

## مطالعه تنوع ژنتیکی در برخی ارقام جو (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و صفات فیزیولوژیک فروکتان و نشت یونی تحت تنش سرمای دیررس بهاره

### Study on Genetic Diversity of some Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars Using SSR Marker and Physiological Traits, Froctan and Ion Leakage under Late Spring Cold Stress

سحر شمسی فرا<sup>۱</sup>، سیدرضاقلی میرفخرایی<sup>۲\*</sup> و کوثر حق پناه<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹

(مقاله پژوهشی)

#### چکیده

گیاهان همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های محیطی از جمله سرمای دیررس بهاره هستند که بر میزان رشد و تولید آن‌ها اثر می‌گذارد. هدف از این تحقیق، بررسی اثر تنش سرمای دیررس روی صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنش، شامل فروکتان و نشت یونی در مرحله زایشی بود. بدین منظور آزمایشی در شرایط کنترل شده (گلخانه) با مدل تجزیه مرکب در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی که شامل چهار محیط (سطوح دمایی ۸°C (شاهد)، ۲°C، ۰°C و -۲°C)، ۲۰ رقم جو زراعی در سه تکرار، در دانشکده کشاورزی تربیت مدرس انجام شد. نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده‌های فیزیولوژیک نشان داد که سطوح تنش سرما، رقم و اثر متقابل رقم در سرما برای هر دو صفت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین و نیز تجزیه بای‌پلات صفات فیزیولوژیک نشان داد گوهران و جلگه متحمل‌ترین و ریحان ۰۳ و ماکوئی حساس‌ترین ارقام به تنش سرما می‌باشند. برای بررسی تنوع ژنتیکی در بخش مولکولی از ۱۴ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. میانگین محتوای چندشکلی برابر ۰/۴۰ برآورد شد. ارقام با ضریب تشابه جاکارد و روش تجزیه خوشه‌ای با مدل Complete linkage گروه‌بندی شدند و ۲۰ رقم جو زراعی در چهار گروه قرار گرفتند. نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام، حاکی از ارتباط بالای (بالاترین ضریب تبیین، R<sup>2</sup>)، نشانگر EBmac0674 با صفت نشت یونی (۳۴/۳) و نشانگر Bmag0173 با صفت فروکتان (۲۰/۸) بود.

واژه‌های کلیدی: بای‌پلات، تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی، مقایسه میانگین

۱ و ۲. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول Email: Abdhoorz@modares.ac.ir

مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده اول به راهنمایی سیدرضاقلی میرفخرایی می‌باشد

در کلیه ارقام مورد بررسی گردید. در تحقیقی نایر<sup>۵</sup> و همکاران (2005) اثر تنش سرما بر گیاهچه‌های ۱۴ روزه خود با استفاده از اندازه‌گیری نشت الکترولیت‌ها بررسی کردند. نتایج نشان داد که با کاهش دما، نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت. اختلال در فعالیت غشاهای سلولی در اثر تنش سرما، سبب نشت الکترولیت‌ها از سلول شده و اندازه‌گیری میزان نشت از بافت‌های تحت تنش می‌تواند معیار قابل قبولی برای سنجش تحمل به تنش سرما باشد (هان و بیسجوف<sup>۶</sup>، 2004). قندهای محلول در محافظت سلول‌های گیاهان از خساراتی که به‌وسیله تنش سرما ایجاد می‌شود، نقش‌های مثبتی را ایفا می‌کنند. کربوهیدرات‌ها رابطه مستقیمی با فرآیندهای فیزیولوژیک مانند فتوسنتز، انتقال و تنفس دارند و افزایش آن‌ها یکی از مهم‌ترین مشخصات گیاهان در تحمل به شرایط تنش می‌باشد و با بالا بردن غلظت درون‌سلولی، مانع از یخ‌زدن سلول‌ها در اثر سرما می‌شوند (یوانیون<sup>۷</sup> و همکاران، 2009). فروکتان‌ها به‌عنوان یکی از الیگوساکاریدهای مشتق از ساکارز، علاوه بر ایفای نقش کربوهیدرات‌های ذخیره‌ای در گیاه، به ایفای نقش در مراحل متابولیک متأثر از تنش سرما نیز می‌پردازند (ساسانی و همکاران، ۱۳۹۱). هم‌چنین مهم‌ترین کربوهیدرات در شرایط تنش محسوب می‌شود و به مقدار زیاد تحت شرایط درجه حرارت پایین در غلات تجمع می‌یابد که ممکن است در نتیجه کاهش نیاز فتوسنتزی در درجه حرارت پایین باشد (کوزیلینو<sup>۸</sup> و همکاران، 2016). مطالعات متعددی از ارتباط غلظت فروکتان با انجماد و تحمل به خشکی منتشر شده است. بررسی اثر فروکتان در لیپوزوم، ارتباط مستقیم بین غشا و فروکتان را نشان داده است تجمع فروکتان در دوره‌ی رشد با سازگاری به سرما مرتبط می‌باشد. قندهای ساده می‌توانند از گیاهان در برابر آسیب انجماد و سرما محافظت کنند فروکتان به‌عنوان یک قند هگزوز، با کاهش نقطه انجماد مایع گیاهی، از بافت گیاه محافظت می‌کند (لیونگستن<sup>۹</sup> و همکاران، 2009). در تحقیقی اسدی و همکاران (2012) تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم گندم نان با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره و صفات فیزیولوژیک نشت یونی و فروکتان تحت تنش سرمای بهاره مورد بررسی قرار دادند که نتایج نشان داد ارقام متحمل به سرما دارای تراوش سلولی کم‌تر و میزان قند فروکتان بالاتری در سطوح مختلف تنش سرما می‌باشند. برآورد تنوع ژنتیکی در محصولات زراعی نقش مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از منابع

جو (*Hordeum vulgare* L.) گیاهی یک‌ساله و از خانواده‌ی غلات (Poaceae) جنس *Hordeum* می‌باشد. یکی از محصولات پایه و قدیمی کشاورزی بوده و جز اولین غلات اهلی شده است. جو از غلات مهم در خوراک دام و صنعت تولید مالت می‌باشد که از آن ۲ درصد برای مصرف انسان استفاده می‌شود (بینوت<sup>۱</sup> و همکاران، 2017) و به‌عنوان یکی از محصولات زراعی مهم، به دلیل تنوع ژنتیکی بالا و توانایی سازگاری بسیار زیاد با شرایط اقلیمی متنوع مورد توجه قرار گرفت این منابع کافی ژرم پلاسما جو به احتمال زیاد حاوی آلل‌های مفیدی می‌باشد که از طریق برنامه‌های به‌نژادی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (نیوتون<sup>۲</sup> و همکاران، 2011). بر اساس جدیدترین آمار سطح زیر کشت جو در سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶ در ایران برابر ۱/۴ میلیون هکتار و تولید حدود ۳/۱۰ میلیون تن در سال و سطح زیر کشت جو آبی برابر ۵۹۷ هزار هکتار و مقدار تولید آن حدود دو میلیون و سی هزار تن گزارش شد است (احمدی<sup>۳</sup> و همکاران، 2019). بر اساس آمار موجود در کشور، حدود ۶۶ درصد اراضی دیم و ۵۱ درصد اراضی آبی زیر کشت گندم و جو، در مناطق سردسیر کوهستانی واقع شده‌اند. مناطق سردسیر کشور تا ارتفاعی بیش از چهار هزار متر از سطح دریا گسترش داشته و متوسط حداقل درجه حرارت در طی یک دوره طولانی کم‌تر از ۱۲°C می‌باشد. آمار بلندمدت نشان می‌دهد که کاهش ناگهانی دما به‌ویژه در اواخر زمستان و یا اوایل بهار باعث خسارت به زراعت گندم و جو در اکثر مناطق سرد و حتی معتدل سرد کشور می‌شود. سرمای بهاره یکی از تنش‌هایی است که هر ساله خسارات قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه‌ی تولید کشور به‌خصوص در بخش غلات تحمیل می‌کند (محفوظی و همکاران، ۱۳۷۴). ارزیابی سریع و مؤثر تحمل گیاهان به تنش سرما مورد توجه محققان زیادی می‌باشد و پژوهش‌های متعددی برای یافتن روش‌های ارزیابی سریع و مؤثر انجام شده است تا بتوان تحمل به سرمای گیاهان را مشخص کرد (میرمیران و همکاران، ۱۳۹۷). غشای پلاسمایی اولین بخشی است که در هنگام تنش یخ‌زدگی خسارت می‌بیند از این‌رو محققان اظهار داشتند که تداوم انسجام غشای پلاسمایی، عامل اصلی بقای گیاه در شرایط تنش سرما است (امور<sup>۴</sup> و همکاران، 2006). ناظمی و همکاران (2007) نشت الکترولیت‌ها را به‌عنوان شاخصی از خسارت یخ‌زدگی در کلزا بررسی کرده و بیان نمودند که کاهش دما سبب افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها

5. Nayar

6. Han and Bischofa

7. Yuanyuan

8. Cozzolino

9. Livingston

1. Binott

2. Newton

3. Ahmadi

4. Uemura

### مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت تجزیه مرکب در مکان بر پایه طرح کاملاً تصادفی که شامل ۲۰ رقم جو (بهمن، ریحان ۰۳، والفجر، جلگه، صحرا، گوهران، زرجو، یوسف، زهک، دشت، فجر ۳۰، خاتم، جنوب، نصرت، بهرخ، ریحان، کویر، نیمروز، ماکویی، نیک) با چهار تیمار سرمایی با الگوبرداری از شرایط سرمای دیررس بهاره از طبیعت در سه سطح دمایی (۲، ۰، -۲) و تیمار شاهد (۸°C+) و سه تکرار در دانشکده کشاورزی تربیت مدرس انجام شد. ابتدا بذور بعد از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (v/v) به مدت چهار روز در دستگاه جوانه‌زنی قرار گرفتند (دما ۲۵°C و رطوبت ۷۰ درصد). بعد از این که جوانه‌ها به اندازه ۲ سانتی‌متر رسیدند، پتری‌دیش‌ها به مدت شش هفته در دمای ۳°C جهت بهاره‌سازی به یخچال انتقال داده شدند. بعد از پایان زمان مقرر کشت گیاهچه‌ها در گلدان‌ها صورت گرفت. پس از دو ماه که بوته‌های جو به مرحله زایشی (خوشه رفتن) رسیدند، معادل مقیاس زادوکس (Zadoks<sup>۲</sup>، 1974)، برابر ۴۸ الی ۶۰ جهت اعمال تنش سرمایی مذکور به اتاقت سرما منتقل، به مدت سه روز به منظور سازگاری، نگهداری شدند و در نهایت برای شروع تنش به ازای هر یک ساعت ۲°C دما کاهش داده شد تا به دماهای موردنظر برای تنش برسد (احمدی و همکاران، ۱۳۸۴). پس از اعمال تنش نمونه‌برداری از آن‌ها صورت گرفت. صفت نشت یونی آن‌ها بلافاصله اندازه‌گیری شد ولی نمونه‌های برگ‌ی هر تیمار مربوط به صفت فروکتان بعد از انتقال به فلاسک ازت مایع (۱۹۶°C-) به آزمایشگاه منتقل شده و در یخچال با دمای ۸۰°C- تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شدند.

جهت تعیین میزان فروکتان بعد از اعمال تنش سرمای بهاره و با استفاده از برگ تازه یا منجمد شده، از روش جرمین<sup>۳</sup> (1956) برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر، و همچنین صفت نشت یونی با استفاده از روش برترین<sup>۴</sup> (1996) (فرمول ۱) تعیین شد.

$$El (\%) = \frac{C_t}{C_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

C<sub>t</sub>: نشت یونی در زمان اول، C<sub>tot</sub>: نشت یونی نهایی

EL%: درصد نشت یونی

به منظور استخراج DNA از هر رقم، ۱۵ عدد بذر پس از ضدعفونی، درون گلدان‌ها کشت و به محض رسیدن به مرحله سه تا چهار برگ، از آن‌ها نمونه‌برداری از برگ ارقام مختلف

ژنتیکی دارد که از طریق صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک، بررسی شجره‌ها و نشانگرهای مولکولی میسر می‌گردد (رشیدی‌منفرد و همکاران، ۱۳۸۶).

امروزه از نشانگرهای مولکولی DNA به عنوان ابزاری مفید برای ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم و تعیین مکان ژن‌های مقاومت به بیماری و تنش‌های محیطی و همچنین رابطه بین اجداد وحشی و ارقام اصلاح‌شده در گیاهان استفاده می‌شود (شهریاری احمدی و همکاران، ۱۳۹۱). در مطالعه‌ای شاکتاره<sup>۱</sup> و همکاران (2016) به بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۳ ژنوتیپ جو وحشی اردن با ۲۹ ژنوتیپ زراعی جو که از مناطق مختلف جمع‌آوری شده بود، با استفاده از نشانگر ریزماهواره پرداختند. ژنوتیپ‌های اسپانتانوم بر اساس طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع و منطقه بارندگی و محل جمع‌آوری در شش جمعیت قرار گرفتند. تمام ژنوتیپ‌های جو با ۱۱ نشانگر SSR برای شناسایی مکان کروموزوم‌ها آنالیز شدند. این نشانگرها ۲۳۷ آلل با میانگین ۵/۲۱ آلل در هر لوکوس را دادند که در ژنوتیپ‌های اسپانتانوم ۲۰۹ آلل با متوسط ۱۹ آلل در هر لوکوس و در ژنوتیپ‌های زراعی ۹۵ آلل با میانگین ۸/۶ آلل در هر لوکوس شناسایی شدند. سطح تنوع ژنتیکی بسیار بالا بود این معنا از متوسط تنوع ژنی ۰/۷۹ که از ۰/۷۴ تا ۰/۸۲ متغیر بود، استنباط گردید. از طرفی بین جمعیت‌ها تنوع ژنتیکی بسیار بالاتری از درون جمعیت‌ها به دست آمد. لاموت و همکاران (۱۳۹۵) در تحقیقی تنوع ژنتیکی ۶۳ ژنوتیپ ایرانی و غیرایرانی جو را با استفاده از ۳۰ جفت نشانگر ریزماهواره تشریح کردند. ۲۹ جفت چندشکلی مشاهده شد. در مجموع ۲۲۵ آلل برای مکان‌های ژنی مختلف با میانگین ۷/۲ شناسایی گردید.

تجزیه و تحلیل چندمتغیره ابزاری کارآمد جهت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در کلکسیون نمونه‌های گیاهی، تعیین روابط بین اجزای اصلی عملکرد، تعیین ارتباط بین تنوع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی و کاهش ابعاد داده‌ها می‌باشد. در این راستا، پژوهش حاضر به ارزیابی تحمل به تنش سرمای بهاره ارقام جو زراعی از طریق اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک (فروکتان و نشت یونی) پس از آزمون‌های سطوح دمایی می‌پردازد. از دیگر اهداف این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم جو زراعی با استفاده از داده‌های مولکولی و در نهایت بررسی ارتباط صفات فیزیولوژیک با نشانگرهای مولکولی است.

2. Zadoks  
3. Jermyn  
4. Bertin

1. Shakhatareh

صورت گرفت. استخراج DNA به روش (C-TAB ساقی معروف<sup>۱</sup>، ۱۹۸۴) انجام گرفت. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ (مدل BioTek) تعیین گردید. پس از انتخاب آغازگرهای SSR، واکنش زنجیره‌ای در حجم ۱۵ میکرولیتر به ترتیب شامل آب دوبار تقطیر (DDW) به میزان ۳/۵ میکرولیتر، مسترمیکس (Mastermix)، ۲ میکرولیتر پرایمرهای پیرو و پیشرو و ۱ میکرولیتر DNA نمونه موردنظر انجام شد.

چرخه‌ی حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸-۵۱ درجه سلسیوس (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در انتها یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصولات تایید شده حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به منظور تعیین چندشکلی و میزان تنوع بین ارقام با ولتاژ ۸۵w و به مدت ۵۰-۴۵ دقیقه روی ژل متافور- آگارز ۳ درصد بارگذاری و سپس با استفاده از دستگاه Gel documentation از ژل تحت اشعه UV عکس‌برداری انجام شد. از نرم‌افزارهای NTSYS-PC، GenALEX، XLSTAT، ۲۰۱۷ و GGEbiplot برای تجزیه داده‌ها محتوای اطلاعات چندشکلی، تجزیه خوشه‌ای، رسم دندروگرام و تجزیه بای‌پلات استفاده شد.

