تحقیقات غلات
سال دوم/ شماره دوم/ ۱۳۹۱ (۹۳ -۸۳)

کارایی نشانگرهای EST-SSR در تعیین تنوع و ساختار ژنتیکی توده‌های بومی جو

نیر عبدالهی سیسی[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[۱و۲*]، سید سیامک علوی‌کیا[۱] و بهزاد صادق‌زاده[۳]

۱- گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، ۲- قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز، ۳- موسسه تحقیقات دیم کشور

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱۸- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۰)

چکیده

توده‌های بومی از ذخایر ژنتیکی با ارزش در برنامه‌های اصلاحی گیاهان زراعی می‌باشند. تعیین سطح تنوع و روابط ژنتیکی بین توده‌های بومی، لازمه حفاظت و بهره‌برداری بهینه از این منابع با ارزش است. در پژوهش حاضر، تنوع و روابط ژنتیکی ۱۱۹ توده بومی و ۲۵ لاین پیشرفته و تجاری جو از کشورهای ایران، چین، مصر، روسیه، پاکستان و اسپانیا با استفاده از ۲۲ جفت آغازگر EST-SSR بررسی شد. در مجموع، ۸۷ آلل در ۲۱ جایگاه EST-SSR، با میانگین ۴/۱۴ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد. میزان اطلاعات چندشکلی از ۰/۲۳ (GBM1212) تا ۰/۸۴ (SCSSR09398) با میانگین ۰/۵۲ متغیر بود. نشانگرهای مورد مطالعه، دارای میانگین تنوع ژنی ۰/۵۸ با دامنه ۰/۲۴ تا ۰/۸۶ بودند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های EST-SSR و با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله تکاملی Kimura 2-Parameter، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه منتسب کرد. در تجزیه به بردارهای اصلی، سه بردار اول در مجموع ۷۰/۰۹ درصد از تغییرات مولکولی کل بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند. نمایش دو بعدی ژنوتیپ‌ها بر اساس دو بردار اصلی اول، گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تائید کرد. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی بالایی درون گروه‌های جغرافیایی مشاهده شد که می‌تواند در برنامه‌های اصلاح جو استفاده شود. نتایج نشان داد که نشانگرهای EST-SSR به عنوان نشانگرهای عملکردی از کارایی مناسبی برای بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و تعیین ساختار جمعیت‌ها برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، جو، نشانگرهای EST-SSR

*نویسنده مسئول: mohammadi@tabrizu.ac.ir

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare*. L.) یکی از اولین گیاهان زراعی اهلی شده به شمار می‌رود. علاوه بر اهمیت تغذیه‌ای، جو یک جزء با ارزش تناوب محصولات است که مزایای زیادی از نظر تنوع گونه‌ای و کنترل آفات و بیماری‌ها دارد (Chakraborty and Newton, 2011). این گیاه همچنین به عنوان گونه مدل در تجزیه‌های ژنتیکی و مولکولی استفاده می‌شود (Pillen *et al*., 2000). میزان DNA هسته‌ای گونه‌های *Hordeum* از ۶/۸۵ تا ۱۰/۶۷ پیکوگرم در گونه‌های دیپلوئید تا ۲۹/۸۵ پیکوگرم در گونه‌های هگزاپلوئید متغیر است (Jakob *et al*., 2004).

توسعه کشاورزی منجر به تولید ارقامی با پتانسیل تولید بیشتر نسبت به توده‌های بومی شده است، ولی استفاده مداوم از ارقام اصلاح‌شده و یکنواختی کشت، تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی را در معرض خطر قرار داده است. بنابراین، استفاده از توده‌های بومی و خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی جهت غنی کردن خزانه ژنی آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. توده‌های بومی دارای سازگاری اکولوژیک و خصوصیات زراعی و اصلاحی با ارزش بوده و منابع ژنتیکی غنی از نظر ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌باشند (Thrupp, 2000). اگلینتون و همکاران (Eglinton *et al*., 1998) گزارش کردند که ژرم‌پلاسم جو وحشی و توده‌های بومی منابع غنی از ژن‌های جدید می‌باشند که با شناسایی و انتقال صفت مناسب از ژرم پلاسم وحشی و بومی به ارقام اصلاح‌شده می‌توان کیفیت مالت، تحمل به تنش خشکی و پایداری عملکرد را افزایش داد. هادادو و همکاران (Hadado *et al*., 2010) در مطالعه تنوع و سازگاری توده‌های بومی جو جمع‌آوری شده از ارتفاعات اتیوپی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالایی درون جمعیت‌های بومی وجود دارد و پتانسیل این توده‌ها را از نظر دارا بودن آلل های مفید، مورد تاکید قرار دادند.

استفاده از ذخایر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی، نیازمند اطلاع از روابط ژنوتیپ‌ها و تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است (Mohammadi and Prasanna, 2003). روش‌های متعددی مبتنی بر داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و تجزیه ساختار جمعیت‌ها استفاده می‌شود. در این راستا، نشانگرهای مبتنی بر DNA، به خصوص نشانگرهای ریزماهواره، به دلیل چندشکلی و تکرارپذیری بالا، چند آللی بودن و امتیازدهی همبارز، کاربرد فراوانی در مطالعات مختلف پیدا کرده‌اند (Meszaros *et al*., 2007).

در سال‌های اخیر، با دسترسی به توالی‌های بیان شده نشانمند (ESTها) و پیشرفت در زمینه بیوانفورماتیک، نشانگرهای SSR طراحی شده بر مبنای نواحی EST (EST-SSR) یا eSSRها در مطالعات مختلف برای بررسی تنوع ژنتیکی عملکردی استفاده شده‌اند (Pillen *et al*., 2000; Chabane *et al*., 2005; Salem *et al*., 2010). نشانگرهای EST-SSR چند شکلی نواحی ژنومی رونویسی شده نشان می‌دهند، بسیار حفاظت شده بوده و نسبت به نشانگرهای SSR انتقال‌پذیری بالایی بین گونه‌های خویشاوند دارند (Scott *et al*., 2000).

