



University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

Cereal Research

Vol. 14, No. 3, Autumn 2024 (309-328)

doi: 10.22124/CR.2024.27831.1827

pISSN: 2252-0163 eISSN: 2538-6115



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Association analysis for proline and fructan content in barley (*Hordeum vulgare* L.) under late spring cold stress using microsatellite markers

Fatemeh Abbaszadeh Panjali Kharabasi¹, Reza Darvishzadeh^{2*}, Seyed Reza Gholi Mirfakhraei³, and Farshid Chamani Balabiglo⁴

1. Graduate M.Sc., Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran (* Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
3. Assistant Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Comprehensive abstract

Introduction

Biotic and abiotic environmental stresses reduce the quantity and quality of agricultural products. Late spring cold stress, if it occurs, can cause significant damage to farmers and producers depending on the growth stage of the crop plants. Association analysis allows for the rapid and initial identification of quantitative trait loci based on linkage disequilibrium. This method is a powerful tool for explaining the genetics of complex agricultural traits and identifying alleles controlling these traits. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity, population structure, linkage disequilibrium pattern and association analysis of some physiological traits of cultivated barley genotypes under late spring cold stress conditions using microsatellite (SSR) markers.

Materials and methods

The plant materials of this study were 60 cultivated barley genotypes including 20 commercial and 40 landraces, which were obtained from the Seed and Plant Improvement Research Institute, Karaj, Iran. The experiment was carried out as a factorial in a completely randomized design with three replications. The studied genotypes were placed under cold stress (+8 and -2 °C) at the reproductive stage (heading and flowering, Zadoks 68-50) and physiological data were measured and collected. Analysis of variance and comparison of means were performed by Tukey's test at a probability level of 5% using SAS software version 9.4. software version 9.4. Also, genomic DNA was extracted using the CTAB method and its quality and quantity were determined using 1% agarose gel electrophoresis and spectrophotometer, respectively. To assess molecular diversity among the studied barley genotypes, DNA samples were amplified by 20 SSR markers using polymerase chain reaction (PCR) and the PCR products were loaded on metaphor-agarose gels. After electrophoresis, the bands in the gels were scored as co-dominant, and then the number of alleles, common allele frequency, marker discrimination power, polymorphic information content (PIC) and gene diversity were calculated using POWER MARKER software. Effective population structure analysis was also conducted using the Bayesian method in the Structure software. To identify genomic regions associated with the measured traits, association analysis based on mixed linear model (MLM) was conducted in TASSEL software, considering the population structure (Q) and the kinship (K) matrices as covariate variables.



Research findings

The results of the variance analysis for the physiological data indicated significant differences in all studied traits among barley genotypes under both temperature conditions of 8 °C and -2 °C. According to the mean comparison results, the highest amount of proline was observed in the local varieties Sahra and Jonoob at 8 °C, while in the -2 °C conditions, the highest levels were found in the genotypes Naik and Zahek. Conversely, the lowest proline levels at both temperature conditions were identified in the genotypes TN-02-6297 and TN-02-6400. Therefore, the two local varieties Naik and Zahek, with their higher proline levels at -2 °C, are introduced as cold-tolerant genotypes against late spring frost stress. Regarding fructan, this study also revealed that at 8 °C, the highest and lowest fructan levels were observed in the genotypes TN-02-6734 and TN-02-4975, respectively. Additionally, under -2 °C conditions, these values were recorded in the genotypes Bahman and TN-02-4952. Polymorphic information content varied from 0.59 for the marker Bmag0007 to 0.82 for the marker Bmag0032. The gene diversity ranged from 0.63 to 0.84, with an average of 0.74, and the frequency of common alleles varied from 0.21 to 0.52. Population structure analysis indicated the presence of two subpopulations among the studied barley genotypes. The results of association analysis based on the mixed linear model (MLM) identified five significant marker-trait associations ($P < 0.05$). Among these, three markers (Bmag0518, Bmag0211, and Ebmac0674) were significantly associated with proline-controlling genes under -2 °C conditions, one marker (Bmag0223) was associated with proline-controlling genes under +8 °C conditions, and one marker (Bmag0173) was linked to fructan-controlling genes under +8 °C conditions. Additionally, no marker was identified with a significant association for fructan levels under -2 °C conditions.

Conclusion

The results of the association analysis in this study showed that five markers, Bmag0518, Bmag0211, Ebmac0674, Bmag0223 and Bmag0173, had a significant association with the proline and fructan contents in barley under cold stress conditions. These markers, after validation with complementary tests, can be utilized in breeding programs by marker-assisted selection (MAS) to improve cold resistance in barley.

Keywords: Genetic diversity, Marker-assisted selection (MAS), Marker-trait association, Mixed linear model, Population structure

Received: July 25, 2024

Accepted: October 30, 2024

Cite this article:

Abbaszadeh Panjali Kharabasi, F., Darvishzadeh, R., Mirfakhraei, S. R. G., & Chamani Balabiglo, F. (2024). Association analysis for proline and fructan content in barley (*Hordeum vulgare* L.) under late spring cold stress using microsatellite markers. *Cereal Research*, 14(3), 309-328. doi: [10.22124/CR.2024.27831.1827](https://doi.org/10.22124/CR.2024.27831.1827).



تجزیه ارتباط برای محتوای پرولین و فروکتان در جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت تنش سرما دیررس بهاره با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

فاطمه عباس‌زاده پنجعلی خرابسی^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*}، سید رضاقلی میرفخرایی^۲ و فرشید چمنی بالابیکلو^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (* نویسنده مسئول):

r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

۳- استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، پردیس کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده جامع

مقدمه: تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی، کمیت و کیفیت محصولات زراعی را کاهش می‌دهند. سرما دیررس بهاره، در صورت بروز قادر است متناسب با مراحل رشدی محصول، آسیب‌های زیادی به کشاورزان و تولیدکنندگان وارد کند. تجزیه ارتباطی امکان شناسایی اولیه و سریع جایگاه صفات کمی بر اساس عدم تعادل پیوستگی را فراهم می‌کند. این روش ابزار قدرتمندی جهت تشریح ژنتیک صفات پیچیده زراعی و شناسایی آلل‌های مؤثر بر کنترل این صفات است. هدف از این مطالعه، ارزیابی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت، الگوی عدم تعادل پیوستگی و تجزیه ارتباطی برخی صفات فیزیولوژیک در جو زراعی تحت شرایط تنش سرما دیررس بهاره با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره (SSR) بود.

مواد و روش‌ها: مواد گیاهی این تحقیق، تعداد ۶۰ ژنوتیپ جو زراعی شامل ۲۰ ژنوتیپ تجاری و ۴۰ ژنوتیپ بومی بود که از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مرحله زایشی (سنبل‌دهی و گلدهی، زادوکس ۶۸-۵۰) تحت تنش سرما (+۸ و -۲) درجه سلسیوس) قرار گرفتند و سپس داده‌های فیزیولوژیک اندازه‌گیری و جمع‌آوری شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. علاوه بر این، DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB استخراج و کیفیت و کمیت آن به‌ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد. جهت ارزیابی تنوع مولکولی بین ژنوتیپ‌ها، نمونه‌های DNA با استفاده از ۲۰ نشانگر SSR طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر و محصولات به‌دست آمده روی ژل متافور- آگارز بارگذاری شدند. پس از انجام الکتروفورز، نوارهای موجود در ژل‌ها به‌صورت هم‌بارز نمره‌دهی و سپس تعداد آلل‌ها، فراوانی آلل شایع، قدرت تمایز نشانگرها، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و تنوع ژنی با استفاده از نرم‌افزار POWER MARKER محاسبه شد. تجزیه مؤثر ساختار جمعیت نیز با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure انجام شد. به‌منظور شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با صفات ارزیابی شده نیز از مدل خطی مخلوط (MLM) با در نظر گرفتن ماتریس ساختار جمعیت (Q) و ماتریس خویشاوندی (K) به‌عنوان متغیر کمکی در نرم‌افزار TASSEL استفاده شد.

یافته‌های تحقیق: نتایج تجزیه واریانس داده‌های فیزیولوژیک، تفاوت معنی‌داری را از نظر تمامی صفات مورد مطالعه بین ژنوتیپ‌های جو در هر یک از شرایط دمایی +۸ و -۲ درجه سلسیوس نشان داد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیش‌ترین مقدار پرولین در شرایط دمایی +۸ درجه سلسیوس در رقم‌های بومی صحرا و جنوب و در شرایط دمایی -۲ درجه سلسیوس در رقم‌های نایک و زهک مشاهده شد و در مقابل، کم‌ترین میزان پرولین در شرایط دمایی +۸ و -۲ درجه سلسیوس به ترتیب در رقم‌های TN-02-6297 و TN-02-6400 ثبت شد. بنابراین دو رقم بومی نایک و زهک با داشتن بالاترین میزان پرولین در شرایط دمایی -۲ درجه سلسیوس به‌عنوان رقم‌های متحمل به تنش سرمای دیررس بهاره معرفی می‌شوند. در مورد فروکتان نیز نتایج این مطالعه نشان داد که در دمایی +۸ درجه سلسیوس، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فروکتان به ترتیب در ژنوتیپ‌های TN-02-6734 و TN-02-4975 مشاهده شد، در حالی‌که در شرایط دمایی -۲ درجه سلسیوس، این مقادیر به ترتیب در ژنوتیپ‌های بهمن و TN-02-4952 ثبت شد. محتوای اطلاعات چند شکل از ۰/۵۹ در نشانگر Bmag0007 تا ۰/۸۲ در نشانگر Bmag0032 متغیر بود. میزان تنوع ژنی نیز از ۰/۶۳ تا ۰/۸۴ با متوسط ۰/۷۴ و فراوانی آلل شایع از ۰/۲۱ تا ۰/۵۲ متغیر بود. تجزیه ساختار جمعیت، وجود دو زیرجمعیت را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه جو نشان داد. نتایج تجزیه ارتباط بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM)، پنج ارتباط معنی‌دار ($P < 0.05$) نشانگر-صفت را شناسایی کرد که از این تعداد، سه نشانگر (Bmag0518، Bmag0211 و Ebmac0674) با ژن‌های کنترل‌کننده پرولین در شرایط دمایی -۲ درجه سلسیوس، یک نشانگر (Bmag0223) با ژن‌های کنترل‌کننده پرولین در شرایط +۸ درجه سلسیوس و یک نشانگر (Bmag0173) با ژن‌های کنترل‌کننده فروکتان در شرایط +۸ درجه سلسیوس ارتباط معنی‌دار داشتند. همچنین، نشانگر با ارتباط معنی‌داری برای میزان فروکتان در شرایط دمایی -۲ درجه سلسیوس شناسایی نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از تجزیه ارتباطی در این مطالعه نشان داد که پنج نشانگر Bmag0211، Bmag0518، Ebmac0674، Bmag0223 و Bmag0173 دارای ارتباط معنی‌دار با میزان پرولین و فروکتان در جو تحت شرایط تنش سرما بودند. از این نشانگرها، بعد از اعتبارسنجی با آزمایش‌های تکمیلی، می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی از طریق گزینش به‌کمک نشانگر (MAS) به‌منظور بهبود مقاومت به سرما در جو استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: ارتباط نشانگر-صفت، تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت، گزینش به‌کمک نشانگر، مدل خطی مخلوط

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۰۹

نحوه استناد به این مقاله:

