

بررسی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

زینب محمدی^۱، عاطفه صبوری^{۲*}، راویه حیدری^۱، حسین صبوری^۳، حسین علی فلاحی^۴، احمدرضا دادرسی^۵ و
صدیقه موسی نژاد^۶

۱، ۲ و ۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۳- دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبد کاووس، ۴- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، ۶- استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۱۸)

چکیده

کاهش تنوع ژنتیکی موجب آسیب‌پذیری شدید محصولات زراعی در برابر تنش‌های محیطی، آفات و بیماری‌ها و در نتیجه کاهش عملکرد می‌شود. در این آزمایش تنوع ژنتیکی ۷۷ ژنوتیپ جو با استفاده از هفت جفت آغازگر AFLP بررسی شد. در مجموع ۲۴۵ نوار ایجاد شد که از بین آنها ۲۲۷ نوار چندشکل بودند و میانگین تعداد نوارهای چندشکل، ۳۲/۴۲ نوار در هر نشانگر بود. میانگین درصد چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکل نیز به ترتیب ۹۲/۳۷ درصد و ۰/۴۳ بود. بررسی کلی آماره‌های تنوع ژنتیکی از جمله تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون نشان داد که از بین هفت ترکیب آغازگری، سه ترکیب E90-M160، E100-M160 و E100-M150 نسبت به سایر ترکیب‌ها مقادیر بالاتری را به خود اختصاص دادند و در حقیقت در تمایز ژنوتیپ‌ها نقش بارزتری ایفا نمودند و از این‌رو، این ترکیب‌ها برای مطالعات بعدی روی جو با استفاده از نشانگرهای AFLP پیشنهاد می‌شوند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش اتصال همسایه‌ها، ژنوتیپ‌ها را به شش گروه تقسیم کرد که با تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها از لحاظ تیپ سرد، گرم یا معتدله مطابقت نسبی داشت، اما این مطابقت جامع نبود. از سوی دیگر، تجزیه ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE نشان داد که ساختار جمعیت به دو زیرجمعیت اصلی قابل تفکیک است. بر این اساس ۲۱ و ۳۵ ژنوتیپ به ترتیب به گروه ۱ و ۲ منتسب و ۲۱ ژنوتیپ نیز به عنوان مخلوط شناخته شدند. ژنوتیپ‌های مربوط به هر زیر جمعیت از لحاظ ساختار و فراوانی آللی بیشترین شباهت را با هم داشتند و متفاوت از سایر گروه‌ها بودند. اطلاعات حاصل از پژوهش حاضر را می‌توان در برنامه‌های اصلاحی بعدی همانند مکان‌یابی ارتباطی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آماره‌های تنوع ژنتیکی، ترکیبات آغازگری، ساختار ژنتیکی

مقدمه

غلات مهم‌ترین گیاهان غذایی کره زمین و تأمین کننده بیش از سه چهارم انرژی و یک دوم پروتئین مورد نیاز بشر بوده و پایه اصلی تغذیه و بقای بشر هستند (Emam, 2007) و از این رو، بهبود صفات مهم و اقتصادی و افزایش تولید و بهره‌وری در غلات از اولویت‌های اصلی برنامه‌های به‌نژادی این حوزه محسوب می‌شود.

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد آن در ژرم‌پلاسم گیاهان و تعیین روابط ژنتیکی مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح نباتات به‌شمار می‌رود (Ganj Khanlo et al., 2012) و تشخیص مقدار تغییرپذیری درون جو، برای برنامه‌های اصلاح جو و حفاظت منابع ژنتیکی به‌عنوان یک امر اساسی و پایه‌ای اهمیت ویژه‌ای در انتخاب والدین برای ایجاد هیبرید دارد (Zaheer et al., 2008). از آنجا که ایران یکی از مراکز تنوع جو در خاورمیانه است به دلیل تنوع ژنتیکی وسیع و بومی بودن جو در این منطقه، اهمیت خاصی برای به‌نژادگران دارد (Shahmoradi et al., 2011).

روش‌های مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به استفاده از صفات مورفولوژیک، آگرونومیک، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره نمود. به‌نژادگران گیاهی معمولاً استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA را نسبت به سایر نشانگرها جهت اطمینان از صحت تنوع بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک ترجیح می‌دهند. یکی از کاربردهای اصلی تکنیک‌های مولکولی، بررسی و برآورد سطح تنوع ژنتیکی در مجموعه‌های ژرم‌پلاسمی و جمعیت‌ها برای استفاده بهینه از آنها در مطالعات ژنتیکی و اصلاح نباتات است. تنوع ژنتیکی رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از حیث صفت مورد بررسی می‌باشد (Mohammadi, 2006). در غلات از نشانگرهای مولکولی در موارد زیادی در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است که به چند مورد اشاره می‌شود.

در پژوهشی که به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۷۲ اکوتیپ گندم سرداری با استفاده از نشانگرهای AFLP و ۱۷ صفت زراعی مورد بررسی قرار گرفت، نشان داد که ۳ جفت آغازگر *MseI* و *EcoRI*، ۱۵۸۲ نوار چندشکل ایجاد کردند (Osmani and Siosemardeh., 2009). این

محققین با توجه به نتایج به دست آمده نتیجه‌گیری نمودند که تنوع ژنتیکی بالایی میان اکوتیپ‌ها وجود دارد که می‌توان از آنها به عنوان اکوتیپ‌های برتر در پژوهش‌های آینده استفاده کرد (Osmani and Siosemardeh., 2009). ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi et al., 2010) تنوع ژنتیکی ۷۳ نمونه جو ایران از دو گونه *H. vulgare* و *H. spontaneum* را با استفاده از ۱۵ جفت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی تنوع در هر دو گونه سودمند هستند.

ارزیابی تنوع ژنتیکی ۶۹ رقم جو با استفاده از ۱۶ نشانگر SSR در کل ۵۲ آلل با میانگین ۳/۲۵ ایجاد کرد. محتوای اطلاعات چندشکل هم ۰/۹۴ به‌دست آمد و با اینکه توانست در کل تنوع موجود را به‌خوبی توجیه کند، اما پیشنهاد شد که نیاز به استفاده از نشانگرها و ارقام بیشتر برای رسیدن به صحت اطلاعات لازم است (Jaishwal et al., 2010). ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۵ لاین و رقم جو، با استفاده از ۱۹ جفت آغازگر SSR و EST-SSR انجام شد که در مجموع ۱۵۷ آلل چندشکل با میانگین ۷/۸۵ آلل به ازای هر جفت آغازگر تولید شد. از نظر تنوع ژنی، بیشترین میزان تنوع ۰/۹ و کمترین آن ۰/۱۷ بود. به‌طور کل، در این آزمایش نشانگرهای مورد استفاده توانستند ژنوتیپ‌های بسیار حساس به سرما را از بقیه ژنوتیپ‌ها تفکیک کنند (Heidari et al., 2011). گنج خانلو و همکاران (Ganj Khanlo et al., 2012) تنوع ژنتیکی ۳۵ ژنوتیپ جو با استفاده از ۴۴ جفت نشانگر ریزماهواره را در کنار ارزیابی ارقام نسبت به تحمل به یخ‌زدگی بررسی کردند. براساس نتایج حاصل، از ۴۴ جفت نشانگر، ۳۶ جفت الگوی نواری مناسبی را تولید نمودند که در مجموع ۲۶۸ آلل چندشکل با میانگین ۷/۴۴ آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تولید شد. میزان تنوع ژنی برای نشانگرهای مورد استفاده در محدوده ۰/۵۳ تا ۰/۹۳ با میانگین ۰/۷۸ به‌دست آمد. این محققین با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، اظهار داشتند این نشانگرها قادرند تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی ارقام جو را به‌نحو مطلوب شناسایی کنند.

