست آمد. برای سطح دمایی 0°C بیشترین ضریب تبیین به میزان 0.29 به نشانگر Bmac0518 و کلوفیل a تعلق داشت و در آخرین سطح دمایی (-2°C) بیشترین ضریب تبیین در بین نشانگرهای آگاهی‌بخش مربوط به نشانگر Bmag0375 و صفت کارتنتوئید با میزان 0.44 برآورد شد. بر طبق جدول ۴ روند وجود نشانگرهای تکراری در بین صفات مورد بررسی حاکم است. مفهوم شناسایی‌های مشابه آن است که به همراه جایگاه نشانگری مربوط، آللی وجود دارد که محصول بیان آن در سنتر صفات مذکور دخالت دارد (اثرات پلیوتروپیک). در بیان دیگر حتی می‌توان وجود آلل‌های متفاوت را در پیوستگی شدید با جایگاه‌های نشانگری در نظر گرفت که هر کدام به طور مستقل در سنتر هر یک از این صفات مؤثرند. نکته دیگری که از وجود نشانگرهای حاوی اطلاعات به ازای هر صفت در چهار سطح دمایی تنش استنطاق می‌گردد آن است که صفت پروولین با توجه به تغییرات دما، از وجود یک یا چند آلل برای حفظ بقای خود بهره می‌برد. نکته قابل ملاحظه دیگر آن است که گاهی یک نشانگر به ازای دو سطح دمایی در خصوص کنترل یک صفت، حضورش اثبات شده است. این وضعیت نشان می‌دهد که با تغییر دما، بیان آلل حاضر در جایگاه نشانگری متوقف نگردیده است (حضور Bmag0375 در سطح شاهد، $+2^{\circ}\text{C}$ و -2°C ، نشانگر EBmac0602 در سطوح شاهد و $+2^{\circ}\text{C}$ ، Bmag0006 در سطوح $+2^{\circ}\text{C}$ و -2°C برای صفت پروولین). در مورد جایگاه نشانگری Bmag0006 نکته قابل توجه آن است که این جایگاه هم حضور خود را در پروولین و هم در کارتنتوئید بروز داد که احتمالاً بتوان در این خصوصیاً با از حضور دو آلل مختلف در این جایگاه و یا از اثرات پلیوتروپیک یک آلل موجود در جایگاه اخیر برای توجیه این حضور مشترک استفاده نمود. به طورکلی، درمورد نشانگرهایی که با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند، می‌توان دریافت که این صفات یا پیوستگی بالایی با همدیگر دارند و یا احتمالاً به صورت ژن‌های چنداثره در مکان‌های کروموزومی مستقر هستند. برای اطمینان از وجود ارتباط پیوستگی بین نشانگرهای و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های در حال تفرقی مانند F2، RIL (لاین‌های ایندرو نوترکیب) و DH

داشتند. بنابراین جایگاه‌هایی با فراوانی آلل رایج کمتر قدرت تمایز بیشتری خواهند داشت. در بررسی صورت گرفته برای شاخص فراوانی آلل رایج کمترین میزان 0.13 برای نشانگر Hvm14 و بیشترین مقدار آن 0.53 برای نشانگر Hvm20 برآورد شد که دارای میانگین با مقدار 0.31 بود. در تحقیقی دیگر فراوانی آلل رایج در آغازگرهای مورد بررسی در محدوده 0.13 / 0.97 برای آغازگر Ebmac0788 و GBM1411 با میانگین 0.56 به دست آمد (۲۸).

