

تجزیه ارتباطی زمان گلدهی و تنوع تک نوکلئوتیدی ژن های *Ppd-HI* (*H. Vulgare*) در *HvGI* و *HvCOI* *HI*

سالار شعفر*^۱، محمدرضا بی همتا^۲، علیرضا طالعی^۳، ولی اله محمدی^۴، بنیامین کیلیان^۵

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادان و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات،
دانشگاه تهران

۵- موسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی IPK آلمان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: salarshaaf@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای SNP موثر در گلدهی جو در ژن های کاندید *COI Ppd-HI* و *GIGANTEA* از تجزیه ارتباطی در مجموعه ای از ۵۲ رقم جو ایرانی و خارجی استفاده گردید. بر اساس ۴۲ نشانگر EST-SSR ساختار ژنتیکی جمعیت به دو زیرجمعیت فرعی تقسیم گردید که با مبدا ارقام در ارتباط بودند. تنوع نوکلئوتیدی بالایی در ناحیه اگزون ژن *Ppd-HI* مشاهده شد ولی ژن های *GIGANTEA* و *COI* تنوع محدودتری نشان دادند. وسعت نامتعادلی پیوستگی (Linkage disequilibrium) در هر سه ژن متغیر و پایین بود که بیانگر سودمندی روش تجزیه ارتباطی ژن کاندیدا برای دسترسی به نقشه واضحی از ژن های کنترل زمان گلدهی در جو می- باشد. ارتباط معنی داری بین ژن های *GIGANTEA* و *Ppd-HI* با زمان گلدهی مشاهده شد به طوری که باعث تفاوت یک هفته ای در زمان گلدهی می شد، در حالی که ارتباط معنی داری بین زمان گلدهی و تنوع در ناحیه اینترون ژن *COI* مشاهده نگردید. اثر متقابل بین مکان های ژنی نیز از لحاظ آماری معنی دار نبود. نتایج این تحقیق نشان داد که ژرم پلاسما مورد مطالعه و به ویژه ارقام ایرانی دارای تنوع زیادی از نظر ژن های کاندید مورد بررسی می باشند که می تواند در برنامه های به نژادی برای زمان گلدهی در جو مورد استفاده قرار گیرد. برخی از آلل های SNP شناسایی شده قادرند تا یک هفته زمان گلدهی را در جو تسریع نمایند که می توان از آن ها در برنامه های گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود. همچنین آلل جدیدی در ژن *GIGANTEA* شناسایی گردید که در گلدهی دیر هنگام نقش عمده ای دارد.

واژه های کلیدی

تجزیه ارتباطی،
جو،
زمان گلدهی،
COI
Ppd-HI
GIGANTEA

مقدمه

گسترش کشاورزی از منطقه اهلی شدن گیاه نیازمند پراکندگی گیاهان زراعی به خارج از محدوده بومی اجداد خود و سازگاری آن ها با محیط های جدید بوده است. زمان گلدهی یکی از صفات کلیدی در سازگاری گیاهان است که از این طریق گیاه می تواند در زمان مناسب گرده افشانی و تولید بذر نماید (Cockram et al. 2007). گلدهی در زمان مناسب به خاطر تکامل مکانیسم های پیچیده ای در گیاهان است که آن ها را قادر می سازد تا در برابر تغییرات محیطی مهم از قبیل طول روز (فتوپریود) و دمای پایین (ورنالیزاسیون) واکنش نشان دهند.

است چرا که در این نوع نقشه‌یابی تمام رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است در نظر گرفته می‌شود در صورتی که در روش معمول نقشه‌یابی تنها در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشتی میوز اتفاق می‌افتد. Jones و همکاران (Jones et al. 2008) ارتباط بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در توالی *Ppd-H1* و زمان گلدهی را در کلکسیون‌های بومی اروپا مطالعه نمودند و یک تک نوکلئوتید به نام SNP48 را به عنوان مهم‌ترین SNP گزارش نمودند که درصد بالایی از تنوع در زمان گلدهی را توجیه می‌کرد و با تنوع در عرض جغرافیایی نمونه‌ها مرتبط بود. همچنین آن‌ها مشاهده نمودند که مکان SNP گزارش شده توسط Turner et al. (2005) عامل اصلی تنوع در گلدهی نبوده است. در مطالعه دیگری Stracke et al. (2009) تنوع نوکلئوتیدی سه ژن کاندید *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HvFt1.H1* و ارتباط آن‌ها را با زمان گلدهی تحت روزهای بلند در کلکسیون‌های بومی از جو زراعی بهار بررسی کردند و مشاهده نمودند که ناحیه کد کننده ژن *Ppd-H1* در مقایسه با دو ژن دیگر بسیار متنوع بوده و ارتباط بسیار قوی با زمان گلدهی دارد. در مطالعات مذکور عمدتاً از ژرم پلاسم‌های با منشأ اروپا استفاده شده در صورتی که کشور ما از مراکز مهم تنوع جو در دنیا محسوب می‌شود، از طرفی ژن *HVGI* یکی از ژن‌های مهم در مسیر فتوپریودی در جو محسوب شده و مطالعه ارتباط آن با زمان گلدهی در تجزیه ارتباطی دارای اهمیت است. هدف از این مطالعه بررسی تنوع نوکلئوتیدی و ارتباط بین تنوع در ژن‌های کاندید *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HVGI* و تنوع در زمان گلدهی در مجموعه‌ای از ارقام و ژنوتیپ‌های جو ایرانی و خارجی است. هدف دیگر این تحقیق امکان شناسایی نشانگرهای SNP یا هاپلوتیپ‌هایی است که در گلدهی جو نقش مهم و تعیین کننده دارند.