در کنار بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ماتریس فاصله یا شباهت، امکان تفکیک یک جمعیت بر اساس ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌ها نیز وجود دارد

استخراج DNA و انجام AFLP

استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌ی به روش CTAB (SaghaiMaroof *et al.*, 1994) انجام شد و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و به همراه فاژ لامبدا تعیین شد. برای انجام روش AFLP تعیین غلظت دقیق DNA ضروری است تا رقیق سازی به درستی صورت گیرد.

روش AFLP مطابق روش وس و همکاران (Vos *et al.*, 1995) انجام شد. پانصد نانوگرم از DNA ژنومی با پنج واحد آنزیمی از آنزیم‌های محدودگر *EcoRI* و *MseI* به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفتند. در ادامه سازگارهای *EcoRI* و *MseI* به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به انتهای DNA برش یافته متصل شدند. سپس در مرحله بعد نمونه‌های حاصل از مرحله قبل با آغازگرهای *EcoRI* و *MseI* دارای یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳' مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند. چرخه‌های حرارتی در این مرحله به تعداد ۳۰ بار و با برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه بود. سپس، محصولات حاصل از تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۱:۵ رقیق شده و با ۱۰ ترکیب آغازگری (جدول ۲) دارای ۲ نوکلئوتید انتخابی علاوه بر یک نوکلئوتید اضافه شده در مرحله پیش تکثیر در انتهای ۳' تحت چرخه حرارتی Touch down شامل سه مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. فرآورده‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید شش درصد تفکیک و به روش نیترا نقره رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، امتیازدهی نوارها به صورت صفر و یک به ترتیب برای عدم حضور و حضور نوارها انجام گرفت.

تجزیه‌های آماری

پس از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آن به نرم‌افزار MEGA، تشکیل ماتریس فاصله جاکارد، تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbour joining امکان‌پذیر شد. برای برآورد آماره‌های تنوع ژنتیکی از نرم‌افزار PopGene32 (Yeh *et al.*, 1997)، Excel و PAST (Hammer *et al.*, 2001) استفاده شد. از جمله آماره‌های تنوع ژنتیکی محاسبه شده، محتوای اطلاعات چندشکل

که بر اساس تفاوت فراوانی آللی آنها منشاء می‌گیرد. این نوع گروه‌بندی از جمله موضوعات مهمی است که در بررسی‌های متعدد همانند تجزیه ارتباط نشانگرها با مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مورد نیاز است. ساختار جمعیت حاصل تفاوت فراوانی آللی است که در زیرگروه‌های مختلف در یک جمعیت طبیعی وجود دارد. اگر بدون شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، تجزیه ارتباط انجام گیرد، منجر به شناسایی روابط کاذب بین نشانگر و QTL خواهد شد. لذا، تعیین ساختار ژنتیکی در جمعیت‌ها و مجموعه ژرم‌پلاسم‌ها از اهمیت در خور توجه‌ای برخوردار می‌باشد (Falush *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005).

نشانگرهای AFLP با توجه به تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم‌زمان چندین مکان ژنی، ظرفیت بررسی کل ژنوم برای تظاهر چندشکلی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه جهت طراحی آغازگر و تولید تعداد نوارهای چندشکل زیادی که به ازای هر ترکیب آغازگری در مدت زمان کوتاه ایجاد می‌نمایند، یکی از برترین نشانگرهای مولکولی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند (Pejic *et al.*, 2009; Osmani and Siosemardeh., 1998). لذا، پژوهش حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو با استفاده از نشانگرهای AFLP طرح‌ریزی شد و علاوه بر تعیین روابط بین ژنوتیپ‌ها و شناسایی ژنوتیپ‌های نزدیک‌تر و یا دورتر بر حسب فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای، ارتباط گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با اقلیم ژنوتیپ‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی پژوهش حاضر شامل ۷۷ ژنوتیپ جو (جدول ۱) بود که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان تهیه شد. این ژنوتیپ‌ها در سال ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان با عرض جغرافیایی ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳ دقیقه شرقی از نصف النهار گرینویچ در گلدان کاشته شدند. نمونه‌های برگ‌ی لازم برای استخراج DNA قبل از مرحله زایشی از برگ‌های کاملاً شاداب و سالم تهیه شد.

جدول ۱- نام و شجره ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه در پژوهش حاضر

