

ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare* L.) با استفاده از نشانگر

## مولکولی ISSR

شریفه حسین پور، اسد معصومی اصل\* و رضا امیری فهلیانی

ایران، یاسوج، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

## چکیده

جو گیاهی دیپلوئید به تعداد ۱۴ کروموزوم می‌باشد که ارزیابی قرابت و خویشاوندی ژنوتیپ‌های آن اطلاعات مفیدی در اختیار بهنژادگران قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر، تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ جو با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از استخراج DNA بومی و اطمینان از کمیت و کیفیت مطلوب آن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ISSR انجام گردید. در این آزمایش ۱۲ آغازگر استفاده شده تعداد ۱۸۰ نوار تولید کردند که ۱۵۹ مورد از آنها چندشکل بودند. درصد چندشکلی برای کل آغازگرها ۸۸/۳۷ درصد و میانگین تعداد نوارهای چندشکل، ۱۵/۹ نوار بود. بالاترین و کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکل به ترتیب مربوط به آغازگرهای  $F_1$  و  $F_{12}$  بود. آغازگر  $F_1$  بیشترین و آغازگر  $F_{12}$  کمترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان دادند. شاخص نشانگری در آغازگر  $F_1$  بالاترین و در آغازگر  $F_5$  کمترین مقدار بود. نتایج حاصل از این پژوهش، کارایی بالای نشانگر ISSR در بررسی تنوع و گروه‌بندی مولکولی ارقام جو را تایید کرد و نشان داد که بین ژنوتیپ‌های جو مورد بررسی تنوع ژنتیکی مناسبی وجود دارد و می‌توان از آنها در برنامه‌های بهنژادی بهره جست.

کلمات کلیدی: هتروزیگوسیتی، چندشکلی، شاخص نشانگری و تجزیه خوشه ای

## مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) گیاهی دیپلوئید ( $2n=2n=14$ ) و یکی از مهمترین و قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است. جو همانند دیگر غلات، تامین کننده نیاز غذایی بشر و حیوانات بوده و از زمان‌های قدیم در تولید مالت و الکل مدنظر بوده است [۲۵]. این گیاه در مقایسه با گندم نیاز آبی کمتری دارد و در مناطقی با حداقل بارندگی یعنی از ۲۰۰ تا ۲۵۰ میلی‌متر به عمل می‌آید [۱۷].

گیاه جو از نظر ژنتیکی دارای تنوع ژنتیکی است و بررسی تنوع ژنتیکی از نیازمندی‌های اولیه همه پروژه‌های بهنژادی گیاهی است. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مبتنی بر DNA برای بهنژادی گیاهان زراعی روند رو به رشدی داشته است. در تکنیک گزینش به کمک نشانگر، همبستگی بین نشانگرهای DNA و صفات مهم زراعی همچون مقاومت به عوامل بیماریزا، حشرات، نماتدها، تحمل به تنش‌های غیر زنده، پارامترهای کیفیت و صفات کمی مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این روش نشانگرهایی که در مجاورت ژن هدف قرار دارند، شناسایی و انتخاب می‌شوند. به این ترتیب، این روش به شناسایی گیاهان حامل ژن‌های هدف بطور هم‌زمان و بدون قرار دادن در معرض هجوم بیمارگر یا حشره یا تنش در نسل‌های اولیه کمک خواهد کرد [۴].

در بین نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای ISSR (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) به علت چندشکلی بیشتر، تکرارپذیری بالا، توزیع ژنومی بالا و تصادفی، سهولت استفاده و قابلیت کاربرد آنها در بررسی ژنوتیپ‌ها و تهیه نقشه ژنومی،

به عنوان نشانگرهای مناسب در مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند [۲۱]. الوندی و همکاران [۲] در ارزیابی ژنوتیپ‌های گندم دوروم با استفاده از نشانگرهای ISSR از ۱۱ آغازگر مختلف استفاده کرده و گزارش کردند که بیشترین شاخص چندشکلی مربوط به آغازگر ۶ و کمترین آن مربوط به آغازگرهای ۱ و ۵ بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و بر اساس ضریب تشابه دایس ژنوتیپ‌ها را در سه گروه دسته‌بندی کرد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ رقم و لاین جو با استفاده از ۹ آغازگر ISSR، در مجموع ۴۳۸ نوار چندشکلی با طول ۳۰۰۰-۸۰ جفت باز تولید شدند. میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرها از ۰/۱۲۱ برای ISSR7 تا ۰/۲۲۷ برای ISSR2 با میانگین ۰/۱۹ متغیر بود. شاخص نشانگر نیز از ۱/۶۹۴ برای ISSR7 تا ۲۲/۴۴۸ برای ISSR9 با میانگین ۸/۹۹ بدست آمد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه بر اساس داده‌های مولکولی، آنها را به شش گروه تقسیم کرد [۱۲]. در تحقیق دیگری برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف جو زراعی ایران از ۲۵ آغازگر ISSR استفاده شد. در مجموع، ۲۰ آغازگر از بین ۲۵ آغازگر مورد استفاده ۷۰ مکان ژنی چندشکلی تولید کردند. تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از ماتریس ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد، ژنوتیپ‌ها را به سه گروه متمایز تقسیم نمود [۱۱]. تنوع ژنتیکی ۸۰ نمونه جو جنوب تونس با استفاده از آغازگرهای ISSR و RAPD بررسی شد. با نشانگرهای ISSR درصد چندشکلی ۶۶/۶۷ درصد و میانگین اطلاعات چندشکلی از ۰/۲۴ تا ۰/۳۹ متغیر بود در حالی که قدرت تفکیک بین ۰/۷۴ تا ۱/۱۶ بدست آمد. با نشانگر RAPD، سه آغازگر در مجموع ۱۷ باند قابل امتیازآور تولید کردند که همه چندشکلی بودند. دو دندروگرام به دست آمده از این نشانگرها، خوشه‌بندی متفاوتی از ۸۰ نمونه را نشان دادند [۱۹]. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف مناطق خشک و مرطوب جو کشور تونس با استفاده از ۹ آغازگر ISSR و ۹ آغازگر RAPD بررسی شد. نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب ۷۲/۲ و ۶۱ درصد نوارهای چندشکلی تولید کردند. کارایی نسبی این سیستم‌های نشانگر با استفاده از پارامترهای مختلف مانند نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI) و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مقایسه شدند. تمام پارامترهای بررسی شده، در سیستم ISSR بالاتر بودند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر روی داده‌های ISSR و RAPD به وضوح ژنوتیپ‌ها را از نظر پس‌زمینه ژنتیکی و منشأ جغرافیایی آنها متمایز کرده و هر دو خوشه‌بندی نتایج ثابتی از شرایط آنها ارائه داد [۱۸]. در تحقیق دیگری برای بررسی فاصله ژنتیکی گونه‌های جو بدست آمده از جمعیت‌های spontaneum غرب کشور ترکیه از نشانگرهای ISSR و RAPD استفاده شد. ۵۵ آغازگر RAPD و ۱۰ آغازگر ISSR برای تشخیص تنوع استفاده شد. در مجموع، با استفاده از ۶۵ آغازگر مورد استفاده ۵۵ جایگاه چندشکلی تولید شد. به وضوح دو گروه خوشه‌ای مجزا در میان جمعیت‌ها ایجاد شد. کمترین تغییرات بین جمعیت‌های "پینارباسی" و "بورنوا" و بیشترین آن بین جمعیت‌های "ایچملر" و "آیدین" مشاهده شد، لذا عنوان شد که سیستم های نشانگری RAPD و ISSR به عنوان دو نشانگر غالب برای تشخیص تنوع ژنتیکی جو موثر و امیدوارکننده هستند [۲۷]. تنوع ژنتیکی ۹۰ نمونه جو، شامل ۴۵ خویشاوند نزدیک جو از منطقه تبت چین و ۴۵ عضو وحشی از کشورهای مختلف سراسر خاورمیانه، با استفاده از نشانگرهای ISSR و SSR<sup>۷</sup> بررسی شد. نتایج نشان داد که اقوام نزدیک وحشی تبتی