هولتون و همکاران (Holton *et al*., 2002) تنوع ژنتیکی ۱۱ رقم جو را با استفاده از ۴۱ جفت آغازگر EST-SSR مطالعه و انتقال‌پذیری آن‌ها را در ۱۵ رقم گندم بررسی کردند. از این آغازگرها، به ترتیب ۱۶ و ۵ جفت آغازگر در جو و گندم چندشکلی نشان دادند. سالم و همکاران (Salem *et al*., 2010) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۷ ژنوتیپ جو از مصر با ۲۳ جفت آغازگر EST-SSR، در مجموع ۹۷ آلل در ۲۲ جایگاه چندشکل با دامنه ۲ تا ۱۲ آلل با میانگین ۴/۳۲ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر کردند. میانگین حداقل ۳/۰۰ و حداکثر ۶/۳۳ آلل به ازای هر جایگاه به ترتیب به نشانگرهای کروموزوم‌های 5H و 4H تعلق داشت و تنوع ژنی از ۰/۱۳۷ تا ۰/۸۹۶ با میانگین ۰/۵۶۳ متغیر بود. جیلال و همکاران (Jilal *et al*., 2008) از ۲۰ جفت آغازگر SSR و EST-SSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی و جغرافیایی ۳۰۴ توده بومی از ۲۹ کشور مختلف جمع‌آوری شده در بانک ژن ایکاردا استفاده کردند که ۱۹ نشانگر چند شکل بودند در مجموع ۴۰۳ آلل با میانگین ۲۰/۲ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد و تعداد آلل‌ها از ۵ تا ۳۷ آلل متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) از. ۰/۲۸ تا ۰/۸۰ با میانگین ۰/۵۹ متغیر بود. وارشنی و همکاران (Varshney *et al*., 2005) میزان PIC نشانگرهای EST-SSR را برای مجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های

جو بین ۰/۲۴ تا ۰/۷۸ با میانگین ۰/۴۸ به دست آوردند. بیشترین میانگین PIC مربوط به نشانگرهای کروموزوم 3H با مقدار ۰/۵۱بود. کومادران و همکاران (Comadran *et al*., 2009) ۱۹۲ ژنوتیپ جو شامل توده‌های بومی و ارقام اصلاحی مربوط به نواحی مدیترانه‌ای را با ۳۰ نشانگر EST-SSR و ۲۲ نشانگر SSR بررسی کردند. در مجموع ۴۷۴ آلل با متوسط ۹/۱۱ آلل به ازای هرمکان تکثیر شد و میزان PIC از ۰/۱۲۶ تا ۰/۵ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه منتسب کرد.

هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی عملکردی توده‌های بومی، لاین اصلاحی و ارقام تجاری جو با استفاده از نشانگرهای EST-SSR و تعیین روابط بین ژنوتیپ‌ها و ساختار جمعیت مورد مطالعه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

مواد گیاهی مورد مطالعه شامل ۶۹ ژنوتیپ بومی جو ایران، ۲۳ ژنوتیپ بومی چین، ۱۲ ژنوتیپ بومی مصر، ۱۵ ژنوتیپ بومی از کشورهای روسیه، پاکستان و اسپانیا، ۹ لاین پیشرفته اصلاحی و ۱۶ رقم تجاری بود. استخراج DNA به روش CTAB (Saghai-Maroof *et al*., 1984) انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین شد.

تجزیه EST-SSR

برای تجزیه EST-SSR از ۲۲ جفت آغازگر توزیع شده در هفت کروموزوم جو با چند شکلی بالا در مطالعات قبلی استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، یک میکرولیتر بافر استخراج، ۰/۲ میکرولیتر dNTPs ۲۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و پس‌رو، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA پلی‌مراز (۵۰ واحد در میکرولیتر)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار همراه با ۵/۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۶۲-۵۵ درجه سانتی‌گراد (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۴ درصد غیر واسرشته‌ساز با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر در دستگاه ژل اسکن ۳۰۰۰ (شرکت Corbett Robotics استرالیا) تفکیک شدند.

تجزیه داده‌ها

الگوی نواری نشانگرهای چندشکل به صورت یک (وجود آلل) و صفر (عدم وجود آلل) امتیازدهی شدند. علاوه بر این، تعداد آلل در هر جایگاه تعیین و فراوانی آللی برآورد شد. برای تعیین قدرت تمایز نشانگر، پارامترهای میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص تنوع ژنی نی (Nei) با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker (Liu and Muse, 2005) محاسبه شد. تجزیه واریانس مولکولی (AVOMA) برای تفکیک واریانس مولکولی کل به واریانس درون و بین توده‌ها (کشورها) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx6.41 (Peakall and Smouse, 2010) انجام شد. برای این تجزیه، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به توده‌های بومی ایران، چین، مصر و سایر کشورها و نیز گروه ارقام تجاری و لاین‌های اصلاحی تقسیم شدند. برای تعیین واریانس مولکولی درون هر کدام از گروه‌ها، شاخص‌های شانون و نی محاسبه شد. گروه بندی ژنوتیپ‌ها، براساس تجزیه خوشه ای با الگوریتم Neighbour-Joining و ضریب فاصله Kimura 2-Parameter با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5/05 (Tamura *et al*., 2011) انجام و بهترین نقطه برش دندروگرام بر مبنای ۱۰۰۰ بار بوت‌استرپ تعیین شد. تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) نیز به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx6.41 انجام شد.