عباس‌زاده پنجعلی خرابسی، فاطمه، درویش‌زاده، رضا، میرفخرایی، سید رضاقلی، و چمنی بالابیکلو، فرشید. (۱۴۰۳). تجزیه ارتباط برای محتوای پرولین و فروکتان در جو (*Hordeum vulgare* L.) تحت تنش سرمای دیررس بهاره با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. *تحقیقات غلات*، ۱۴ (۳)، ۳۰۹-۳۲۸. doi: [10.22124/CR.2024.27831.1827](https://doi.org/10.22124/CR.2024.27831.1827)

مقدمه

در بین غلات، جو (*Hordeum vulgare* L.) به‌عنوان چهارمین محصول در مقیاس جهانی شناخته شده است (FAO, 2020) و یکی از سازگارترین غلات محسوب می‌شود (Tricase et al., 2018). جو به دلیل طبیعت خودگشنی، دیپلوئید بودن با تعداد کروموزوم‌های محدود ($2n=2x=14$) و به نسبت بزرگ (۸-۶ میکرومتر) و همچنین دورگ‌گیری آسان، مدل مهمی برای بررسی‌های ژنتیکی به‌شمار می‌رود (Liu et al., 2020). ایران یکی از مراکز تنوع جو در خاورمیانه است. این گیاه به دلیل تنوع ژنتیکی وسیع و بومی این منطقه، اهمیت ویژه‌ای برای به‌نژادگران دارد. بسیاری از ارقام زراعی مورد کشت و کار در ایران، هنوز از ژنوتیپ‌های بومی هستند (Shahmoradi & Zahrawi, 2014). سطح زیر کشت جو در ایران در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ برابر با ۱۶۸۴۷۱۴ هکتار و مقدار تولید آن ۳۱۷۶۵۰۲ تن بوده است. از این مقدار، ۹۳۴۹۹۰ هکتار به‌صورت دیم و ۷۴۹۷۲۶ هکتار به‌صورت آبی کشت شده و میانگین عملکرد آن به ترتیب ۳۱۹۵ و ۸۳۶ کیلوگرم در هکتار با میزان تولید ۲۳۹۵۱۹۳ و ۷۸۱۳۰۹ تن بوده است (Ministry of Agriculture- Jihad, 2023).

در بین تنش‌های غیرزیستی، تنش دمای بالا و پایین از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده کشت گیاهان بوده و در موفقیت زراعت‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. دمای پایین (سرمازدگی) اغلب روی رشد و عملکرد گیاه تأثیر می‌گذارد و میزان محصول را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد (Wang et al., 2020). سرمازدگی علاوه بر کاهش محصول، در شرایط حاد باعث از بین رفتن گیاه می‌شود (Miranda et al., 2019). سرمازدگی بهاره زمانی رخ می‌دهد که گیاه به‌مدت طولانی در معرض دماهای کم‌تر از دمای بحرانی قرار گیرد و رشد آن متوقف شود. در این حالت به بافت و اندام‌های گیاهی آسیب جدی وارد می‌شود. با وجود مزیت‌های کشت پاییزه، عوامل نامساعد محیطی نظیر سرما و یخبندان، بقای زمستانه و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Nabati et al., 2020). بنابراین، ارزیابی ویژگی‌های فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان به‌منظور انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در شرایط تنش یخ‌زدگی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Nezami et al., 2022). انباشته شدن کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش که به دلیل

تغییرات فرآیندهای فیزیولوژیک مانند فتوسنتز، انتقال و تنفس ایجاد می‌شود، یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های گیاهان است. در واقع کربوهیدرات‌ها با بالابردن غلظت درون سلولی، مانع از یخ زدن گیاهان در اثر سرما می‌شوند (Hajihashemi et al., 2018). فروکتان یکی از مهم‌ترین کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش محسوب می‌شود و در شرایط دماهای پایین، به‌مقدار زیادی در غلات تجمع می‌یابد که ممکن است در نتیجه کاهش نرخ فتوسنتز در دماهای پایین باشد (Cozzolino et al., 2016). از جمله وظایف فروکتان در مقابله با تنش‌های غیرزیستی می‌توان به مشارکت آن در ثبات غشای سلولی با کاهش نشت آب، جلوگیری از کاهش حجم سلول با افزایش فشار اسمزی، مقاومت به سرما و کاهش نقطه انجماد اشاره کرد. همچنین فروکتان به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، نقش مهمی در غیرفعال کردن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS; Reactive Oxygen Species) و جلوگیری از آسیب‌های سلولی در شرایط تنش‌های غیرزیستی دارد. احتمالاً فروکتان از طریق چندین سازوکار باعث تحمل به تنش می‌شود (Choudhir & Vasistha, 2021). علاوه بر فروکتان، پرولین نیز به‌عنوان سبک‌ترین آمینو اسید آزاد سلولی، علاوه بر محافظت اسمزی در تنظیم هموستازی، در تعادل وضعیت انرژی و اکسایش/ احیا سلول نیز مؤثر است. همچنین، پرولین می‌تواند به‌عنوان مولکول سیگنال در تنظیم عملکرد میتوکندری، تنظیم تکثیر یا مرگ سلول و تحریک بیان ژن‌هایی که در بازبانی مؤثرند، نقش ایفا کند (Chalecka et al., 2021). این متابولیت به‌عنوان تعدیل‌کننده اسمزی با محافظت از ساختارهای درون سلولی طی تنش‌های محیطی، نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش در گیاهان دارد و به‌عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی برای ارزیابی تحمل به دمای پایین و سازگاری با سرما استفاده می‌شود (Hosseinfard et al., 2022). تنوع ژنتیکی در یک جمعیت از گونه‌های گیاهی، که شامل نژادهای بومی ارقام تجاری می‌شود، یک منبع اساسی برای توسعه شیوه‌های کشاورزی پایدار و افزایش تولید غذا است (Latutrie et al., 2019). به‌همین دلیل، ارزیابی تنوع ژنتیکی، گام اصلی برای کشف ژن‌های مفید در محصولات زراعی است (Brbaklić et al., 2021). تنوع ژنتیکی یکی از عناصر اساسی پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری با شرایط متغییر محیطی است (Hoban et al., 2021). برای ارزیابی تنوع ژنتیکی

می‌توان از نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی استفاده کرد. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA به دلیل عدم تأثیرپذیری از محیط و قابلیت تکرارپذیری بالا از مهم‌ترین نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند (Singh *et al.*, 2024a). همچنین، نشانگرهای مبتنی بر DNA در بررسی ساختار ژنتیکی ژرم‌پلاسم نیز مفید هستند (Singh *et al.*, 2024b). یکی از نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای SSR هستند که به علت تکرارپذیری بالا، ماهیت چند آلی، توارث هم‌بارز، فراوانی ژنومی بالا و توزیع تصادفی در ژنوم، کاربرد زیادی در مطالعات ژنومیک گیاهی دارند (Singh *et al.*, 2024a). در بررسی روابط ژنتیکی ۱۲ رقم جو از نشانگرهای SSR و RAPD استفاده شد، به طوری که نشانگرهای SSR تنوع بالایی را نسبت به RAPD نشان دادند و ارقام را به خوبی از یکدیگر تفکیک کردند (Karim *et al.*, 2010).

نشانگرهای مولکولی ابزارهای ارزش‌مندی هستند که به کمک آن‌ها می‌توان ژن‌های کنترل‌کننده صفاتی نظیر تحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده را از طریق تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباطی شناسایی کرد و دست‌ورزی ژنتیکی را آسان‌تر انجام داد (Kage *et al.*, 2016). در تجزیه ارتباطی، مجموعه بزرگی از افراد یک جمعیت به طور تصادفی جمع‌آوری و تجزیه بر اساس عدم تعادل پیوستگی انجام می‌شود که در ژنتیک انسانی به‌وفور از آن استفاده شده است (Park, 2019). بر خلاف تجزیه پیوستگی، تجزیه ارتباطی با استفاده از تنوع موجود در جمعیت‌های طبیعی، ارتباط بین تنوع فنوتیپی و تنوع ژنوتیپی (چندشکلی موجود در ژنوم) را بررسی و نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفات را شناسایی می‌کند (Niu *et al.*, 2019). این روش به‌عنوان جایگزین یا مکمل تجزیه پیوستگی با بهره‌گیری از تنوع موجود در جمعیت‌های طبیعی و لحاظ کردن تمامی وقایع میوزی که در طول تکامل جمعیت رخ داده است، وضوح نقشه‌یابی را افزایش می‌دهد (Zhu, 2016). در این روش به دلیل این‌که از تنوع موجود در جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود، تا حد زیادی در وقت و هزینه‌ها صرفه‌جویی می‌شود. از طرف دیگر، در مطالعات تجزیه پیوستگی برای هر مکان ژنی حداکثر دو آلل مورد مطالعه قرار می‌گیرد، در صورتی که در تجزیه ارتباطی به طور بالقوه و هم‌زمان تمام آلل‌های یک مکان ژنی (حداقل دو آلل)، ارزیابی می‌شوند (Yu & Buckler, 2006). تجزیه

ارتباطی دقیق‌تر از تجزیه پیوستگی است و به راحتی می‌توان از آن در فرآیند گزینش به‌کمک نشانگر استفاده کرد (Moose & Mumm, 2008). علاوه بر نقشه‌یابی بر مبنای جمعیت‌های طبیعی، می‌توان از جمعیت‌های نقشه یابی چند والدی مانند نقشه‌یابی ارتباطی آشیانه‌ای و تلاقی‌های نسل‌های پیشرفته چندوالدی نیز برای نقشه یابی استفاده کرد. این جمعیت‌ها برای غلبه بر محدودیت های جمعیت‌های دو والدی تولید می‌شوند که تنوع ژنتیکی چند والد باعث ایجاد تنوع فنوتیپی بالا و نیز وضوح مناسب نقشه‌یابی پیوستگی می‌شود (Xu *et al.*, 2017). هدف از این پژوهش، بررسی تنوع و شباهت ژنتیکی ۶۰ ژنوتیپ جو با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات فیزیولوژیک مؤثر در تحمل به سرمای دیررس بهاره در جو با استفاده از تجزیه ارتباطی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۶۰ ژنوتیپ جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.) شامل ۲۰ ژنوتیپ تجاری و ۴۰ ژنوتیپ بومی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس ارزیابی شدند. ارقام مورد استفاده از بخش بانک ژن گیاهی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شدند. قبل از کشت ابتدا بذرها به مدت پنج دقیقه در هیپوکلریت سدیم پنج درصد (۷/۷) ضدعفونی و سپس دو تا سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. آن‌گاه بذرها روی کاغذ صافی درون پتری‌دیش منتقل و به مدت چهار روز در دستگاه جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰٪ در تاریکی قرار داده شدند. بعد از این‌که جوانه‌ها به حدود دو سانتی‌متر رسیدند، پتری‌دیش‌ها جهت بهاره‌سازی به مدت شش هفته در دمای 1 ± 3 درجه سلسیوس در یخچال قرار گرفتند. بعد از بهاره‌سازی، نورسته‌ها به گلدان‌هایی با قطر ۲۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر منتقل شدند. با رسیدن بوته‌ها به اوایل مرحله زایشی (سنبل‌دهی و گل‌دهی، کد زادوکس ۵۰ الی ۶۸) (Zadoks *et al.*, 1974)، گلدان‌ها به اتاقک رشد (دمای 24°C روز و 14°C شب) منتقل و به‌منظور سازگاری به مدت سه روز در آنجا نگهداری شدند. به‌منظور اعمال تنش، دما به‌ازای هر یک ساعت به‌میزان دو درجه سلسیوس کاهش داده شد تا به سطح دماهای مورد نظر برای تنش (2°C - و 8°C +) برسد (Shroyer *et al.*,

دستگاه نانودراپ BioTek بررسی شد. در این تحقیق ۲۰ جفت آغازگر ریزماهوره جو از سری‌های Bmag, Bmac, Shamsifar و EBmac مورد مطالعه قرار گرفت (et al., 2021; Haghpanah et al., 2020). آغازگرها از شرکت سیناکلون به صورت پودر در ویال‌های دو میلی‌لیتر تهیه و به نسبت ۹:۱ رقیق شدند. برای رقیق‌سازی آغازگرها، ۱۰ میکرولیتر آغازگر با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ترکیب شد. غلظت آغازگرها پس از رقیق‌سازی و جهت استفاده در واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction) در حدود ۱۰ میکرولیتر بر پیکومول بود. اجزای واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر، شامل یک میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ ng/μl، پنج میکرولیتر Master Mix، یک میکرولیتر آغازگر و ۳/۶ میکرولیتر آب دیونیزه بود. تکثیر در دستگاه چرخه حرارتی Bio-Rad انجام شد. برنامه دمایی شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در انتها یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات PCR روی ژل متافور-آگارز بارگذاری و الکتروفورز با ولتاژ ۸۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل تحت اشعه UV در دستگاه Gel documentation عکس‌برداری و سپس نوارهای مشاهده شده به صورت هم‌بارز نمره‌دهی شدند.