1. Inter Simple Sequence Repeat
2. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
3. Rnadam Amplified Polymorphic DNA
4. Effective Multiplex Ratio
5. Marker Index
6. Polymorphism Information Content
7. Simple sequence Repeat

جو از تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به کشورهای خاورمیانه برخوردار بودند. ۱۰ آغازگر ISSR ۹۱ آلل متفاوت تکثیر کردند که ۷۹ الل چندشکل در ژنوتیپ‌های تبتی (۸۶/۸۱ درصد) و ۸۲ الل چندشکل در ژنوتیپ‌های خاورمیانه (۸۰/۴۹ درصد) بود. یازده جفت آغازگر نشانگرهای SSR در بین ژنوتیپ‌های تبتی، ۱۰۰ نوار چندشکل (۱۰۰ درصد) و در بین ژنوتیپ‌های خاورمیانه، ۷۷ نوار چندشکل (۹۸/۷۲ درصد) تولید کردند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را دو گروه مجزا قرار داد که با منشاء جغرافیایی نمونه‌ها در ارتباط بود [۲۸]. در پژوهشی، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. ۱۷ آغازگر RAPD و ۱۶ آغازگر ISSR به ترتیب ۸۶ و ۵۶ باند چندشکل ایجاد کردند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس UPGMA و دندروگرام رسم شده با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.02 سه خوشه اصلی را نشان داد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های CD-89-2 و CD-89-7 و کمترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های CD-89-2 و CD-89-3 بود. بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی نی، میانگین تعداد باندهای مؤثر، شاخص شانون و محتوای چندشکلی به ترتیب ۱/۳۸۱، ۰/۳۳۲ و ۸۷/۱۲ درصد بودند. نتایج نشان داد که آنالیز RAPD و ISSR روش‌های مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌های گندم نان هستند [۲۳].

در پژوهش دیگری تنوع ژنتیکی ۸۵ ژنوتیپ برنج با استفاده از ۶ نشانگر iPBS<sup>۱</sup>، یک نشانگر IRAP و ۹ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. آلل‌های چندشکل توسط هر نشانگر شناسایی شدند (از ۳ تا ۸ آلل متغیر بودند) و به طور متوسط ۵/۳۳ آلل در هر مکان مشاهده شد. از بین آلل‌های شناسایی شده، آلل‌های ISSR1-2، iPBS2241-2، ISSR16-4، ISSR55-1، ISSR57-1، iPBS2242-2 و iPBS2240-1 مرتبط با چندین صفت در شرایط نرمال و تنش بودند. نشانگر iPBS2240 با سطوح بالای محتوای اطلاعات چندشکل، تنوع Nie، تنوع شانون و تعداد آلل مؤثر در این مطالعه به عنوان بهترین نشانگر برای ژن شناسایی شد [۲۶].

با توجه به مطالب بالا، تحقیقات انجام شده روی ژنوتیپ‌های جو در کشور کم بوده و اطلاعات ما در مورد قرابت و خویشاوندی ژنوتیپ‌های جو موجود در کشور اندک است. از طرفی در طی چند سال اخیر در مرکز تحقیقات دیم گچساران تعدادی ژنوتیپ جو با منشاء داخلی و بین‌المللی (۱۶ ژنوتیپ پیشرفته امیدبخش) در مسیر بهنژادی و ایجاد رقم‌های جدید سازگار به شرایط ایران قرار گرفته اند لذا هدف از انجام این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۶ ژنوتیپ پیشرفته امیدبخش که در معرض رهاسازی به عنوان رقم جدید هستند و دو رقم جو ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و دسته‌بندی آنها بر اساس اطلاعات ژنتیکی می‌باشد تا بتوان از این اطلاعات در راستای ایجاد ارقام جدید بهره جست.

## مواد و روش‌ها

شجره ژنوتیپ‌های مورد بررسی که از مرکز تحقیقات دیم گچساران تهیه گردیدند در جدول ۱ آمده است. پس از کشت بذور در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه، نمونه‌های برگ‌ی جهت استخراج DNA تهیه گردید.

1. Inter-Primer Binding Site
2. Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism

## جدول ۱- شجره ژنوتیپ‌های جو مورد بررسی

برای

استخر

اج

DN

A

برگی

از

روش

فاطمه

ی‌فرد

و

معصوم

می‌اص

ل [۵]

استفاد

ه

گردید

.

ارزیاب:

ی

کمیت

و

کیفیت

ت

DN

A

استخر

اج

شده با روش‌های بارگذاری نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪ و انجام الکتروفورز و نیز اندازه‌گیری میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گردید.

آغازگرهای ISSR مورد استفاده [۱۳ و ۱۴ و ۲۴] (جدول ۲) توسط شرکت تکاپو زیست-تهران ساخته شدند. دمای اتصال بهینه آغازگرها با استفاده از برنامه گرادینت دمایی دستگاه حرارتی ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) تعیین شد.