نتایج و بحث

چندشکلی نشانگرهای EST-SSR

از ۲۲ جفت آغازگر EST-SSR مورد استفاده، ۲۱ نشانگر در ژنوتیپ‌ها چند شکل بودند. شکل ۱ الگوی نواری

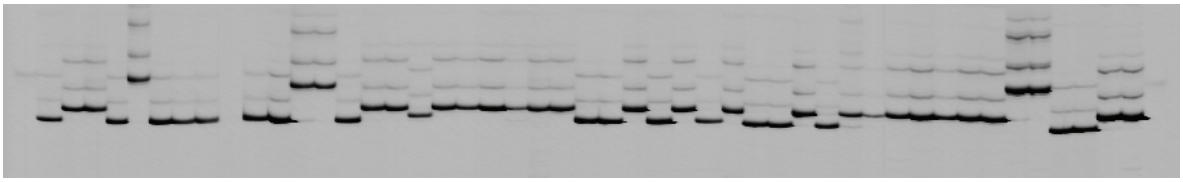
حاصل از جفت آغازگر SCSSR15334 را در تعدادی از ژنوتیپ‌های جو نشان می‌دهد. در مجموع ۸۷ آلل با دامنه از ۲ تا ۹ و میانگین ۴/۱۴ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد. بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگر SCSSR09398 (۹ آلل) و کمترین آن مربوط به نشانگرهای GBM1459، GBM1139 و SCSSR18076 (۲ آلل) بود. نشانگرهای مربوط به کروموزوم 4H با میانگین ۶ بیشترین و کروموزوم 3H با میانگین ۳ دارای کمترین تعداد آلل بودند. میزان تنوع ژنی از ۰/۲۴ تا ۰/۸۶ با میانگین ۰/۵۸ متغیر بود. بیشترین و کمترین تنوع ژنی، به ترتیب مربوط به نشانگرهای SCSSR09398 و GBM1212 بود. میزان اطلاعات چندشکلی از ۰/۲۳ (GBM1212) تا ۰/۸۴ (SCSSR09398) با میانگین ۰/۵۲ تغییر کرد (جدول ۱). در بین نشانگرهای EST-SSR مورد استفاده، بیشترین فراوانی آلل شایع (۰/۸۷)، کمترین میزان تنوع ژنی (۰/۲۴) و PIC (۰/۲۳) مربوط به نشانگر GBM1212 بود که نشان دهنده همبستگی منفی بین فراوانی آلل شایع و سایر پارامترها است. پارامتر فراوانی آلل شایع با تعداد آلل کمترین میزان همبستگی (۰/۷۴-) را داشت در حالی که همبستگی بالایی بین این پارامتر و تنوع ژنی (۰/۹۸-) و PIC (۰/۹۵-) برآورد شد. به‌طوری‌که نشانگرهای GBM1459، GBM1139 و SCSSR18076 با وجود دو آللی بودن مقدار PIC و تنوع ژنی بالاتری نسبت به نشانگر GBM1212 داشتند، چرا که این نشانگر دارای کمترین فراوانی آلل شایع بود.

هوبنر و همکاران (Hubner *et al*., 2009) در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۱ ژنوتیپ وحشی جو با استفاده از ۴۲ آغازگر EST-SSR، تعداد آلل را از ۶ تا ۳۹ با میانگین ۱۱/۳۴ آلل به ازای هر جایگاه و مقدار PIC را از ۰/۲۷ تا ۰/۹۳ با متوسط ۰/۶۱ گزارش کردند که بیشتر از تعداد آلل تکثیر شده در مطالعه حاضر بود. دلیل این امر می‌تواند به تنوع بالای ژنوتیپ‌های وحشی در مقایسه با توده‌های بومی و ارقام اصلاح‌شده باشد. حیدری و همکاران (Heidari *et al*., 2011) تنوع ژنتیکی ۳۵ رقم و لاین جو را با استفاده از ۱۹ جفت آغازگر EST-SSR بررسی کردند. در مجموع ۱۵۷ آلل با میانگین ۷/۸۵ آلل به ازای هر جفت آغازگر تکثیر شد. میانگین اطلاعات چندشکلی ۰/۶۹ و تنوع ژنی از ۰/۱۹ تا ۰/۹ متغیر بود. چابن و همکاران (Chabane *et al*., 2005) در بررسی ۲۳ جو وحشی و زراعی متعلق به مناطق مختلف را با ۱۲ جفت آغازگر SSR و ۱۰ جفت آغازگر EST-SSR گزارش کردند که نشانگرهای SSR چندشکلی بالایی را در مقایسه با EST-SSR داشتند. آن‌ها، متوسط PIC را ۰/۷۴ و ۰/۶ و میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه را ۹ و ۵/۶ به ترتیب برای SSR ژنومی و EST-SSR بدست آوردند. کاستیلو و همکاران (Castillo *et al*., 2010) با بررسی ساختار ژنتیکی ۹۴ ژنوتیپ جو وحشی با ۴۹ جفت آغازگر SSR شامل ۲۶ جفت EST-SSR، در مجموع ۲۱۰ آلل با میانگین ۸/۱ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر کردند و نشانگرهای EST-SSR دارای PIC بین ۰/۲۲ تا ۰/۹۱ با میانگین ۰/۶ بودند. در مطالعه الوچ و همکاران (Eleuch *et al*., 2008) روی ۴۸ ژنوتیپ جو با ۲۲ جفت آغازگر ریزماهواره، در مجموع ۲۳۸ آلل با میانگین ۱۰/۸۱ آلل به ازای هر جایگاه تکثیر شد و میانگین تنوع ژنتیکی و PIC به ترتیب ۰/۷۰ و ۰/۶۸ بود. سه جفت آغازگر مورد استفاده در مطالعه آن‌ها، EST-SSR بودند و طبق انتظار درجه چندشکلی و PIC کمتری نسبت به SSRهای ژنومی داشتند. دیل و همکاران (Theil *et al*., 2003) دامنه تغییرات PIC را برای ۷۶ جفت آغازگر EST-SSR در بررسی ۵۴ ژنوتیپ جو، بین ۰/۲۸ تا ۰/۷۸ با میانگین ۰/۴۵ برآورد کردند. تفاوت در تعداد آلل‌های تکثیرشده در مطالعات مختلف توسط آغازگرهای SSR و EST-SSR می‌تواند ناشی از ماهیت مواد ژنتیکی مورد استفاده، تعداد آغازگرها و ژنوتیپ‌ها باشد (Salem *et al*., 2010). وارشنی و همکاران (Varshney *et al*., 2005) گزارش کردند که به دلیل ماهیت مکانیسم‌های سُر خوردن آنزیم DNA پلی‌مراز در هنگام همانندسازی و نیز کراسینگ‌اُور نابرابر در ایجاد چند شکلی در جایگاه‌های SSR، چندشکلی آن‌ها بیشتر از نشانگرهای EST-SSR است.