به منظور اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک، با توجه به این‌که یکی از مفروضات تجزیه و تحلیل واریانس آن است که خطاها باید دارای توزیع نرمال باشد، ابتدا آزمون نرمال بودن توزیع اشتباه آزمایشی داده‌ها برای هر کدام از صفات و سپس تجزیه‌های آماری بر روی داده‌ها انجام گرفت. تجزیه واریانس تک و چندمتغیره انجام شد و سپس مقایسه میانگین با روش LSD صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای ارقام به روش وارد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌های فیزیولوژیک نشان داد که سطوح تنش سرما، ارقام مورد مطالعه و اثرات متقابل بین آن‌ها در صفات اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار آماری دارند (جدول ۱). اختلاف معنی‌دار در بین سطوح بیانگر آن است که واکنش ارقام مورد بررسی در حداقل یکی از سطوح با دیگر سطوح متفاوت است. وجود تنوع ژنتیکی مؤثر در تحمل به تنش سرما بهاره برای انتخاب ارقام متحمل به تنش با عملکرد بالا

و درک بهتر سازوکارهای فیزیولوژیک مرتبط با تحمل به تنش سرمای دیررس در جو می‌تواند بسیار مفید باشد. اختلاف معنی‌دار آماری بین ارقام بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا بین مواد گیاهی مورد ارزیابی و احتمالاً مکانیسم‌های متفاوت بین آن‌ها در واکنش به تنش سرمای دیررس است که می‌تواند در انتخاب والدین مناسب و تولید جمعیت‌های در حال تفرق جهت مکان‌یابی محل‌های ژنی مورد استفاده قرار گیرند. معنی‌دار شدن اثر متقابل ژنوتیپ در تنش بیانگر پاسخ‌های متفاوت ژنوتیپ‌ها در محیط‌های مختلف است.

مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد که ارقام متحمل به سرما از میزان قند فروکتان بیش‌تر و نش‌ت یونی کم‌تری برخوردار هستند بر این اساس ارقام جلگه، گوهران و زهک تحمل بیش‌تر و در مقابل ارقام ماکویی، به‌رخ و زرجو حساسیت بیش‌تری نسبت به سرما داشتند (جدول ۲). برای صفت فروکتان واکنش ارقام از سطح شاهد ( $+8^{\circ}\text{C}$ ) به طرف تنش شدید ( $-2^{\circ}\text{C}$ ) از روند ثابتی برخوردار نبوده و نوسان نشان داد. به‌طور کلی بالاترین میزان فروکتان در سطح دمایی  $-2^{\circ}\text{C}$  مربوط به رقم گوهران و کم‌ترین آن مربوط به رقم ماکویی می‌باشد. افزایش قند در طول دوره مقاوم شدن گیاه به سرما به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی در برابر خسارات سرما می‌باشد. در طول این دوره گیاه با از دست دادن تدریجی آب، غلظت مواد را افزایش می‌دهد و به این ترتیب از طریق افزایش میزان قند، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی به تأخیر افتاده و از آب‌گیری القاء شده توسط یخ جلوگیری می‌شود (منصوری‌ده‌شعبی و همکاران، ۱۳۹۰). قندها هم‌چنین باعث کاهش پسابیدگی سلول‌ها در مقابل تشکیل یخ‌های بین سلولی می‌گردند. افزایش محتوای قند برگ و طوقه را می‌توان به‌عنوان یک شاخص فیزیولوژیک مناسب برای مقاومت به سرما در نظر گرفت. احتمال می‌رود که یکی از دلایل اساسی در کاهش قند فروکتان در دمای  $-2^{\circ}\text{C}$  در گیاهان، دپلمریزه شدن فروکتان به قندهای ساده باشد که این فرآیند، انرژی مورد نیاز را در اختیار گیاه قرار می‌دهد (دیون<sup>۲</sup> و همکاران، ۲۰۰۱). نکته مهم در بررسی تطبیقی روند تغییرات میزان نش‌ت یونی، وضعیت رقم گوهران است که نه تنها واجد کم‌ترین مقدار این صفت است، و البته به‌عنوان یک ویژگی مثبت می‌باشد، بلکه در تیمار کاهش از  $0^{\circ}\text{C}$  به  $2^{\circ}\text{C}$ ، کاهش میزان نش‌ت یونی را به‌عنوان یک ویژگی منحصربه‌فرد از بین تمامی ژنوتیپ‌ها از خود بروز داده است. مقدار کم تغییر نش‌ت یونی در این رقم ممکن است مربوط به فعالیت سازوکارهایی باشد که با فعالیت‌های اکسیدانی، خصوصیات و ترکیب سلولی در ارتباط باشد (متسودا/

محسوب می‌شوند. ریحان ۰۳ (G2) که دارای کم‌ترین فاصله با مرکز بای‌پلات است از نظر صفت فروکتان دارای سازگاری عمومی برای هر چهار سطح دمایی می‌باشد. هیچ سطح تنشی در جایی که به‌رخ، کویر و ماکوئی (به‌ترتیب G15، G17 و G19) راس محسوب شدند، قرار نداشت به‌عبارت‌دیگر ارقام مذکور در هیچ‌کدام از سطوح تنش دارای ویژگی مطلوب نیستند و نسبت به تنش پاسخ قابل توجهی نشان ندادند (شکل ۱).

#### روش بای‌پلات برای بررسی صفت نشت یونی

از نظر صفت نشت یونی دو سطح دمایی  $0^{\circ}\text{C}$  و  $+2^{\circ}\text{C}$  شباهت تقریباً زیاد و همبستگی مثبت و معنی‌دار نسبت به‌هم نشان دادند و هم‌چنین دو محیط  $+8^{\circ}\text{C}$  و  $-2^{\circ}\text{C}$  نیز شبیه به‌هم بودند و با توجه به زاویه بین آن‌ها که کم‌تر از  $90^{\circ}$  است، می‌توان گفت این دو محیط اخیر همبستگی مثبت با هم دارند. در سطوح دمایی  $+8^{\circ}\text{C}$  و  $-2^{\circ}\text{C}$ ، ریحان ۰۳ (G2) بیش‌ترین مقدار را از نظر صفت نشت یونی دارا بود که این نشان از حساس بودن این رقم نسبت به سرما می‌باشد (شکل ۲). در تحقیقی آهک‌پز و همکاران (۱۳۹۲)، به بررسی تعیین ژنوتیپ‌های پرمحصول و سازگار در قالب آزمایش‌های یکنواخت ناحیه‌ای بر روی ۱۰ لاین جو به همراه دو رقم شاهد (محلی و آبیدر)، در ایستگاه‌های تحقیقاتی مناطق سردسیر و معتدل دیم شامل مراغه، سرارود، اردبیل، ارومیه، کردستان و زنجان پرداختند. برای بررسی اثر متقابل ژنوتیپ در محیط از روش GGE بای‌پلات استفاده شد و با کمک این روش ارقام برتر در هر ایستگاه را معرفی شدند. گل‌آبادی و همکاران (۲۰۰۶) در گندم استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و نمودار بای‌پلات برای انتخاب ژنوتیپ‌ها تحت شرایط تنش مورد تأکید قرار گرفت.

به‌طورکلی نتایج تجزیه بای‌پلات تأییدی بر نتایج قبلی بود، با توجه به شکل‌های بای‌پلات، برای فروکتان رقم گوهران با قرار گرفتن در ناحیه مربوط به سطوح ۰ (صفر) و  $-2^{\circ}\text{C}$  به‌عنوان ژنوتیپ پاسخ‌ده و متحمل معرفی می‌شود از طرفی باتوجه به صفت نشت یونی نیز رقم گوهران با دارا بودن کم‌ترین مقدار و قرار گرفتن در ناحیه مقابل  $-2^{\circ}\text{C}$  به‌عنوان رقم متحمل معرفی می‌شود.