1	Mahour	
2	Khorram	جدو
3	Arbayan-01//As46/Aths/3/Barjoui, <b>ICB02-0406-0AP-8AP-0AP</b>	ل ۲ -
4	Avt/Attiki//MAtt733371/3/Aths/Lignee686/4/Kabaa, <b>ICB98-0796-0AP-15AP-0AP-14AP-0AP-8AP-0AP</b>	توالی آغازگر
5	Lignee527/NK1272/4/Avt/Attiki//Aths/3/Giza121/Pue, <b>ICB95-0279-0AP-8AP-0AP-14AP-0AP</b>	رها و
6	Rhn03/3/Mr2584/Att//Mari/Aths*302/4/Rhn03/Lignee527, <b>ICB05-0272-3AP-0AP</b>	دمای
7	Rhn03/3/Mr2584/Att//Mari/Aths*302/4/Ssn/Badia//Arar/3/Gloria'S'/Copal'S', <b>ICB05-0292-7AP-0AP</b>	بهینه
8	Aths/Lignee686//Mari/Aths*2/3/Lignee527/NK1272//Alanda/6/JLB7001/5)Deir Alla106//DL70/ Pyo/3/RM1508/4/Arizona5908/Aths//Avt/Attiki/3/Ager, <b>ICB05-0238-0AP-5AP-0AP</b>	اتصال آنها
9	AwBlack/Aths//Arar/3/9Cr27907/Roho/4/CompCr229//As46/Pro/3/DeirAlla106//DL71/Strain205, <b>ICB97-0605-0AP-10AP-0AP-5AP-0AP-1AP-0AP</b>	
10	E.ACACIA/DEFRA//PENCO/CHEVRON-BAR, <b>CBSS02Y00319S-0M-0M-5Y-1M-0Y</b>	
11	SHENMAI NO.3/MSEL//CANELA, <b>CBSS04Y00367T-I-2Y-2M-0Y-0M-0Y</b>	
12	SHENMAI NO.3/MSEL//CANELA, <b>CBSS04Y00367T-D-3Y-1M-0Y-0M-0Y</b>	
13	ATAH92/2*M81//TOCTE/3/PENCO/CHEVRON-BAR, <b>CBSS01M00733T-0TOPY-7M-2M-2Y-1M-0Y</b>	
14	DEFRA/CL128//PFC 88209, <b>CBSS02Y00326S-0M-0M-4Y-1M-0Y</b>	
15	FRESA/LEGACY, <b>CBSS05Y00125S-7Y-0M-0Y-0M-1AP</b>	
16	MoB1337/Wi2291//Moroco9-75/3/Hml	
17	TRADITION/6/P.STO/3/LBIRAN/UNA80//LIGNEE640/4/BLLU/5/PETUNIA1 /7/LEGACY// PENCO/CHEVRON-BAR, <b>CBSS04M00295T-2M-0Y-0M-0Y-1M-0AP</b>	
18	LIMON/BICHY2000//NE167/CLE176, <b>CBSS05Y00064S-29Y-0M-0Y-0M-3AP</b>	

اسم آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	توالی آغازگر (3' → 5')
F1	۶۳/۶	ACC ACC ACC ACC ACC ACC G
F2	۵۶/۳	ACA CAC ACA CAC ACA CCG
F3	۵۲/۴	CTC TCT CTC TCT CTC TG
F4	۴۳/۲	GAT AGA TAG ACA GAC A
F5	۳۶	GGG TGG GGT G
F6	۵۲/۶	GTG TGT GTG TGT GTG TYA

CTC TCT CTC TCT CTC TGC	۵۶/۳	F7
CTC TCT CTC TCT CTA	۴۳/۵	F8
CAG CAG CAG GC	۳۸	F9
GTG TGT GTG TGT CC	۴۳/۷	F10
CAC ACA CAC ACA AC	۴۰/۸	F11
CAC ACA CAC ACA GT	۴۰/۸	F12

جهت اجرای واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر بافر مسترمیکس آمپلی‌کن (شرکت سیناژن)، ۲ میکرولیتر آغازگرهای ISSR (با غلظت ۱۰ میکرومول)، ۶/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل و ۱/۵ میکرولیتر DNA رقیق‌سازی شده در تیوب ۰/۲ میکرولیتری افزوده شدند. برنامه واکنش PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه (به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی (به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال (به مدت ۴۵ ثانیه بر اساس دماهای بیان شده در جدول ۲) و بسط (به مدت ۱/۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) بود. بسط نهایی شامل یک چرخه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصولات واکنش PCR روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند. پس از الکتروفورز، وجود و عدم وجود باند روی ژل بصورت صفر و یک امتیازدهی شد و پس از تشکیل ماتریس داده‌های اولیه، رسم نمودار تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار NTSYS version 2.02 انجام شد. برای تعیین همبستگی بین ماتریس‌های تشابه و گروه‌بندی توده‌ها، از آزمون منتل استفاده شد. بر اساس آزمون کوفتیک، بهترین روش خوشه‌بندی روش Compelet بر اساس ضریب تشابه Jaccard بود. برای محاسبه شاخص‌های He، I، Ne و Na از نرم افزار Genalex6.51b1 استفاده شد. درصد چندشکلی هر آغازگر و شاخص تنوع برای هر آغازگر بر اساس PIC محاسبه گردید [۶].

شاخص نشانگری (MI) با استفاده از فرمول  $MI = PIC \times EMR$  برای هر آغازگر محاسبه شد. در این رابطه EMR نسبت چندگانه موثر می‌باشد که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژنوتیپ است و بر حسب رابطه  $EMR = np + \beta$  محاسبه می‌شود. در رابطه مربوط به محاسبه مقدار  $\beta$  ( $\beta = np / (np + nnp)$ )، np تعداد کل جایگاه‌های ژنی چندشکل و nnp تعداد باندهای یک شکل است.

از نرم افزارهای SPSS و Statistics 22 به منظور انجام تجزیه لجستیک استفاده گردید. همچنین برای انجام آزمون  $T^2$  هتلینگ و مشخص کردن خط برش در نمودار خوشه‌ای، از نرم افزار SAS استفاده گردید.

## نتایج و بحث

در این آزمایش ۱۲ آغازگر استفاده شده در مجموع ۱۸۰ نوار تولید کردند که در این میان، ۱۵۹ نوار چندشکل بودند. آغازگرهای F2 و F7 هیچ نواری تولید نکردند. درصد چندشکلی برای کل آغازگرها ۸۸/۳۷ درصد بوده و تعداد نوار تولید شده توسط هر آغازگر به طور متوسط ۱۸ نوار بود. همچنین میانگین نوارهای چندشکل تولید شده، ۱۵/۹ نوار بود. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده مربوط به آغازگرهای F1 و F6 و کمترین تعداد مربوط به آغازگر F5 بود. آغازگرهای F1، F4 و F10 هر سه ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان دادند (جدول ۳). Barker [۱۵] پیشنهاد کرد که برای کاهش دادن خطای استاندارد تخمین فاصله‌ای، نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در مطالعات فاصله ژنتیکی باید بیشتر از ۴ آلل تولید کنند. بر این