مواد و روش‌ها

۵۲ رقم جو از موسسه اصلاح نهال و بذر کرج تهیه و در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. که از این تعداد ۲۷ رقم ایرانی و بقیه خارجی بودند. ارقام ایرانی خود شامل ۲۳ رقم بومی و ۴ رقم اصلاح شده بودند. ارقام خارجی نیز فقط شامل ارقام تجاری از

ژن‌های مسیر فتوپریود در بین آراییدوپسیس که گیاهی روزبلند است و برنج که روزکوتاه است به خوبی حفاظت شده‌اند (Greenup et al. 2009). در آراییدوپسیس ژن *CO* باعث ترجمه ژن *FT (FLOWERING LOCUS T)* شده و گلدهی را تحت شرایط روزهای بلند سرعت می‌بخشد. ژن *GI (GIGANTEA)* احتمالاً در بالادست ژن *CO* در مسیر فتوپریود به طور مثبت عمل می‌کند (Suarez-Lopez et al. 2001). جو نیز مانند آراییدوپسیس یک گیاه روزبلند است ولی از لحاظ فیلوژنتیکی به برنج نزدیک‌تر است. در جو نیز همولوگ‌های مختلفی شناسایی شده‌اند که در مسیر فتوپریود نقش کلیدی دارند از جمله ژن *HvCO1* (Griffith et al. 2003) و ژن *GI* (Dunford et al. 2005) و ژن مهم *Ppd-H1* واقع در کروموزوم ۳ و ژن مهم *Ppd-H1* واقع در کروموزوم ۲ که اخیراً همسانه شده است (Turner et al. 2005). در جو آل‌های غالب (حساس به فتوپریود) *Ppd-H1* باعث گلدهی زود هنگام تحت روزهای بلند می‌شوند ولی تحت روزهای کوتاه تأثیری در گلدهی ندارند. گیاهان دارای آل مغلوب (غیر حساس به فتوپریود) *ppd-H1* دارای گلدهی دیر هنگام هستند. *Ppd-H1* یک شبه تنظیم کننده واکنش است که بسیار مشابه ژن *PRR7* در آراییدوپسیس عمل می‌کند (Turner et al. 2005). از آنجایی که این ژن‌ها در تعیین زمان گلدهی در جو نقش عمده‌ای دارند مطالعه آن‌ها به عنوان ژن‌های کاندید در مطالعات تجزیه ارتباطی در ژرم پلاسم‌های طبیعی جالب توجه خواهد بود و از این طریق می‌توان تنوع صفات پیچیده را به سطح ژن و یا نوکلئوتید رساند. روش ژنتیک ارتباطی بر اساس توالی-یابی مجدد ژن کاندید روش قدرتمندی در جهت دسترسی به این هدف به مجرد اطلاعات گسترده ژنومیک و تجزیه گسترده فنوتیپی است. طی سالیان اخیر شناسایی و بهره‌برداری سیستماتیک از تنوع طبیعی روش مهمی در پژوهش ژنومی گیاهان و به نژادی گیاهی به شمار می‌رود (Buckler et al. 2002). تجزیه ارتباطی که به تجزیه LD نیز مرسوم است مزیت‌های عمده‌ای نسبت به مکان‌یابی معمول دارد. اولاً به دلیل اینکه در این گونه مطالعات از جوامع طبیعی استفاده می‌شود تنوع ژنتیکی وسیع‌تری نسبت به جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی وجود دارد، دوم اینکه بسته به جمعیت، نقشه‌یابی LD دارای دقت بسیار بالاتری

۷۳°C در ۳۰ ثانیه و ۷۳°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. جداسازی محصولات تکثیر شده PCR به روش الکتروفورز موئین با استفاده از دستگاه Mega BACE1000 (Amersham) صورت گرفت. این دستگاه مبتنی بر سیستم آنالیز DNA بر اساس فلورسنس بوده که از روش الکتروفورز موئین در شناسایی و تفکیک قطعات تکثیر شده استفاده می‌کند. جهت تعیین کیفیت، اندازه و نام‌گذاری قطعات تفکیک شده از روش استاندارد MegaBACE ET400-R استفاده با استفاده از نرم افزار MegaBACE™ Genetic Profiler استفاده شد (www.gelifesciences.com).

تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت به دلیل اینکه در تجزیه ارتباطی از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود وجود نیروهای تکاملی در آنها اجتناب ناپذیر است و نادیده گرفتن آنها باعث ایجاد پیوستگی‌های دروغین نشانگر-صفت می‌شود. لذا ساختار ژنتیکی جمعیت و تعیین زیر جمعیت-های احتمالی با روش گروه‌بندی Bayes و نرم افزار STRUCTURE انجام شد (Pritchard et al. 2000). این روش هر یک از ارقام را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیر جمعیت میزان LD حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. بین ۱ تا ۶ زیر جمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیر جمعیت‌ها سه تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش یا burn-in و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم افزار STRUCTURE برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیت) یک ماتریس بنام (Q_{it}) را بدست می‌دهد. این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر رقم در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت (K)، با استفاده از دو روش برآورد شد یکی بر اساس معیار انتخابی در STRUCTURE یعنی $\ln P(D)$ که احتمال پسین داده‌ها را با در نظر گرفتن K فرضی محاسبه می‌کند، و دیگری بر اساس روش Evanno et al. 2005 استفاده شد.