به منظور تجزیه آماری داده‌ها، ابتدا همگنی واریانس خطاهای آزمایشی با آزمون بارتلت (Bartlett, 1937) و نرمال بودن توزیع خطاها با آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro & Wilk, 1965) انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های پرولین و فروکتان به ترتیب با استفاده از مدل خطی عمومی و آزمون توکی در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. برای بررسی تنوع مولکولی ژنوتیپ‌ها، تعداد آلل‌ها، قدرت تمایز نشانگرها، فراوانی آلل شایع، تنوع ژنی و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC; Polymorphic Information Content) در نرم‌افزار POWER MARKER محاسبه شد. تجزیه ساختار جمعیت و بررسی تعداد زیرجمعیت‌ها (K) و همچنین شناسایی ژنوتیپ‌های مختلط بر اساس روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار Structure ver. 2.3.4 انجام گرفت (Gumede et al., 2022). این روش با استفاده از

۱۹۹۵). گلدان‌ها به مدت دو ساعت در دمای تنش نگهداری شد و سپس مجدداً دما به‌ازای هر یک ساعت دو درجه افزایش یافت تا به دمای ۲۴ °C برسد. نمونه‌برداری از گیاهان پس از ۲۴ ساعت از اعمال تنش انجام شد.

برای سنجش فروکتان، ۰/۲ گرم از نمونه‌های برگ‌نگهداری شده در فریزر در دمای ۸۰ °C- توزین و با سه میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط و سائیده شدند. هم‌گنای حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف و سپس یک میلی‌لیتر از محلول به دست آمده با پنج میلی‌لیتر آنترن دو درصد در اسید سولفوریک ۷۰ درصد مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه، در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۷/۵ دقیقه قرار داده شد. بعد از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب نور در طول موج ۶۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Genova) قرائت شد. برای این منظور از استاندارد اینولین با غلظت‌های صفر تا ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (Tolipov, 2021). برای اندازه‌گیری پرولین نیز از روش (Carillo & Gibon, 2011) استفاده شد. ابتدا برای تهیه عصاره گیاهی، مقدار ۵۰ میلی‌گرم برگ پرچم منجمد شده به کمک ازت مایع سائیده شد تا همگن شود. نمونه پودر شده درون میکروتیوب دو میلی‌لیتر با یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۸۰ °C قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول واکنش، مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۹۵ °C قرار داده شد. در انتها ۱۸۰ میکرولیتر از آن به میکروپلیت منتقل و میزان جذب نور با دستگاه نانودراپ (BioTek مدل Epoch) در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد.

استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام شد (Irsyadi et al., 2024). برای تعیین کیفیت نمونه‌های DNA مقدار دو میکرولیتر DNA به همراه یک میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading dye) روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت در بافر TAE الکتروفورز شد. ژل با Safe Stain رنگ‌آمیزی و سپس در دستگاه Gel documentation زیر نور UV عکس‌برداری شد. کمیت نمونه‌های DNA از نظر غلظت مواد همراه آن نظیر پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها نیز با

(زیرجمعیت‌ها) یک ماتریس به نام Q محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. میزان عدم تعادل پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه شد. برای انجام تجزیه ارتباطی، داده‌های فنوتیپی، ژنوتیپی و ماتریس Q به نرم‌افزار معرفی شدند. برای تعیین روابط معنی‌دار نشانگر-صفت از مدل خطی مخلوط (MLM) به‌همراه ماتریس‌های K و Q در نرم‌افزار TASSEL استفاده شد. K به‌عنوان یک عامل تصادفی که ضریب خویشاوندی افراد را نشان می‌دهد، با نرم‌افزار TASSEL محاسبه شد. نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه با توجه به مقادیر P-value تا ۰/۰۵ انتخاب شدند.

داده‌های ژنوتیپی چندین جایگاه نشانگر، هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت، میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. تعداد زیرجمعیت فرضی اولیه بین یک تا ده در نظر گرفته شد. جهت حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۱۰۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده شد (Julca *et al.*, 2020). برای تعیین تعداد بهینه زیرجمعیت‌ها (K) از روش ایوانو و همکاران (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K

جدول ۱- آغازگرهای ریزماهواره (SSR) مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Microsatellite (SSR) primers used in this study

Name	Primer sequence	Chromosomal location	Melting temperature (°C)
Bmag0211	F: ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC R: AACCCAGTAACACCGTCCTG	1H	52.7
Hvm54	F: AGTTCCTGACCCGATGTC R: AGTTCCTGACCCGATGTC	2H	57.1
Bmag0032	F: CCA TCA AAG TCC GGC TAG R: GTC GGG CCT CAT ACT GAC	1H	51.8
Hvm40	F: CGATTCCCCTTTTCCCAC R: ATTCTCCGCCGTCCACTC	4H	61
Bmag0007	F: TGAAGGAAGAATAAACAACCAACA R: TCCCCTATTATAGTGACGGTGTG	7H	57.1
Ebmac0602	F: GATTGGAGCTTCGGATCAC R: CCGTCTAGGGAGAGGTTCTC	6H	55.5
Ebmac0674	F: GAACGTATAGCAGGAGCAA R: CATCGTTCCCTTCATGAT	6H	57.1
Ebmac0518	F: AATGCCATGATGTTATTGG R: AGAAGATTACATCGAATAGATCA	2H	55
Bmag0223	F: TTAGTCACCCTCAACGGT R: CCCCTAACTGCTGTGATG	5H	60
Bmag0323	F: GCCAGTCAATCCAACCCTC R: GTGGCTATGATAGGAATAGCCG	5H	57.1
Ebmac0679	F: ATTGGAGCGGATTAGGAT R: CCCTATGTCATGTAGGAGATG	4H	56
Bmac0518	F: AATGCCATGATGTTATTGG R: AAGAAGATTACATCGATGATCA	2H	51.8
Bmag0381	F: TTTTATTATTGCATCTAGGGC R: TATCAAGATCATGACGTCTCA	2H	49.8
Bmag0606	F: CTATTGTAAATGTATGTATGTCC R: TCATTGGTCCAGATAATACAA	3H	55
Bmag0603	F: ATACCATGATACATCACATCG R: GGGGTATGTACGACTAACTA	3H	58
Bmag0011	F: ACAAAAACACCGCAAAGAAGA R: GCTAGTACCTAGATGACCCCC	7H	58
Bmag0173	F: CATTTTTGTTGGTGACGG R: ATAATGGCGGGAGAGACA	6H	54
Bmag0125	F: AATTAGCGAGAACAAAATCAC R: AGATAACGATGCACCACC	2H	55

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل داده‌های فیزیولوژیک

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده ژنوتیپ و دما و برهمکنش بین آن‌ها بر میزان پرولین و فروکتان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). معنی‌دار بودن برهمکنش ژنوتیپ × دما نشان داد که تغییرات میزان پرولین و فروکتان در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه جو در دو شرایط دمایی 8°C و 2°C - روند یکسان و مشابهی نداشت و احتمالاً سازوکارهای ژنوتیپ‌ها در دو سطح دمایی فوق متفاوت بوده است.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که میزان پرولین و فروکتان در بیش‌تر ژنوتیپ‌های جو در دمای 2°C - نسبت به دمای 8°C + افزایش یافته است (جدول ۲). نتایج نشان داد که در شرایط دمای 8°C + درجه سلسیوس، بیش‌ترین میزان پرولین در رقم‌های بومی صحرا و جنوب (به ترتیب $1/37$ و $1/30$ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) و در شرایط دمای 2°C - درجه سلسیوس در رقم‌های بومی نایک و زهک (به ترتیب $1/70$ و $1/66$ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد. در مقابل، کم‌ترین میزان پرولین در شرایط دمای 8°C + و 2°C - درجه سلسیوس به ترتیب در رقم‌های TN-02-6297 و TN-02-6400 (به ترتیب $0/31$ و $0/53$ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) مشاهده شد. بنابراین دو رقم بومی نایک و زهک با داشتن بالاترین میزان پرولین در شرایط دمای 2°C - به عنوان رقم‌های متحمل به تنش سرمای دیررس بهاره معرفی می‌شوند. پرولین به عنوان یک متابولیت آمینو اسیدی مهم، می‌تواند به عنوان یک سیگنال برای تحریک پاسخ‌های گیاه به تنش عمل کند. علاوه بر این، تجمع پرولین نه تنها یک سیگنال تنش است، بلکه با حفظ فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سطوح ترکیبات آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی، به کاهش آسیب‌های گیاهی با کاهش محتوای گونه‌های اکسیژن فعال و تنظیم اسمزی کمک می‌کند (Jiang et al., 2023).