اساس، چون میانگین تعداد نوارهای چندشکل تولید شده در این پژوهش بیشتر از ۴ بود لذا نشانگرهای ISSR مورد استفاده در پژوهش حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جو مناسب می‌باشند. نظری و عبدالشاهی [۹] گزارش کردند که از ۱۰ آغازگر استفاده شده، ۹ آغازگر آن چندشکلی قابل توجهی نشان دادند. همچنین عنوان کردند که برای مجموع ژنوتیپ‌ها ۳۱ نوار چندشکل با میانگین ۳/۴ نوار به ازای هر آغازگر تشکیل شده است. نخعی و همکاران [۸] با استفاده از ۲۰ آغازگر روی گندم گزارش کردند که ۹ آغازگر باندهای تکرارپذیر و چندشکل تولید کردند. از مجموع ۳۵۱ نوار تکثیر شده، ۲۱۷ نوار چندشکل با ۸۶ درصد چندشکلی و تعداد متوسط ۲۴/۱۱ نوار بودند. پژوهش حاضر نیز از نظر تولید نوار چندشکل حد وسط تعداد نوار تولید شده در این دو تحقیق بود یعنی نشانگر مورد استفاده در مورد گیاه جو خوب عمل کرده است.

Najaphy et al [۲۲] در پژوهشی با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR برای شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های اصلاحی گندم نشان دادند که در مجموع ۸۶ نوار تولید شد که در این میان ۶۹ نوار چندشکلی نشان دادند (۸۰/۲ درصد). در مجموع، آغازگرهای ISSR مورد استفاده در پژوهش حاضر با تولید تعداد کافی نوارهای چندشکل نشان دادند که در ارزیابی تنوع ژنتیکی نمونه‌های جو پتانسیل لازم را دارند.

جدول ۴- تعداد نوارهای تکثیر شده، چندشکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر

نام آغازگر	تعداد نوارهای تکثیر شده	تعداد نوارهای چندشکل	درصد چندشکلی
F1	۲۷	۲۷	۱۰۰
F3	۱۵	۱۴	۹۳/۳۳
F4	۱۰	۱۰	۱۰۰
F5	۷	۶	۸۵/۷۱
F6	۲۶	۲۵	۹۶/۱۵
F8	۲۲	۲۰	۹۰/۹۰
F9	۱۷	۱۲	۷۰/۵۸
F10	۱۵	۱۵	۱۰۰
F11	۱۹	۱۵	۷۸/۹۴
F12	۲۲	۱۵	۶۸/۱۸
میانگین	۱۸	۱۵/۹	۸۸/۳۷

بر اساس جدول ۴، بالاترین میزان PIC مربوط به آغازگر F1 بود. این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها قادر به تفکیک بهتر ژنوتیپ‌ها بود و لذا می‌توان از این آغازگر به منظور آنالیز ژرم‌پلاسم‌های گیاه جو در پژوهش‌های بعدی بهره گرفت. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از پارامترهای مهم جهت مقایسه نشانگرها از لحاظ قدرت تفکیک آن‌ها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است و بیانگر قدرت تفکیک بالای آن نشانگر می‌باشد [۱۶].

آغازگر F1 بیشترین و آغازگر F12 کمترین میزان هتروزیگوسیتی را نشان دادند (جدول ۴). میزان هتروزیگوسیتی پایه و اساس تنوع ژنتیکی می‌باشد. شاخص نشانگری (MI) آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه بین ۲/۲۳۷ و ۱۲/۷۹۸ متغیر بود (جدول ۴). به منظور پیش‌بینی کارایی یک نشانگر، شاخص نشانگری معیار مناسبی می‌باشد. آغازگرهایی از جمله F1 (با شاخص نشانگری ۱۲/۷۹۸) و F6 (با شاخص نشانگری ۹/۸۳۱) بالاترین و نشانگر F5 (۲/۲۳۷) کمترین مقدار شاخص

نشاندگی را نشان دادند. بالا بودن چندشکلی و شاخص نشاندگی، نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه جو می‌باشد.

شاخص شانون (I) تنوع در هر آغازگر را نشان می‌دهد. مقدار میانگین شانون در این پژوهش ۰/۵۳۹ می‌باشد. کمترین آن مربوط به آغازگر F<sub>12</sub> (۰/۳۶۸) و حداکثر آن مربوط به آغازگرهای F<sub>10</sub> (۰/۶۱۵) و F<sub>1</sub> (۰/۶۱۴) بود. حداکثر آل موثر (Ne) بدست آمده در این پژوهش مربوط به آغازگرهای F<sub>1</sub> (۱/۸۰۹) و F<sub>10</sub> (۱/۸۰۶) و حداقل آن مربوط به آغازگر F<sub>12</sub> (۱/۴۱۴) بود. آل‌های متفاوت (Na) بیان‌کننده تعداد آل‌های مشاهده شده و تعداد واقعی آل‌هایی است که در جمعیت پیدا می‌شوند. کمترین مقدار Na، برای آغازگر F<sub>12</sub> (۱/۶۸۲) و بیشترین آن مربوط به آغازگرهای F<sub>3</sub>، F<sub>4</sub>، F<sub>5</sub>، F<sub>6</sub>، F<sub>8</sub> و F<sub>10</sub> بود. مقادیر بالای چندشکلی، شاخص نشاندگی و هتروزیگوسیتی ژنوتیپ‌های جو در این پژوهش نشان داد که نشانگرهای مولکولی ISSR دارای توانمندی کافی برای بررسی تنوع ژرم‌پلاسم این گیاه می‌باشند.