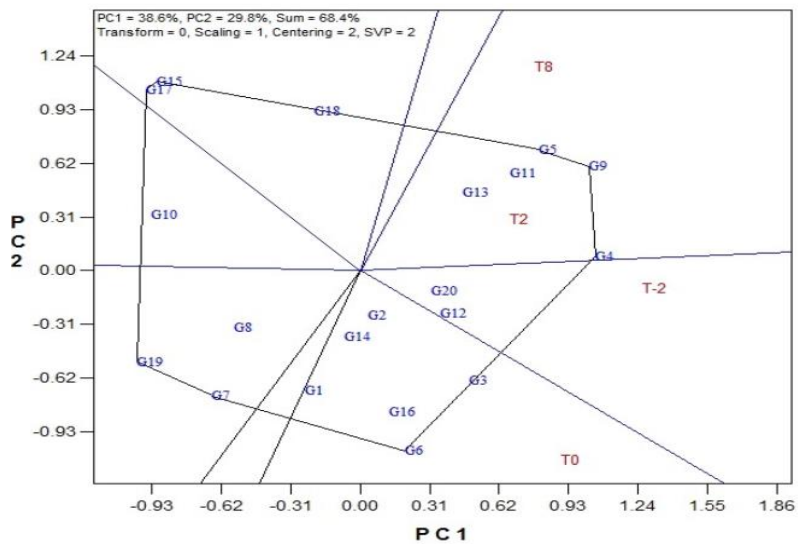
و ایبا<sup>۱</sup>، (۲۰۰۵). معالی/میری و همکاران (۲۰۰۷) تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول را عامل مهم تحمل به سرما در گیاهان بیان کردند. بعد از کاهش دما، ساختار غشای سلولی موقتاً تغییر وضعیت می‌دهد که بر قابلیت نفوذپذیری غشاء تأثیر می‌گذارد. تغییر موقت وضعیت غشاء منجر به افزایش بیان ژن‌های تنظیم‌کننده در غشای سلولی می‌باشد، که از آن جمله ژن‌های دساتوراز<sup>۲</sup> است که نسبت اسیدهای چرب غیراشباع به اشباع را افزایش می‌دهند و منجر به برگشت سیالیت غشاء به حالت مایع می‌شود. آپوستوا و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی اثر تنش سرما در مرحله گیاهچه‌ای روی دو رقم گندم گزارش کردند که سطوح نشت یونی توسط دماهای بالای صفر درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد درحالی‌که تیمار گیاهان با دماهای زیر صفر، افزایش شدیدی را در نشت غشای پلاسمایی منجر می‌شود.

#### روش بای‌پلات برای بررسی صفت فروکتان

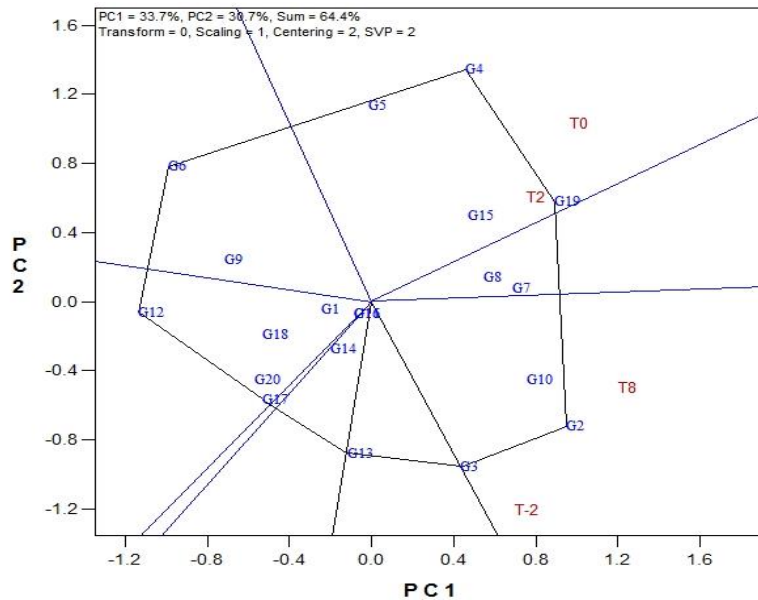
GGE بای‌پلات که به‌طور هم‌زمان اثرات اصلی ژنوتیپ و اثر متقابل  $G \times E$  را بررسی می‌کند، می‌تواند به‌صورت گرافیکی به سؤالات زیادی در مورد ژنوتیپ‌ها و محیط‌های آزمایشی پاسخ دهد. در این بررسی سطوح دمایی به‌عنوان محیط برای انجام تجزیه بای‌پلات در نظر گرفته شدند و به هر ژنوتیپ عدد مشخص به‌منظور راحتی بررسی نتایج داده شد (بهمن (۱)، ریحان ۰۳ (۲)، والفجر (۳)، جلگه (۴)، صحرا (۵)، گوهران (۶)، زرجو (۷)، یوسف (۸)، زهک (۹)، دشت (۱۰)، فجر ۳۰ (۱۱)، خاتم (۱۲)، جنوب (۱۳)، نصرت (۱۴)، به‌رخ (۱۵)، ریحان (۱۶)، کویر (۱۷)، نیمروز (۱۸)، ماکویی (۱۹) و نیک (۲۰)). روش مذکور می‌تواند هم‌زمان محیط‌ها را ارزیابی نموده و بر اساس توانایی در جدا کردن ژنوتیپ‌ها آن‌ها را گروه‌بندی کند (یان و تینکر<sup>۳</sup>، ۲۰۰۶).

دو سطح دمایی  $+8^{\circ}\text{C}$  و  $+2^{\circ}\text{C}$  در تأثیر روی ژنوتیپ‌ها از طریق صفت فروکتان نسبت به هم شباهت نشان دادند. هم‌چنین دو محیط  $0^{\circ}\text{C}$  و  $-2^{\circ}\text{C}$  نیز شبیه به‌هم بودند (با توجه به زاویه بین آن‌ها که کم‌تر از  $90^{\circ}$  است) رقم گوهران (G6) در این دو سطح بیش‌ترین مقدار فروکتان، و بیش‌ترین فاصله را از مرکز بای‌پلات را نشان داد که این تأییدی بر نتایج قبل است. به‌طورکلی ژنوتیپ‌هایی که بیش‌ترین فاصله را از مرکز بای‌پلات دارند بیش‌ترین میزان پاسخ به سطوح تنش‌های مختلف را نشان می‌دهند و جز ژنوتیپ‌های پاسخ‌ده به محیط

1. Matsuda and Iba  
2. Desaturase  
3. Yian and Tinker



شکل ۱: نمایش گرافیکی GGE بای پلات بر اساس ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه در ۴ سطح تنش دمایی (محیط) با توجه به صفت فروکتان  
Fig. 1: Graphic representation of GGE biplot based on 20 studied genotypes in 4 levels of temperature stress (environment) according to froctun trait



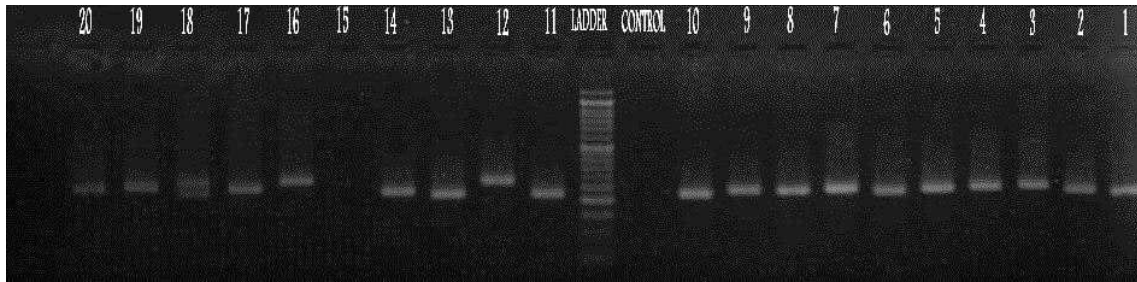
شکل ۲: نمایش گرافیکی GGE بای پلات بر اساس ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه در ۴ سطح تنش دمایی (محیط) با توجه به صفت نشت یونی

Fig. 2: Graphic representation of GGE biplot based on 20 studied genotypes in 4 levels of temperature stress (environment) due to ion leakage trait

جو زراعی انتخاب شدند. پس از انجام واکنش PCR جهت تعیین میزان چندشکلی و میزان تنوع، محصول آن روی ژل متافور آگارز ۳ درصد بارگذاری شد و در نهایت امتیازدهی صفر و یک به ترتیب به غیاب و حضور آللهای هر لوکوس مارکری تعلق گرفت (شکل ۳).