در مورد فروکتان نیز نتایج این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فروکتان در دمای 8°C + به ترتیب در ژنوتیپ‌های TN-02-6734 و TN-02-4975 و در شرایط دمای 2°C - به ترتیب در ژنوتیپ‌های بهمن و TN-02-4952 مشاهده شد. مطالعات متعددی برای بررسی ارتباط بین محتوای فروکتان و سطح تحمل به تنش‌های غیرزیستی مختلف مانند گرما، خشکی و سرما انجام شده است. فروکتان‌ها ممکن است به عنوان محافظت

کننده‌های سرما عمل کرده و غشای پلاسمایی را طی تنش کم‌آبی پس از ادغام پلی‌ساکارید در ناحیه سرگروه لیپیدی غشا تثبیت کنند (Valluru et al., 2008). این مکانیزم سطح آب را حفظ کرده و با جلوگیری از نشت، از بافت‌های گیاهی در برابر تنش‌های غیرزیستی محافظت می‌کند. سطح فروکتان‌ها در برخی گونه‌های گیاهی به راحتی با استفاده از روش‌های به‌نژادی کلاسیک بهبود نمی‌یابد، زیرا تنوع ژنتیکی میزان فروکتان در ژن‌پایه‌های برخی گونه‌ها پایین است. با این حال، سطح فروکتان‌ها در گیاهان را می‌توان با استفاده از ابزارهای زیست‌فناوری برای بیوسنتز فروکتان‌ها در برابر تنش‌های غیرزیستی افزایش داد. گیاهان با افزایش قندهای محلول به‌نوعی خود را در برابر سرما محافظت می‌کنند (Márquez-López et al., 2022). میزان فروکتان‌ها تحت تنش سرما در برخی از ژنوتیپ‌های گیاهی به دلایل متعددی می‌تواند کاهش یابد. دمای پایین می‌تواند فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده فروکتان و فرآیندهای بیوشیمیایی را مختل کند و به دنبال آن منجر به کاهش سنتز این ترکیب شود. علاوه بر این، گیاهان در شرایط سرما ممکن است سریعاً از ذخایر کربوهیدراتی خود از جمله فروکتان‌ها استفاده کنند تا انرژی لازم برای حفظ متابولیسم و عملکرد سلولی را تأمین کنند. این رفتار به‌ویژه در شرایطی که فشار متابولیکی به دلیل تنش سرما افزایش می‌یابد، مشهود است. همچنین، تنش سرما می‌تواند منجر به تولید گروه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود که این ترکیبات به سلول‌ها آسیب می‌زنند و می‌توانند عملکرد آنزیم‌های تولیدکننده فروکتان را کاهش دهند. در نهایت، گیاهان به منظور سازگاری با شرایط سرما ممکن است مسیرهای متابولیک خود را تغییر دهند که این تغییرات خود می‌تواند منجر به کاهش تولید فروکتان‌ها شده و باعث کاهش سطح آن‌ها شود (Zhu, 2016). به‌طور کلی، قندها در کاهش دمای انجماد آب سلولی، تأمین انرژی قابل دسترس و محافظت از ساختمان و نحوه عمل پروتئین‌ها در ایجاد تحمل به سرما نقش عمده‌ای دارند. در نتیجه می‌توان گفت که گیاهان با تجمع میزان پرولین و فروکتان، حجم آسیب‌های سرمازدگی را کاهش می‌دهند (Atıcı et al., 2003). به هر حال، با شناسایی ارقام متحمل به سرما از طریق بررسی تغییرات اسیدهای آمینه پرولین و فروکتان، می‌توان گیاهان را از خسارت تنش‌های غیرزیستی با استفاده از برنامه‌های به‌نژادی دور ساخت.

جدول ۲- تجزیه واریانس میزان پرولین و فروکتان در ژنوتیپ‌های جو تحت شرایط تنش سرمای دیررس بهاره

Table 2. Analysis of variance of proline and fructan in barley genotypes under late cold stress conditions

Sources of variation	df	Mean square	
		Proline	Fructan
Genotype	59	121.89**	0.225**
Temperature	1	905.97**	4.05**
Genotype × Temperature	59	21.98**	0.10**
Experimental error	240	0.41	0.021
CV (%)		6.87	16.83

** Significant at 1% probability level.

جدول ۳- مقایسه میانگین پرولین و فروکتان در ۶۰ ژنوتیپ جو مورد مطالعه تحت شرایط تنش سرمای دیررس بهاره

Table 3. Mean comparison of proline and fructan traits in 60 studied barley genotype under late cold stress conditions

No.	Genotype	Fructan		Proline		No.	Genotype	Fructan		Proline	
		(μmol.g ⁻¹ FW)		(μmol.g ⁻¹ FW)				(μmol.g ⁻¹ FW)		(μmol.g ⁻¹ FW)	
		+8°C	-2°C	+8°C	-2°C			+8°C	-2°C	+8°C	-2°C
1	TN-02-6282	8.91	10.98	0.61	0.73	31	TN-02-6654	10.61	3.79	0.90	1.53
2	TN-02-6287	5.98	7.88	0.56	1.09	32	TN-02-6655	3.94	8.28	0.81	0.70
3	TN-02-6297	5.49	9.94	0.31	0.59	33	TN-02-6721	11.28	14.79	0.75	1.30
4	TN-02-6307	7.34	7.93	0.58	1.04	34	TN-02-6722	7.5	8.77	0.69	0.86
5	TN-02-6331	2.74	4.72	0.48	1.13	35	TN-02-6723	15.53	18.03	0.91	0.87
6	TN-02-6333	3.96	6.92	0.54	1.19	36	TN-02-6729	5.27	6.23	0.74	0.80
7	TN-02-6392	4.96	8.86	0.76	0.62	37	TN-02-6734	17.13	19.87	0.75	1.41
8	TN-02-6396	4.95	8.32	0.78	0.90	38	TN-02-6743	5.29	18.28	0.68	0.89
9	TN-02-6398	3.88	6.06	0.57	0.67	39	TN-02-6760	10.19	4.63	0.83	1.05
10	TN-02-6400	5.36	17.8	0.86	0.53	40	Auxin	13.95	15.27	0.54	1.09
11	TN-026407	3.99	5.01	0.79	1.29	41	Sahra	15.21	20.21	1.37	1.46
12	TN-02-6279	8.78	4.75	0.51	0.67	42	Nike	15.63	18.08	0.71	1.70
13	TN-02-6250	4.3	10.98	0.60	0.72	43	Jolghe	13.02	20.67	0.69	1.20
14	TN-02-6221	5.49	11.9	0.83	0.92	44	Fajr	13.03	18.66	0.61	0.82
15	TN-02-6208	5.73	14.16	0.76	0.88	45	Zahak	8.03	17.56	0.91	1.66
16	TN-02-6189	5.23	6.34	0.81	0.87	46	Behrokh	4.06	5.25	0.65	0.85
17	TN-02-6177	4.98	13.97	0.78	0.60	47	Nimroz	8.36	14.08	0.94	0.87
18	TN-02-6065	5.58	9.06	0.80	0.88	48	Kavir	16.09	18.84	1.10	1.12
19	TN-02-6053	6.9	8.83	0.41	0.90	49	Fajr30	4.006	13.25	1.08	0.83
20	TN-02-6052	8.22	10.45	0.58	0.77	50	Khatam	13.99	20.05	0.94	1.15
21	TN-02-5026	13.58	15.84	0.76	0.95	51	Bahman	13.2	21.8	0.75	0.79
22	TN-02-5014	7.99	13.62	0.67	0.92	52	Zarjo	2.89	3.87	0.94	1.24
23	TN-02-5009	4.15	5.9	0.59	1.14	53	Gohran	4.12	4.99	0.72	0.69
24	TN-02-4988	10.24	14.9	0.76	0.94	54	Jonob	4.94	8.26	1.30	1.45
25	TN-02-4975	2.29	5.8	0.72	0.84	55	Dasht	14.56	17.89	1.10	1.19
26	TN-02-4952	3.41	1.95	0.54	0.88	56	Reyhan	6.37	7.78	1.06	1.10
27	TN-02-4941	3.76	5.98	0.53	0.69	57	Nosrat	2.25	3.7	0.65	1.07
28	TN-02-4835	11.86	4.15	0.89	0.87	58	Reyhan03	14.77	17.41	0.96	0.95
29	TN-02-6477	2.97	5.33	0.76	0.83	59	Joseph	8.23	10.44	0.86	0.76
30	TN-02-6502	7.49	10.29	0.65	0.74	60	Makoi	5.49	8.42	0.62	0.82
HSD [†]	-	2.22	2.21	0.47	0.52	HSD [†]	-	2.22	2.21	0.47	0.52

† HSD indicates Tukey's honestly significant difference test at 5% probability level.

تجزیه و تحلیل داده‌های ژنوتیپی

تنوع ژنتیکی جمعیت

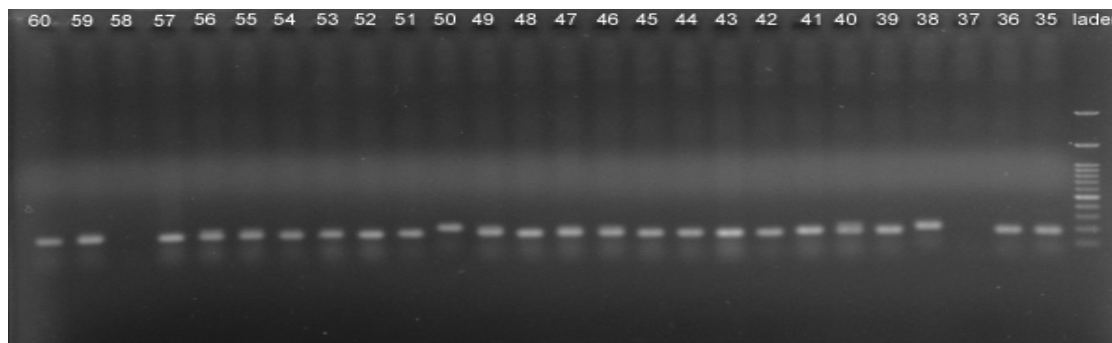
به‌منظور ارزیابی تنوع و تعیین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی جو از ۲۰ نشانگر ریزماهواری (SSR) استفاده و برای مشاهده تنوع بین ژنوتیپ‌ها، محصول PCR نشانگرها روی ژل آگارز-متافور بارگذاری شد. شکل (۱) نوارهای الکتروفورز محصول PCR نشانگر Bmag0211 را به‌عنوان نمونه نشان می‌دهد. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که دو نشانگر یک‌شکل بودند و در نتیجه از محاسبات حذف و فقط ۱۸ نشانگر چندشکل

جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱). آغازگرهای مورد استفاده در مجموع ۹۷ آلل با میانگین ۵/۳۸ آلل در هر جایگاه تکثیر کردند. تعداد آلل‌های مشاهده شده در مکان‌های ژنی بین ۴ تا ۷ آلل متغیر بود. آغازگرهای Bmag0032، Bmag0223 و Ebmac0679 با تعداد ۷ آلل بیش‌ترین تعداد آلل را تکثیر کردند (جدول ۴). تفاوت در تعداد آلل‌های مشاهده شده می‌تواند ناشی از وجود کپی‌های متعدد در یک ژنوم، اختلاف در تعداد توالی‌های تکراری، نوع نوکلئوتیدها، آلل‌های نادر و تفاوت در پایه ژنتیکی آن‌ها باشد.