تجزیه واریانس مولکولی

تجزیه واریانس مولکولی بر اساس منشأ جغرافیایی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و داده‌های EST-SSR نشان داد که واریانس درون و بین گروهی به ترتیب ۸۸ و ۱۲ درصد واریانس مولکولی کل ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند. محققین دیگر نیز در مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های بومی جو از

کشورهای مختلف، تنوع درون گروهی بیشتری در مقایسه با تنوع بین‌گروهی گزارش کردند (Parzies *et al.*, 2000; Turpeinin *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2011). پارزیس و همکاران (Parzies *et al.*, 2000) بیان داشتند که تنوع ژنتیکی درون توده‌های بومی جمع‌آوری شده قدیمی بیشتر از توده‌های بومی جدید است و وقوع رانده شدگی ژنتیکی در هنگام دوره‌های تجدید در بانک‌های ژن می‌تواند عامل احتمالی دیگر برای افزایش تنوع ژنتیکی درون توده‌ها باشد. تورپینین و همکاران (Turpeinin *et al.*, 2001) با بررسی ارتباط تنوع نشانگرهای ریزماهواره با فاکتورهای اکولوژیکی در جمعیت‌های جو وحشی *Hordeum spontaneum* گزارش کردند که توزیع تنوع ژنتیکی مولکولی در درون جمعیت‌های تصادفی نیست و با فاکتورهای اکولوژیکی از قبیل و دما، در دسترس بودن آب و نوع خاک ارتباط دارد. در مطالعه حاضر نیز، تنوع درون گروهی بالا احتمالاً ناشی از فاکتورهای فوق باشد.



شکل ۱- الگوی نواری نشانگر SCSSR15334 در تعدادی از توده‌های بومی جو ایران.
Figure 1. Banding pattern of SCSSR15334 in some of the Iranian barley landraces.

جدول ۱- نام، کروموزم و پارامترهای ژنتیکی نشانگرهای EST-SSR چندشکل در ژنوتیپ‌های جو مورد ارزیابی
Table 1. Name, chromosome and genetic parameters of polymorphic EST-SSR markers in the studied barley genotypes

نشانگر Marker	کروموزوم Chromosome	تعداد آلل Number of allele	فراوانی آلل شایع Major allele frequency	تنوع ژنی Gene diversity	میزان اطلاعات چندشکلی Polymorphic information content
GBM1461	1H	5	0.36	0.74	0.69
SCSSR04163	1H	5	0.65	0.53	0.48
GBM1459	2H	2	0.58	0.49	0.37
SCSSR03381	2H	5	0.27	0.77	0.73
GBM1110	3H	3	0.55	0.58	0.50
SCSSR25691	3H	4	0.52	0.63	0.58
GBM1139	3H	2	0.60	0.48	0.37
GBM1221	4H	7	0.36	0.74	0.70
SCSSR20569	4H	5	0.46	0.65	0.58
SCSSR15334	5H	5	0.41	0.68	0.62
GBM1176	5H	3	0.83	0.29	0.27
SCSSR02306	5H	3	0.66	0.51	0.45
GBM05939	5H	3	0.54	0.54	0.45
SCSSR18076	5H	2	0.83	0.28	0.24
SCSSR03907	5H	7	0.30	0.81	0.78
GBM1436	5H	3	0.79	0.35	0.32
SCSSR09398	6H	9	0.21	0.86	0.84
SCSSR05599	6H	4	0.41	0.70	0.65
GBM1212	6H	3	0.87	0.24	0.23
SCSSR15864	7H	4	0.44	0.70	0.65
GBM1126	7H	3	0.51	0.53	0.42
میانگین Mean		4.14	0.53	0.58	0.52

گروهی بالایی را در مقایسه با تنوع بین گروهی بر اساس نشانگرهای SSR (۰/۷۶ و ۰/۶۲) و EST-SSR (۰/۶۰ و ۰/۴۴) گزارش کردند. جیلال و همکاران (Jilal *et al*., 2008) در مطالعه ۳۰۴ ژنوتیپ جو متعلق به ۳۰ کشور و ۷ ناحیه جغرافیایی، واریانس بین مناطق و بین کشورها در درون مناطق را به ترتیب ۵/۳۴ و ۳/۶۳ درصد برآورد کردند، در حالی که واریانس بین ژنوتیپ‌ها از کشورهای مختلف، ۵۴/۳۶ واریانس بین ژنوتیپ‌ها، یا به عبارت دیگر حدود ۳۶/۶۷ درصد واریانس مولکولی کل را به خود اختصاص دادند. تفکیک واریانس درون گروهی به واریانس درون گروه‌های منفرد نشان داد که توده‌های بومی چین (۱۱/۵۵٪) و ایران (۱۱/۳۱٪) بیشترین و توده‌های بومی مصر (۸/۷۶٪) کمترین میزان واریانس درون گروهی کل را به خود اختصاص دادند. واریانس درون گروهی بالای ارقام زراعی و لاین‌های اصلاحی (۱۱/۱۹) به دلیل پایه ژنتیکی و شجره و نیز منشأ متفاوت آن‌ها است. بر اساس شاخص‌های شانون و نی، نیز توده‌های بومی چین و ایران بیشترین و توده‌های بومی مصر کمترین تنوع درون گروهی را داشتند (جدول ۲).