### تجزیه تنوع ژنتیکی ارقام جو بر اساس نشانگرهای مولکولی ریزماهواره

در این تحقیق ۱۴ جفت آغازگر SSR مورد بررسی اولیه قرار گرفت (جدول ۳) که در نهایت ۱۲ آغازگر که چندشکلی مناسبی نشان دادند. جهت بررسی تنوع مولکولی روی ۲۰ رقم



شکل ۳: محصول PCR ژل متافور-آگارز ۳ درصد در ۲۰ رقم جو زراعی و وجود چندشکلی در آغازگر Bmac0032

Fig. 3: PCR product of 3% metaphor-agarose gel in 20 cultivars of barley and the presence of polymorphism in Bmac0032 primer

بین لوکوس‌های نشانگری از ۰/۲۵ (Bmag0011) تا ۰/۹۵ (Bmag0399) با میانگین ۰/۶۱ متغیر بود. نشانگرهایی با PIC بالا، فراوانی آلل رایج کم‌تری نشان دادند بنابراین می‌توان گفت جایگاه‌هایی با فراوانی آلل رایج کم‌تر دارای قدرت تمایز تنوع بیش‌تری می‌باشند. در تحقیقی فراوانی آلل رایج در آغازگرهای موردبررسی در محدوده ۰/۱۳ برای آغازگر Ebmac0788 و ۰/۹۷ برای آغازگر GBM1411 با میانگین ۰/۵۶ به‌دست آمد (شوروزدی<sup>۶</sup> و همکاران، ۲۰۱۴). شاخص شانون یکی از چندین شاخص تنوع ژنی می‌باشد که برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون جمعیت به‌کار می‌رود (شانون<sup>۷</sup>، ۱۹۸۴). درواقع معیاری برای اندازه‌گیری میزان آلل‌های چندشکل در یک جایگاه است. محدوده این شاخص بین ۰/۲۸ تا ۰/۶۲ به‌ترتیب برای نشانگرهای Bmag0011 و Bmag0131 با میانگین کل ۰/۴۹ به‌دست آمد. در واقع هرچه شاخص شانون بیش‌تر باشد، تنوع ژنتیکی بالاتری در بین ارقام موردبررسی مشاهده می‌شود. تعداد آلل با فراوانی برابر در هر جایگاه ریزماهواره، تعداد آلل مؤثر (AE) برای آن جایگاه نامیده می‌شود که شاخصی دیگر برای ارزیابی تنوع ژنی می‌باشد. تعداد آلل مؤثر از محاسبه تعداد آلل و فراوانی آن‌ها به‌دست می‌آید. نتایج بررسی تعداد آلل مؤثر برای تمام جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه نشان داد که میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در کل جایگاه‌های ریزماهواره مورد مطالعه، برابر ۱/۵۴ است و بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر در جایگاه Bmag0131 و کم‌ترین آن در جایگاه Bmag0011 وجود دارد. در مطالعه‌ای در ۲۴ رقم جو زراعی با استفاده از ۱۰ جفت نشانگر ریزماهواره، تعداد آلل‌های مؤثر از ۱/۹۶ تا ۴ آلل برای هر آغازگر گزارش شد (مجیرشیبانی و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیق دیگری که با ۶۴ رقم جو زراعی و ۱۴ نشانگر انجام شد، میانگین تعداد آلل‌های مؤثر ۵/۲۳ محاسبه شد (حاج‌منصور و همکاران، ۲۰۱۰).

آغازگرهای مورد استفاده ۳۰ آلل را در مجموع با میانگین ۲/۵ آلل در هر جایگاه تکثیر کردند. آغازگر Bmag0173 با ۴ آلل بیش‌ترین تعداد آلل را نشان داد (جدول ۴). هامید/ و همز<sup>۱</sup> (۲۰۱۴) با ارزیابی ۲۶ ژنوتیپ جو با استفاده از ۱۵ آغازگر SSR، میانگین تعداد آلل به ازای هر جایگاه را ۲/۶ آلل و پاندی<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۴) ۱۶۵ آلل با میانگین ۱/۶ آلل در ۲۷ آغازگر SSR را در ارزیابی ۱۰۷ ژنوتیپ جو گزارش کردند. علت تفاوت در تعداد آلل‌ها در بین پژوهش‌های مختلف می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد ژنوتیپ‌ها و تفاوت در پایه ژنتیکی آن‌ها باشد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) شاخصی است که به‌وسیله آن ارزش یک نشانگر برای نشان دادن چندشکلی درون جمعیت، مشخص می‌شود و یک معیار قوی در ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها بوده که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه عمل می‌کند (ریبریو کاروالهو<sup>۳</sup> و همکاران، ۲۰۰۴). میانگین چندشکلی به‌دست آمده ۰/۴۰ بود. بیش‌ترین میزان چندشکلی با مقدار ۰/۵۰ مربوط به نشانگرهای Bmag0381 و Bmag0131 و کم‌ترین آن‌ها با ۰/۰۹ به Bmag0399. تعلق داشت (جدول ۴). بنابراین می‌توان از دو نشانگر Bmag0381 و Bmag0131 به‌عنوان بهترین نشانگرها جهت آنالیز تنوع ژنتیکی نام برد. در تحقیقی که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام جو با استفاده از مارکر SSR انجام گرفت، میانگین اطلاعات چندشکلی ۰/۵۷ گزارش گردید (فریریر<sup>۴</sup> و همکاران، ۲۰۱۶). کادری<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۰۹) با مطالعه ۱۴ ژنوتیپ جو بومی و زراعی با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر SSR، میانگین PIC و میانگین تعداد جایگاه آلل را به‌ترتیب ۰/۵۳ و ۸۷/۲ گزارش کردند. فراوانی آلل رایج آلی است که در بین کلیه آلل‌های مشاهده شده برای یک لوکوس نشانگری، بیش‌ترین فراوانی را در بین ژنوتیپ‌های موردبررسی دارد. این شاخص

1. Hamida and Hamza
2. Pandey
3. Ribeiro-Carvalho
4. Ferreira
5. Kadri

6. Shuorvazdi  
7. Shanon

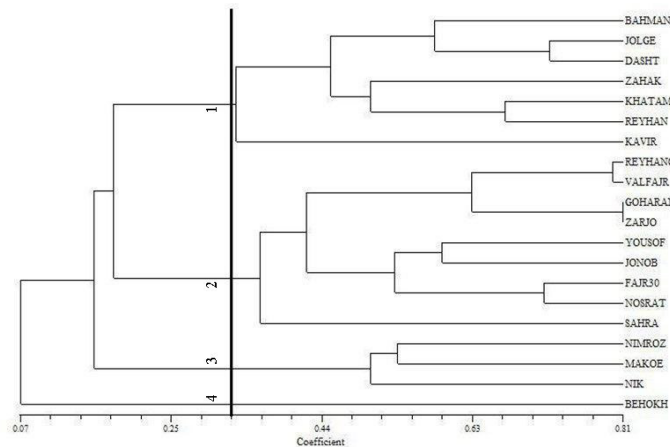
شمسی فر و همکاران: مطالعه تنوع ژنتیکی در برخی ارقام جو ...

### گروه‌بندی ارقام جو بر اساس داده‌های نواحی ریزماهواره

تجزیه‌ای خوشه‌ای بهترین روش برآورد شباهت بین افراد در یک مجموعه ذخایر توارثی می‌باشد. هدف از تجزیه خوشه‌ای، انتساب ژنوتیپ‌ها به گروه‌هاست به طوری که ژنوتیپ‌های دارای شباهت و خویشاوندی بیش‌تر در یک گروه قرار گیرند. تجزیه خوشه‌ای بر مبنای ضریب تشابه جاکارد با استفاده از الگوریتم Complete linkage برای ۲۰ رقم انجام گرفت. نتیجه این تجزیه آماری ارقام را در چهار گروه قرار داد. در گروه اول ارقام کویر، دشت، ریحان، خاتم، زهک، جلگه و بهمن، در گروه دوم ارقام ریحان ۰۳، والفجر، صحرا، گوهران، زرجو، یوسف، فجر ۳۰، جنوب و نصرت در گروه سوم ماکویی، نیک و نیمروز و در گروه چهارم به رخ قرار گرفتند (شکل ۴). قرار گرفتن به رخ در گروه جداگانه بیانگر اختلاف ژنوم این رقم با بقیه ارقام از نظر جایگاه‌های ریزماهواره می‌باشد. ارقامی که در یک گروه قرار گرفتند، دارای شباهت ژنتیکی بیش‌تر بوده و احتمالاً تحت

تأثیر شرایط آب و هوایی مشابه قرار گرفته‌اند که باعث تغییرات ژنتیکی مشابه در آن‌ها گردیده است و یا دارای جد مشترک می‌باشند. دندروگرام حاصل به‌طور نسبی تطابق خوبی با اطلاعات شجره‌ای و تیپ رشدی در ارقام مورد بررسی داشت، اما قرار نگرفتن برخی ارقام در کنار هم را می‌توان ناشی از عدم پوشش کامل ژنوم توسط نشانگرهای مورد استفاده و قرار گرفتن مکان ریزماهواره در ناحیه غیرکدشونده که در بروز صفات نقش دارند، دانست.