جدول ۴- مقادیر مربوط به شاخص‌های چندشکلی آغازگرهای مورد مطالعه

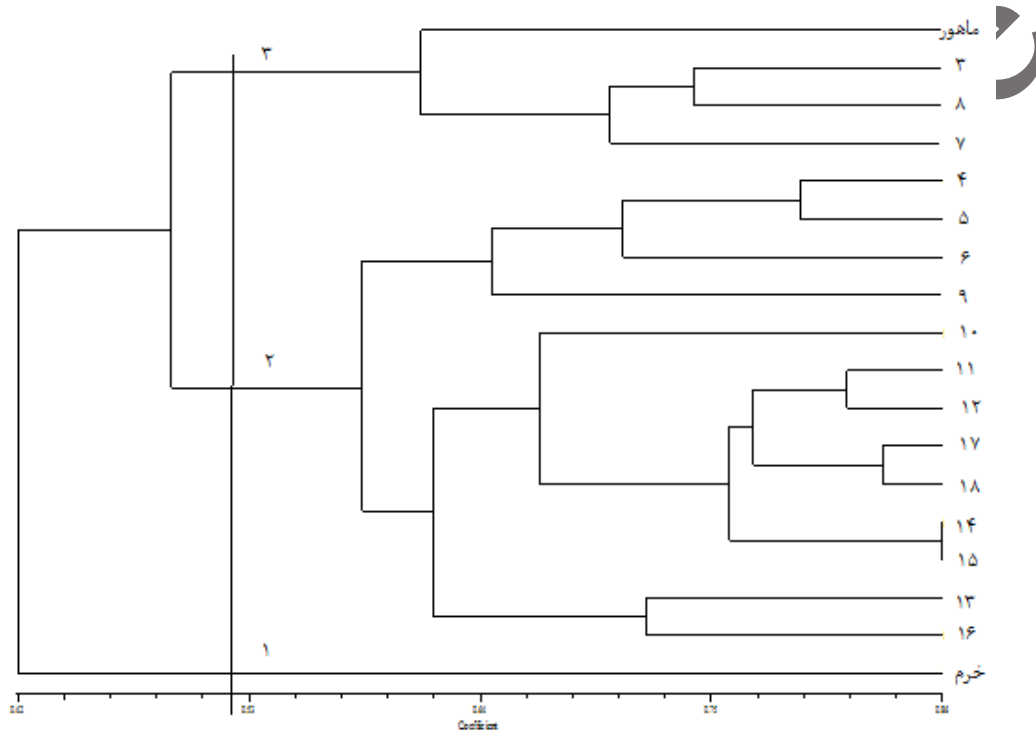
نام آغازگر	PIC	MI	Na	Ne	I	He
F1	۰/۴۷۴	۱۲/۷۹۸	۱/۹۲۹	۱/۸۰۹	۰/۶۱۴	۰/۴۳۲
F3	۰/۴۱۹	۵/۴۷۴	۲	۱/۶۵۴	۰/۵۴۷	۰/۳۷۱
F4	۰/۳۷۲	۳/۷۲	۲	۱/۵۴۱	۰/۴۸۵	۰/۳۲۰
F5	۰/۴۳۵	۲/۳۳۷	۳	۱/۶۹۷	۰/۵۹۵	۰/۴۰۶
F6	۰/۴۰۹	۹/۸۳۱	۲	۱/۶۲۹	۰/۵۳۹	۰/۳۶۲
F8	۰/۴۵۷	۸/۳۰۸	۲	۱/۷۶۰	۰/۶۰۴	۰/۴۱۸
F9	۰/۳۷۵	۳/۱۷۶	۱/۷۰۶	۱/۵۵۰	۰/۴۳۷	۰/۳۰۳
F10	۰/۴۷۳	۷/۰۹۵	۲	۱/۸۰۶	۰/۶۱۵	۰/۴۳۰
F11	۰/۴۴۷	۵/۲۹۲	۲	۱/۷۳۱	۰/۵۸۶	۰/۴۰۳
F12	۰/۳۱۰	۳/۱۷۰	۱/۶۸۲	۱/۴۱۴	۰/۳۶۸	۰/۲۴۶
میانگین	۰/۴۱۷	۶/۱۱۰	۱/۹۲۲	۱/۶۶۴	۰/۵۳۹	۰/۳۷۰

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های جو مطالعه شده بر مبنای مشاهدات مولکولی (شکل ۲) ژنوتیپ‌ها را در سه گروه قرار داد که توسط آزمون‌های CCC و T<sup>2</sup> هتلینگ تایید شد.

گروه اول شامل ژنوتیپ ۲، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۴، ۵، ۶، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸ و گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ۱، ۳، ۸ و ۷ بود. ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ رقم هستند و بقیه، ژنوتیپ‌های پیشرفته امیدبخش هستند که حاصل تلاقی‌های مختلف بوده و امید می‌رود در آینده نزدیک به عنوان رقم رهاسازی شوند.

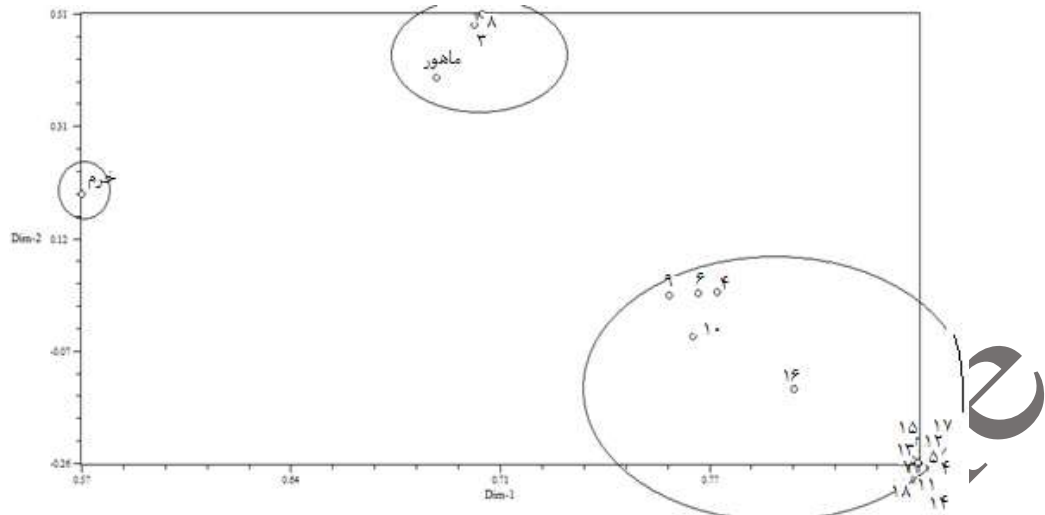
بیشترین فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ بدست آمد که در صورت مناسب بودن صفات موردنظر، در برنامه به‌نژادی به عنوان والدین در روش تلاقی می‌توان از آن‌ها استفاده کرد. اکثر ژنوتیپ‌های بررسی شده در این پژوهش، در گروه ۲ قرار گرفتند. این موضوع نشان می‌دهد که اکثر ژنوتیپ‌ها مربوط به نواحی جغرافیایی نزدیک به هم می‌باشند. ژنوتیپ‌های ۱، ۳، ۸ و ۷ در گروه ۳ قرار گرفتند، یعنی این ژنوتیپ‌ها قرابت ژنتیکی دارند و لذا ژنوتیپ‌های ۳ و ۷ و ۸ با ژنوتیپ ۱ (رقم ماهور) مشابهت ژنتیکی دارند ولی ژنوتیپ ۲ (رقم خرم) با هیچیک از ژنوتیپ‌های مورد بررسی قرابت ژنتیکی ندارد.

دهقان‌منشادی و همکاران [۳] ژنوتیپ‌های گندم نان را در شرایط خشکی با نشانگر مولکولی SSR بررسی کرده و گزارش کردند که تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را در ۳ گروه قرار داد. نام‌آور و همکاران [۷] با بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم جو وحشی به وسیله نشانگر مولکولی SSR گزارش کردند که تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی، ژنوتیپ‌ها را در ۶ گروه قرار داد. آنها همچنین عنوان کردند که ژنوتیپ‌های موجود در یک گروه عموماً از یک منطقه جغرافیایی خاص جمع‌آوری شده بودند. در پژوهش حاضر چون محل جمع‌آوری نمونه‌ها معلوم نیست و ژنوتیپ‌ها منشاء داخلی و خارجی دارند لذا فقط می‌توان میزان خویشاوندی آنها را بررسی کرد.