تجزیه خوشای مولکولی

تجزیه خوشای بر مبنای ضریب تشابه دایس^۱ با استفاده از الگوریتم UPGMA برای 20 رقم با به کارگیری نرم‌افزار NTSYS pc ver. 2.02 ارقام بر اساس داده‌های SSR، ارقام را در چهار گروه طبقه‌بندی کرد (ارقام بهمن، ریحان^۳، صحراء، زهک، دشت، خاتم، جنوب، ریحان، کویر، تیک و نیمروز در گروه اول، ارقام والفجر، جلگه و ماکویی در گروه دوم، ارقام گهران، زرجو، یوسف، فجر، نصرت در گروه سوم و رقم بهرخ به تهایی در گروه چهارم) (شکل ۳). رقم بهرخ از لحاظ نشانگرهای مورد بررسی تفاوت بیشتری با بقیه ارقام داشت. از طرفی ژنتیکی که در یک گروه قرار دارند، می‌تواند بینگر این باشد که ارقام که در این گروه قرار دارند، مشاهده اتفاق افتاده است. دندروگرام حاصل به طور نسبی تطابق خوبی با اطلاعات شجره‌ای و تیپ رشدی در ارقام مورد بررسی داشت، اما قرار نگرفتن برخی ارقام در کنار هم را می‌توان ناشی از عدم پوشش کامل ژنوم توسط نشانگرهای مورد مطالعه و تعلق مکان ریزماهواره به بخش غیرکشونده که در بروز صفات نقش ندارند، دانست. توجه به این مسئله مهم است که اگر بین دسته‌بندی حاصل به طور نسبی تطابق خوبی با صفات زراعی هماهنگی وجود نداشته باشد، ایرادی به دندروگرام حاصل از آزمایش‌های مولکولی وارد نمی‌شود. چرا که صفات کمی از توارث‌پذیری بسیار پایینی برخوردار هستند و محصول اثر کل ژنوم به همراه تأثیر محیط هستند در حالی که نشانگرهای مولکولی مانند SSR به دلیل تعداد محدود آغازگر، بخش کوچکی از ژنوم را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (۲۹). در این راستا، در مطالعه‌ای تبع ژنتیکی موجود در سه گروه ژنتیکی جو (ژنتیکی بومی، لاین‌های خالص و ارقام تجاری) با منشأ ترکیبی با استفاده از 30 جفت آغازگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از 20 آلل تولید شده ژنتیکی‌ها به پنج گروه تقسیم شدند. ارقام تجاری، یک ژنتیکی بومی و یک لاین خالص در یک گروه و بقیه ژنتیکی‌ها بومی در چهار گروه باقیمانده قرار گرفتند (۱۵).

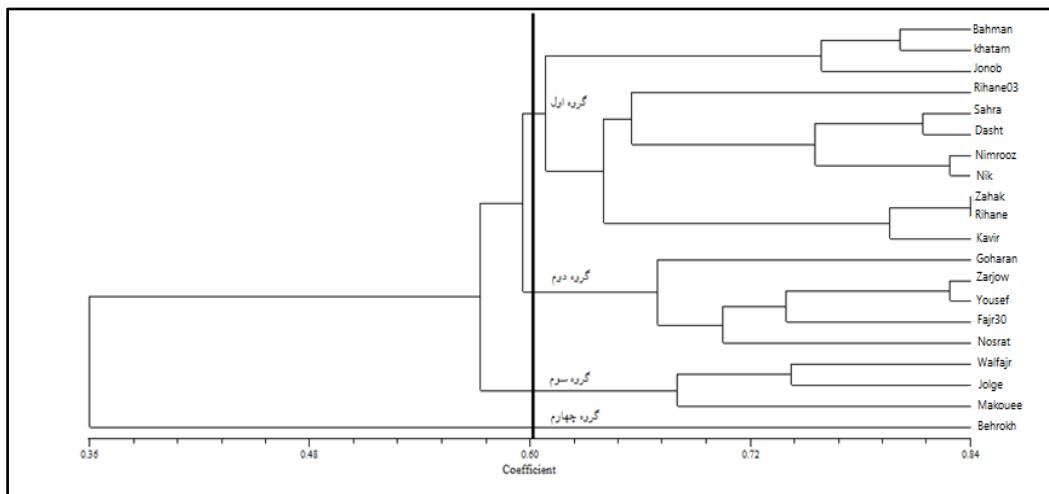
تجزیه ارتباطی^۲

به منظور تعیین ارتباط بین صفات فیزیولوژیکی با داده‌ها مولکولی در ارقام موردنظر و شناسایی نشانگرهایی که بطور بالقوه با این صفات همبستگی دارند، از روش رگرسیون گام به گام استفاده شد. نتایج حاصل از رگرسیون، ارتباط معنی‌دار شش نشانگر Bmag0375، Bmag0006، EBmac0775 و EBmac0375

مجاورت این نشانگرها قرار دارد و برای بهبود صفات مربوطه می‌توان از این نشانگرها به منظور انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد. بر اساس مطالعاتی نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیمهای مختلف رشدی در جو با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباطی، شناسایی گردید.