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Joining–Neighbour و ضریب فاصله Kimura 2-Parameter با استفاده از داده‌های EST-SSR، ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه منتسب کرد (شکل ۲). گروه اول شامل ۲۸ توده بومی ایران، چهار توده چینی و دو لاین اصلاحی و رقم تجاری بود. گروه دوم دارای دو زیر گروه بود که زیرگروه اول شامل ارقام تجاری و اصلاحی و زیر گروه دوم شامل توده‌های بومی از کشورهای مختلف بود. در گروه سوم، شش لاین اصلاحی، یک رقم تجاری، شش توده بومی ایرانی و دو توده بومی از چین و پاکستان قرار داشتند. اکثر توده‌های بومی مصر در گروه چهار قرار گرفتند. علاوه بر این، ۱۱ توده بومی از ایران و توده‌های بومی از اتیوپی، هند و اسپانیا نیز به این گروه منتسب شده بودند. گروه پنجم شامل ۲۰ توده بومی ایران، ۱۲ توده بومی از چین، دو، یک و یک توده بومی به ترتیب از مصر، انگلستان و الجزایر بود. هفت رقم تجاری نیز در این گروه قرار داشتند.

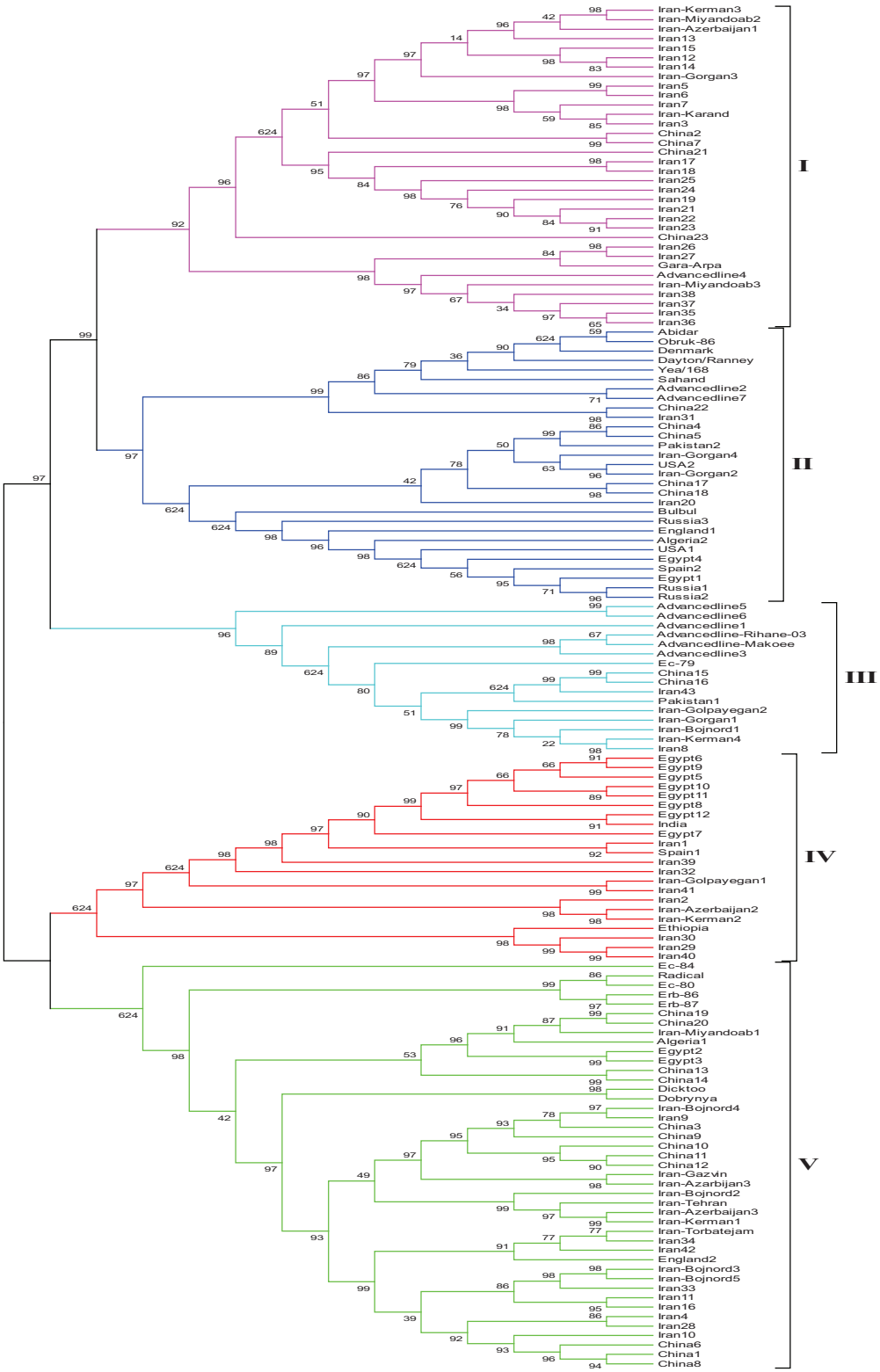
در این گروه بندی، ژنوتیپ‌های بومی ایران و چین به دلیل تعداد زیاد و نیز گستردگی از نظر شرایط آب و هوایی در اکثر گروه‌ها پخش بودند که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای درون ژنوتیپ‌های جو ایران و چین می‌باشند. پارک و همکاران (Park *et al*., 2011) نیز در مطالعه تنوع ژنتیکی ۷۳۷ توده بومی جو از کشورهای کره، چین و ژاپن با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نتوانستند توده‌ها را به طور کامل بر اساس کشور منشأ تفکیک کنند و در گروه-بندی حاصل ادغام توده‌های کشورهای مختلف وجود داشت. آن‌ها بیان داشتند که تنوع توده‌های بومی در نتیجه الگوی تکامل طبیعی آن‌ها که ناشی از شرایط آب و هوایی و اکولوژیکی محل کشت آن‌ها است و فشار گزینشی اعمال شده از سوی کشاورزان در طی دوره کشت و کار این توده-ها است.