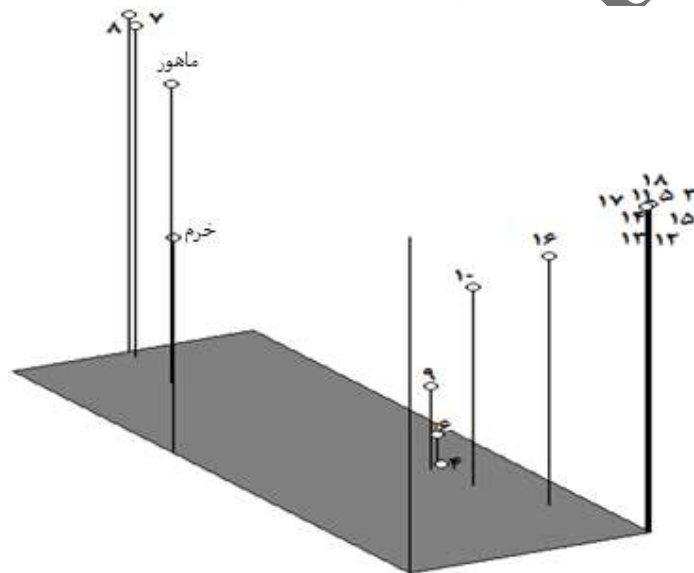


شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه بر مبنای مشاهدات مولکولی

نمودار دو بعدی (شکل ۳) و سه بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی (شکل ۴)، نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۲) را تایید کرده و گروه‌بندی حاصل از این دو نمودار مشابه این گروه‌بندی بود. نام‌آور و همکاران [۷] در بررسی تنوع ژنتیکی جو با استفاده از نشانگر SSR آنها نمودارهای دو بعدی و سه بعدی تجزیه به مختصات اصلی را نیز رسم کرده و بیان کردند که نتیجه تجزیه به مختصات اصلی تعداد گروه‌های تشکیل شده در تجزیه خوشه‌ای را تایید کرد، اما افراد موجود در گروه‌های تجزیه به مختصات اصلی با افراد موجود در گروه‌های تجزیه خوشه‌ای تا حدی تفاوت داشتند. در پژوهش حاضر در نمودار دو بعدی اختلافی بین گروه‌بندی‌ها نبود ولی در نمودار سه بعدی ژنوتیپ ۳ از گروه شامل ژنوتیپ‌های ۷ و ۸ و رقم ماهور به گروه دیگری منتقل شده است.



شکل ۳- نمودار دو بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه



شکل ۴- نمودار سه بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه

## جدول ۵- ضرایب تاثیر B تجزیه لجستیک دوتایی

شرایط	آغازگر	1A	3A	4A	5A	6A	8A	9A	10A	11A	12A	صفت
C	اکسیداز	۱۲/۸۶۸	-۰/۹۹۲	-۰/۳۰۳	-۱۹/۱۰	-۸/۲۰	-۹۷/۸۰	۱۱۶۶/۶۵	-۱۱/۶۷	-۲۳۰۶۵/۸۴	۱۲۰/۹۶	
	پراکسیداز	-۴۳/۵۳۷	-۵۹/۶۰۴	-۶۲/۹۷۹	۲۶/۵۲	-۲۲۵/۶۰	۵۶/۶۶	۳۵۶۴/۰۸۲	-۶۱/۶۲۷	۲۸۳۷۱/۴۸۰	-۳۳۲۵/۱۰۲	
	وزن هزار دانه	-۰/۱۱۲	۰/۲۰۴	۰/۰۶۵	-۰/۰۰۸	۰/۰۳	-۱/۲۰	۳۰/۲۷	-۰/۱۶	-۴۵/۹۷	-۲/۸۰	
	تعداد پنجه	-۰/۲۰۸	-۱/۸۴۰	۴۲/۹۴۱	۱/۸۲	-۵۳/۹۵	-۰/۳۶	-۵۸/۱۱	-۴/۴۰	-۲۰۰۱/۱۱	۱۱/۶۰	
	طول سنبله	-۲۷/۲۰	-۰/۷۵۱	۹۰/۴۳۳	-۱/۲۸	-۴۸/۲۵	-۴/۳۹	-۹۳/۵۷	۰/۴۵	۸۹/۳۳	۱/۴۶	
	ارتفاع گیاه	-۱۱/۴۲	-۰/۴۷۸	-۱۲/۸۴۵	۰/۲۰	۲/۳۴	-۰/۱۵۸	-۵/۳۹	۰/۳۶	-۶۰/۰۶	۱۱/۲۵	
	تعداد دانه در سنبله	۳/۱۹	-۰/۱۳۸	۲۱/۸۱۷	۰/۰۹	-۲/۱۴	۰/۱۶	۲۲/۳۰	۰/۱۶	۱/۳۶	-۴/۴۹	
	عملکرد زیستی	-۶۱/۰۰	۱۰/۹۰۸	۲۴۹/۵۰۶	۳/۵۳	۶/۱۱	-۱۴/۶۷	-۲/۵۸	-۳/۱۷	۲۴۴/۰۷	-۸۰/۰۳	
	عملکرد دانه	-۸۸/۴۵	-۱۵/۵۴۷	-۵۱۰/۲۱۸	۸/۹۰	۱۴۲/۲۳	۹/۲۱	۲۱۰/۰۲	۱۴/۴۴	۲۱۲۰/۸۳	-۲۹/۸۶	
	C	اکسیداز	-۲/۲۲	-۳۵/۵۴۲	-۸/۹۸۷	-۱۸/۸۶	-۱۴/۱۵	-۷۵/۴۸	۳۳۳/۷۰	-۱۳/۳۳	-۴۰/۷۴	-۱۹۶/۰۹
پراکسیداز		-۵۸۲/۶۳	۲۶/۶۳۶	-۲۰/۲۸۶	۲۰/۳۱	۴۵/۰۱	-۲۱۵۴/۷۰	۷۲۸/۳۴	-۱۰۰/۷۸	-۶۳۶/۶۶	-۲۱۴۴۳/۸۸	
وزن هزار دانه		-۱۱/۴۸	۰/۴۰۹	۰/۲۵۵	۰/۱۶	۰/۲۷	۱/۳۹	-۶۷/۹۹	۰/۳۴	-۷/۲۹	۱۳/۴۸	
تعداد پنجه		۱۱/۹۷	-۲/۵۸۱	-۰/۲۷۴	-۶۴/۰۶	-۲۸۰/۸	-۸۹/۳۳	۷۲/۲۲	-۱/۱۰	-۳۵/۸۰	-۲۲۷/۰۳	
طول سنبله		۱/۱۶	۰/۱۱۱	۷/۵۶۷	-۱۷۴/۳۷	-۱۶۹/۰۹	-۲۲۱/۰۵	۱۹۸/۱۳	-۲/۸۸	۳/۹۵	-۰/۱۹	
ارتفاع گیاه		-۰/۴۱	۰/۱۰۰	۸/۵۹۰	۲۴/۶۸	۶/۳۲	۲۵/۴۸	۱۸/۷۰	-۰/۱۲	۹/۱۶	۰/۱۰	
تعداد دانه در سنبله		۰/۱۱	۰/۰۰۴	-۱/۰۵۴	۲/۲۴	-۴۷/۴۳	۰/۰۶	-۱۶/۶۹	۰/۱۴	-۲/۷۹	-۰/۱۳	
عملکرد زیستی		۱/۸۴	۰/۵۵۳	۳۲۴/۰۴۹	-۱۷/۰۱	-۷۲/۵۱	-۲/۷۰	۲۷۴/۰۶	۱/۸۸	-۳۲/۰۳	۴/۹۰	
عملکرد دانه		-۷/۰۳	-۲/۱۳۴	-۳۲/۹۱۱	-۳۳۱/۳۶	۳۳۵/۳۰	-۳/۰۶	-۳۲۵/۱۶	۲/۵۲	۲۴۷/۸۶	-۱۱/۴۳	