(۱۲)

(دابل‌هایپلوبید) می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها مشخص شوند (۸). به طور کلی با استفاده از نتایج بدست آمده از این قسمت، مشاهده گردید که در هر ناجبه، ارتباط تفرق نشانگرها با صفات مختلفی معنی‌دار گردید، که این معنی‌داری بیانگر این است که احتمالاً بخشی از ژن‌های کنترل کننده این صفات در



شکل ۳-نمودار تجزیه خوشه‌ای ۲۰ رقم جو بر اساس ضریب تشابه دایس به روش UPGMA
Figure 3. Cluster analysis diagram of 20 barley cultivars based on Dice similarity coefficient by UPGMA method

جدول ۴- تعداد نشانگرهای پیوسته با صفات فیزیولوژیکی و درصد تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرها
Table 4. The number of linkage markers with physiological traits and the percentage of justified changes in these traits with the help of marker

نشانگرهاي مرتب	R ² total	R ² max	R ²	تعداد نشانگر	سطح دمایي	صفت
Bmac0518	.۰/۵۷۴۹	.۰/۲۹۲۱	.۰/۹۲۱			
Bmag0337			.۰/۹۷۶۱	۳	.	a کلروفیل
EBmac0684			.۰/۶۷۴۹			
EBmac0602	.۰/۱۴۷۷	.۰/۱۴۷۷	.۰/۱۴۷۷	۱	.	b کلروفیل
Bmac0518	.۰/۴۱۹۷	.۰/۲۲۲۱	.۰/۲۲۱	۲	.	کلروفیل کل
EBmac0684		.۰/۴۱۹۷				
Bmag0006	.۰/۲۱۹۸	.۰/۲۱۹۸	.۰/۲۱۹۸	۱	+۸	
Bmag0006			.۰/۲۸۶۷			
Bmag0375	.۰/۸۵۰۶	.۰/۲۸۶۷	.۰/۵۶۸۸	۴	+۲	
Bmag0603			.۰/۷۳۴۶			
Bmag0337			.۰/۸۵۰۶			
EBmac0602			.۰/۲۷۶۵			کارتنتوئید
Bmag0375			.۰/۰۱۶۱			
EBmac0679	.۰/۷۴۹۵	.۰/۲۷۶۵	.۰/۶۵۶۷	۴	.	
EBmac0684			.۰/۷۴۹۵			
Bmag0375	.۰/۵۹۲	.۰/۴۴۰۵	.۰/۴۴۰۵	۲	-۲	
Bmag0120		.۰/۵۹۲	.۰/۵۹۲			
Bmag0375			.۰/۳۷۲۳			
EBmac0775	.۰/۸۷۳۶	.۰/۳۷۲۳	.۰/۵۶۶۳	۵	+۸	
EBmac0602			.۰/۶۹۹۵			
EBmac0679			.۰/۸۱۷۲			
Hvm20			.۰/۸۷۲۶			
Bmag0337			.۰/۸۷۲۶			
Bmac0518			.۰/۶۱۷			
Bmag0006	.۰/۸۷۲۴	.۰/۴۳۵۳	.۰/۷۳۲۴	۵	+۲	پرولین
EBmac0602			.۰/۱۱۵۲			
Bmag0375			.۰/۸۷۲۴			
Bmag0337			.۰/۱۹۸۳			
Bmag0375	.۰/۶۳۲۹	.۰/۲۹۸۳	.۰/۵۱۹۹	۳	-۲	
Bmag0006		.۰/۶۳۲۹	.۰/۶۳۲۹			