Table 1. Name and pedigree of studied barley genotypes in this research

| شماره | نام یا شجره | اقلیم | شماره | نام یا شجره | اقلیم | شماره | نام یا شجره | اقلیم |
|--------|-----------------------|-----------------------------|--------|--------------------|-----------------------------|--------|-----------------------|------------------------|
| Number | Name or Pedigree | Climate | Number | Name or Pedigree | Climate | Number | Name or Pedigree | Climate |
| 1 | یوسف Youssef | گرم Warm | 27 | - EB-88-3 | گرم Warm | 53 | - EBYT-W-89-17 | گرم Warm |
| 2 | ایزه Izeh | گرم Warm | 28 | - EB-88-4 | گرم Warm | 54 | - EBYT-W-89-18 | گرم Warm |
| 3 | - NB17 | نامعلوم Unknown | 29 | - EB-88-5 | گرم Warm | 55 | - EBYT-W-89-19 | گرم Warm |
| 4 | - NB5 | نامعلوم Unknown | 30 | - EB-88-7 | گرم Warm | 56 | - EBYT-W-89-4 | گرم Warm |
| 5 | - L4shori | نامعلوم Unknown | 31 | - EB-88-10 | گرم Warm | 57 | - EBYT-W-89-5 | گرم Warm |
| 6 | نیمروز Nimroz | سرد Cold | 32 | - EB-88-14 | گرم Warm | 58 | - EBYT-W-89-7 | گرم Warm |
| 7 | کوبر Kavir | معتدل گرم Warm temperate | 33 | - EB-88-16 | معتدل Temperate | 59 | - EB-88-20 | گرم Warm |
| 8 | - Prodogtive | سرد Cold | 34 | - EB-88-19 | گرم Warm | 60 | - EBYT-W-89-8 | گرم Warm |
| 9 | بهمن Bahman | سرد Cold | 35 | بومی Bomi | سرد Cold | 61 | ۳۹ معتدل 39Motadel | معتدل Temperate |
| 10 | ۳۶ معتدل 36Motadel | معتدل Temperate | 36 | ریحانه Rihane | معتدل گرم Warm temperate | 62 | - EB-86-17 | گرم Warm |
| 11 | ۳۱ معتدل 31Motadel | معتدل Temperate | 37 | ارس Arass | سرد Cold | 63 | - EB-87-7 | گرم Warm |
| 12 | ۲۸ گرم 28Garm | گرم Warm | 38 | گوهرجو Goharjow | سرد Cold | 64 | - EB-88-13 | گرم Warm |
| 13 | ۲۴ گرم 24Garm | گرم Warm | 39 | کارون Karon | گرم جنوب South Warm | 65 | دشت Dasht | گرم شمال North Warm |
| 14 | ۲۱ گرم 21Garm | گرم Warm | 40 | - EB-88-2 | گرم Warm | 66 | ماکویی Makouee | سرد Cold |
| 15 | - EC-84-10 | سرد Cold | 41 | جنوب Jonoob | گرم جنوب South Warm | 67 | نصرت Nosrat | معتدل Temperate |
| 16 | - 45Motadel | معتدل Temperate | 42 | شیرین Shirin | گرم جنوب South Warm | 68 | - EC-83-17 | سرد Cold |
| 17 | - EC-82-11 | سرد Cold | 43 | ترش Torsh | گرم جنوب South Warm | 69 | - EBYT-W-79-10 | گرم Warm |
| 18 | - EC-81-13 | سرد Cold | 44 | فجر ۳۰ Fajre30 | معتدل Temperate | 70 | - MB-83-14 | معتدل Temperate |
| 19 | - MB-82-12 | معتدل Temperate | 45 | - W-82-5 | گرم Warm | 71 | - W-79-10 | گرم Warm |
| 20 | - EB-86-14 | گرم Warm | 46 | - EBYT-W-89-2 | گرم Warm | 72 | - EBYT-W-89-3 | گرم Warm |
| 21 | - EB-86-6 | گرم Warm | 47 | - EBYT-W-89-9 | گرم Warm | 73 | - EBYT-W-89-6 | گرم Warm |
| 22 | - EB-86-4 | گرم Warm | 48 | - EBYT-W-89-10 | گرم Warm | 74 | - EB-88-11 | گرم Warm |
| 23 | - EB-86-3 | گرم Warm | 49 | - EBYT-W-89-11 | گرم Warm | 75 | - EB-88-6 | گرم Warm |
| 24 | - EB-85-5 | گرم Warm | 50 | - EBYT-W-89-13 | گرم Warm | 76 | - EB-88-8 | گرم Warm |
| 25 | - EB-87-20 | گرم Warm | 51 | - EBYT-W-89-15 | گرم Warm | 77 | - EB-88-9 | گرم Warm |
| 26 | - EB-88-1 | گرم Warm | 52 | - EBYT-W-89-16 | گرم Warm | | | |

جدول ۲- ترکیبات آغازگری مورد استفاده در تجزیه AFLP
Table 2. Primer combinations used for AFLP analysis

| آغازگرهای <i>EcoRI</i> | | آغازگرهای <i>MseI</i> | |
|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>EcoRI</i> Primer | | <i>MseI</i> Primer | |
| نام | توالی DNA | نام | توالی DNA |
| Name | DNA Sequence | Name | DNA Sequence |
| E060 | GACTGCGTACCAATTCAAG | M140 | GATGAGTCCTGAGTAAAAC |
| E070 | GACTGCGTACCAATTCAAT | M150 | GATGAGTCCTGAGTAAAGA |
| E080 | GACTGCGTACCAATTCACG | M160 | GATGAGTCCTGAGTAAAGT |
| E090 | GACTGCGTACCAATTCACT | | |
| E100 | GACTGCGTACCAATTCAGT | | |
| E110 | GACTGCGTACCAATTCATC | | |

گروه پایین‌تر تحت عنوان $L'(K)$ تعیین و سپس تفاضل $L'(K)$ برای گروه‌های مجاور تحت عنوان $L''(K)$ به دست آمد. با استفاده از این محاسبات، ΔK از رابطه $|L''(K)|/Stdev$ محاسبه شد. در نهایت، با رسم نمودار دو طرفه K و ΔK ، نقطه اوج منحنی به دست آمد که همان تعداد بهینه K خواهد بود (Dadras *et al.*, 2013).

انتساب افراد به زیرجمعیت‌ها نیز مطابق روش اسپاتار و همکاران (Spataro *et al.*, 2011) انجام شد و برای هر فرد در هر گروه درصد عضویت محاسبه شد. مطابق این روش یک ژنوتیپ هنگامی می‌تواند به انتساب یک گروه درآید که درصد عضویت آن 0.7 یا بیش‌تر از آن باشد و در صورتی که درصد عضویت کمتر از 0.69 باشد، به عنوان ژنوتیپ مخلوط در نظر گرفته می‌شود.

تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی بر اساس نشانگرهای AFLP نیز با استفاده از نرم‌افزار PAST (Hammer *et al.*, 2001) و تجزیه تنوع بین جمعیت‌های متشکل از نوع اقلیم ژنوتیپ با استفاده از نرم‌افزار PopGene 32 (Yeh *et al.*, 1997) انجام شد.

تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نوع اقلیم ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAIX نسخه ۶/۵۰۱ (Peakall و Smouseand, 2012) انجام شد. البته باید خاطر نشان نمود در تقسیم‌بندی مذکور تعداد چهار ژنوتیپ که اقلیم آنها نامشخص بود کنار گذاشته شدند و سایر ژنوتیپ‌ها به سه دسته گرم، سرد و معتدل گروه‌بندی شدند (جدول ۱). همچنین فاصله و شباهت ژنتیکی نی بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار PopGene 32 (Yeh *et al.*, 1997) محاسبه شد.

(PIC) بود که با توجه به غالب بودن نشانگر از رابطه (۱) محاسبه شد:

$$PIC_i = 2 f_i(1-f_i) \quad (1)$$

در این رابطه PIC_i برابر با PIC نشانگر نام، f_i فراوانی وجود قطعه نام و $(1-f_i)$ فراوانی عدم وجود قطعه نام است (Roldin-Ruiz *et al.*, 2000). این شاخص با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد. سایر آماره‌های تنوع شامل تعداد آلل موثر و ضریب تنوع نی با استفاده از نرم‌افزار PopGene 32 (Yeh *et al.*, 1997) و شاخص شانون با استفاده از نرم‌افزار PAST (Hammer *et al.*, 2001) به دست آمد.