تجزیه رگرسیون لجستیک بین صفات مورفولوژیکی و آنزیمی در شرایط تنش و بدون تنش و داده‌های مولکولی (جدول ۵) نشان داد که صفات مورفولوژیکی و آنزیمی با آغازگرها مرتبط می‌باشند. این ارتباط، بیان‌کننده پیوستگی بین این نشانگرها و ژن‌های بیان‌کننده این صفات می‌باشند. وقتی ضریب تاثیر (B) یک متغیر مستقل بر متغیر وابسته، مثبت و بزرگ باشد، مرتبط با حضور باند است و اگر منفی باشد، مرتبط با عدم حضور باند می‌باشد. بطور کلی برای بیان همبستگی با بیشترین احتمال، باید عدد ضریب B را با S.E مقایسه کرد و هرچه این عدد مثبت و بزرگتر از S.E باشد و میزان احتمال آن کمتر باشد، احتمال وجود این همبستگی افزایش می‌یابد. در مجموع، در این پژوهش نشانگری مرتبط با صفات مورد بررسی پیدا نشد. در پژوهش Kraakman *et al* [۲۰] از بین ۲۳۶ نشانگر AFLP بررسی شده بر روی ۱۴۶ رقم جوی بهاره، رگرسیون چندگانه گام به گام نشان داد که ۱۸ مورد از ۲۰ نشانگر، ۴۰ تا ۵۸ درصد تغییرات صفات عملکرد و پایداری عملکرد را تعیین می‌کنند. ابراهیمی و همکاران [۱] عنوان کردند که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان دارند. رشیدی منفرد و همکاران [۱۰] در گندم دوروم ارتباط بین ۶ صفت زراعی و ۷۴ نشانگر چندشکل را بررسی و نشان دادند که ۳۲ نشانگر چندشکل با حداقل یکی از ۶ صفت زراعی رابطه معنی‌داری دارند. شیرمحمدی و همکاران [۲۶] نیز با بررسی تنوع ژنتیکی ارقام برنج نشان دادند که نشانگرهای ISSR با چندین صفت در شرایط نرمال و تنش مرتبط بودند.

## نتیجه‌گیری

آغازگر FI با برخورداری از بیشترین PIC و MI به عنوان بهترین آغازگر برای بررسی تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شد که در بررسی تنوع و گروه‌بندی مولکولی ژنوتیپ‌های جو کارایی بالایی داشت. این آغازگر در مطالعات آینده نیز می‌تواند بسیار مفید واقع شوند. این پژوهش همچنین نشان داد که بین ژنوتیپ‌های جو مورد بررسی تنوع ژنتیکی کافی وجود دارد و می‌توان از آنها در برنامه‌های تلاقی ژنوتیپ‌ها و ایجاد ارقام جدید بهره جست.

## تشکر و قدردانی

از حمایت‌های مالی دانشگاه یاسوج و از همکاری خانم سمیه حاجی‌زاده کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشکده و خانم یاسمین کرمی کارشناس آزمایشگاه ژنتیک و نیز خانم سیده زهرا فاطمی فرد کارشناس ارشد بهنژادی گیاهی که در طول این پژوهش به انحاء مختلف یاریگرمان بودند تشکر و قدردانی می‌شود.

**تضاد منافع:** نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

## منابع

- ۱- ابراهیمی، ا، نقوی، م. ر. سبکدست، م. و مرادی‌سراب‌شلی، ا. ۱۳۹۰. تجزیه ارتباطی صفات زراعی با نشانگرهای ریزماهواره در جوهای بومی ایران. ژنتیک نوین، ۶ (۱): ۳۵-۴۳.
- ۲- الوندی، ر.، محمدی، و ل. شوشتری. ۱۳۹۴. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم با استفاده از خصوصیات زراعی و مارکرهای مولکولی. بهنژادی نهال و بذر. ۳۱ (۳): ۴۵۸-۴۴۱.