کشورهای مختلف آسیا، اروپا، آمریکا و آفریقا بودند. از نظر تیپ رشدی تعداد ۱۱ رقم دارای تیپ بینابینی وبقیه ارقام تیپ بهاره داشتند. از نظر تیپ سنبله تعداد ۲۰ رقم دو ردیفه و بقیه ۶ ردیفه بودند. تاریخ گلدهی ارقام در شرایط آب و هوایی کرج ثبت شده و داده‌های فنوتیپی ارقام بین یک تا سه سال در دسترس بودند. تجزیه داده‌های فنوتیپی

با در نظر گرفتن رقم به عنوان تیمار و سال به عنوان تکرار تجزیه آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. از آنجایی که تکرار به صورت نامتعادل بود و ارقام ژنتیکی مورد مطالعه به صورت تصادفی انتخاب شده بودند بنابراین از روش آماری REML (Restricted Maximum Likelihood) برای برآورد اجزای واریانس با استفاده از دستور PROC MIXED و در محیط نرم افزار آماری SAS استفاده شد. وراثت پذیری عمومی زمان گلدهی از طریق تقسیم جزء واریانس ژنتیکی بر واریانس فنوتیپی محاسبه گردید. سپس مقادیر ارزش‌های ژنوتیپی یا BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) برای هر یک از ارقام محاسبه و در تجزیه‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین ژنوتیپ جمعیت DNA ژنومی از برگ‌های جوان ارقام مورد مطالعه به روش Doyle و همکاران استخراج شد (Doyle et al. 1990). تعداد ۴۲ نشانگر همباز EST-SSR غیر پیوسته با توزیع یکنواخت روی ۷ کروموزوم جو و ۵ تا ۷ SSR در هر کروموزوم که در (جدول ۱) مندرج است جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ارقام مورد استفاده قرار گرفتند (Thiel et al. 2003). معیار انتخاب نشانگرها محل آنها روی نقشه با حداکثر پوشش ژنومی و میزان تنوع نشانگرها (یعنی نشانگرهای با چند شکلی بالا یا دارای آل‌های فراوان) بودند. جفت آغازگرهای مستقیم و معکوس ۴۲ نشانگر SSR به صورت فلورسنت با سه رنگ آبی، سبز و قرمز برجسب گذاری شده و در ۱۴ ترکیب آغازگری به صورت تریپلکس ادغام گردیدند. روش PCR در واکنش ۵ میکرولیتری شامل ۱۰ ng DNA ژنومی، ۰/۰۱ μM از هر آغازگر و بافر ۱ برابر مالتی پلکس DNA (Qiagen, Chatsworth, CA) انجام شد. نیمرخ‌های حرارتی PCR به صورت: ۹۶°C به مدت ۱۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه، ۴۰ چرخه به صورت ۹۵°C در یک دقیقه، ۶۰°C در ۳۰ ثانیه،

جدول ۱- اسامی، محل کروموزوم، فاصله ژنتیکی، اندازه و تعداد آلل و تنوع ۴۲ نشانگر EST-SSRs در جمعیت جو مورد مطالعه.