R^2 و R^2_{total} به ترتیب بیشترین ضریب تبیین مربوط به یک نشانگر برای صفت کمی و مجموع کل ضریب تبیین نشانگرها برای صفات کمی

ارقام با یکدیگر متفاوتند. با توجه به نکات اخیر امکان شناسایی نشانگرهایی وجود دارد که با آلل‌های بسیار ارزشمند در تحمل سرمای بهاره در هر یک از صفات مورد مطالعه پیوستگی داشته باشد که در تولید ارقام متحمل به سرما با تجمیع آلل‌های مرتبط با این ویژگی در برنامه‌های بهترادی کاربرد خواهد داشت. شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای تسریع انتقال صفات موردنظر به ارقام دیگر و ردیابی آن‌هاست. اصولی‌ترین روش شناسایی این نشانگرها تهیه جمعیت‌های در حال تفرق و پس از آن ردیابی صفات کیفی و یا کمی در این جمعیت‌ها می‌باشد، تا براساس آن نشانگرها پیوسته شناسایی شوند (۲۳).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از موسسه تحقیقات تهیه نهال و بذر کرج، بخش غلات به پاس مساعدة در انجام این طرح کمال تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

پس از بررسی صفات مذکور و تعیین پلی ژنیک بودن آن‌ها، نکته بسیار ارزشمند دیگر آن است که مواردی از ارقام بهاره جو مشاهده شده که از ارقام زمستانه مقادیر بیشتری از صفات فیزیولوژیک مورد بررسی را در تحمل به تنش سرمای دیررس از خود بروز دادند. به عبارت دیگر این ارقام از یک روند واکنش ثابت در مواجهه با افزایش تدریجی تنش سرما برخوردار نیستند. نکته‌ای که در تمامی تحقیقات انجام یافته مشاهده شده است، به نظرم رسید که این وضعیت ناشی از نوعی توانایی‌ها و پتانسیل‌های ویژه‌ی هر رقم است که به تاسب تغییر شرایط محیطی یا از طریق پایداری عناصر موثر در ایجاد تحمل نظری حفظ مقدار کلروفیل و یا از طریق تجزیه ترکیبات فیزیولوژیک و در اختیار گیاه قراردادن به منظور ایجاد تحمل (تولید پرولین) و بالاخره از طریق سنتز متabolیت‌های جدید (پلی‌پیتیدهای مربوطه) باشد و چون امکانات گیاه در این موارد بسیار متعدد است، بنابراین هر رقم در مواجهه با تغییر شرایط محیطی، از گروهی از این مواد بهره‌برداری می‌کند که در اندازه و قدرت هر یک از آن‌ها،