جدول ۴- تعداد آلل‌ها، فراوانی آلل رایج، محتوای اطلاعات چندشکلی و تنوع ژنی نشانگرهای SSR در ۶۰ ژنوتیپ جو

Table 4. Number of alleles, common allele frequency, polymorphic information content and gene diversity of the studied SSR markers in 60 barley genotypes

Marker	Number of alleles	Common allele frequency	Polymorphic information content	Gene diversity
Bmag0007	5	0.52	0.59	0.63
Hvm54	4	0.43	0.61	0.67
Bmag0032	7	0.21	0.82	0.84
Hvm40	6	0.29	0.74	0.77
Bmag0211	4	0.46	0.61	0.67
Ebmac0602	6	0.33	0.74	0.77
Ebmac0674	4	0.41	0.60	0.66
Ebmac0518	6	0.38	0.72	0.76
Bmag0223	7	0.27	0.77	0.80
Bmag0323	6	0.33	0.70	0.74
Ebmac0679	7	0.41	0.70	0.74
Bmac0518	5	0.28	0.73	0.77
Bmag0381	4	0.42	0.64	0.70
Bmag0606	4	0.35	0.64	0.70
Bmag0603	6	0.23	0.78	0.81
Bmag0011	4	0.37	0.62	0.68
Bmag0173	6	0.35	0.69	0.73
Bmag0125	6	0.23	0.78	0.81
Average	5.38	0.35	0.69	0.74



شکل ۱- الگوی نوارهای الکتروفورز محصول PCR نشانگر Bmag0211 در تعدادی از ژنوتیپ‌های جو زراعی روی ژل آگارز-متافور
Figure 1. Electrophoresis banding pattern of PCR product for Bmag0211 marker in some barley genotypes on agarose-metaphor gel

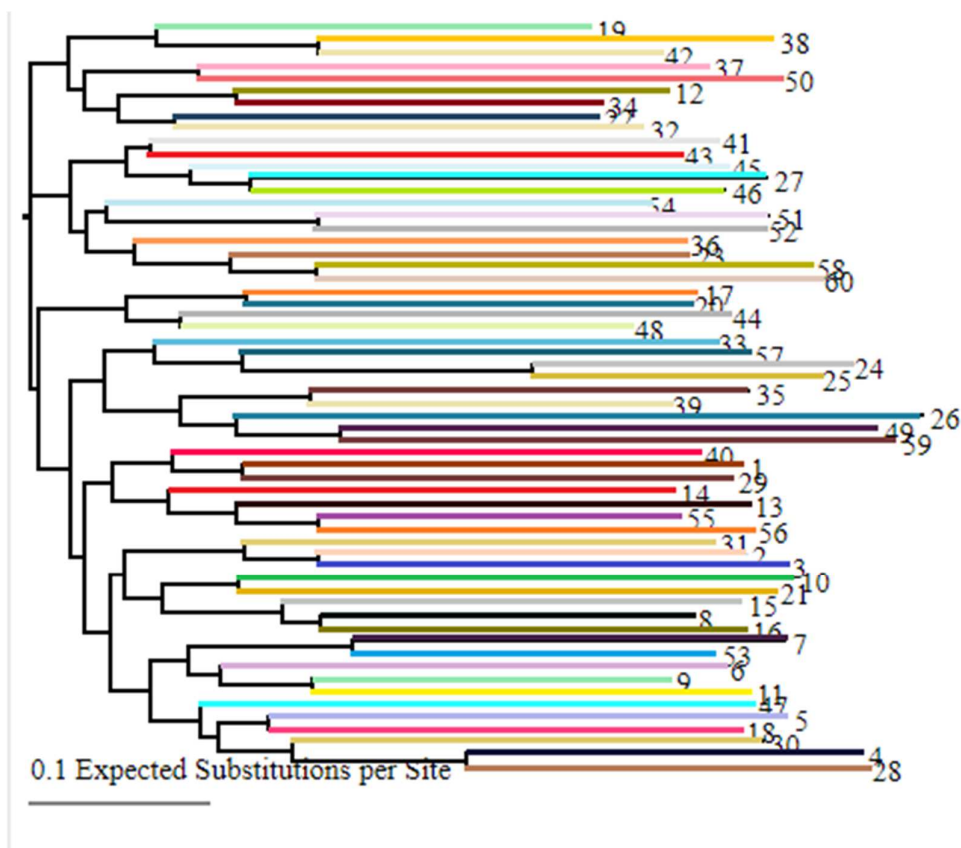
بیش‌تری داشتند. همچنین، بررسی سه شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی، تنوع ژنی و فراوانی آلل رایج نشان داد که نشانگرهایی با PIC و تنوع ژنی بالا، فراوانی آلل رایج کم‌تری داشتند. بنابراین، جایگاه‌هایی با فراوانی آلل رایج کم‌تر، قدرت ظهور چندشکلی بیش‌تری را خواهند داشت. در مطالعه‌ای که با ۶۴ ژنوتیپ جو زراعی و ۱۴ آغازگر انجام شد، متوسط تعداد آلل‌های مؤثر ۵/۲۳ آلل برآورد شد (Hajmansoor *et al.*, 2010). در مطالعه دیگری روی ۲۴ رقم جو زراعی با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهوره، تعداد آلل‌های مؤثر از ۱/۹۶ تا ۴ آلل گزارش شد (Mojirsheibani *et al.*, 2013). با توجه به تمامی این مطالعات و بررسی‌ها، تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشأ و ویژگی‌های متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهوره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری (اختلاف در تعداد آن‌ها) و آلل‌های نادر باشد.

تجزیه خوشه‌ای

در بین روش‌های مختلف تجزیه‌های چند متغیره، تجزیه خوشه‌ای از جمله مهم‌ترین روش‌های آماری است که به‌طور گسترده‌ای در اصلاح نباتات برای گروه‌بندی ارقام مختلف گیاهان استفاده می‌شود (Mohammadi & Prasanna, 2003; Vus *et al.*, 2020). در تجزیه خوشه‌ای افراد داخل یک خوشه دارای بیش‌ترین شباهت بوده و بین خوشه‌ها بیش‌ترین تفاوت وجود دارد. بنابراین اگر گروه‌بندی درست انجام گیرد، اجزاء یا افراد داخل خوشه‌ها از لحاظ ژنتیکی به‌هم نزدیک‌تر و افراد خوشه‌های متفاوت از هم دورترند (Wu *et al.*, 2019). نتایج تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه‌ها (Neighbor-Joining)، ژنوتیپ‌های مورد بررسی جو را در چهار خوشه اصلی گروه‌بندی کرد (شکل ۲، جدول ۵). نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که برخی از ارقام به‌واسطه داشتن شباهت بیش‌تر از نظر جایگاه‌های ژنی مشترک ریزماهوره‌ها، در یک گروه قرار گرفتند. در مطالعه آنیو و همکاران (Enyew *et al.*, 2019) ۵۲ ژنوتیپ جو بومی ایتوپی در شش خوشه تفکیک و ژنوتیپ‌های زودرس، دیررس و همچنین ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا و پابند در خوشه‌های متفاوت گروه‌بندی شدند.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم است که به‌وسیله آن می‌توان به ارزش یک نشانگر برای نشان دادن چندشکلی درون جمعیت و مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها پی برد. میانگین PIC به‌دست آمده برای ۱۸ نشانگر ۰/۶۹ بود. کم‌ترین میزان PIC با مقدار ۰/۵۹ مربوط به نشانگر Bmag0007 و بیش‌ترین میزان آن با ۰/۸۲ مربوط به نشانگر Bmag0032 و پس از آن، نشانگرهای Bmag0603 و Bmag0125 هر دو با ۰/۷۸ بود. در نتیجه این سه نشانگر قدرت بیش‌تری در ایجاد چندشکلی و تمایز ژنوتیپ‌های مورد بررسی جو داشتند و بنابراین قابلیت استفاده در برنامه‌های بررسی تنوع ژنتیکی در بین توده‌های بومی و تجاری جو را دارند. تنوع ژنی یکی دیگر از معیارهای ارزیابی تنوع آلی نشانگرها و میزان اطلاعات نشانگری در مطالعات بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است. میزان تنوع ژنی از ۰/۶۳ تا ۰/۸۴ با متوسط ۰/۷۴ متغیر بود. مقایسه میزان PIC و تنوع ژنی نشان داد که این دو شاخص رابطه مستقیمی با هم دارند. بونمن و همکاران (Bonman *et al.*, 2011) در ارزیابی ۲۰۶ ژنوتیپ جو در ۲۹ جایگاه ریزماهوره، متوسط تعداد آلل و PIC را به‌ترتیب ۱۲/۰۳ آلل و ۰/۷۳ گزارش کردند و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را به چهار گروه اصلی تفکیک کردند. خدایاری و همکاران (Khodayari *et al.*, 2012) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ توده بومی دو و شش ردیفه جو با ۱۷ نشانگر ریزماهوره، تنوع بالایی با متوسط PIC برابر با ۰/۶۵۱ و متوسط تعداد ۸/۱۱۷ آلل در هر مکان گزارش کردند. در تحقیق دیگری ۱۱۹ ژنوتیپ بومی جو از کشورهای مختلف و ۲۵ رقم تجاری و لاین اصلاحی با استفاده از ۴۵ نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت ۲۲۵ آلل با میانگین ۵ آلل در هر جایگاه گزارش شد (Shuorvazdi *et al.*, 2014).

آلل رایج (Common allele frequency) آلی است که بیش‌ترین فراوانی را بین آلل‌های مشاهده شده برای نشانگر مورد بررسی دارد. فراوانی آلل رایج از ۰/۲۱ در نشانگر Bmag0032 تا ۰/۵۲ در نشانگر Bmag0007 متغیر و متوسط فراوانی آلل رایج در کل جایگاه‌های ریزماهوره مورد مطالعه ۰/۳۵ بود. مقایسه تعداد آلل و فراوانی آلل رایج در جایگاه‌های ریزماهوره نشان داد که نشانگرهایی با تعداد آلل چندشکل کم‌تر، فراوانی آلل رایج



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های جو بر اساس نشانگرهای SSR به روش Neighbor-Joining با استفاده از نرم‌افزار TASSEL
 Figure 2. Cluster analysis of barley genotypes based on SSR markers by Neighbor-Joining method using TASSEL software

جدول ۵- گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۶۰ ژنوتیپ جو با استفاده از نشانگرهای SSR

Table 5. Groups resulting from cluster analysis of 60 barley genotypes using SSR markers

Group	Genotypes in each group
First	32-22-34-12-50-37-42-38-19
Second	60-58-23-36-52-51-54-46-27-45-43-41
Third	17-20-44-48
Fourth	33-57-24-25-35-39-26-49-59-40-1-29-14-13-55-56-31-2-3-10-21-15-8-16-7-53-6-9-11-47-5-18-30-4-28

تجزیه ساختار جمعیت

در مطالعات تجزیه ارتباطی از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود و بهتر است که جمعیت مورد بررسی فاقد هر گونه ساختار باشد، زیرا وجود ساختار در جمعیت عامل بازدارنده در جهت دستیابی به نتایج قابل اعتماد است (Pritchard & Donnelly, 2001). به طوری که اگر اثر ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط کنترل نشوند، نتایج مثبت دروغین می‌تواند حاصل شود (Brescghello & Sorrells, 2006). پریچارد و دانلی (Pritchard & Donnelly, 2001) بحث‌هایی در مورد برخی محدودیت‌های موجود در روش‌های خوشه‌بندی بر

مبنای فاصله مطرح و روش خوشه‌بندی بر مبنای مدل Bayesian را پیشنهاد کردند. به کمک این روش حتی با استفاده از تعداد اندکی نشانگر مولکولی تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی افراد به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص افراد مختلط امکان‌پذیر می‌شود. تجزیه مؤثر ساختار ژنتیکی جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیرجمعیت‌ها، دو زیرجمعیت احتمالی را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی کرد که به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس Q استفاده شد (شکل ۳). انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها مطابق روش اسپاتارو و همکاران (Spataro *et al.*, 2011) انجام شد و

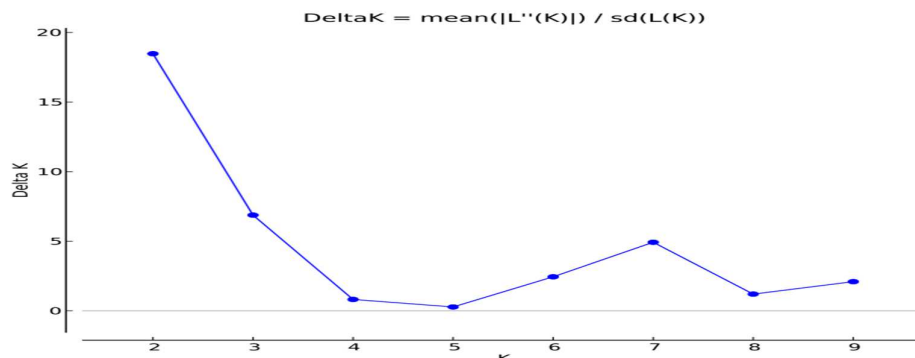
گرفته می‌شوند. بر اساس نتایج ارائه شده در بارپلات، از کل ۶۰ رقم مورد مطالعه جو بر اساس نشانگرهای SSR، ۳۰ رقم (۵۰ درصد) به ساختار اول (قرمز) و ۲۵ رقم (۴۱/۶۶ درصد) به ساختار دوم (سبز) تعلق گرفت و ۵ رقم (۸/۳۳ درصد) نیز ساختار مختلط داشتند (شکل ۴).