مقدار PIC	تعداد آلل	اندازه (bps)	فاصله ژنتیکی (cM)	لوکوس	کروموزوم
۰/۸۶	۱۹	۱۸۰-۲۴۰	۳۰/۰	GBM۰۰۷	۱H
۰/۵۳	۳	۲۲۲-۲۲۸	۵۹/۴	GBM۰۰۲۹	
۰/۵۰	۶	۱۶۱-۱۷۴	۶۴/۳	GBM۰۰۱۳	
۰/۴۲	۶	۱۰۸-۱۳۵	۶۹/۸	GBM۰۳۳۴	
۰/۶۱	۱۷	۲۶۱-۳۶۳	۹۷/۷	GBM۰۰۰۲	
۰/۷۹	۸	۳۰۶-۳۵۱	۱۲۷/۹	GBM۰۰۶۱	
۰/۸۳	۱۱	۱۹۴-۲۲۴	۱۳۱/۸	GBM۰۴۶۱	
۰/۶۰	۵	۲۷۲-۲۸۰	۲۵/۲	GBM۰۰۳۵	۲H
۰/۶۷	۹	۱۵۶-۱۷۲	۵۷/۹	GBM۰۴۵۹	
۰/۶۸	۶	۱۳۴-۱۵۰	۶۵/۱	GBM۰۲۱۸	
۰/۶۴	۶	۱۴۲-۱۶۳	۱۰۶/۳	GBM۰۲۰۸	
۰/۶۵	۳	۲۱۰-۲۱۶	۱۴۰/۹	GBM۰۰۴۷	
۰/۵۷	۴	۲۷۹-۲۹۱	۹/۲	GBM۰۲۸۰	۳H
۰/۶۸	۷	۱۵۰-۱۸۰	۶۵/۷	GBM۰۴۱۳	
۰/۷۷	۵	۲۸۴-۲۹۲	۶۸/۸	GBM۰۰۳۱	
۰/۶۴	۷	۲۰۷-۲۳۷	۷۶/۷	GBM۰۱۱۰	
۰/۶۷	۴	۲۷۶-۲۸۸	۱۰۹/۵	GBM۰۴۰۵	
۰/۶۸	۷	۲۶۴-۲۹۲	۰/۰	GBM۰۵۰۱	۴H
۰/۷۱	۶	۱۱۶-۱۲۸	۱۶/۱	GBM۰۲۲۱	
۰/۷۶	۱۱	۱۱۴-۱۶۲	۳۱/۵	GBM۰۳۲۳	
۰/۵۲	۵	۲۳۴-۲۴۶	۶۵/۲	GBM۰۰۲۰	
۰/۵۷	۷	۱۸۹-۲۱۰	۸۶/۸	GBM۰۰۰۳	
۰/۸۱	۱۰	۲۰۲-۲۶۶	۱۱۵	GBM۰۰۱۵	
۰/۷۰	۵	۲۵۵-۲۶۷	۱۲۹/۸	GBM۰۰۱۸	
۰/۶۶	۵	۲۸۲-۲۹۰	۲۲/۳	GBM۰۱۷۶	۵H
۰/۶۸	۷	۲۰۶-۲۱۸	۵۳/۱	GBM۰۰۲۶	
۰/۴۲	۴	۱۶۵-۱۷۷	۸۴/۹	GBM۰۴۸۳	
۰/۴۵	۴	۱۱۷-۱۳۵	۱۳۸/۹	GBM۰۳۶۳	
۰/۵۹	۴	۲۸۲-۲۹۸	۱۸۱/۷	GBM۰۰۶۴	
۰/۷۸	۹	۲۵۴-۲۷۸	۳۵/۶	GBM۰۰۲۱	۶H
۰/۷۱	۷	۲۹۲-۳۱۲	۴۵/۳	GBM۰۰۷۵	
۰/۶۴	۴	۹۹-۱۰۸	۵۴/۲	GBM۰۲۱۲	
۰/۶۷	۷	۱۹۶-۲۲۴	۶۵/۲	GBM۰۰۶۳	
۰/۷۹	۸	۳۴۴-۳۵۸	۶۹/۲	GBM۰۲۵۶	
۰/۷۱	۵	۱۷۱-۱۸۳	۹۳/۸	GBM۰۰۰۸	
۰/۲۱	۴	۲۶۲-۲۷۴	۱۲۹/۵	GBM۰۴۰۴	
۰/۵۳	۴	۲۰۴-۲۱۳	۱۳/۲	GBM۰۰۶۰	۷H
۰/۷۰	۱۲	۱۰۸-۱۶۸	۲۶/۷	GBM۰۳۲۶	
۰/۸۷	۲۱	۱۲۴-۲۲۶	۴۱/۵	GBM۰۴۶۴	
۰/۶۱	۸	۲۶۴-۲۹۰	۵۶/۴	GBM۰۰۳۳	
۰/۶۹	۷	۹۴-۱۰۶	۷۱/۳	GBM۰۵۱۶	
۰/۷۳	۱۲	۹۰-۱۵۰	۹۰/۶	GBM۰۴۱۹	
۰/۵۴	۷/۳۵				میانگین

اطلاعات توالی ژنومی ژن‌های مورد مطالعه که در بانک ژنی (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) موجود است برای طراحی آغازگرها و تکثیر قطعات استفاده شد. از آنجایی که در داخل هر کدام از ژن‌ها آغازگرهای مختلفی در اختیار قرار می‌گرفت انتخاب بهترین ترکیب آغازگر بر اساس تولید محصولات قوی PCR، کیفیت توالی‌یابی و میزان چند شکلی موجود در توالی

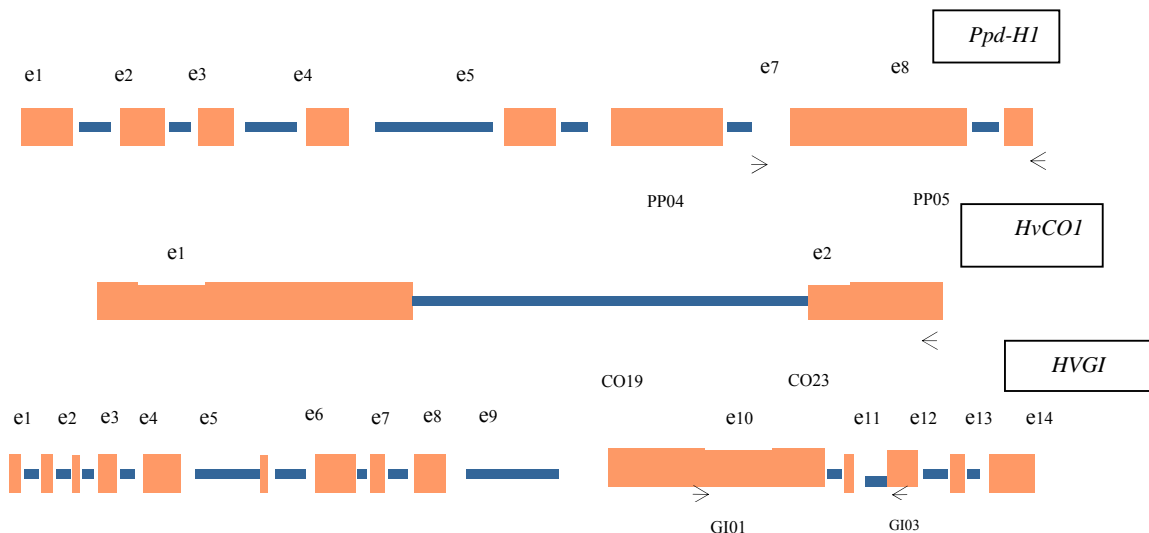
این روش بر آماره ΔK استوار است که شیب تابع احتمالی $\ln P(D)$ را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. مقدار PIC هر یک از نشانگرهای SSR با روش استاندارد Anderson و همکاران (Anderson et al. 1993) محاسبه شدند.