- ۳- دهقان‌منشادی، ز. دشتی، ح. ملک‌زاده، خ. و مداح‌حسینی، ش. ۱۳۹۷. ارزیابی ژنوتیپ‌های گندم نان در شرایط تنش خشکی با استفاده از شاخص‌های تحمل به خشکی و نشانگرهای مولکولی SSR. علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۹ (۴): ۳۵-۵۰.
- ۴- شفیعی، آ. ا. ملکی زنجانی، ب. کرمی، ث. و ایمانی خواه، ف. ۱۳۸۹. ردیابی ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای Lr32 در ارقام و لاین‌های گندم ایرانی با استفاده از آزمون تیپ آلودگی و نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن Lr32. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷ (۳): ۳۷-۲۱.
- ۵- فاطمی‌فرد، س. ز. و معصومی‌اصل، ا. ۱۳۹۷. استخراج DNA از برگ خشک شده غلات با روشی سریع و بدون استفاده از ازن. پانزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۱۵-۱۳ شهریورماه، ۴-۱.
- ۶- ملکی، ح. ح. درویش‌زاده، ر. و محسنی، ز. ۱۳۹۲. ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه بندی لاین‌های پیشرفته آفتابگردان (*Helianthus annuus L.*) با استفاده از نشانگر ISSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۶ (۳): ۴۴-۳۳.
- ۷- نام‌آور، ع. طهماسبی، ز. عرفانی‌مقدم، ج. فاتحی، ف. یوسفی، ز. و زارعی، ب. ۱۳۹۵. بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌ای از ژرم‌پلاسم جو وحشی (*Hordeum spontaneum*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR. تحقیقات غلات. ۶ (۲): ۲۰۱-۲۱۴.
- ۸- نخعی، ز. پهلوانی، م. ه. اسماعیل‌زاده‌مقدم، م. زینلی‌نژاد، خ. ۱۳۹۵. گروه‌بندی و مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام گندم ایرانی با استفاده از نشانگر ISSR. دومین کنگره ملی توسعه و ترویج مهندسی کشاورزی و علوم خاک ایران. انجمن توسعه و ترویج علوم و فنون بنیادین. (خردادماه ۱۳۹۵). ایران، تهران. ۵-۱.
- ۹- نظری، م. ر. عبدالشاهی، ا. ۱۳۹۲. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم نان (*Triticum aestivum*) از طریق صفات مورفوفیزیولوژیک و نشانگرهای مولکولی SSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. ۶ (۱): ۲۳۱-۲۱۵.
- ۱۰- رشیدی‌منفرد، س. مردی، م. حسین‌زاده، ا. و نقوی، م. ر. ۱۳۸۷. تجزیه ارتباطی بین صفات زراعی مهم و نشانگرهای رتروترانسپوزونی SSAP در نمونه‌های گندم دوروم. فصل‌نامه علمی-پژوهشی ژنتیک نوین، ۳ (۲): ۳۶-۲۹.
- ۱۱- زارعی، ل. ک. چقامیرزا و ع. فرشادفر. ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو زراعی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. دومین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی. کرمان.
- ۱۲- صادقی‌پور، ف. س. شایان، س. ا. محمدی، م. مقدم‌واحد، ک. قاسمی‌گل‌عدانی و ا. یوسفی. ۱۳۹۷. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو پاییزه با استفاده از نشانگرهای ISSR. پانزدهمین کنگره ملی علوم زراعت و اصلاح نباتات. کرج.
- 13-Abouzied HM (2011). Assessment of genetic diversity among wheat somaclonal variants lines using morphological traits and molecular markers. African Journal of Biotechnology, 1(66):1451-14861.
- 14-Abou-Deif MH, Rashed MA, Sallam MAA, Mostafa EAH, Ramadan WA (2013). Characterization of Twenty Wheat Varieties by ISSR Markers. Middle-East Journal of Scientific Research, 15(2): 168-175.
- 15-Barker JSF (1999). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5th world congress on Genetics Applied to Livestock productions. University of Guelph, Guelph.
- 16-Carvalho A, Brit JL, Macas B, Pinto HG (2009). Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. Biochemical Genetics, 47:276-294.

- 17-Dofing SM, Berke TG, Baenziger PS, Kingt CW (1992). Yield and yield component response of barley in subarctic and temperate environment Canadian Journal of Plant Science, 72: 663-699.
- 18-Drine S, Guasmi F, Ben Ali S, Triki T, Boussorra F, Ferchichi A (2016). Genetic diversity analysis of different barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes from arid and humid regions using ISSR and RAPD markers. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, 34(2): 1930-1939.
- 19-Guasmi F, Elfalleh W, Hannachi H, F`eres Kh, Touil L, Marzougui N, Triki T, Ferchichi A. (2012). The use of ISSR and RAPD markers for genetic diversity among south Tunisian barley. International Scholarly Research Network, ISRN Agronomy. ID 952196, 10 pages. doi:10.5402/2012/952196.
- 20-Kraakman ATW, Niks RE, Van den berg PMMM, Stam P, Van Eeuwijk FA (2004). Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. Genetics, 168: 435-446.
- 21-Liu B, Wendel JF (2001). Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes, 1: 205-208.
- 22-Najaphy A, Ashrafi Parchin R, Farshadfar E (2011). Evaluation of genetic diversity in wheat cultivars and breeding lines using inter simple sequence repeat markers. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 10:2634-2638.
23. Nazarzadeh Z, Onori H, Akrami S (2022). Genetic Diversity of Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes Using RAPD and ISSR Molecular Markers. Journal of Genetic Resources, 6(1): 69-76.
- 24-Pasqualone A, Lotti C, Bruno A, De Vita P, Di Fonzo N, Blanco A (2000). Use of ISSR markers for cultivar identification in durum wheat. CIHEAM, 157-161.
- 25-Rasmusson DC (1985). Barley. American Society of Agronomy. Crop Science Society of America, Soil Science of America, Publishers, Madison Wisconsin, 522p.
- 26-Shirmohammadli S, Sabouri H, Ahangar L, Ebadi AA, Sajadi SJ (2018). Genetic diversity and association analysis of rice genotypes for grain physical quality using iPBS, IRAP, and ISSR markers. Journal of Genetic Resources, 4(2): 122-129.
- 27-Tanyolac B (2003). Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. spontaneum) populations from west Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution, 50: 611-614.
- 28-Wang A, Yu Zh, Ding Y (2009). Genetic diversity analysis of wild close relatives of barley from Tibet and the Middle East by ISSR and SSR markers. C.R. Biol, 332(4):393-403. doi: 10.1016/j.crvi.2008.11.007.



## Evaluation of genetic diversity of barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) using ISSR molecular markers

Sharifeh Hosseinpoor<sup>1</sup>, Asad Masoumiasl<sup>2\*</sup>, Reza Amiri-Fahlani<sup>3</sup>

1, 2, 3: M.Sc. student of Plant Breeding, Associate, and Assistant Professor of Plant Breeding, Yasouj University, respectively.

### Abstract

Barley is a diploid plant with 14 chromosomes, and the evaluation of its genotypes' kinship provides useful information to breeders. In the present study, the genetic diversity of 18 barley genotypes was evaluated using the ISSR molecular marker. After extracting leaf DNA and ensuring the desired quantity and quality, a polymerase chain reaction was performed using ISSR primers. In this experiment, the 12 primers used produced 180 bands, 159 of which were polymorphic. The percentage of Polymorphism Information Content (PIC) for all primers was 88.37% and the average number of polymorphic bands was 15.9 bands. The highest and lowest PIC values were related to primers F1 and F12, respectively. Primer F1 showed the highest and primer F12 the lowest amount of heterozygosity. The marker index (MI) was the highest in primer F1 and the lowest in primer F5. The results of this research confirmed the high efficiency of the ISSR marker in examining the diversity and molecular grouping of barley cultivars and showed that there is a suitable genetic diversity between the studied barley genotypes and they can be used in breeding programs.

**Keywords:** Heterozygosity, Polymorphism, Marker index, Cluster analysis.

Preproof of Manuscript