برای هر گروه درصد عضویت برآورد شد. بر اساس این روش وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به یک خوشه بیش‌تر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن خوشه تعلق می‌گیرد و ژنوتیپ‌های با درصد عضویت کم‌تر از ۰/۷ به‌عنوان ژنوتیپ ترکیبی یا مخلوط (Admix) در نظر

جدول ۶- آماره‌های محاسبه شده برای مقادیر بهینه K با استفاده از نرم‌افزار Structure

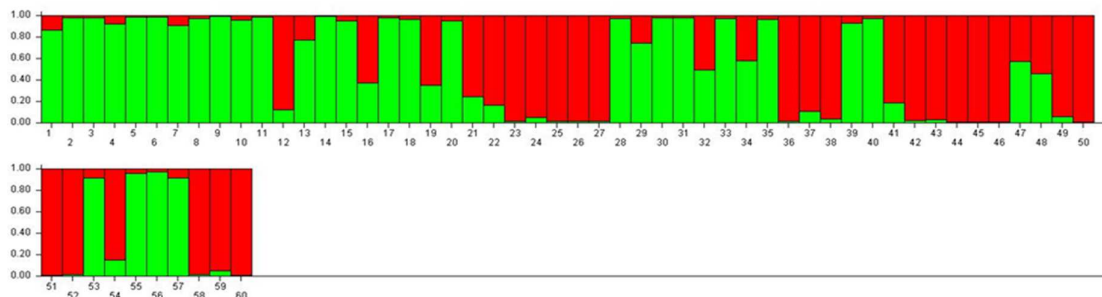
Table 6. Calculated statistics for optimal values of K using Structure software

K	Mean LnP (K)	LnP (K)	Ln' (K)	Ln'' (K)	ΔK
1	-3241.87	0.581	—	—	—
2	-3062.50	2.672	179.37	49.380	18.474
3	-2932.51	3.433	129.99	23.610	6.876
4	-2826.13	17.360	106.38	14.180	0.816
5	-2733.93	24.037	92.20	6.650	0.276
6	2648.38	35.525	85.55	86.820	2.443
7	-2649.65	119.073	-1.270	586.490	4.925
8	-3237.41	923.202	-587.76	1108.160	1.200
9	-2717.01	421.458	520.400	883.020	2.095
10	-3079.63	636.248	-362.620	—	—



شکل ۳- نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد زیرجمعیت‌ها (K=2) در توده‌های بومی و تجاری جو زراعی مورد بررسی بر اساس نشانگرهای SSR در نرم‌افزار Structure با استفاده از Structure Harvester

Figure 3. Two-way charts to determine the number of subpopulations (K=2) in the investigated native and commercial barley based on SSR markers in Structure software using Structure Harvester



شکل ۴- تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل بی‌زین برای ۶۰ ژنوتیپ مورد مطالعه جو بر اساس نشانگر SSR. هر رنگ یک زیرجمعیت را نشان می‌دهد. اعداد روی محورهای افقی و عمودی به ترتیب شماره ژنوتیپ و ضریب تعلق (Q) هر ژنوتیپ به دو زیرجمعیت را نشان می‌دهند.

Figure 4. Bayesian model based-cluster analysis of the studied 60 barley genotypes using ISSR markers. The numbers on the x- and y-axis indicate the genotype number and the membership coefficient (Q) of each genotype to the two subpopulations, respectively.

عدم تعادل پیوستگی (Linkage Disequilibrium)

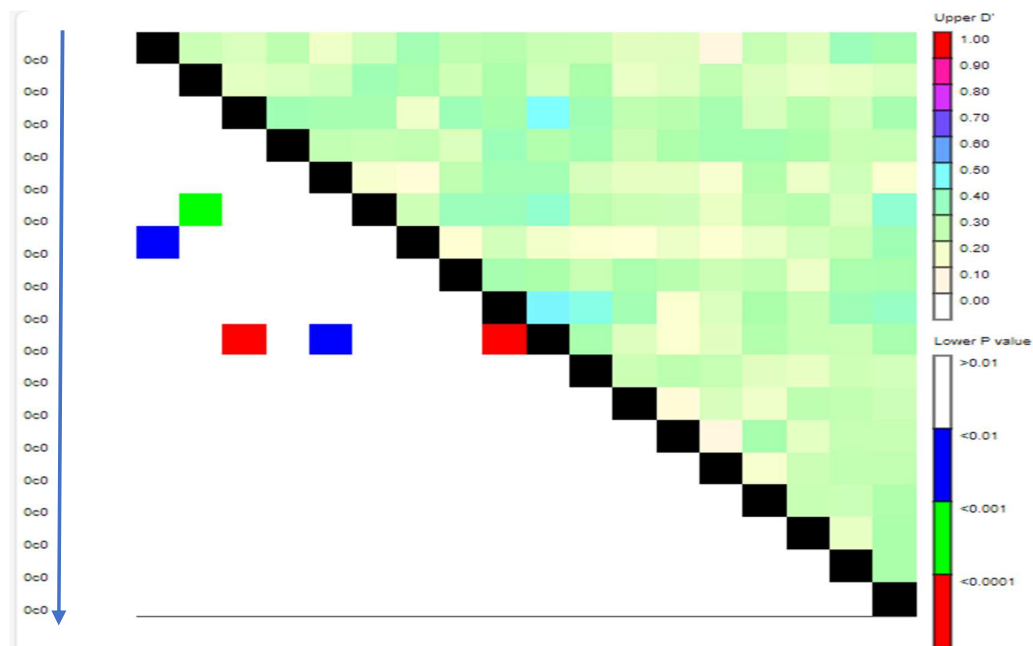
پایه و اساس تجزیه ارتباطی، عدم تعادل پیوستگی (LD; Linkage Disequilibrium) است که نشان‌دهنده همبستگی غیرتصادفی آلل‌ها در مکان‌های ژنتیکی مختلف روی یک کروموزوم (گروه پیوستگی) یا کروموزوم‌های مختلف است. مکان‌یابی QTL‌ها در ژنتیک کمی بر اساس عدم تعادل پیوستگی صورت می‌گیرد. علاوه بر ترکیب ساختار جمعیت، گستره عدم تعادل پیوستگی (LD) در ژنوم از اهمیت اساسی برخوردار است (Al-Maskri *et al.*, 2012). میزان LD در نتیجه اتفاقات نوترکیبی که در طول زمان رخ می‌دهد، کاهش می‌یابد. در صورتی که تعداد اتفاقات نوترکیبی بیشتری بین دو مکان ژنی اتفاق افتد، LD سریع‌تر زوال پیدا می‌کند. اگر LD داخل یک منطقه خیلی سریع زوال پیدا کند، برای پویش آن منطقه ژنومی به تعداد زیادی نشانگر در آن ناحیه نیاز خواهد بود. از طرف دیگر، اگر LD خیلی آهسته زوال پیدا کند، اندازه بلوک‌های هاپلوتایپی بسیار بزرگ خواهد بود و در نتیجه به‌طور واضح نمی‌توان مکان ژنی علی را شناسایی کرد (Tahmasbali *et al.*, 2021). از روش‌هایی که برای نمایش چگونگی کاهش عدم تعادل پیوستگی مورد استفاده قرار می‌گیرد، ترسیم ماتریس عدم تعادل بین جایگاه‌های ژنی است (شکل ۵). ماتریس عدم تعادل، ماتریسی قطری است که دو طرف آن را جایگاه‌های ژنی (نشانگرها) تشکیل می‌دهند. عناصر بالای قطر اصلی، میزان عدم تعادل پیوستگی و عناصر پایین قطر اصلی، میزان سطح احتمال را برای آزمون دقیق فیشر به‌صورت بلوک‌های رنگی نشان می‌دهد، در نتیجه ماتریس به شکل مربع است. همان‌گونه که مقیاس‌بندی سمت راست شکل (۵) نشان می‌دهد، رنگ‌های قرمز و سفید عناصر بالای قطر اصلی به‌ترتیب به معنی عدم تعادل پیوستگی مطلق و تعادل پیوستگی و رنگ‌های آبی و سفید در پایین قطر اصلی به‌ترتیب معنی‌داری یا غیرمعنی‌داری عدم تعادل پیوستگی در سطح احتمال یک درصد را نشان می‌دهند. عدم تعادل پیوستگی به‌وسیله دو آماره D' و r^2 اندازه‌گیری می‌شود. در این مطالعه ارزش r^2 بین ۰/۱۲ تا ۰/۱۷ بود (جدول ۷).

تجزیه ارتباطی نشانگر - صفت

به‌طور کلی برای تجزیه ارتباطی دو روش شامل مدل خطی عمومی (GLM; General Linear Model) و

مدل خطی مخلوط (MLM; Mixed Linear Model) پیشنهاد شده است. در روش GLM فقط ساختار جمعیت (ماتریس Q) در نظر گرفته می‌شود، در حالی که در روش MLM علاوه بر ماتریس ساختار جمعیت، ماتریس روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت (ماتریس K) نیز به‌عنوان متغیر کمکی (Covariate) در تجزیه ارتباط در نظر گرفته می‌شود و بنابراین روابط و پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت به‌حداقل می‌رسد و نتایج دقیق‌تر و قابل اعتمادتری در مقایسه با مدل GLM به‌دست می‌آید (Bresseghele & Sorrells, 2006). در مطالعه حاضر، تجزیه ارتباطی بر اساس مدل MLM به‌صورت جداگانه برای دو شرایط دمایی ($+8^{\circ}\text{C}$ و -2°C) انجام شد. نتایج نشان داد که در مجموع پنج نشانگر SSR با ژن‌های کنترل‌کننده صفات مورد بررسی در سطح احتمال پنج درصد ارتباط معنی‌داری داشتند. از این تعداد، سه نشانگر (Bmag0518 , Bmag0211 , Ebmac0674) با ژن‌های میزان پرولین در شرایط تنش دمایی -2°C ، یک نشانگر (Bmag0223) با ژن‌های میزان پرولین در شرایط دمایی $+8^{\circ}\text{C}$ و یک نشانگر (Bmag0173) نیز با ژن‌های میزان فروکتان در شرایط دمایی $+8^{\circ}\text{C}$ ارتباط معنی‌داری نشان دادند (جدول ۷)، و نشانگر دارای ارتباط معنی‌دار با میزان فروکتان در شرایط دمایی -2°C شناسایی نشد.