توالی‌یابی و تجزیه ژن‌های کاندید

صورت می‌گرفت. بر این اساس بهترین ترکیب آغازگر برای تکثیر و توالی‌یابی ناحیه ژنی تحت پوشش انتخاب می‌گردد. جهت اطمینان از ناحیه ژنی تکثیر شده توالی‌ها با توالی مرجع موجود در بانک ژن ردیف یابی و استنباط می‌شد (جدول ۲). آغازگرها طوری طراحی شدند که فواصل به طول ۸۸۰ bp شامل آگزون ۷ تا آگزون ۸ از ژن *Ppd-H1*، ۸۴۱ bp شامل انتهای ایترون ۱ و آگزون ۲ و یک قسمت از ۳'-UTR از ژن *HvCO1* و ۸۵۰ bp شامل قسمتی از آگزون ۱۰، آگزون ۱۱ و قسمتی از آگزون ۱۲ از ژن *HVGI* را پوشش دهند (شکل ۱). محصولات PCR ابتدا خالص-سازی شده و سپس با کمک دستگاه Nanodrop تعیین غلظت شدند. مقدار ۱۰ نانوگرم از محصولات PCR برای توالی‌یابی استفاده شد. توالی‌یابی از هر دو انتهای قطعات PCR و با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس که در واکنش PCR استفاده شده بودند به کمک سیستم توالی‌یابی خودکار موئین (Applied

جدول ۲- جزئیات آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر PCR و توالی‌یابی ژن‌های کاندید زمان گلدهی در جو که بر اساس توالی‌های مرجع انتخاب شده‌اند. دمای اتصال آغازگرها به همراه اندازه قطعات تکثیر شده از هر ژن نیز مشخص شده‌اند.

ژن کاندید	نام آغازگر	توالی آغازگر (۵'-۳')	توالی مرجع بانک ژن	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول تکثیری (bp)
<i>Ppd-H1</i>	PP04	GTGCAAAGCATAATATCAGTGTCC	FJ515518	۶۱	۸۸۰
	PP05	GGCCAAAGACACAAGAATCAG			
<i>HvCO1</i>	CO19	TCGCTCCATACACAAAAATCTC	AF490467	۵۹	۸۴۱
	CO23	AGCATCGATTTCGTTGAAATAC			
<i>HVGI</i>	GI01	TGTCTCCATCGTGAACAAAG	AY740524	۶۰	۸۵۰
	GI03	TCTCCACATCTTTGACCTTCC			



شکل ۱- ساختار ژنی *Ppd-H1*، *HvCO1* و *HVGI* در جو. آغازگرها با علامت پیکان و نواحی آگزون با حرف e نشان داده شده‌اند.

فرض می‌شوند که در آن $G = K\sigma_a^2$ و σ_a^2 واریانس ژنتیکی افزایشی و K ماتریس ضرایب خویشاوندی افراد است. اثرات باقیمانده دارای واریانس یکنواخت فرض می‌شوند یعنی $R = I\sigma_e^2$ که در آن σ_e^2 واریانس مقادیر باقیمانده است. مقادیر σ_a^2 و σ_e^2 با استفاده از الگوریتم EM برآورد شدند (Laird et al. 1982). ماتریس‌های K و Qst به ترتیب با نرم افزارهای SPAGEDI و STRUCTURE و بر اساس نشانگرهای EST-SSR برآورد شدند (Evanno et al. 2005; Hardy et al. 2002). به منظور شناسایی اثرات متقابل احتمالی اپیستاتیک بین ژنی، مدلی با طبقه‌بندی دوطرفه در هر مرحله برای دو مکان ژنی با استفاده از نرم افزار SAS 9/1 برآورد شد. در صورت معنی‌دار بودن چنین اثری از میانگین‌های تصحیح شده هر مکان ژنی به صورت جداگانه برای مقایسات استفاده می‌شد و در صورت غیر معنی‌دار بودن عبارت اثر متقابل از مدل حذف و از میانگین‌های اصلی برای مقایسات استفاده می‌شد.

نتایج و بحث

تجزیه فنوتیپی

زمان گلدهی دامنه‌ای از ۹۳ تا ۱۲۲ و میانگین ۱۰۲/۶ روز پس از کاشت را در جمعیت نشان داد (جدول ۳). ارقام دو ردیفه نسبت به شش ردیفه تقریباً گلدهی زودتر داشتند ولی تغییرات کمتری نشان دادند. همچنین ارقام ایرانی به صورت برجسته دارای گلدهی زودتر بوده و تغییرات کمتری در مقایسه با ارقام خارجی نشان دادند. واریانس ژنتیکی بسیار معنی‌داری در این ژرم پلاسم مشاهده گردید ($P < 0.001$) و وراثت‌پذیری صفت نیز در جمعیت بسیار بالا بود (۸۴/۲۲ درصد).