برای انجام تجزیه ساختار و تفکیک کل جمعیت به زیر جمعیت‌های متمایز از لحاظ ساختار ژنتیکی از نرم‌افزار STRUCTURE نسخه 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) استفاده شد. از آنجایی که در مورد ساختار جمعیت اطلاعات قبلی در دست نبود، تعداد بهینه K یعنی تعداد زیر جمعیت‌های مورد مطالعه در جمعیت مورد نظر با شبیه‌سازی محاسبه گردید. شبیه‌سازی با طول دوره Burn-in ۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار MCMC ۱۰۰۰۰۰ (Markov Chain Monte Carlo) صورت پذیرفت. تعداد K از ۲ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و برای محاسبه تعداد زیر جمعیت‌ها (K) از روش اوانو و همکاران (Evanno *et al.*, 2005) استفاده شد. به این صورت که از دو ستون خلاصه شده K و $LnP(D)$ برای محاسبات استفاده و برای هر K ، میانگین $L(K)$ و انحراف معیار ($Stdev$) تکرارها محاسبه شد. بعد از آن، تفاوت میانگین تکرارها برای گروه‌های مجاور به صورت تفاضل میانگین گروه بالاتر از میانگین

نتایج و بحث

بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی

از هفت ترکیب آغازگری *MseI* و *EcoRI* در مجموع ۲۴۵ نوار ایجاد شد که از بین آنها ۲۲۷ نوار چندشکل بودند (جدول ۳) و میانگین مکان‌های چندشکل ۳۲/۴۲ به‌دست آمد. درصد چندشکلی به‌دست آمده از ۹۷/۳۶ درصد برای E90-M160 و ۸۴/۳۷ درصد برای E110-M150 متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی به‌دست آمده در این تحقیق ۹۲/۳۷ درصد بود. با توجه به درصد بالای چندشکلی به‌دست آمده در پژوهش حاضر می‌توان انتظار داشت این نشانگرها بتوانند به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های جو عمل نمایند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2006) اظهار داشتند، دسترسی به نرخ بالایی از چندشکلی، ارزیابی کارا و سودمندی را در بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی به‌دست خواهد داد. لذا، با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان از نشانگر AFLP و به‌ویژه ترکیب‌های آغازگری که درصد چندشکلی بالاتری را تولید نموده بودند، به‌عنوان یک ابزار توانمند در برنامه‌های اصلاحی جو استفاده نمود.

محتوای اطلاعات چندشکلی، برای هر ترکیب به‌صورت جداگانه در جدول ۳ ارائه شده است. محتوای اطلاعات چندشکل در این تحقیق بین ۰/۳۹ تا ۰/۴۸ و میانگین آن ۰/۴۳ بود. بالاترین میزان PIC محاسبه شده در ترکیبات آغازگری E100-M160 و E100-M150 به‌ترتیب با میزان ۰/۴۸ و ۰/۴۷ و بعد از آنها در ترکیب E110-M150 به میزان ۰/۴۵ تعیین شد. با توجه به اینکه میزان اطلاعات چندشکلی یا PIC قدرت تفکیک یک نشانگر را به‌واسطه تعداد آلل‌های چندشکل و فراوانی نسبی این آلل‌ها در جمعیت نشان می‌دهد، لذا مقادیر بالاتر PIC به‌دست آمده برای این نشانگرها نشان‌دهنده کارایی بالای این ترکیبات آغازگری در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. بررسی کلی آماره‌های تنوع ژنتیکی شامل محتوای اطلاعات چندشکلی، تعداد آلل موثر، ضریب تنوع نی و شاخص شانون نشان داد که از بین هفت ترکیب آغازگری، سه ترکیب E90-M160، E100-M160 و E100-M150 نسبت به سایر ترکیبات مقادیر بالاتری را به خود اختصاص دادند و در حقیقت در تمایز ژنوتیپ‌ها نقش بارزتری ایفا نمودند.

علی‌رغم اینکه نشانگرهای AFLP در تمایز ژنوتیپ‌ها از یکدیگر به‌خاطر تولید نوارهای بانندی بسیار زیاد برتر از سایر نشانگرها می‌باشند، اما ممکن است برای برخی از گونه‌ها به‌علت خصوصیات ژنومی، برخی ترکیبات آغازگری ضعیف‌تر عمل نمایند و باید یا از ترکیبات آغازگری مناسب‌تر با ایجاد تغییراتی در تعداد نوکلوتید آغازگرها و یا از نشانگرهای دیگر استفاده شود. رحیم ملک و همکاران (Rahim Malek *et al.*, 2008) برای اشباع نقشه پیوستگی گندم نان از نشانگرهای AFLP و ۱۳ ترکیب آغازگری استفاده نمودند که در مجموع ۶۸۴ نوار حاصل شد و از بین آنها تنها ۱۱۵ نوار چندشکل بودند. بیش‌ترین تعداد نوار چندشکل ۱۶ (۳۲/۵ درصد) و کم‌ترین تعداد آن سه (۷/۵ درصد) با متوسط ۸/۸ نوار چندشکل (۱۶/۶ درصد) بود. آنها بر اساس نتایج تحقیق اظهار داشتند که با توجه به درصد چندشکلی پایین مشاهده شده باید از نشانگرهای با سطح چندشکلی بالا برای اشباع نقشه پیوستگی در جمعیت گندم نان استفاده گردد.

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی حاکی از این مطلب بود که کل تنوع ژنتیکی با ۷۶ مؤلفه توجیه شده و درصد زیادی از این تنوع (۹۰/۷۸) توسط ۴۹ مؤلفه اول بیان می‌شود. توجیه مقدار کمی از تنوع کل به‌وسیله چند مؤلفه اول نشان‌دهنده توزیع مناسب نشانگرهای مورد استفاده در ژنوم و نمونه‌برداری مطلوب از قسمت‌های مختلف ژنوم است (Mohammadi, 2002). بنابراین، نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی بیانگر این مطلب است که هفت جفت نشانگر AFLP مورد استفاده دارای توزیع مناسب ژنومی بوده‌اند و پراکنش آنها بر روی ژنوم به گونه‌ای بوده است که توانسته نمونه‌برداری مناسبی را از کل ژنوم جو داشته باشد.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها

تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Neighbour joining و ضریب فاصله جاکارد انجام شد (شکل ۱). بر این اساس، اگرچه تمایز ارقام بومی از ژنوتیپ‌های اصلاح شده با استفاده از نشانگرهای AFLP به طور شفاف انجام نشد، اما تعدادی از ژنوتیپ‌ها که متعلق به اقلیم گرم، سرد یا معتدل بودند، در یک خوشه کوچک نزدیک به هم قرار گرفتند. برای مثال ژنوتیپ‌های اصلاح شده EB-88-10، EB-88-3، EB-88-7، EB-88-19، EB-88-1.