مطالعات متعددی برای شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف در جو انجام شده است. روی و همکاران (Roy *et al.*, 2010) واکنش ۳۱۸ نمونه ژنتیکی جو وحشی را نسبت به بیماری لکه قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای ارزیابی و با استفاده از روش تجزیه ارتباطی، ۱۳ ناحیه واجد QTL‌های کنترل‌کننده مقاومت به این بیماری را با r^2 بین ۲/۳ تا ۳/۹ درصد شناسایی کردند. وانگ و همکاران (Wang *et al.*, 2016) از نشانگرهای SNP و SSR به‌منظور تهیه نقشه ژنتیکی و شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات زراعی در یک جمعیت دابل هاپلوئید جو استفاده کردند. در مطالعه دیگری، QTL‌های کنترل‌کننده صفات گیاهچه‌ای جو تحت شرایط کشت هیدروپونیک در یک جمعیت دابل هاپلوئید شناسایی شد (Wang *et al.*, 2017). امروزه کاربرد اغلب مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی در گیاهان محدود به گونه‌های گیاهی مهم با ژنوم شناخته شده است. علاوه بر این، تعداد محدودی از QTL‌های شناسایی شده در سطح ژن همسانه‌سازی شده‌اند.



شکل ۵- پلات عدم تعادل پیوستگی (LD plot) در ژنوتیپ‌های جو با استفاده از نرم‌افزار TASSEL. قسمت بالای قطر میزان عدم تعادل پیوستگی با استفاده از آماره D و قسمت پایین قطر سطح احتمال معنی‌دار عدم تعادل پیوستگی بین جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.
Figure 5. Linkage disequilibrium plot (LD plot) in barley genotypes using TASSEL software. The upper part of diameter shows degree of linkage disequilibrium using the D statistic and the lower part of the diameter shows the the significant level (P-value) for linkage disequilibrium between marker pairs.

جدول ۷- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در ارقام مورد مطالعه جو با استفاده از مدل MLM

Trait	Marker	Temperature	P-value	R ²
Proline	Bmag0518	-2 °C	0.0092	0.20
Proline	Bmag0211	-2 °C	0.019	0.17
Proline	Ebmac0674	-2 °C	0.0453	0.12
Proline	Bmag0223	+8 °C	0.0469	0.21
Fructan	Bmag0173	+8 °C	0.0498	0.177

نتیجه‌گیری کلی

جمعیت مورد مطالعه نشان داد. نتایج تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM)، در مجموع پنج ارتباط معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) نشانگر-صفت را بین نشانگرهای SSR با مقادیر پرولین و فروکتان تحت دو شرایط دمایی شناسایی کرد. از این تعداد، سه مکان (Bmag0518, Bmag0211, Ebmac0674) با ژن‌های کنترل کننده پرولین تحت شرایط دمای $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ، یک مکان (Bmag0223) با ژن‌های کنترل کننده پرولین تحت شرایط دمای $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ و یک مکان (Bmag0173) با ژن‌های کنترل کننده فروکتان تحت شرایط دمای $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ارتباط معنی‌دار داشتند. از نشانگرهای شناسایی شده، بعد از اعتبارسنجی، می‌توان برای بهبود مقاومت به سرما در جو از طریق اصلاح به کمک نشانگر استفاده کرد.

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین الگوی عدم تعادل پیوستگی و تجزیه ارتباطی میزان پرولین و فروکتان در جو زراعی، ۶۰ ژنوتیپ به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت شرایط نرمال ($+8\text{ }^{\circ}\text{C}$) و تنش سرمای دیررس بهاره ($-2\text{ }^{\circ}\text{C}$) ارزیابی شدند. بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، تفاوت معنی‌داری بین ارقام جو از نظر هر دو صفت مورد مطالعه در هر دو شرایط دمایی $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ و $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ مشاهده شد. محتوای اطلاعات چند شکلی از ۰/۵۹ تا ۰/۸۲ به ترتیب در نشانگرهای Bmag0007 و Bmag0032، تنوع ژنی از ۰/۶۳ تا ۰/۸۴ با متوسط ۰/۷۴ و فراوانی آلل رایج از ۰/۲۱ تا ۰/۵۲ متغیر بود. تجزیه ساختار جمعیت، وجود دو زیرجمعیت را در

تضاد منافع

نویسندگان تایید می‌کنند که این تحقیق در غیاب هرگونه روابط تجاری یا مالی می‌تواند به عنوان تضاد منافع بالقوه تعبیر شود، انجام شده است.

مقاله حاصل یک کار تحقیقاتی اصیل بوده و تا کنون به‌طور کامل به هیچ زبانی و در هیچ نشریه یا همایشی چاپ و منتشر نشده است و هیچ اقدامی نیز برای انتشار آن در هیچ نشریه یا همایشی صورت نگرفته و نخواهد گرفت.

رعایت اخلاق در نشر

نویسندگان اعلام می‌کنند که در نگارش این مقاله به‌طور کامل از اخلاق نشر از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و انتشار دوگانه، پیروی کرده‌اند. همچنین این

اجازه انتشار مقاله

نویسندگان با چاپ این مقاله به‌صورت دسترسی باز موافقت کرده و کلیه حقوق استفاده از محتوا، جدول‌ها، شکل‌ها، تصویرها و غیره را به ناشر واگذار می‌کنند.

References

- Al-Maskri, A. H., Sajjad, M., & Khan, S. H. (2012). Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. *International Journal of Agriculture & Biology*, 14, 153-160. doi: [10.13140/2.1.1925.9524](https://doi.org/10.13140/2.1.1925.9524).
- Atıcı, Ö., & Nalbantoğlu, B. (2003). Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, 64(7), 1187-1196. doi: [10.1016/S0031-9422\(03\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00420-5).
- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical test. *Proceedings of the Royal Society A*, 160, 268-282.
- Bonman, J. M., Gu, Y., Coleman-Derr, D., Jackson, E. W., & Bockelman, H. E. (2011). Inferring geographic origin of barley (*Hordeum vulgare* L. subsp. vulgare) accessions using molecular markers. *Genetic Resources & Crop Evolution*, 58, 291-298. doi: [10.1007/s10722-010-9574-4](https://doi.org/10.1007/s10722-010-9574-4).
- Brbakić, L., Trkulja, D., Mikić, S., Mirosavljević, M., Momčilović, V., Dudić, B., & Aćin, V. (2021). Genetic diversity and population structure of Serbian barley (*Hordeum vulgare* L.) collection during a 40-year long breeding period. *Agronomy*, 11(1), 118. doi: [10.3390/agronomy11010118](https://doi.org/10.3390/agronomy11010118).
- Breseghele, F., & Sorrells, M. E. (2006). Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science*, 46, 1323-1330. doi: [10.2135/cropsci2005.09-0305](https://doi.org/10.2135/cropsci2005.09-0305).
- Carillo, P., & Gibon, Y. (2011). Protocol: Extraction and determination of proline. *PrometheusWiki*, 1-5. <https://hdl.handle.net/11591/322173>.
- Chalecka, M., Kazberuk, A., Palka, J., & Surazynski, A. (2021). P5C as an interface of proline interconvertible amino acids and its role in regulation of cell survival and apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11763. doi: [10.3390/ijms222111763](https://doi.org/10.3390/ijms222111763).
- Choudhir, G., & Vasistha, N. K. (2021). Engineering fructan biosynthesis against abiotic stress. In: Wani, S. H., Gangola, M. P., & Ramadoss, B. R. (Eds.). *Compatible Solutes Engineering for Crop Plants Facing Climate Change*. Springer, Cham. pp. 145-170. doi: [10.1007/978-3-030-80674-3_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-80674-3_6).
- Cozzolino, D., Degner, S., & Eglinton, J. (2016). Relationships between fructans content and barley malt quality. *Food Analytical Methods*, 9(7), 2010-2015. doi: [10.1007/s12161-015-0386-1](https://doi.org/10.1007/s12161-015-0386-1).
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620. doi: [10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x).
- Enyew, M., Dejene, T., Lakew, B., & Worede, F. (2019). Clustering and principal component analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces for major morphological traits from North Western Ethiopia. *International Journal of Agricultural Science & Food Technology*, 5(2), 58-63. doi: [10.17352/2455-815X.000043](https://doi.org/10.17352/2455-815X.000043).
- FAO. (2020). FAOSTAT Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Retrieved June 15, 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Gumede, M. T., Gerrano, A. S., Amelework, A. B., & Modi, A. T. (2022). Analysis of genetic diversity and population structure of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) Walp) genotypes using single nucleotide polymorphism markers. *Plants*, 11(24), 3480. doi: [10.3390/plants11243480](https://doi.org/10.3390/plants11243480).

- Hajmansoor, S., Bihamta, M. A., Nabipour, A., Mohammadi, A., Pirseyedi, M., & Nikkhah H. R. (2010). Genetic diversity in barley genotypes: II. Microsatellite markers and morphological traits. *Seed & Plant Journal*, 26(2), 150-172. [In Persian]. doi: [10.22092/spj.2017.110955](https://doi.org/10.22092/spj.2017.110955).
- Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J. M., Djalovic, I., & Siddique, K. H. (2018). Effect of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology, and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1430. doi: [10.3389/fpls.2018.01430](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01430).
- Haghpanah, K., Mirfakhraee, S. R., Khodadadi, M., & Shamsifar, S. (2020). 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. *Journal of Crop Breeding*, 12(34), 199-209. [In Persian]. doi: [10.29252/jcb.12.34.199](https://doi.org/10.29252/jcb.12.34.199).
- Hoban, S., Bruford, M. W., Funk, W. C., Galbusera, P., Griffith, M. P., Grueber, C. E., & Heuertz, M., Hunter, M. E., Hvilsom, C., Stroil, B. K., Kershaw, F., Khoury, C. K., Laikre, L., Lopes-Fernandes, M., MacDonald, A. J., Mergeay, J., Meek, M., Mittan, C., Mukassabi, T. A., O'Brien, D., Ogden, R., PALMA-SILVA, C., Ramakrishnan, U., Segelbacher, G., Shaw, R. E., Sjögren-Gulve, p., Veličković, N., & Vernesi, C. (2021). Global commitments to conserving and monitoring genetic diversity are now necessary and feasible. *Bioscience*, 71(9), 964-976. doi: [10.1093/biosci/biab054](https://doi.org/10.1093/biosci/biab054).
- Hosseinfard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyla, Ł., & Garnczarska, M. (2022). Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5186. doi: [10.3390/ijms23095186](https://doi.org/10.3390/ijms23095186).
- Irsyadi, M. B., Sari, S. K., Oktiasuti, E., & Rineksane, I. A. (2024). Rapid genomic DNA extraction for Soybean (*Glycine max* L. Merr) using modified CTAB protocol to obtain high-quality DNA. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 61(2), 97-104. doi: [10.56042/ijbb.v61i2.7603](https://doi.org/10.56042/ijbb.v61i2.7603).
- Jiang, J., Guo, Z., Sun, X., Jiang, Y., Xie, F., & Chen, Y. (2023). Role of proline in regulating turfgrass tolerance to abiotic stress. *Grass Research*, 3(1), 1-7. [10.48130/GR-2023-0002](https://doi.org/10.48130/GR-2023-0002).
- Julca, I., Marcet-Houben, M., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Gaut, B. S., Díez, C. M., & Gabaldón, T. (2020). Genomic evidence for recurrent genetic admixture during the domestication of Mediterranean olive trees (*Olea europaea* L.). *BMC Biology*, 18, 148. doi: [10.1186/s12915-020-00881-6](https://doi.org/10.1186/s12915-020-00881-6).
- Kage, U., Kumar, A., Dhokane, D., Karre, S., & Kushalappa, A. C. (2016). Functional molecular markers for crop improvement. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(5), 917-930. doi: [10.3109/07388551.2015.1062743](https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1062743).
- Karim, K., Rawda, A., Hatem, C. M., Mbarek, B. N., & Mokhtar, T. (2010). Analysis of genetic diversity and relationships in local Tunisian barley by RAPD and SSR analysis. *African Journal of Biotechnology*, 9(44), 7429. doi: [10.5897/AJB2010.000-3313](https://doi.org/10.5897/AJB2010.000-3313).
- Khodayari, H., Saeidi, H., Roofgar, A., Rahiminejad, M. R., Pourkheirandish, M., & Komatsuda, T. (2012). Genetic diversity of cultivated barley landraces in Iran measured using microsatellites. *International Journal of Bioscience, Biochemistry & Bioinformatics*, 2(4), 287-290. doi: [10.7763/IJBBB.2012.V2.118](https://doi.org/10.7763/IJBBB.2012.V2.118).
- Latutrie, M., Gourcilleau, D., & Pujol, B. (2019). Epigenetic variation for agronomic improvement: An opportunity for vegetatively propagated crops. *American Journal of Botany*, 106(10), 1281. doi: [10.1002/ajb2.1357](https://doi.org/10.1002/ajb2.1357).
- Liu, M., Li, Y., Ma, Y., Zhao, Q., Stiller, J., Feng, Q., Tian, Q., Liu, D., Han, B., & Liu, C. (2020). The draft genome of a wild barley genotype reveals its enrichment in genes related to biotic and abiotic stresses compared to cultivated barley. *Plant Biotechnology Journal*, 18(2), 443-456. doi: [10.1111/pbi.13210](https://doi.org/10.1111/pbi.13210).
- Márquez-López, R. E., Loyola-Vargas, V. M., & Santiago-García, P. A. (2022). Interaction between fructan metabolism and plant growth regulators. *Planta*, 255(2), 49. doi: [10.1007/s00425-022-03826-1](https://doi.org/10.1007/s00425-022-03826-1).
- Ministry of Agriculture Jihad. (2023). Agricultural Statistical Bulletin, Cropping year 2021-2022. Vol. 1. Crop Plants. Reports on the area, production and yield of crop plants. Information and Communication Technology Center, Ministry of Agriculture Jihad, Tehran, Iran. [In Persian].