جدول ۲- تنوع ژنتیکی درون گروه‌های جغرافیایی توده بومی، ارقام تجاری و لاین‌های اصلاحی جو بر اساس شاخص‌های شانون و نی
Table 2. Within group genetic diversity of barley geographical landraces, commercial varieties and breeding lines based on Shanon's and Nei's indices

Index	شاخص	ارقام تجاری و لاین‌های اصلاحی Commercial varieties and breeding lines	توده‌های بومی سایر کشورها Landraces from other counters	توده‌های بومی مصر Egyptian landraces	توده‌های بومی چین Chines landraces	توده‌های بومی ایران Iranian landraces
Shanon's index	شاخص شانون	0.81 (0.09)	0.79 (0.11)	0.63 (0.11)	0.93 (0.08)	1.02 (0.05)*
Nei's index	شاخص نی	0.53 (0.04)	0.47 (0.12)	0.38 (0.06)	0.53 (0.04)	0.55 (0.02)
Within group variance (%)	واریانس درون گروه (درصد)	11.19	10.19	8.76	11.55	11.31

* Digits within parenthesis indicate standard error.

* اعداد داخل پارانتز نشان‌دهنده خطای معیار می‌باشند.

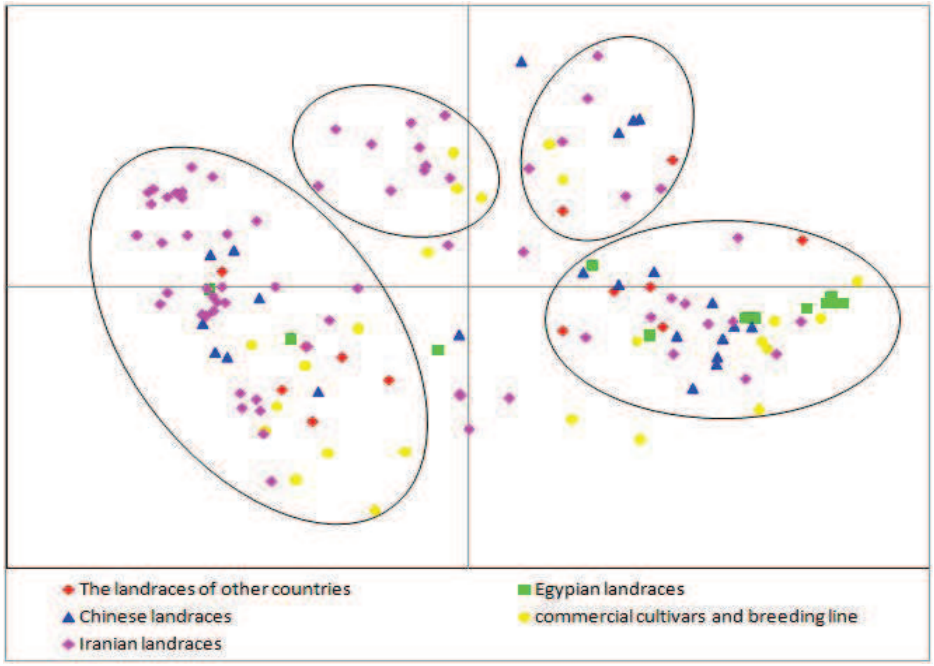


شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه بر اساس داده‌های نشانگرهای EST-SSR و با استفاده از الگوریتم Neighbor-Joining و ضریب فاصله Kimura-2- parameter.

Figure 2. Grouping of barley genotypes based on EST-SSRs data using Neighbor-Joining algorithm and Kimura-2-parameter distance coefficient.

بنابراین، در مطالعه حاضر، عدم قرار گرفتن کامل توده‌های بومی یک کشور در کنار هم ممکن است به علت پراکنش جغرافیایی وسیع آن‌ها در کشور منشأ باشد که در این صورت توده‌های مختلف تحت تأثیر نیروهای تکاملی متفاوت قرار داشتند و یا گزینش آن‌های در مناطق مختلف برای صفات متفاوت مطابق با شرایط مربوطه بوده است. بررسی محل‌های جمع‌آوری توده‌های بومی ایران با منشأ مشخص نشان می‌دهد که این توده‌ها متعلق به نواحی جغرافیایی با شرایط آب و هوایی و اکولوژیکی متفاوت هستند. در مطالعات مختلف، تعداد کم نشانگر مورد استفاده، پوشش ژنومی و ماهیت ژنتیکی آن‌ها نیز به عنوان دلیل احتمالی دیگر برای عدم رسیدن به یک گروه‌بندی کاملاً منطبق با منشأ جغرافیایی ژنوتیپ‌ها ذکر شده است (Salem *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011). در این مطالعه، تکثیر ۸۷ آلل در ۲۱ جایگاه EST-SSR تعداد نشانگر متوسطی را برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی توده‌های بومی فراهم کرده است، ولی گروه‌بندی لا ین‌های اصلاحی پیشرفته با شجره مشترک در کنار یکدیگر می‌تواند نشانه‌ای از کارایی این نشانگرها باشد. با این وجود، استفاده از تعداد بیشتر نشانگر، مخصوص نشانگرهای SSR ژنومی ممکن است به تفسیر بیشتر این موضوع کمک کند.