جدول ۳- آماره‌های تنوع ژنتیکی برای هفت ترکیب آغازگری AFLP

Table 3. Genetic diversity statistics for seven primer combinations of AFLP

| ترکیب آغازگری Primer combination | نوارهای چندشکل Polymorph bands | تعداد کل نوارها Total bands | درصد چندشکلی Polymorphism Percentage | محتوای اطلاعات چندشکل PIC | تعداد آلل‌های موثر Effective allele number | تنوع ژنی Nei's gene diversity | شاخص شانون Shannon's index | آماره‌های تنوع ژنتیکی Genetic diversity statistics |
|----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| E80-M150 | 28 | 30 | 93.33 | 0.40 | 1.43 | 0.29 | 3.16 | 0.043 |
| E90-M150 | 38 | 40 | 95 | 0.41 | 1.41 | 0.28 | 3.06 | 0.043 |
| E100-M150 | 32 | 35 | 91.42 | 0.47 | 1.68 | 0.38 | 3.49 | 0.084 |
| E110-M150 | 27 | 32 | 84.37 | 0.45 | 1.46 | 0.29 | 3.17 | 0.054 |
| E80-M160 | 29 | 33 | 87.87 | 0.39 | 1.34 | 0.23 | 2.84 | 0.047 |
| E90-M160 | 37 | 38 | 97.36 | 0.43 | 1.54 | 0.33 | 3.28 | 0.059 |
| E100-M160 | 36 | 37 | 97.29 | 0.48 | 1.73 | 0.41 | 3.65 | 0.067 |
| Total مجموع | 227 | 245 | 646.46 | 3.05 | 10.62 | 2.25 | 22.65 | 0.397 |
| Mean میانگین | 32.42 | 35 | 92.37 | 0.43 | 1.51 | 0.32 | 3.23 | 0.0567 |

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر روی سه جمعیت گرم، سرد و معتدل

Table 4. Result of AMOVA for three population of warm, temperate and cold

| منابع تغییر Source of variation | درجه آزادی Degree of freedom | مجموع مربعات Sum of squares | اجزاء واریانس Variance component | درصد تنوع Percentage of variation |
|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| بین جمعیت‌ها Between populations | 2 | 139.603 | 1.178 | 2 |
| درون جمعیت‌ها Within populations | 71 | 3574.033 | 50.338 | 98 |
| کل Total | 73 | 3713.635 | 51.516 | 100 |

بالاترین مقدار G_{st} را شامل می‌شود که برابر با ۰/۰۸ است و بیانگر این مفهوم است که بالاترین تمایز بین جمعیت‌ها از لحاظ نشانگرهای مورد استفاده مربوط به ترکیب آغازگر E100-M150 بوده است و در حقیقت بیشترین تفاوت موجود بین جمعیت‌های مورد بررسی از لحاظ الگوی نواری مربوط به این ترکیب آغازگری است.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که از کل تنوع ژنتیکی موجود، فقط ۲ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها بوده و ۹۸ درصد تنوع مرتبط با درون جمعیت‌ها بود. این نتیجه بیانگر این حقیقت است که تنوع بسیار بالای درون جمعیت‌ها موجب می‌شود که تفکیک جمعیت‌ها از یکدیگر به راحتی امکان‌پذیر نباشد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز این نتیجه‌گیری را تأیید می‌کند، به طوری که با وجود قرار گرفتن چندین ژنوتیپ با اقلیم یکسان در کنار یکدیگر، تفکیک کامل و واضح ژنوتیپ‌ها از لحاظ اقلیم با استفاده از این تجزیه مقدور نبود.

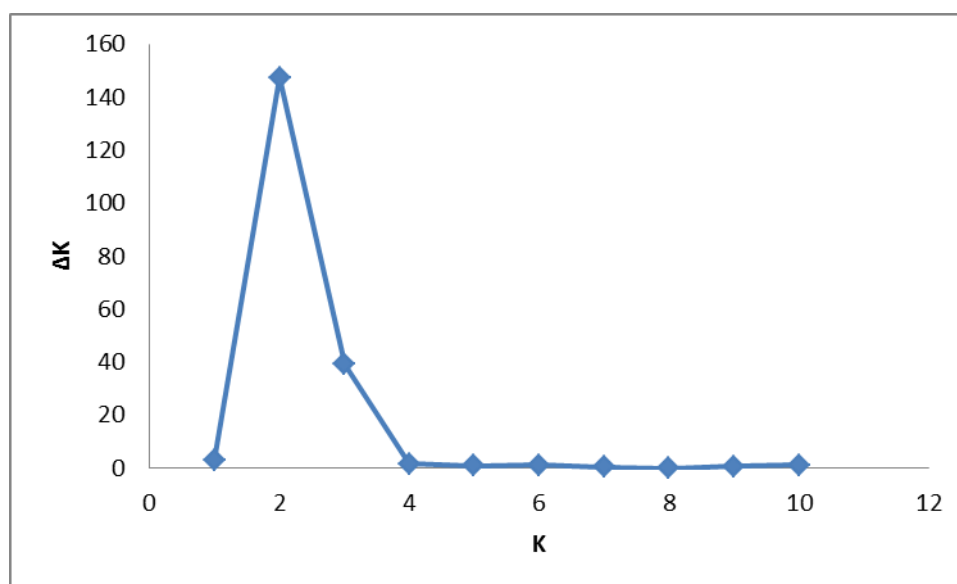
EB-88-5، EB-88-4، EB-87-20، EB-85-5، EB-86-3 و EB-86-4 که متعلق به اقلیم گرم بودند، در یک خوشه قرار گرفتند. همچنین، ژنوتیپ‌های اصلاح شده EC-81-13 و EC-82-11 که از اقلیم سرد هستند در مجاورت هم قرار گرفتند. به همین ترتیب، ارقام جنوب، شیرین و ترش که متعلق به اقلیم گرم جنوب هستند و نیز ژنوتیپ‌های EB-88-16 و MB-82-12 که از اقلیم معتدل هستند، در نزدیکی هم قرار گرفتند. بنابراین، نتایج بیانگر این حقیقت است که ژنوتیپ‌های منتسب شده به یک خوشه که از لحاظ بسیاری از خصوصیات مشابه به هم بوده و قابل توصیه به مناطق اقلیمی مشابه‌ای می‌باشند، از لحاظ خصوصیات ژنومی نزدیک به هم می‌باشند.