- Miranda, C., Bilavcik, A., Chaloupka, R., Dreisiebner-Lanz, S., Gastoł, M., Luedeling, E., & McCallum, S. (2019). EIP-AGRI Focus Group. Protecting fruit production from frost damage. Minipaper 5: Phenology and critical temperatures. European Commission. https://ec.europa.eu/eip/agriculture/sites/default/files/fg30_mp5_phenology_critical_temperatures.pdf.
- Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants - salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248. doi: [10.2135/cropsci2003.1235](https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235).
- Mojirsheibani, E., Peyghambari, S. A., Yazdisamadi, B., Naghavi, M. R., & Ghadrnan, K. (2013). Evaluation of genetic diversity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and relationship among traits using agronomic characteristics and molecular markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 15(1), 46-59. [In Persian]. dor: [20.1001.1.15625540.1392.15.1.5.3](https://doi.org/20.1001.1.15625540.1392.15.1.5.3).
- Moose, S. P., & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 147(3), 969-977. doi: [10.1104/pp.108.118232](https://doi.org/10.1104/pp.108.118232).
- Nabati, J., Nezami, A., Mirmiran, S. M., Hasanfard, A. R., Hojjat, S. S., & Bagheri, A. (2020). Freezing tolerance in some lentil genotypes under controlled conditions. *Seed & Plant Journal*, 36(2), 183-205. doi: [10.22092/sppi.2020.123186](https://doi.org/10.22092/sppi.2020.123186).
- Nezami, A., Nabati, J., Mirmiran, S. M., Hasanfard, A., & Mohammadi, M. (2022). How does the freezing stress in the seedling stage affect the chickpea's morpho-physiological and biochemical attributes? *Gesunde Pflanzen*, 75, 1107-1119. doi: [10.1007/s10343-022-00771-7](https://doi.org/10.1007/s10343-022-00771-7).
- Niu, S., Song, Q., Koiwa, H., Qiao, D., Zhao, D., Chen, Z., & Wen, X. (2019). Genetic diversity, linkage disequilibrium, and population structure analysis of the tea plant (*Camellia sinensis*) from an origin center, Guizhou Plateau, using genome-wide SNPs developed by genotyping-by-sequencing. *BMC Plant Biology*, 19, 328. doi: [10.1186/s12870-019-1917-5](https://doi.org/10.1186/s12870-019-1917-5).
- Park, L. (2019). Population-specific long-range linkage disequilibrium in the human genome and its influence on identifying common disease variants. *Scientific Reports*, 9(1), 11380. doi: [10.1038/s41598-019-47832-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-47832-y).
- Pritchard, J. K., & Donnelly, P. (2001). Case-control studies of association in structured or admixed populations. *Theoretical Population Biology*, 60(3), 227-237. doi: [10.1006/tpbi.2001.1543](https://doi.org/10.1006/tpbi.2001.1543).
- Roy, J. K., Smith, K. P., Muehlbauer, G. J., Chao, S., Close, T. J., & Steffenson, B. J. (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Molecular Breeding*, 26, 243-256. doi: [10.1007/s11032-010-9402-8](https://doi.org/10.1007/s11032-010-9402-8).
- Shahmoradi, S., & Zahrawi, M. (2014). Identification of traits related to drought tolerance in barley genotypes originated from arid climates of Iran. *Journal of Crop Improvement*, 16(1), 23-41. [In Persian]. doi: [10.22059/jci.2014.51940](https://doi.org/10.22059/jci.2014.51940).
- Shamsifar, S., Mirfakhraei, R., & Haghpanah, K. (2021). Study of genetic diversity in some barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using microsatellite markers and physiological traits of fructan and ion leakage under late spring freeze stress. *Plant Production Technology*, 13(1), 163-177. [In Persian]. doi: [10.22084/PPT.2021.22542.2016](https://doi.org/10.22084/PPT.2021.22542.2016).
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Shuorvazdi, A., Mohammadi, S. A., Norozi, M., & Sadeghzadeh, B. (2014). Molecular analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. *Plant Genetic Researches*, 1(1), 51-64. [In Persian]. doi: [10.29252/pgr.1.1.51](https://doi.org/10.29252/pgr.1.1.51).
- Shroyer, J. P., Mikesell, M. E., & Paulsen, G. M. (1995). Spring freeze injury to Kansas wheat. Publication of Kansas State University. pp. 1-12.
- Singh, I. M., Ngangkham, U., Sarika, K., Devi, Y. S., Singh, T. S., Singh, T. B., & Laha, R. (2024a). Genetic diversity and DNA fingerprinting of rice varieties of Manipur using microsatellite markers. *Electronic Journal of Plant Breeding*, 15(2), 504-514. doi: [10.37992/2024.1502.063](https://doi.org/10.37992/2024.1502.063).
- Singh, P., Sharma, A., Tandon, V., Salgotra, R. K., Sharma, M., Gupta, V., & Sharma, D. (2024b). Genetic diversity and population structure of Bael [*Aegle marmelos* (L.) Correa] genotypes using molecular markers in the North-Western plains of India. *Scientific Reports*, 14(1), 18032. doi: [10.1038/s41598-024-69030-1](https://doi.org/10.1038/s41598-024-69030-1).

- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti, Z. P., & Negri, V. (2011). Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical & Applied Genetics*, 122, 1281-1291. doi: [10.1007/s00122-011-1530-y](https://doi.org/10.1007/s00122-011-1530-y).
- Tahmasbali, M., Darvishzadeh, R., Fayaz Moghaddam, A., & Alipour, H. (2021). Selection of tolerant genotypes to broomrape *Orobanche cernua* stress in oriental tobacco *Nicotiana tabacum* genotypes using stress tolerance indices. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 9(4), 83-100. [In Persian]. doi: [10.22034/arpp.2021.12247](https://doi.org/10.22034/arpp.2021.12247).
- Tolipov, X. T. (2021). Determination of inulin in plants. *Вестник магистратуры*, 4-1(115), 16-18. <https://cyberleninka.ru/article/n/determination-of-inulin-in-plants>.
- Tricase, C., Amicarelli, V., Lamonaca, E., & Ran, R. L. (2018). Economic analysis of the barley market and related uses. In: Tadele, Z. (Ed.). *Grasses as Food and Feed*. IntechOpen. pp. 25-46. doi: [10.5772/intechopen.78967](https://doi.org/10.5772/intechopen.78967).
- Valluru, R., Lammens, W., Claupein, W., & Van den Ende, W. (2008). Freezing tolerance by vesicle-mediated fructan transport. *Trends in Plant Science*, 13(8), 409-414. doi: [10.1016/j.tplants.2008.05.008](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.05.008).
- Vus, N. A., Kobyzeva, L. N., & Bezuglaya, O. N. (2020). Determination of the breeding value of collection chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions by cluster analysis. *Vavilov Journal of Genetics & Breeding*, 24(3), 244. doi: [10.18699/VJ20.617](https://doi.org/10.18699/VJ20.617).
- Wang, H., Blakeslee, J. J., Jones, M. L., Chapin, L. J., & Dami, I. E. (2020). Exogenous abscisic acid enhances physiological, metabolic, and transcriptional cold acclimation responses in greenhouse-grown grapevines. *Plant Science*, 293, 10437. doi: [10.1016/j.plantsci.2020.110437](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110437).
- Wang, J., Sun, G., Ren, X., Li, C., Liu, L., Wang, Q., Du, B., & Sun, D. (2016). QTL underlying some agronomic traits in barley detected by SNP markers. *BMC Genetics*, 17, 103. doi: [10.1186/s12863-016-0409-y](https://doi.org/10.1186/s12863-016-0409-y).
- Wang, Q., Sun, G., Ren, X., Wang, J., Du, B., Li, C., & Sun, D. (2017). Detection of QTLs for seedling characteristics in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under hydroponic culture condition. *BMC Genetics*, 18, 94. doi: [10.1186/s12863-017-0562-y](https://doi.org/10.1186/s12863-017-0562-y).
- Wu, W., Bang, S., Bleecker, E. R., Castro, M., Denlinger, L., Erzurum, S. C., & Wenzel, S. E. (2019). Multiview cluster analysis identifies variable corticosteroid response phenotypes in severe asthma. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 199(11), 1358-1367. doi: [10.1164/rccm.201808-1543OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201808-1543OC).
- Xu, W., Liu, Q., Xu, W., Zhou, Z., Pham, D. T., Lou, P., & Hu, J. (2017). Energy condition perception and big data analysis for industrial cloud robotics. *Procedia Cirp*, 61, 370-375. doi: [10.1016/j.procir.2016.11.164](https://doi.org/10.1016/j.procir.2016.11.164).
- Yu, J., & Buckler, E. S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 155-160. doi: [10.1016/j.copbio.2006.02.003](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.003).
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14, 415-421. doi: [10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x).
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167(2), 313-324. doi: [10.1016/j.cell.2016.08.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029).