تجزیه به بردارهای اصلی به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای انجام شد. سه بردار اول در مجموع ۷۰/۰۹٪ از تغییرات مولکولی کل بین ژنوتیپ‌ها را تبیین کردند. بردار اول ۳۷/۲۱٪، بردار دوم ۱۸/۷۵٪ و بردار سوم ۱۴/۱۳٪ واریانس کل را در بر داشتند. تبیین حدود ۷۰٪ تغییرات مولکولی کل توسط سه بردار اول نشان می‌دهد که همبستگی بالایی بین نشانگرهای مورد استفاده وجود دارد یا به عبارت دیگر آن‌ها از نواحی ژنومی خاص ژنوم هستند (Mohammadi and Prasanna, 2003). با توجه به اینکه نشانگرهای EST-SSR از نواحی رمز کننده ژنوم هستند این نتیجه دور از انتظار نمی‌باشد. نحوه پراکنش ژنوتیپ‌ها در نمودار شکل ۳ نشان داده شده است. اکثر توده‌های بومی ایران دارای مقادیر پایین بردار اول و مقادیر بالای بردار دوم هستند، در حالی که بیشتر توده‌های بومی چین و مصر، از مقادیر بالای بردار اول و پایین بردار دوم برخوردار می‌باشند. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تا حدود زیادی با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت.



شکل ۳- پراکنش دوبعدی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه بر اساس دو بردار اصلی حاصل از تجزیه به بردارهای اصلی داده‌های EST-SSR.

Figure 3. Two dimensional distribution of the studied barley genotypes based on two principal coordinates resulted from principal coordinate analysis of EST-SSR data.

نتیجه گیری

در این بررسی ۲۱ جفت آغازگر مورد استفاده چند شکلی قابل قبولی را ایجاد کردند. با توجه به این که نشانگرهای EST-SSR تنوع ژنتیکی عملکردی در بخش بیان شونده ژنوم نشان می‌دهند، بنابراین ابزارهای مناسب برای تجزیه ارتباط صفات مهم اقتصادی و زراعی جهت استفاده در برنامه‌های اصلاح گیاهان می‌باشند. تنوع ژنتیکی بالای شناسایی شده در این مطالعه بین و درون توده‌های بومی جو نشان‌دهنده ژرم‌پلاسم غنی توده‌های بومی جو به خصوص در ایران است که این توده‌ها می‌توانند برای گسترش پایه ژنتیکی لا ین‌های اصلاحی و نیز به عنوان منابع با ارزش برای ژن‌های مفید مورد استفاده قرار گیرند. عدم انطباق کامل گروه‌بندی حاصل از داده‌های مولکولی با کشورهای منشأ آن‌ها که در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است، ممکن است به علت تعداد کم نشانگرهای مورد استفاده و نیز به دلیل تنوع جغرافیایی وسیع محل جمع‌آوری در کشورها باشد. با در نظر گرفتن انتقال‌پذیری بالای نشانگرهای EST-SSR بین گونه‌های مختلف یک جنس و حتی بین جنس‌ها، نشانگرهایی با چندشکلی بالا می‌توانند به عنوان کاندیدا برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مختلف، تجزیه ارتباط و گزینش به کمک نشانگر استفاده شوند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از موسسه تحقیقات دیم کشور و بانک ژن گیاهی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور برای فراهم کردن مواد گیاهی قدردانی می‌شود. این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز و در آزمایشگاه ژنومیک و اصلاح نباتات مولکولی دانشگاه تبریز انجام شد.

References

Castillo, A., Dorado, G., Feuillet, C., Sourdille, P. and Hernandez, P. 2010. Genetic structure and ecogeographical adaptation in wild barley (*Hordeum chilense* Roemer et Schultes) as revealed by microsatellite markers. **BMC Plant Biology** 10: 1-13.

Chabane, K., Ablett, G. A., Cordeiro, G. M., Valkoun, J. and Henry, R. J. 2005. EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. **Genetic Resources and Crop Evolution** 52: 903-909.

Chakraborty, S. and Newton, A. C. 2011. Climate change, plant diseases and food security, an overview. **Plant Pathology** 60: 2-14.

Comadran, J., Thomas, W. T. B., Van Eeuwijk, F. A., Ceccarelli, S., Grando, S., Stanca, A. M., Pecchioni, N., Akar, T., Al-Yassin, A., Benbelkacem, A., Ouabbou, H., Bort, J., Romagosa, I., Hackett, C. A. and Russell, J. R. 2009. Patterns of genetic diversity and linkage disequilibrium in a highly structured *Hordeum vulgare* association-mapping population for the Mediterranean basin. **Theoretical and Applied Genetics** 119: 175-187.

Eglinton, J. K., Evans, D. E., Brown, A. H. D., Langride, P., McDonald, G., Jefferies, S. P. and Barr, A. R. 1998. The use of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) in Breeding for Quality and Adaptation. Australian Barley Technical Symposium.

Eleuch, L., Jilal, A., Grando, S., Ceccarelli, S., von Korff Schmising, M., Tsujimoto, H., Hajer, A., Daaloul, A. and Baum, M. 2008. Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using simple sequence repeat markers. **Journal of Integrative Plant Biology** 50: 1004-1014.

Hadado, T. T., Rau, D., Bitocchi, E. and Papa, R. 2010. Adaptation and diversity along an altitudinal gradient in Ethiopian barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces revealed by molecular analysis. **BMC Plant Biology** 10: 121-141.

Heidari, A., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M., Shakiba, M. R., Ghasemi Golezani, K. and Yousefi, A. 2011. Analysis of genetic diversity in barley genotypes using SSR and EST-SSR markers. **Iranian Journal of Crop Sciences** 13: 146-156. (In Persian).