منابع

1. Abdollahi-Sisi, N., S.M. Mohammadi, S.S. Alavi-kia and B. Sadeghzadeh. 2012. Efficiency of EST-SSR markers in determination genetic diversity and relationships of barley landraces. *Cereal Research*, 93: 123-133.
2. Ahmadi, K., H.R. Ebadzadeh, F. Hatami and A. Kazemian. 2019. Amarnameh vezarat jahad keshavarzi, 95 pp.
3. Askary Kelestanie, A.R., A. Asadi, R.G. Mirfakhrai and A.R. Abasi. 2016. Evaluation of Some Bread Wheat Genotypes in the Reproductive Stage under Pattern Chilling Stress Journal of Crop Breeding, 8: 77-86 (In Persian).
4. Bates, L.S., R.D. Walderen and I.D. Taere. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies Plant Soil Journal, 39: 2 Journal of Crop Breeding, 8(17): 205-207 (In Persian).
5. Bhatt, G.M. 1973. Significance of path coefficient analysis in determining the nature of character association. *Euphytica*, 22: 338-343.
6. 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". *American Journal of Human Genetics*, 32(3): 314-331.
7. Esra, C.D.A. and U. Sulun. 2010. Effect of Cold on Protein, Proline, Phenolic Compounds and Chlorophyll Content of Two Pepper (*Capsicum annuum* L.) Varieties. G.U. Journal of Science, 23: 1-6.
8. Fakheri, B.A. and L. Mehravaran. 2013. Locating QTLs controlling agronomic traits of "Steptoe×Morex" derived double haploid population of barley under drought stress conditions. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 44: 47-57 (In Persian).
9. Ganjkhanehloo, E., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam, K. Ghassemi Golezani, M.R. Shakiba, and A. Yousefi. 2012. Genetic diversity in barley as revealed by microsatellite markers and association analysis of these markers by traits related to freezing tolerance. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28-1(1): 101-114 (In Persian).
10. Ghorbani, A., F. Zarinkamar and A. Fallah. 2009. The Effect of Cold Stress on the Morphologic and Physiologic Characters of Two Rice Varieties in Seedling Stage. *Journal of Crop Breeding*, 1(3): 50-66 (In Persian).
11. Hartmut, K. and F. Babani. 2000. Detection of photosynthetic and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 889-895.
12. Ivandic, 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.
13. Joshi, S.P., P.K. Ranjekar, and V.S. Gupta. 1999. Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science*, 77: 230-240.
14. Kadri, K., R. Abdellawi and H. Cheikh-Mohamed. 2009. Genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis. *Biological Diversity and Conservatio*, 2: 27-35.

15. Kandemir, N., A. Yildirim and R. Gunduz. 2010. Determining the levels of genetic variation using SSR markers in three Turkish barley materials known as Tokak. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 34: 17-23.
16. Koc, F., N. Kalay, I. Ardic, K. Ozbek, A. Celik, K. Ceyhan, H. Kadi, M. Karayakali, S. Sahin, F Altunkas, O. Onalan and M.G. Kaya. 2011. Antioxidant status and levels of antioxidant vitamins in coronary artery ectasia. *Coron. Artery Disease*, 22(5): 306-310.
17. Lahoot, F., M. Zeinolabedini, J. Karimi, M. Shahbazi and B. Sadeghzadeh. 2016. Assessment of genetic diversity of Iranian and non-Iranian barely genotypes (*Hordeum vulgare L.*) using SSR markers. *Journal of Crop Biotech*, 15: 25-35 (In Persian).
18. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methodes in Enzymology*, 148: 350-382.
19. Mahfoozi, S., A.E. Limin, F. Ahakpaz and D.B. Flower. 2006. Phenological development and freezing resistance in wheat under field conditions in North-West Iran. *Field Crop Research*, 97: 182-187.
20. Mahfoozi, S., E. Majidi, M. Taeb and A. Taleii. 1994. Methodology of evaluating of cold tolerant sources in wheat cultivars. M.Sc. Dissertation. Univ. Azad Islamic, Karaj, Iran.
21. Mango, T., F. Carrierosu, R.A. Cifavell, M. Gallitelli and F. Callini. 2001. Development of microsatellite markers in durum wheat (*Triticum turgidum L. ssp durum*). *Chinese Journal of Genetics*, 33: 917-928.
22. Mostowska, A. 1997. Environmental factors affecting chloroplasts. In: M. Pessarakli (ed.) *Handbook of photosynthesis*, 407-426.
23. Naghavi, M.R., M. Moghaddam, M. Toorchchi and M.R. Shakiba. 2016. Evaluation of spring wheat cultivars for physiological, morphological and agronomic traits under drought stress. *Journal of Crop Breeding*, 8: 64-77 (In Persian).
24. Nuccio, M.L., D. Rhodest, S.D. Rhodest and A.D. Hanson. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance, *Current Opinion in Plant Biology*, 2(2): 128-134.
25. Pecetti, L. and M.M. Nachit. 1993. Phenotypic variation of durum wheat landraces from Morocco. Influence of some feature of the collecting site. *Agricoltura mediterranea journal*, 123: 243-251.
26. Saghai-Marof, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 81:8014-8018.
27. Shroyer, J.M., M.K. Mikesell and G.M. Paulsen. 1995. Spring freeze injury to Kansas wheat. Kansas State University.
28. Shuorvazdi, A., S.A. Mohammadi, M. Norozi and B. Sadeghzadeh. 2013. Molecular analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. *Journal of Plant Genetic Research*. 51-64.
29. Soleimani, V.D., B.R. Baum and D.A. Jonson. 2002. AFLP and pedigree- based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum L.*]. *Theoretical and Applied Genetic*, 104: 350-357.
30. Suriyan, C. and K. Chalermpol. 2009. Effect of salt stress on proline accumulation photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pakistan journal of botany*, 41(1): 87-98.
31. Thomas, J.C., R.L. De Armond and H.J. Bohnert. 1992. Influence of NaCl on growth, proline, and phosphoenolpyruvate carboxylase levels in *Mesembryanthemum crystallinum* suspension cultures. *Plant Physiol*, 98: 626-631.
32. Yau, S.K.j., G. Ortiz-ferrara and J.P. Srivastava. 1989. Cluster analysis of bread wheat lines grown in diverse rainfed environments. *Rachis*, 8(2): 31-35.
33. Zadoks, J.C., T.T. Chang and C.F. Konzak. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14: 415-421.
34. Zobel, R.W., M.J. Wright and H.G. Ganch. 1988. Statistical analysis of yield traits. *Agronomy Journal*, 88: 338-343.