اگر بین گروه‌بندی حاصل از نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی هماهنگی وجود نداشته باشد، ایرادی به دندروگرام حاصل از آزمایش‌های مولکولی وارد نمی‌شود زیرا صفات کمی دارای توارث‌پذیری پایینی هستند درحالی‌که نشانگرهای مولکولی از جمله SSR به دلیل تعداد محدود آغازگر، بخش کوچکی از ژنوم را مورد ارزیابی قرار می‌دهد (سلیمانی و همکاران، ۲۰۰۲).



شکل ۴: دندروگرام حاصل از روش Complete linkage جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو زراعی

Fig. 4: Dendrogram generated from method for classifying the barley genotypes

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی در ارقام جو زراعی تحت تنش سرمای دیررس

Table 1: Analysis of variance for physiological Traits in barley cultivars under Spring Chilling Stress

میانگین مربعات MS	درجه آزادی df	منابع تغییر S.O.V.
فروکتان Fructan	3	تنش سرما Cold stress
0.003**	3	تنش سرما
نش یونی Ion leakage	8	تکرار در تنش سرما Repeat in Cold stress
0.000014 <sup>ns</sup>	8	تکرار در تنش سرما
ژنوتیپ Genotype	19	ژنوتیپ
0.0003**	19	ژنوتیپ
ژنوتیپ × تنش سرما Genotype × Cold stress	57	ژنوتیپ × تنش سرما
0.0002**	57	ژنوتیپ × تنش سرما
خطا Error	152	خطا
0.000072	152	خطا
3.27	13.99	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)

\*\* : معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و ns: عدم معنی‌داری

\*\* : Significant at the level of 1% and ns: Non-significant



جدول ۲: مقایسه میانگین ۲۰ رقم مورد مطالعه براساس صفات فیزیولوژیک در چهار سطح تنش دمایی

Table 2: Mean comparison of 20 studied cultivars based on physiological traits in four temperature stress levels

نشت یونی (درصد) Ion leakage (%)				فروکتان (میکروگرم در میلی لیتر) Fructan ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )				صفت Character
-2°C	0°C	+2°C	+8°C	-2°C	0°C	+2°C	+8°C	رقم Cultivare
83.3	61.16	55.78	32.053	0.256	0.270	0.259	0.243	بهمن Bahman
90.9	63.02	58.02	65.103	0.255	0.269	0.267	0.248	ریحان ۰۳ Rihan03
87.6	55.28	57.79	63.550	0.265	0.274	0.271	0.244	والفجر Walfajr
73.0	72.34	71.12	39.087	0.274	0.271	0.270	0.255	جلگه Jolge
66.5	65.63	64.26	46.260	0.256	0.272	0.273	0.264	صحرا Sahra
65.0	59.39	49.56	32.463	0.274	0.274	0.246	0.244	گوهران Goharan
84.7	66.43	63.49	51.500	0.245	0.264	0.274	0.234	زر جو Zarjow
70.2	63.92	46.75	80.707	0.253	0.259	0.264	0.240	یوسف Yusof
76.2	63.16	40.50	29.667	0.273	0.263	0.274	0.257	زهک Zahak
83.2	62.92	52.47	71.153	0.247	0.251	0.260	0.246	دشت Dasht
77.1	60.44	49.74	51.957	0.264	0.262	0.276	0.255	فجر ۳۰ Fajr30
72.4	48.18	60.86	30.837	0.264	0.270	0.264	0.250	خاتم Khatam
85.0	52.45	55.34	52.253	0.266	0.259	0.272	0.253	جنوب Jonob
79.7	58.27	50.70	47.740	0.263	0.266	0.255	0.246	نصرت Nosrat
76.2	66.73	60.92	54.513	0.242	0.247	0.258	0.257	به رخ Behokh
77.1	60.44	49.74	51.957	0.258	0.274	0.268	0.241	ریحان Reyhan
81.8	55.24	46.15	41.233	0.250	0.239	0.260	0.251	کوبر Kavir
73.7	61.64	27.42	53.000	0.264	0.244	0.263	0.253	نیمروز Nimrooz
76.7	70.85	59.63	63.387	0.239	0.263	0.266	0.238	ماکوئی Makouee
77.5	60.81	25.49	49.990	0.261	0.269	0.266	0.251	نیک Nik
13.643				0.000096				LSD <sub>5%</sub>

جدول ۳: مشخصات آغازگر ریزماهواره مورد بررسی  
 Fig 3: Specifications of microsatellite primers in this study

دمای اتصال (°C) Annealing Tm (°C)	توالی Sequence	آغازگر primer
53	CGATGCTTTACTATGAGAGGT GGGTCTGAAGCCTGAAC	Bmac0399
55	AATTAGCGAGAACAAAATCAC AGATAACGATGCACCACC	Bmag0125
54	CATTTTGTGGTGACGG ATAATGGCGGGAGAGACA	Bmag0173
51	TTCAGAAACGGAGTTTTG CCTCCACACAAAAATCC	Bmag0131
58	ACAAAAACACCGCAAAGAAGA GCTAGTACCTAGATGACCCCC	Bmag0011
51	TTTATTATGCATCTAGGC TATCAAGATCATGACGTCTCA	Bmag0381
55	CTATTTGTAATGTATGTATGTCC TCATTGGTCCAGATAATACAA	Bmag0606
55	CCATCAAAGTCCGGCTAG GTCGGGCCTCATACTGAC	Bmac0032
56	CGATTCCCTTTTCCCAC ATTCTCCGCCGTCCACTC	HVM40
56	ACTAAGTCCTTTCACGAGGA GTGTGTAGTAGGTGGTACTTG	EBmac0806
58	GAACGTATAGCAGGAGCAA CATCGTCCCTTCATGAT	EBmac0674
55	ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC ACATCATGTCGATCAAAGC	Bmag0211
55	TCATGGAGACCGTTGTAGT CCACAAGCCTCTGTTCTC	Bmag0341
56	CACGGTATAAATATCCACCC ATGGACTCTTCTCCCTGAA	AF043094A

جدول ۴: شاخص‌های تنوع اندازه‌گیری شده توسط آغازگرهای SSR در ارقام جو مورد مطالعه در این تحقیق

Table 3: Diversity parameters measured by SSR primers in the studies barley cultivars in this research

درصد آل مؤثر Number of Effective allele	شاخص شانون Shannon's index	فراوانی آل رایج Frequency of common allele	محدوده آلی Allelic size range(bp)	چندشکلی PIC	مکان کروموزومی Chromosom loc.	نشانگر Marker
1.53	0.53	0.95	119-130	0.09	1H	Bmag0399
1.62	0.56	0.50	121-180	0.49	2H	Bmag0125
1.45	0.44	0.55	170-270	0.48	1H	Bmac0032
1.34	0.40	0.40	121-177	0.45	6H	Bmag0173
1.58	0.48	0.75	162-220	0.32	6H	EBmac0806
1.78	0.62	0.65	100-204	0.50	3H	Bmag0131
1.68	0.56	0.75	140-165	0.40	4H	HVM40
1.64	0.53	0.80	132-192	0.35	1H	Bmag0211
1.19	0.28	0.25	140-205	0.35	7H	Bmag0011
1.43	0.47	0.45	144-157	0.43	6H	EBmac0674
1.66	0.58	0.55	180-220	0.50	2H	Bmag0381
1.76	0.59	0.80	140-240	0.44	3H	Bmag0606
1.54	0.49	0.61	-	0.40	-	Mean

جدول ۵: نشانگرهای پیوسته با صفات فیزیولوژیکی و درصد تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرها

Table 4: Linkage markers with physiological traits and the percentage of justified changes in these traits with the help of marker

مارکر مرتبط Related markers	R <sup>2</sup> t (%)	R <sup>2</sup> max	دما (سانتی‌گراد) Temperature (°C)	تنش Stress	کنترل Control	صفت Character
Bmag0173, Bmag0339 Bmag0211, Bmag0606 Bmag0125, Bmag0032 HVM40, EBmac0674	94.5	20.8	0°C	تنش Stress		فروکتان Fructan
EBmac0674, Bmag0125	54.3	34.3	+8°C	کنترل Control		نشست یونی Ion leakage
Bmag0173, Bmac0032 Bmag0131, Bmag0011	71.9	32.1	+2°C	تنش Stress		
EBmac0674	23.6	23.6	-2°C			