ساختار ژنتیکی جمعیت

تعیین ژنوتیپ جمعیت با ۴۲ نشانگر EST-SSR تعداد ۳۰۹ آلل و دامنه‌ای بین ۳ تا ۲۱ آلل در هر نشانگر را آشکار ساخت. مقادیر PIC نیز تغییراتی بین ۰/۲۱ تا ۰/۸۷ با میانگین ۰/۵۴ در جمعیت نشان داد (جدول ۱). بیش از ۶۵ درصد از نشانگرهای SSR مقادیر PIC بین ۰/۴ و ۰/۷ را نشان دادند. روش بیز که در نرم افزار STRUCTURE برای تعیین تعداد کلاستر یا زیرجمعیت‌های

برای اندازه‌گیری تنوع نوکلئوتیدی (π)، تنوع هاپلوتیپی (hd)، برآورد نوترکیبی Hudson و Kaplan (Rm) و آزمون (D) Tajima برای انحراف از تعادل موتاسیون-رانس (اثر گزینش) در سطح توالی ژن‌های کاندید از نرم افزار DnaSP v3 استفاده شد (Rozas et al. 1999; Hudson et al. 1985; Tajima. 1989). برای برآورد LD از آماره r^2 (مربع ضریب همبستگی) و بر اساس چند شکلی-های SNP که حداقل در دو رقم وجود داشتند استفاده شد (LD Hill et al. 1968). معنی‌داری هر LD با استفاده از آزمون دوطرفه دقیق فیشر تعیین و مقادیر r^2 در مقابل فواصل بین نوکلئوتیدهای چندشکل به شکل نمودار با استفاده از نرم افزار TASSEL v2.01 انجام شد.

تجزیه ارتباطی صفت-هاپلوتیپ

تنها هاپلوتیپ‌هایی که حداقل در دو رقم وجود داشتند در تجزیه ارتباطی بکار رفتند. روشی که برای بررسی ارتباط هاپلوتیپ‌ها و زمان گلدهی استفاده شد روش $Q+K$ بود که هر دو اطلاعات حاصل از K (ضریب خویشاوندی افراد) و Q (ضرایب ساختار جمعیت) را با هم تلفیق می‌کند و معلوم شده که این روش در مقایسه با مدل‌های خطی رایج در تجزیه‌های ارتباطی روش برتری است (Yu et al. 2006). این روش در نرم افزار TASSEL v2.01 به صورت مدل خطی مختلط یا MLM قابل اجراست. مدل آماری به صورت زیر است (Yu et al. 2006): $y = X\beta + Zu + e$ در این مدل y بردار مقادیر BLUP، β بردار نامعلوم اثرات ثابت شامل نشانگر ژنتیکی (هاپلوتیپ) و ماتریس ساختار جمعیت (Qst) و متغیرهای کمکی دیگر است. لازم به یاد آوری است که در این مطالعه تجزیه ارتباطی در دو حالت انجام گرفت. در حالت اول بردار β شامل دو اثر مذکور بود ولی در حالت دوم متغیر تیپ سنبله نیز به دلیل اهمیت آن در منابع به عنوان عامل احتمالی ایجاد ساختار در جمعیت به عنوان متغیر کمکی به بردار β اضافه شد (Haseneyer et al. 2010). بردار u بردار نامعلوم اثرات تصادفی ژنتیکی افزایشی افراد، X و Z ماتریس‌های تلاقی و e بردار مقادیر باقیمانده تصادفی هستند. بردارهای e و u دارای توزیع نرمال با میانگین صفر و واریانس

$$\text{Var} \begin{pmatrix} u \\ e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{pmatrix}$$

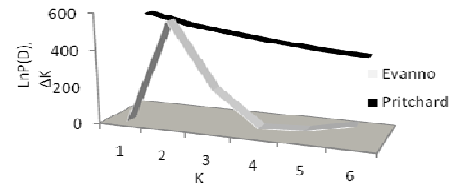
ارقام بر اساس مبداء ایرانی و خارجی در مقایسه با تیپ سنبله بیشتر در ارتباط است. به عنوان مثال اکثر ارقام خارجی در زیرجمعیت دوم قرار دارند. بنابراین تقسیم ژرم پلاسما به دو زیرجمعیت تا درجه زیادی بر اساس مبداء ارقام منطقی به نظر می‌رسد.

تنوع مولکولی و عدم تعادل پیوستگی (LD)

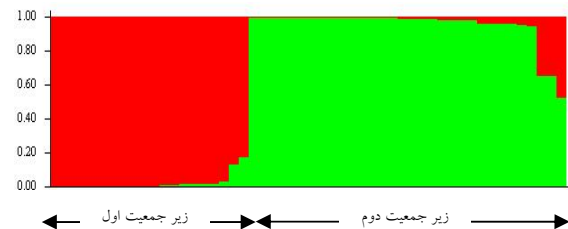
در توالی ژنی *Ppd-H1* تعداد ۱۷ مکان چندشکل و ۳ مکان indel یعنی معادل یک مکان در هر ۴۴ جفت باز شناسایی شدند (جدول ۵). چند شکلی‌ها در نواحی آگرون قرار داشتند. تعداد چندشکلی‌ها، تعداد هاپلوتیپ‌ها و تنوع نوکلئوتیدی در ارقام خارجی بیشتر از ارقام ایرانی و در شش ردیفه نیز بیشتر از دو ردیفه بود (جدول ۴). فراوانی اکثریت مکان‌های SNP به غیر از مکان‌های ۳۰۹۴-s و ۳۳۲۷-s ($p < 0.05$) در وضعیت تعادل قرار داشتند. تعداد ۱۰ هاپلوتیپ شناسایی شد که ۸ تای آنها دارای فراوانی بیش از ۵ درصد بودند (جدول ۵). اکثر ارقام ایرانی در گروه‌های هاپلوتیپی ۷، ۸، ۹ و ۱۰ قرار گرفتند. در هاپلوتیپ‌های ۵ و ۷ و ۱۰ فقط ارقام ۶ ردیفه وجود داشتند. بلوک‌های LD پراکنده‌ای در توالی این ژن مشاهده شد (شکل ۴). میزان LD در بین مکان‌های SNP تقریباً متغیر بود (میانگین ۰/۲۸). در ناحیه آگرون متوسط LD ($r^2 = 0.3$) دو برابر ناحیه اینترون ژن بود ($r^2 = 0.15$). با توجه به (شکل ۴) یک بلوک ۱۱۵ جفت بازی LD (بین ۲۸۰۰-s تا ۲۹۱۱-s) در ناحیه آگرون اول وجود داشت ($r^2 = 1$, $p < 0.001$). مکان‌های ۲۵۲۵-s، ۲۵۳۰-s و ۲۷۲۷-s نیز با هم‌دیگر و با این بلوک در LD کامل بودند و در این فاصله مکان‌های ۲۵۴۳-s، ۲۶۹۵-s، ۲۷۰۵-s و ۲۷۲۸-s به صورت جداگانه تفرق می‌یابند. در توالی ژن *HvCO1* تعداد ۱۳ مکان چند شکلی یا معادل یک SNP در هر ۶۴ جفت باز شناسایی شدند (جدول ۴). تعداد ۱۷ هاپلوتیپ شناسایی شد که ۸ تای آنها فراوانی بیش از ۵ درصد در ژرم پلاسما نشان دادند و از بین آنها هاپلوتیپ‌های ۳ و ۱۱ فقط در ارقام ایرانی وجود داشتند. توزیع ۸ هاپلوتیپ در بین ارقام دو و شش ردیفه تقریباً یکنواخت بود و هاپلوتیپ خاصی مشاهده نشد (جدول ۶). بر خلاف *Ppd-H1* اکثر چندشکلی‌ها در نواحی اینترون و ۳'UTR و تنها یک مکان SNP در ناحیه آگرون قرار داشتند.