Study on Genetic Diversity of some Barley (*Hordeum vulgare L.*) Cultivars using SSR Marker and Physiological Traits Plant Pigments and Proline under Late Cold Stress

Kosar Haghpanah¹, Reza Gholi Mirfakhraee², Mostafa Khodadadi³ and Sahar Shamsifar⁴

1 and 4- Graduated M.Sc. Student, Tarbiat Modares University

2- Assistant Professor, Genetic and Plant Breeding Department, Tarbiat Modares University

(Corres Pending author: Abdhoorz@modares.ac.ir)

3- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO)

Received: March 30, 2020 Accepted: May 18, 2020

Abstract

Plants are often exposed to a wide range of abiotic stresses, which have adverse effects on the survival, growth, quality, and quantity of crops. Coldness is one of these stresses that the late spring cold can cause great damages to the crop (cereal) planting during the reproductive period. The purpose of this research was to investigate the effect of spring cold on the physiological traits, associated with stress toleration including proline amino acid, and pigments (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoid) in the reproductive stage. To this end, an experiment was conducted in a controlled condition (greenhouse) with a combined analysis model based on a completely randomized design in four media (control temperature level of +8°C, +2°C, 0°C, and -2°C) for 20 cultivars of barley and three replication in the Faculty of Agriculture of Tarbiat Modares University, Iran, in 2016-17. The results of the analysis of variance showed that cold stress levels, cultivar, and interaction of cultivar on cold were significant for all the traits at 1% probability level. Cold-tolerant cultivars had higher levels of proline (Jolgeh cultivar) and plant pigments (Yousef and Nik) at different levels of cold stress. The cluster analysis was performed through the Ward method using the Euclidean distance coefficient to determine the genetic relationships between the studied cultivars, and the studied cultivars were divided into five groups at the control and severe stress (-2°C) levels and tolerated cultivars were grouped together. 12 pairs of microsatellite primers were used to study the genetic diversity in the molecular segment and the average polymorphism content information was estimated as much as 0.38. The cultivars were grouped through the Dice similarity coefficient as well as cluster analysis via the UPGMA model, and 20 cultivars of barley were divided into 4 groups. The results of correlation analysis through stepwise regression analysis showed a high correlation (highest coefficient of explanation) for Bmag0337 indicator with proline ($R^2=0.43$), Bmac0518 indicator with chlorophyll a and total chlorophyll ($R^2=0.29$), EBmac0602 indicator with chlorophyll b ($R^2=0.15$), and Bmag0375 ($R^2=0.44$) with carotenoid trait.

Keywords: Barley, Genetic Diversity, Microsatellite Marker, Spring Cold Stress