Holton, T. A., Christopher, J. T., McClure, L., Harker, N. and Henry, R. J. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. **Molecular Breeding** 9: 63-71.

Hubner, S., Hoffken, M., Oren, E., Haseneyer, G., Stein, N., Graner, A., Schmid, K. And Fridman, E. 2009. Strong correlation of wild barley (*Hordeum spontaneum*) population structure with temperature and precipitation variation. **Molecular Ecology** 18: 1523-1536.

Jakob, S. S., Meister, A. and Blattner, F. R. 2004. The considerable genome size variation of *Hordeum* species (*Poaceae*) is linked to phylogeny, life forms and speciation rates. **Molecular Biology and Evolution** 21: 860-869.

Jilal, A., Grando, S., Henry, R. J., Slade lee, L., Rice, N., Hill, H., Baum, M. and Ceccarelli, S. 2008. Genetic diversity of ICARDA's worldwide barley landrace. **Genetic Resources and Crop Evolution** 55: 1221-1230.

Liu, K. and Muse, S. V. 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21: 2128-2129.

Meszaros, K., Ildiko, K., Csaba, K., Judit, B., Laszlo, L. and Zoltan, B. 2007. Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). **South African Journal of Botany** 73: 43-48.

Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. **Crop Science** 43: 1235-1248.

Park, S. K., Lee, D. J., Baek, H. J., Lee, J. and Farooq, M. 2011. Study of the genetic diversity of Korean, Chinese and Japanese landraces of barley (*Hordeum vulgare* L.) using microsatellites. **Biodiversity Research and Conservation** 23: 3-13.

Parzies, H. K., Spoor, W. and Ennos, R. A. 2000. Genetic diversity of barley landrace accessions (*Hordeum vulgare* ssp. vulgare) conserved for different lengths of time in ex situ gene banks. **Heredity** 84: 476-486.

Peakall, R. and Smouse, P. E. 2010. GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6: 288-295.

Pillen, K., Binder, A., Kreuzkam, B., Ramsay, L., Waugh, R., Forster, J. and Leon, J. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. **Theoretical and Applied Genetics** 101: 652-660.

Saghai-Maroof, M. A., Solaiman, K., Tprgensen, R. A. and Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-lenth polymorphism in barely: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 81: 8014-8018.

Salem, K. F. M., Varshney, R. K., Roder, M. S. and Borner, A. 2010. EST-SSR based estimates on functional genetic variation in a barley (*Hordeum vulgare* L.) collection from Egypt. **Genetic Resources and Crop Evolution** 57: 515-521.

Scott, K. D., Eggler, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E. M., Lee, L. S. and Henry, R. J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. **Theoretical and Applied Genetics** 100: 723-726.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software, version 5.0. **Molecular Biology and Evolution** 24: 1596-1599.

Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R. K. and Graner, A. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 106: 411-422.

Thrupp, L. A., 2000. Linking agricultural biodiversity and food security: the valuable role of agrobiodiversity for sustainable agriculture. **International Affairs** 72: 265-281.

Turpeinen, T., Tenhola, T., Manninen, O., Nevo, E. and NissilÄ, E. 2001. Microsatellite diversity associated with ecology factors in *Hordeum spontaneum* populations in Israel. **Molecular Ecology** 10: 1577-1591.

Varshney, R. K., Grosse, I., Hahnel, U., Prasad, M., Stein, N., Langridge, P., Altschmied, L., and Graner, A. 2005. Genetic mapping and BAC selection using EST-SSR markers provides an estimate on the gene space in the barely genome. **Theoretical and Applied Genetics** 113: 239-250.

Zhang, H., Sreenivasulu, N., Weschke, W., Stein, N., Rudd, S., Radchuk, V., Potokina, E., Scholz, U., Schweizer, P., Zierold, U., Langridge, P., Varshney, R. K., Wobus, U. and Graner, A. 2004. Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags. **Plant Journal** 40: 276-290.

Efficiency of EST-SSR markers in determination genetic diversity and relationships of barley landraces

Neyer Abdollahi Sisi[1], Seyed Abolghasem Mohammadi[1, 2*], Seyed Siyamak Alavi-kia[1] and Behzad Sadeghzadeh[3]

1. Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, 2. [2]Center of Excellence in Cereal Molecular Breeding university of Tabriz, Tabriz, 2. Dryland Agricultural Research Institute (DARI), Maragheh, Iran

(Received: September 8, 2012- Accepted: December 10, 2012)

Abstract

Landraces are valuable genetic resources in crop breeding program. Determining level of genetic variation and relationships between landraces is necessary for optimal conservation and utilization of these valuable resources. In the present study, genetic diversity and relationships of 119 barley landraces from Iran, China, Egypt, Russia, Pakistan and Spain as well as 25 commercial varieties and breeding lines were evaluated using 22 EST-SSR primer pairs. A total of 87 alleles were amplified with an average of 4.14 alleles per locus in 21 polymorphic EST-SSR loci. Polymorphic information content ranged from 0.23 (GBM1212) to 0.84 (SCSSR09398) with an average of 0.52. The average of gene diversity for the studied markers was 0.58 with range of 0.24 to 0.86. Cluster analysis based on EST-SSR data, using Neighbor-Joining algorithm and Kimura 2-parameter evolutionary distance coefficient assigned the genotypes into five groups. In principal coordinate analysis, the first three coordinates explained about 70.09% of total molecular variance. Biplot presentation of the genotypes based on the two first coordinates confirmed the grouping resulted from cluster analysis. Analysis of molecular variance revealed high within group variance in geographical groups of barley which could be utilized in barley breeding programs. The results indicated that EST-SSR markers as functional markers have acceptable efficiency in analysis of genotypes relationships and determining population structure.

Keywords: Barley, Cluster analysis, EST-SSR markers, Genetic diversity

*Corresponding author: mohammadi@tabrizu.ac.ir