## تجزیه ارتباطی

شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی یکی از مهم‌ترین اهداف برای ردیابی و تسریع انتقال صفات مطلوب، به ژنوتیپ‌های دیگر است (تقوی و همکاران، 2007). به منظور تعیین ارتباط بین صفات فیزیولوژیکی با داده‌های مولکولی در ارقام جو زراعی و شناسایی نشانگرهایی که ممکن است با این صفات همبستگی داشته باشند، از روش رگرسیون گام‌به‌گام استفاده شد. نتایج حاصل از رگرسیون برای صفت فروکتان فقط در سطح دمایی  $0^{\circ}\text{C}$  ارتباط معنی‌دار با هشت نشانگر Bmag0173، Bmag0339، Bmag0211، Bmag0606، Bmag0125، Bmag0032، HVM40 و EBmac0674 را نشان داد. که بیش‌ترین ضریب تبیین را نشانگر Bmag0173 و به میزان  $20/8\%$  بود. برای صفت نشت‌یونی در سطح شاهد ( $8^{\circ}\text{C}$ ) دو نشانگر EBmac0674 و Bmag0125 در دمای  $2^{\circ}\text{C}$  چهار نشانگر Bmag0173، Bmac0032، Bmag0131 و Bmag0011 در سطح دمایی  $2^{\circ}\text{C}$  - نشانگر EBmac0674 ارتباط معنی‌دار با صفت مذکور نشان دادند. در صفت نشت‌یونی بیش‌ترین ضریب تبیین در دمای شاهد ( $8^{\circ}\text{C}$ ) و دمای تنش  $2^{\circ}\text{C}$  - مربوط به نشانگر EBmac0674 بود که به ترتیب  $34/3$  و  $23/6$  را نشان داد هم‌چنین در سطح دمایی  $2^{\circ}\text{C}$  + بیش‌ترین ضریب تبیین در نشانگر Bmag0173،  $32/1$  به دست آمد (جدول 5). وجود نشانگرهای مشابه در صفات موردبررسی نشان از آن است که در جایگاه نشانگری مربوط، آلی وجود دارد که محصول بیان آن در سنتز صفات مذکور دخالت دارد که همان اثرات پلیوتروپیک می‌باشد. به بیان دیگر می‌توان وجود آل‌های متفاوت را در پیوستگی شدید با جایگاه‌های نشانگری در نظر گرفت که هرکدام به‌طور مستقل در سنتز هر یک از این صفات مؤثر هستند.

گاهی یک نشانگر به ازای دو سطح دمایی در خصوص کنترل یک صفت، حضورش اثبات گردیده است که نشان می‌دهد با تغییر دما، بیان آل حاضر در جایگاه نشانگری متوقف نگردیده است. جایگاه نشانگری که در هر دو صفت فروکتان و نشت‌یونی خود را بروز داده است که احتمالاً بتوان از حضور دو آل مختلف در این جایگاه و یا از اثرات پلیوتروپیک یک آل موجود در جایگاه مذکور برای توجیه این حضور مشترک استفاده نمود (نشانگر Bmag0173 و یا Bmag0125). به‌طور کلی در مورد نشانگرهایی که با بیش از یک صفت ارتباط نشان دادند، می‌توان دریافت که این صفات یا باهم پیوستگی بالایی دارند و یا احتمالاً به‌صورت ژن‌های چند اثره در مکان‌های کروموزومی مستقر هستند. برای اطمینان از وجود ارتباط پیوستگی بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه

جمعیت‌های در حال تفرق مانند F2، لاین‌های اینبرد نوترکیب<sup>۱</sup> (RIL) و دابل‌هاپلوئید<sup>۲</sup> (DH) می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل‌کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها مشخص گردد (فاخری و مهرآوران، 2013). نتایج به‌دست‌آمده از این تجزیه نشان داد که در هر ناحیه، ارتباط تفرق نشانگرها با صفات مختلفی معنی‌دار گردید که این بیانگر این است که احتمالاً بخشی از ژن‌های کنترل‌کننده این صفات در مجاورت این نشانگرها قرار دارد و برای بهبود صفات مربوطه می‌توان از این نشانگرها به‌منظور انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد. در یک بررسی، ارتباط بین 10 صفت زراعی و 70 نشانگر حاصل از 10 جفت آغازگر ریزماهوره بر روی 115 ژنوتیپ جو بومی ایران گزارش شد که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط دارند که در این صورت صفات موردنظر یا دارای پیوستگی بسیار نزدیکی با هم هستند و یا احتمالاً تحت تأثیر ژن‌های چند اثره قرار می‌گیرند (ابراهیمی و همکاران، 1390).

## نتیجه‌گیری کلی

پس از بررسی صفات مذکور و تعیین پلی‌ژنیک بودن آن‌ها، نکته بسیار ارزشمند آن است که مواردی از ارقام بهره‌جو مقادیر بیش‌تری از صفات فیزیولوژیک موردبررسی را در تحمل به تنش سرمای دیررس نسبت به ارقام زمستانه نشان دادند. به‌عبارت‌دیگر ارقام موردبررسی در این تحقیق از روند واکنش ثابتی در مواجهه با افزایش تنش سرما برخوردار نیستند. که می‌تواند متأثر از توانایی هر رقم که متناسب با تغییرات محیط و عناصر مؤثر در ایجاد تحمل (افزایش فروکتان و کاهش نشت‌یونی) و هم‌چنین توانایی ذاتی خود گیاه باشد. در نتیجه هر رقم در مواجهه با تنش از واکنش متفاوتی برخوردار است. و نکته آخر این که امکان شناسایی نشانگرهایی که دارای آل‌های بسیار ارزشمند در تحمل به تنش سرمای بهره‌جو در هر یک از صفات مورداستفاده، و ایجاد رقم متحمل به سرما با تجمع آل‌های مرتبط در برنامه‌های اصلاحی وجود دارد. به دلیل مشخص بودن جایگاه نشانگرهای SSR روی کروموزوم‌های مختلف می‌توان نشانگرهایی را که در پیوستگی با آل‌هایی که تغییرات زیادی از صفات زراعی مطلوب را کنترل می‌کند، مشخص نمود و در آینده برای برنامه‌های به‌نژادی (گزینش به کمک نشانگر) از آن‌ها استفاده کرد. هم‌چنین از آنجاکه دوره‌ی وقوع تنش سرمای دیررس به تناسب شرایط اقلیمی مراکز تولید این محصول زراعی است، پیشنهاد می‌گردد، در دوره‌های