تجزیه واریانس مولکولی

در تجزیه تنوع بین و درون جمعیت‌ها بر اساس اقلیم ژنوتیپ‌ها، آماره تنوع ژنتیکی (G_{st}) محاسبه و مقادیر آن در جدول ۳ ارائه شد. ترکیب آغازگری E100-M150

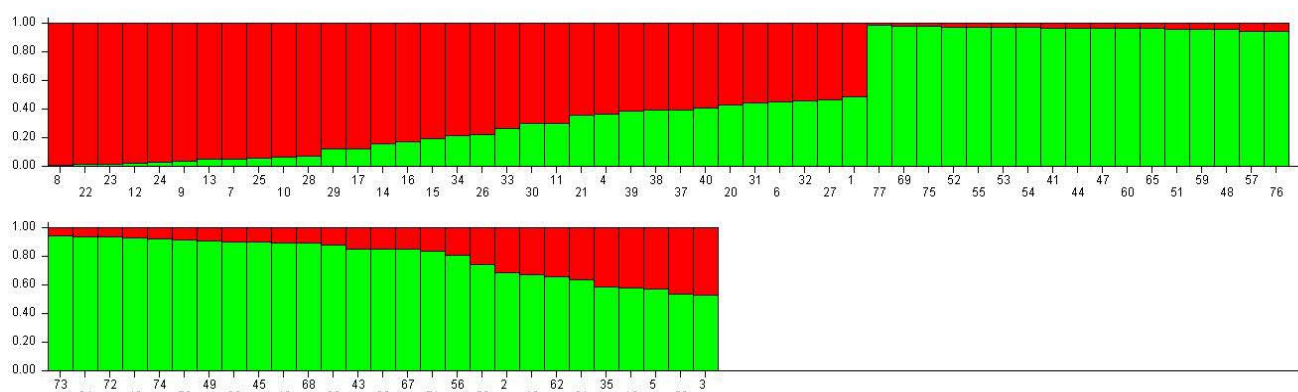
جدول ۷- عضویت ژنوتیپها بر اساس نتایج مستخرج از نرم افزار STRUCTURE
Table 7. Genotypes membership derived from STRUCTURE software

| نام یا شجره Name or pedigree | درصد عضویت | | نام یا شجره Name or pedigree | درصد عضویت | | نام یا شجره Name or pedigree | درصد عضویت | |
|---------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|
| | گروه ۱ Membership percentage of group 1 | گروه ۲ Membership percentage of group 2 | | گروه ۱ Membership percentage of group 1 | گروه ۲ Membership percentage of group 2 | | گروه ۱ Membershi p percentage of group 1 | گروه ۲ Membership percentage of group 2 |
| یوسف Youssef | 0.508 | 0.492 | - EB-88-3 | 0.535 | 0.465 | - EBYT-W-89-17 | 0.28 | 0.972 |
| ایذه Izeh | 0.31 | 0.69 | - EB-88-4 | 0.924 | 0.076 | - EBYT-W-89-18 | 0.028 | 0.972 |
| - NB17 | 0.467 | 0.533 | - EB-88-5 | 0.877 | 0.123 | - EBYT-W-89-19 | 0.025 | 0.975 |
| - NB5 | 0.633 | 0.367 | - EB-88-7 | 0.699 | 0.301 | - EBYT-W-89-4 | 0.189 | 0.811 |
| - L4shori | 0.422 | 0.578 | - EB-88-10 | 0.556 | 0.444 | - EBYT-W-89-5 | 0.051 | 0.949 |
| نیمروز Nimroz | 0.546 | 0.454 | - EB-88-14 | 0.54 | 0.46 | - EBYT-W-89-7 | 0.458 | 0.542 |
| - Kavir | 0.944 | 0.056 | - EB-88-16 | 0.729 | 0.271 | - EB-88-20 | 0.038 | 0.962 |
| - Prodogtive | 0.99 | 0.011 | - EB-88-19 | 0.785 | 0.215 | - EBYT-W-89-8 | 0.032 | 0.968 |
| بهمن Bahman | 0.961 | 0.039 | بومی Bomi | 0.413 | 0.587 | ۳۹ معتدل 39Motadel | 0.36 | 0.64 |
| ۳۶ معتدل 36Motadel | 0.935 | 0.065 | ریحانه Rihane | 0.147 | 0.853 | - EB-86-17 | 0.337 | 0.663 |
| ۳۱ معتدل 31Motadel | 0.697 | 0.303 | ارس Arass | 0.601 | 0.399 | - EB-87-7 | 0.093 | 0.907 |
| ۲۸ گرم 28Garm | 0.978 | 0.022 | گوهرجو Goharjow | 0.604 | 0.396 | - EB-88-13 | 0.058 | 0.942 |
| ۲۴ گرم 24Garm | 0.95 | 0.05 | کارون Karoon | 0.611 | 0.389 | دشت Dasht | 0.033 | 0.967 |
| ۲۱ گرم 21Garm | 0.841 | 0.159 | - EB-88-2 | 0.586 | 0.414 | ماکویی Makouee | 0.115 | 0.885 |
| - EC-84-10 | 0.805 | 0.195 | جنوب Jonoob | 0.029 | 0.971 | نصرت Nosrat | 0.149 | 0.851 |
| - 45Motadel | 0.824 | 0.176 | شیرین Shirin | 0.067 | 0.933 | - EC-83-17 | 0.105 | 0.895 |
| - EC-82-11 | 0.876 | 0.124 | ترش Torsh | 0.145 | 0.855 | - EBYT-W-79-10 | 0.015 | 0.985 |
| - EC-81-13 | 0.42 | 0.58 | فجر ۳۰ Fajre30 | 0.029 | 0.971 | - MB-83-14 | 0.083 | 0.917 |
| - MB-82-12 | 0.328 | 0.672 | - W-82-5 | 0.095 | 0.905 | - W-79-10 | 0.159 | 0.841 |
| - EB-86-14 | 0.568 | 0.432 | - EBYT-W-89-2 | 0.103 | 0.897 | - EBYT-W-89-3 | 0.058 | 0.942 |
| - EB-86-6 | 0.637 | 0.363 | - EBYT-W-89-9 | 0.03 | 0.97 | - EBYT-W-89-6 | 0.057 | 0.943 |
| - EB-86-4 | 0.984 | 0.016 | - EBYT-W-89-10 | 0.04 | 0.96 | - EB-88-11 | 0.074 | 0.926 |
| - EB-86-3 | 0.984 | 0.016 | - EBYT-W-89-11 | 0.087 | 0.913 | - EB-88-6 | 0.017 | 0.983 |
| - EB-85-5 | 0.966 | 0.034 | - EBYT-W-89-13 | 0.251 | 0.749 | - EB-88-8 | 0.054 | 0.946 |
| - EB-87-20 | 0.939 | 0.061 | - EBYT-W-89-15 | 0.036 | 0.964 | - EB-88-9 | 0.013 | 0.987 |
| - EB-88-1 | 0.778 | 0.222 | - EBYT-W-89-16 | 0.025 | 0.975 | - | - | - |