جدول ۳- میانگین و دامنه تغییرات زمان گلدهی در ژرم پلاسما مورد مطالعه جو

ژرم پلاسما	تعداد	$\pm Sd$ میانگین	حداقل	حداکثر
کل	۵۲	۱۰۲/۶±۸/۸۶	۹۳	۱۲۲
دو ردیفه	۲۰	۱۰۱/۷±۹/۲۷	۹۳	۱۲۰
شش ردیفه	۳۲	۱۰۳±۸/۵۷	۹۳	۱۲۲
ایرانی	۲۷	۹۸±۶/۲۸	۹۴	۱۱۵
خارجی	۲۵	۱۰۷±۸/۵۵	۹۳	۱۲۲

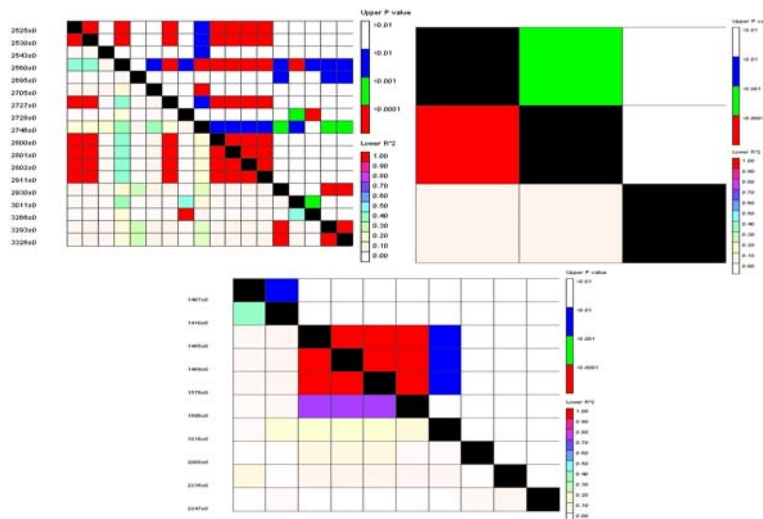


شکل ۲- مقایسه دو روش آماری استفاده شده برای تعیین تعداد زیرجمعیت (K).



شکل ۳- نمودار ساختار جمعیت جو که بر اساس ضرایب عضویت Q در نرم افزار STRUCTURE به دو زیرجمعیت فرعی تفکیک شده است.

احتمالی بکار می‌رود تنها تغییر بسیار جزئی در منحنی $\ln P(D)$ در مقدار $K=2$ نشان داد و بنابراین تعیین زیرجمعیت‌های احتمالی در ژرم پلاسما امکان پذیر نبود. در مقابل، منحنی ΔK به صورت کاملاً واضح یک مقدار حداکثر را در $K=2$ نشان می‌دهد که در آن شکستگی کاملاً روشن است (شکل ۲). با در نظر گرفتن دو روش بکار رفته، ژرم پلاسما جو به احتمال بسیار قوی دارای دو زیرجمعیت بود و بنابراین مقادیر Q_{st} برای $K=2$ استخراج و برای مطالعات بعدی تجزیه ارتباطی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۳). در $K=2$ از بین ۲۷ رقم ایرانی تعداد ۱۸ رقم (۶۷ درصد) در زیرجمعیت اول و ۹ رقم (۳۳ درصد) در زیرجمعیت دوم گروه بندی شدند. همچنین از بین ۲۵ رقم خارجی تعداد ۳ رقم (۱۲ درصد) در زیرجمعیت اول و ۲۲ رقم (۸۸ درصد) در زیرجمعیت دوم قرار گرفتند. از نظر تیپ سنبله دو ردیفه تعداد ۹ رقم (۴۵ درصد) در زیرجمعیت اول و ۱۱ رقم (۵۵ درصد) در زیرجمعیت دوم جای گرفتند. از نظر تیپ ۶ ردیفه نیز تعداد ۱۲ رقم (۳۷/۵ درصد) در زیرجمعیت اول و ۲۰ رقم (۶۲/۵ درصد) در زیرجمعیت دوم گروه بندی شدند. ملاحظه می‌شود که گروه بندی



شکل ۴- نمایش وسعت LD بین مکان های SNP در ژن های *HvCO1*، *Ppd-H1* و *HvGI* تنها مکان هایی که حداقل در دو وارپته موجودند در این تجزیه در نظر گرفته شدند. خانه های پائین قطر نشان دهنده درجه پیوستگی جفت مکان های چندشکل با معیار r^2 و خانه های بالای قطر نشان دهنده مقادیر p بر اساس آزمون دقیق فیشر هستند.