1. Recombinant Inbred Line  
2. Double Haploeid

## منابع

- ابراهیمی، ا.، و نقوی، م.، و سبک‌دست نودهی، م.، و مردی، م. ۱۳۸۹. ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های دو گونه‌های جو (*H. vulgare L.* و *H. spontaneum L.*) با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. مجله علوم زراعی ایران، ۱۲ (۳ (پیاپی ۴۷)): ۳۳۳-۳۴۵.
- احکامی، آ. م.، نقوی، م.، مردی، م.، حسین‌زاده، آ.، پیرسیدی، م.، کاظمی الموتی، م.، هاشم‌پور، ل. و امیدبخش، م.، ا. ۱۳۸۷. مطالعه تنوع نسبی گندم دروم (*Triticum durum*) با استفاده از نشانگرهای AFLP. مجله علوم زراعی ایران، ۱: ۲۵-۳۵.
- احمدی، ع.، یزدی صمدی، ب. و زرگرنجاج، ج. ۱۳۸۴. واکنش فیزیولوژیکی گیاهچه‌های گندم به دمای پایین. دانش کشاورزی، ۱۵ (۲): ۲۷-۴۳.
- آهک‌پز، ف.، نادر محمودی، ک.، حسابی، ع.، سلیمانی، ک.، نیستانی، ا. و عابدی‌اصل، غ. ر. ۱۳۹۲. بررسی پایداری عملکرد دانه لاین‌ها و ارقام جو در مناطق سرد و سرد معتدل دیم. مجله زراعت دیم ایران، ۱ (۳): ۳۳-۵۴.
- رشیدی منفرد، س.، و حسین‌زاده، ع.، و مردی، م.، و نقوی، م.، و پیرسیدی، س. ۱۳۸۷. ارزیابی تنوع ژنتیکی گندم دوروم (*Triticum turgidum var. durum*) با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی (SSAP). علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی)، ۱۲ (۴۵ (الف)): ۱۴۷-۱۵۵.
- ساسانی، ش.، توکل افشاری، ر.، محفوظی، س.، ترواسکیس، ب. ۱۳۹۱. ارتباط تغییرات فنولوژیک و تکمیل نیاز بهاره سازی با روند انباشت قندهای محلول و تحمل به سرما در گندم نان (*Triticum aestivum*). علوم گیاهان زراعی ایران، ۴۳ (۲): ۲۸۱-۲۹۳.
- لاهورت، ف.، زین‌العابدینی، م.، کریمی، ج.، شهبازی، م. و صادق زاده، ب. ۱۳۹۵. ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ایرانی و غیرایرانی جو با استفاده از نشانگرهای SSR. زیست فناوری گیاهی، ۱۵: ۲۵-۳۵.
- مجیرشیبانی، ا.، پیغمبری، س. ع.، یزدی صمدی، ب.، نقوی، م. ر. و قدردان، ک. ۱۳۹۲. ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط بین صفات با استفاده از ویژگی‌های زراعی و نشانگرهای مولکولی در ارقام جو. مجله علوم زراعی ایران، ۱: ۴۶-۵۹.
- محفوظی، س.، مجیدی، م.، طائب، و. و طالعی، ا. ۱۳۷۴. روش ارزیابی مقاومت به سرما منابع در ارقام گندم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، ۱۲۰ صفحه.
- نظامی، ا.، برزویی، ا.، جهانی، م.، عزیز، م. و شریف، ا. ۱۳۸۶. نشت الکترولیت‌ها به‌عنوان شاخصی از یخ‌زدگی در کلزا (*Brassica napus*). پژوهش‌های زراعی ایران، ۱: ۱۶۷-۱۷۵.
- Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F. and Kazemiyan, A. 2019. Amarnameh vezarat jahad keshavarzi, 95 pp.
- Apostolova, P., Yaneva, I., Apostolova, P. and Yaneva, I. 2006. Antioxidative defence in winter wheat plants during early cold acclimation. *Plant Physiology*, 21: 101-108.
- Bertin, P., Bouharmont, J. and Kinet, J. M. 1996. Somaclonal variation and improvement in chilling tolerance in rice. *Plant Breeding*, 115: 268-273.
- Binott, J. J., Owuoche, J. O. and Bartels, D. 2017. Physiological and molecular characterization of Kenyan barley (*Hordeum vulgare L.*) seedlings for salinity and drought tolerance. *Euphytica*, 213 (7): 139.
- Cozzolino, D., Degner, S. and Eglinton, J. 2016. Relationships between fructans content and barley malt quality. *Food Analytical Methods*, 9 (7): 2010-2015.
- Dionne, J., Castonyuay, Y., Nadeuu, P. and Desjardins, Y. 2001. Amino acid and protein changes during cold acclimation of green- type Annual Bulgrass ecotype. *Crop Science*, 41: 1862-1870.
- Fakheri, B. A. and Mehravaran, L. 2013. Locating QTLs controlling agronomic traits of "Steptoe × Morex" derived double haploid population of barley under drought stress conditions. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 44: 47-57.
- Ferreira, J. R., Pereira, J. F., Turchetto, C., Minella, E., Consoli, L. and Delatorre, C. A. 2016. Assessment of genetic diversity in Brazilian barley using SSR markers. *Genetics and molecular biology*, 39 (1): 86-96.
- Hamida, W. B. and Hamza, S. 2014. SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. *Euphytica*, 135: 107-118.
- Han, B. and Bischof, J. C. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology*, 48 (1): 8-21.
- Jermyn, M. A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature*, 177: 38-39.
- Kadri, K., Abdellawi, R. and Cheikh-Mhamed, H. 2009. Genetic diversity in barley genetic diversity in local Tunisian barley based on RAPD and SSR analysis. *Conservation Biology Division*, 2 (1): 27-35.
- Livingston, D. P., Hincha, D. K. and Heyer, A. G. 2009. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (13): 2007-2023.

- Mirmiran, M., Nezami, A. and Kafi, M. 2017. Investigation of frost tolerance in fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.). Iranian Journal of Field Crop Research, 16 (2): 299-315.
- Naghavi, M. R., Mardi, M., Pirseyedi, S. M., Kazemi, M., Potki, P. and Ghaffari, M. R. 2007. Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 237-240.
- Nayyar, H., Bains, T. S. and Kumar, S. 2005. Chilling stressed chickpea seedlings: effect of cold acclimation, calcium and abscisic acid on cryoprotective solutes and oxidative damage. Environmental and Experimental Botany, 54 (3): 275-285.
- Newton, A. C., Flavell, A. J., George, T. S., Leat, P., Mullholland, B., Ramsay, L. and Swanston, J. S. 2011. Crops that feed the world 4. Barley: a resilient crop? Strengths and weaknesses in the context of food security. Food Security, 3 (2): 141.
- Pandey, G. P. and Torric, J. H. 1973. Path coefficient analysis of seed yield components in soybeans. Crop Science. 13: 505-507.
- Ribeiro-Carvalho, C., Guedes-Pinto, H., Igrejas, G., Stephenson, P., Schwarzacher, T. and Heslop-Harrison, J. S. 2004. High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace 'Barbela'. Annals of Botany 94 (5): 699-705.
- Saghai Maroof, M. A., Soliman, M., Jorgensen R. A. and Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 81: 8014-8018.
- Shahriyari Ahmadi, F., Salehi, M., Ghasemi, V. and Ramezani Moghadam, M. R. 2012. Investigating the genetic diversity between some cotton (*Gossypium* sp.) genotypes in the German plasma germ using a microsatellite molecular marker (ISSR). Iranian Journal of Field Crop Research, 10 (4): 674-680.
- Shakhathreh, Y., Baum, M., Haddad, N., Alrababah, M. and Ceccarelli, S. 2016. Assessment of genetic diversity among Jordanian wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes revealed by SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 63 (5): 813-822.
- Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.
- Shuorvazdi, A. S., Mohammadi, A., Norozi, M. and Sadeghzadeh, B. 2014. Molecular analysis of genetic diversity and relationships of barley landraces based on microsatellite markers. Journal of Plant Genetic Research, 1 (1): 51-64.
- Soleimani, V. D., Baumand, B. R. and Jonson, D. A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L.). Theoretical and Applied Genetic, 104: 350-357.
- Thomas, H. 1990. Osmotic adjustment in *Lolium perenne*: its heritability and the nature of solute accumulation, Annals of Botany, 66: 521-530.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L. 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. Plant, Cell and Environment, 26 (7): 1083-1096.
- Yan, W. and Tinker, N. A. 2006. Biplot analysis of multi-environment trial data: Principles and applications. Canadian Journal of Plant Science, 86: 623-645.
- Yuanyuan, M., Yali, Z., Jiang, L. and Hongbo, S. 2009. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. African Journal of Biotechnology, 8 (10): 2004-2010.
- Zadoks, J. C., Chang, T. T. and Konzak, C. F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Research, 14: 115-121.

## Study on Genetic Diversity of some Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars Using SSR Marker and Physiological Traits, Fructan and Ion Leakage under Late Spring Cold Stress

Shamsifar<sup>1</sup>, S., Mirfakhraei<sup>2\*</sup>, S. R. and Haghpanah<sup>1</sup>, K.

### Abstract

Plants are always exposed to a vast range of environmental stress including the late spring cold stress which affects their growth and production. The purpose of this research was to investigate the effect of Late cold stress on the physiological traits, associated with stress tolerance that consists of fructan and Ion leakage in the reproductive stage. To this end, an experiment was conducted in a controlled condition (greenhouse) with a combined analysis model based on a completely randomized design in four media (control temperature level of +8°C, +2°C, 0°C, and -2°C) for 20 cultivars of barley and three replication in the Faculty of Agriculture of Tarbiat Modarres University, Iran. The results of the analysis of variance showed that cold stress levels, cultivar, and interaction of cultivar on cold were significant for all the traits at 1% probability level. The results of comparing the mean and biplot analysis of physiological traits showed that Gohran and Jelgeh are the most tolerant and Reyhan 03 and Makoei are the most sensitive cultivars to cold stress. To study the genetic diversity in the molecular segment, 14 pairs of microsatellite primers were used and the average polymorphism content was estimated as much as 0.40. The cultivars were grouped by the Jacard similarity coefficient as well as cluster analysis method via the Complete linkage model, and 20 cultivars of barley were divided into 4 groups. The results of correlation analysis using stepwise regression analysis showed a high correlation ( $R^2$ ) for EBmac0674 indicator with Ion leakage trait (34.3) and Bmag0173 indicator with fructan trait (20/8).

**Keywords:** Biplot, Cluster analysis, Polymorphis, Mean comparison

---

1 and 2. MSc Graduate and Assistant Professor, Respectively, Department of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*: Corresponding author      Email: Abdhoorz@modares.ac.ir

This paper has been extracted from the first author's MSc thesis under the guidance of Seyed Rezaghali Mirfakhraei.