شکل ۲- نمودار دو طرفه برای تعیین تعداد بهینه K

Figure 2. Bilateral chart to determine the optimal number of K



شکل ۳- ساختار جمعیت استنتاج شده از نرم‌افزار STRUCTURE

Figure 3. Inferred population structure out of STRUCTURE software

نتایج مشابه با نتایج پژوهش حاضر در بسیاری از تحقیقات قبلی گزارش شده است. در پژوهشی که بر روی ۷۰۲ ژنوتیپ توتون با منشأ نواحی مختلف دنیا با استفاده از ۷۲ نشانگر ریزماهواره انجام گرفت، در کل ۱۰۳۱ آلل با میانگین ۱۴/۷ آلل برای هر نشانگر شناسایی شد. در تجزیه خوشه‌ای انجام شده بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که منشأ جغرافیایی یکسانی داشتند در گروه‌های یکسانی قرار گرفتند اما با این حال تنوع درون جمعیتی در تجزیه واریانس مولکولی ۹۲/۱۸ درصد برآورد گردید که مقدار قابل توجه‌ای نسبت به تنوع درون جمعیتی است (Moon *et al.*, 2009). نتایج مشابه با این پژوهش در مطالعات عبدالهی و همکاران (Abdollahi *et al.*, 2012) که تنوع ژنتیکی توده‌های بومی و ارقام اصلاح شده جو را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR) بررسی نمودند نیز گزارش شده است. آنها بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، اظهار داشتند که سهم واریانس بین و درون گروهی به ترتیب ۱۰ و ۹۰ درصد بوده و به این ترتیب، تنوع موجود در درون گروه‌ها، درصد بسیار بیشتری از واریانس مولکولی کل را در مقایسه با تنوع بین گروه‌ها (۱۰٪) تبیین نمود. ما و همکاران (Ma *et al.*, 2012) و

نتایج مشابه با نتایج پژوهش حاضر در بسیاری از تحقیقات قبلی گزارش شده است. در پژوهشی که بر روی ۷۰۲ ژنوتیپ توتون با منشأ نواحی مختلف دنیا با استفاده از ۷۲ نشانگر ریزماهواره انجام گرفت، در کل ۱۰۳۱ آلل با میانگین ۱۴/۷ آلل برای هر نشانگر شناسایی شد. در تجزیه خوشه‌ای انجام شده بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که منشأ جغرافیایی یکسانی داشتند در گروه‌های یکسانی قرار گرفتند اما با این حال تنوع درون جمعیتی در تجزیه واریانس مولکولی ۹۲/۱۸ درصد برآورد گردید که مقدار قابل توجه‌ای نسبت به تنوع درون جمعیتی است (Moon *et al.*, 2009).

STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) برای نشانگرهای چندشکل AFLP نشان می‌دهد. جدول ۷ درصد عضویت ۷۷ ژنوتیپ جو را نشان می‌دهد. بر این اساس ۲۱ ژنوتیپ به گروه ۱ و تعداد ۳۵ ژنوتیپ به گروه ۲ منتسب شدند و ۲۱ ژنوتیپ جزو ژنوتیپ‌های مخلوط شناخته شدند.

یک جمعیت می‌تواند از لحاظ ساختار ژنتیکی، که ناشی از تفاوت فراوانی آللی است، به زیرگروه‌های مختلف تقسیم شود. جمعیت مورد مطالعه در پژوهش حاضر نیز به دو گروه اصلی تفکیک شد. گروه‌بندی بر اساس ساختار جمعیت نتایج متفاوت از تجزیه خوشه‌ای به دست می‌دهد. چون اساساً نحوه گروه‌بندی در تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس شباهت یا فاصله متفاوت از هم می‌باشد. نکته‌ای که باید در نظر داشت این است که اگر بدون شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه، تجزیه ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات انجام گیرد، منجر به شناسایی روابط کاذب بین نشانگر و QTL خواهد شد. از این رو، تعیین ساختار ژنتیکی در جمعیت‌ها و مجموعه ژرمپلاسماها از اهمیت قابل توجه‌ای برخوردار می‌باشد (Falush *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2003). لذا از نتایج حاصل می‌توان به‌عنوان اطلاعات مورد نیاز قبل از انجام تجزیه ارتباط برای شناسایی نشانگرهای پیوسته به مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی با استفاده از این مجموعه ژرمپلاسما جو استفاده نمود تا از شناسایی بخشی از پیوستگی‌های کاذب که ممکن است به‌خاطر تفاوت در ساختار جمعیت باشد ممانعت به‌عمل آید.

ایواندیک و همکاران (Ivandic *et al.*, 2002) نیز نتایج مشابه‌ای در بررسی ژنوتیپ‌های جو گزارش نمودند، به طوری که در این پژوهش‌ها نیز مقدار تنوع ژنتیکی مشاهده شده در درون جمعیت‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی مشاهده شده در بین جمعیت‌ها بود.

فاصله و شباهت ژنتیکی نی در بین جمعیت‌ها در جدول ۵ ارایه شده است. مطابق نتایج AMOVA، فاصله بین جمعیت‌ها ناچیز و شباهت آنها از لحاظ نشانگرهای AFLP قابل توجه به دست آمد. این نتایج متفقاً بیانگر این حقیقت می‌باشند که نشانگرهای AFLP قادر به تمایز کامل ژنوتیپ‌ها از لحاظ اقلیم نیستند.

تجزیه ساختار ژنتیکی

به‌منظور شناسایی زیرجمعیت‌های با ساختار ژنتیکی متمایز از هم از تجزیه ساختار در مجموعه ژرمپلاسما جو مورد مطالعه استفاده شد. جدول ۶ آماره‌های محاسبه شده با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) برای تعیین مقدار K برای ژنوتیپ‌های جو و شکل ۲ نمودار دو طرفه برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. بر اساس شکل ۲، نقطه اوج منحنی در نقطه برابر با ۲ است که نشان‌دهنده این مطلب است که تعداد بهینه K برابر با ۲ می‌باشد. لذا، ژنوتیپ‌ها به دو گروه با ساختار ژنتیکی متفاوت از هم قابل تفکیک هستند و یک گروه نیز به‌عنوان مخلوط شناسایی شد که با توجه به درصد عضویت مندرج در جدول ۷ نمی‌توان این ژنوتیپ‌ها را مختص گروه ۱ یا ۲ در نظر گرفت. شکل ۳ نیز ساختار استنتاج شده برای جمعیت مورد مطالعه حاضر را به‌وسیله نرم‌افزار

References

- Abdollahi, N., Mohammadi, S. A., Alavikia, S. and Sadeghzadeh, B. 2012. Analysis of genetic diversity in barley improved and landraces using SSR. Proceeding of 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Congress. 3-5 September, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian).
- Dadras, A. R., Sabouri, H., Mohammadi-Nejad, G., Sabouri, A. and Shoaie-Deilami, M. 2013. Investigation of genetic diversity of Barley and Virginia tobacco varieties using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Journal of Agricultural Biotechnology* 5(2): 29-45. (In Persian).
- Ebrahimi, A., Naghavi, M. R., Sabokdast, M. and Mardi, M. 2010. Assessment of genetic diversity in accessions of two barely species (*H. vulgare* L. and *H. Spontaneum* L.) using SSR markers. *Iranian Journal of Crop Sciences* 12 (3): 333-345. (In Persian).
- Emam, Y. 2007. Cereal production. Shiraz University Press (3rd ed.). pp: 87-101. (In Persian).
- Evanno, G., Reganut, E. and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

- Falush, D., Stephens, M. and Pritchard, J. K., 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics** 164: 1567-1587.
- Gangkhanlou, A., Mohammadi, S. A., Moghaddam, M., Ghasemi-Golazani, K., Shakiba, M. and Yousefi, A. 2012.** Genetic diversity in barley as revealed by microsatellite markers and association analysis of these markers by traits related to freezing tolerance. **Seed and Plant Improvement Journal** 28 (1): 101-114. (In Persian).
- Gupta, P. K., Rustgi, S. and Kulwal, P. L. 2005.** Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. **Plant Molecular Biology** 57: 461-485.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. and Ryan, P. D. 2001.** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** 4 (1): 1-9.
- 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 (1): 146-156. (In Persian).
- Ivandic, V., Hackett, C. A., Zhang, Z., Staub, J. E., Nevo, E. and Thomas, T. B. 2002.** Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: Associations with ecology, geography and flowering time. **Plant Molecular Biology** 48: 511-527.
- Jaiswal, S. K., Pandey, S. P., Sharma, S., Prasad, R., Prasad, L. C., Verma, R. P. S. and Joshi, A. K. 2010.** Diversity in Indian barley (*Hordeum vulgare*) cultivars and identification of genotype-specific fingerprints using microsatellite markers. **Journal of Genetics** 89: e46-e54.
- Ma, X., Sela, H., Jiao, G., Li, C., Wang, A., Pourkheirandish, M., Weiner, D., Sakuma, S., Krugman, T., Nevo, E., Komatsuda, T., Korol, A. and Chen, G. 2012.** Population-genetic analysis of HvABC31 promoter sequence in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. spontaneum). **BMC Evolutionary Biology** 12 (188) 1-11.
- Mohammadi, S. A., 2002.** Statistical methods in genetics. Proceedings of 6th Statistics International Conference. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (In Persian).
- Mohammadi, S. A. 2006.** Molecular analysis of genetic diversity of perspectives. Proceeding of 9th Iranian Crop Sciences Congress. 27-29 August, Tehran. (In Persian).
- Osmani, Zh. and Siosemardeh, A. 2009.** Evaluation of genetic diversity in sardari wheat ecotypes using DNA marker and agronomic traits. **Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources** 13 (47): 301-319. (In Persian).
- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2012.** GenAlex: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics** 28: 2537-2539.
- Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgane, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G. and Motto, M. 1998.** Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLP, RAPDs, SSRs, and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics** 97:1248-1255.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. and Donnelly, P. 2000.** Association mapping in structured populations. **The American Society of Human Genetics** 67: 170-181.
- Rahimmalek, M., Sayyed Tabatabaei, B. A. and Mohammadi, S. A. 2008.** Saturating microsatellite linkage map of wheat in Fukuho-Komugi × Oligo-Culm cross population using AFLP marker. **Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources** 12 (43): 567-575. (In Persian).
- Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T. J., Coll, R., Van-Eijk, M. J. T. and De-Loose, M. 2000.** Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2 AFLP characterization. **Molecular Breeding** 6: 593-602.
- Saghai-Marouf, M. A., Biyashev, R. M., Yang, G. P., Zhang, Q. and Allard, R. W. 1994.** Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barely species diversity, chromosomal location and population dynamics. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA** 91: 5466-5570.
- Shahmoradi, Sh., Shafaoddin, S. and Yousefi, A. 2011.** Phenotypic diversity in barley ecotypes of arid-zone of Iran. **Seed and Plant Improvement Journal** 27-1 (4): 495-515. (In Persian).
- Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti-Zeuli, P. and Negri, V. 2011.** Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. **Theoretical and Applied Genetics** 122: 1281-1291.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 4407- 4414.

- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. J. B., Ye, Z. H. and Mao, J. X. 1997.** POPGENE: The user-friendly shareware for population genetic analysis. Edmonton. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- Zaheer, A., Salfullah, A., Muhammad, M., Muhammad, Z. and Muhammad-Shahid, M. 2008.** Genetic diversity for morpho-genetic traits in barley germplasm. **Pakistan Journal of Botany** 40 (3): 1217-1224.
- Zhang, H. Y., Liu, X. Z., Li, T. S. and Yang, Y. M. 2006.** Genetic diversity among flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. **Botanical Studies** 47: 223-229.

Investigation of population structure and genetic diversity of barley genotypes using AFLP molecular markers

Zeynab Mohammadi¹, Atefeh Sabouri^{2*}, Raviyeh Heydari¹, Hossein Sabouri³, Hossein Ali Falahi⁴, Ahmadreza Dadras⁵ and Seddigheh Mousanejad⁶

1, 2, and 5. M. Sc. Student, Assist. Prof. and Ph. D. Student, respectively, Dept. of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, 3. Assoc. Prof., Dept. of Plant Production, College of Agricultural Science and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, 4. Staff Member, Golestan Agricultural Research and Natural Resources Center, Golestan, 6. Assist. Prof., Dept. of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan

(Received: December 16, 2013- Accepted: April 7, 2014)

Abstract

Reduction in genetic diversity caused extreme vulnerability of crops to pests, diseases and environmental stresses will result in reduced yield. The genetic diversity of 77 barely genotypes were evaluated using seven AFLP combination primers. A total of 245 bands were generated which 227 were polymorph with average of 32.42 polymorphic band per marker. Average percentage of polymorphism and polymorphic information content were 92.37% and 0.43, respectively. General evaluation of the genetic diversity statistics including the number of effective alleles, Nei's gene diversity and Shannon's index showed that three primer combinations of E90-M160, E100-M160 and E100-M150 had higher values than the other combinations and had a more obvious role in distinguishing of the studied genotypes. Therefore, these primers are recommended to further studies on barely using AFLP makers. Cluster analysis using the neighbor joining method assigned genotypes to six groups. This type of grouping was nearly consistent with grouping of the genotypes in term of cold, warm or temperate climate, but not as comprehensive accordance. The analysis of population genetic structure using STRUCTURE software showed that population structure is separable into two main sub-populations with 21 and 35 genotypes, respectively, and 21 genotypes were identified as mixed genotypes. Genotypes of each sub-population had most similarity for allele frequencies and genetic structure and are different from the other groups. Results from this research can be used in future breeding programs such as association mapping.

Keywords: Genetic diversity statistics, Genetic structure, Primer combinations

*Corresponding author: a.sabouri@guilan.ac.ir