جدول ۴- برآورد های تنوع نوکلئوتیدی (Pi)، تنوع هاپلویتی (Hd)، اثر گزینش (D) و مقدار نوترکیبی (Rm) در ژنهای کاندید

ژن	تعداد چندشکلی	$\pi \times 10^{-3} (\pm Sd)$	Rm	D	تعداد هاپلویتی	hd ($\pm Sd$)
<i>Ppd-H1</i>						
کل (N=52)	20	5/6 (0/00033)	0	0/67	10	0/882 (0/018)
ایترون	0	0	0	0	0	0
اگزون	20	5/6 (0/00033)	0	0/67	10	0/882 (0/018)
ایرانی	13	4/84 (0/00049)	0	0/76	7	0/853 (0/036)
خارجی	15	5/46 (0/00044)	0	0/75	8	0/858 (0/038)
دو ردیفه	10	4/5 (0/00035)	0	1/35	6	0/881 (0/036)
شش ردیفه	16	5/25 (0/00043)	0	0/49	8	0/806 (0/044)
<i>HvCO1</i>						
کل (N=52)	13	4/06 (0/00026)	3	0/55	17	0/917 (0/017)
ایترون	7	5/58 (0/00045)	2	1/56	8	0/765 (0/034)
اگزون	1	0/22 (0/00017)	0	-0/66	2	0/111 (0/057)
3' UTR	5	15/72 (0/00021)	1	-0/59	6	0/63 (0/053)
ایرانی	11	4/15 (0/00034)	2	0/66	12	0/92 (0/026)
خارجی	13	3/88 (0/00045)	2	-0/27	12	0/902 (0/035)
دو ردیفه	10	3/96 (0/00053)	2	0/63	13	0/953 (0/028)
شش ردیفه	13	3/99 (0/00027)	1	0/12	12	0/903 (0/026)
<i>HvGI</i>						
کل (N=51)	3	0/73 (0/00014)	0	-0/14	2	0/491 (0/052)
ایترون	1	1/9 (0/00017)	0	1/46	2	0/466 (0/04)
اگزون	2	0/26 (0/00017)	0	-1/16	2	0/077 (0/05)
ایرانی	3	0/97 (0/00022)	0	0/1	2	0/593 (0/05)
خارجی	1	0/38 (0/00011)	0	0/38	2	0/323 (0/097)
دو ردیفه	1	0/6 (0/00007)	0	1/16	2	0/505 (0/056)
شش ردیفه	3	0/67 (0/00025)	0	-0/66	2	0/34 (0/1)

جدول ۵- مکان های چند شکل واقع در قطعه توالی یابی شده در ژن *PpdH1* در ژرم پلاس جو مورد مطالعه

سلسله	جایگاه ژنی مکان های چند شکل													تعداد نمونه				سلسله							
	e7						e8							شش ردیفه	دو ردیفه	خارجی	ایرانی								
C	G	G	C	C	A	G	G	del	del	del	C	G	G	C	G	A	T	C	FJ515518						
.	del	del	del	G	C	.	.	.	C	T	0	4	2	2	0/077	1		
.	.	.	T	del	del	del	A	C	.	.	.	C	T	2	2	4	0	0/077	2		
.	A	T	.	G	A	.	.	del	del	del	G	C	.	T	G	.	C	T	0	4	4	0	0/077	3	
.	.	.	G	.	G	.	.	del	del	del	T	G	C	T	.	G	.	C	T	1	0	1	0	0/19	4
.	.	.	.	G	.	.	.	del	del	del	T	G	C	T	.	G	.	C	T	11	0	7	4	0/211	5
.	A	T	.	G	A	.	.	del	del	del	G	C	.	.	G	.	C	T	5	3	4	4	0/154	6	
.	.	.	.	G	A	C	G	A	.	G	8	0	2	6	0/154	7
.	.	.	.	G	.	.	.	del	del	del	T	G	C	.	G	2	2	1	3	0/077	8
.	.	.	.	G	.	.	.	del	del	del	T	G	C	.	G	C	.	.	.	2	5	0	7	0/135	9
G	.	.	.	G	A	C	G	A	.	G	1	0	1	0	0/19	10

از نمونه بانک ژنی FJ515518 به عنوان توالی مرجع استفاده شده است. e7 و e8 نشاندهنده اگزون های هفتم و هشتم هستند. علامت (.) نشاندهنده تشابه این جایگاه با توالی مرجع است. del نشاندهنده وجود حذف در جایگاه نوکلئوتیدی مورد نظر است

جدول ۶- مکان های چند شکل موجود در قطعه توالی یابی شده ژن *HvCO1* در ژرم پلاسما جو مورد مطالعه
جایگاه ژنی مکان های چند شکل

هایلو تیپ	فرکانس	ایران	ایران	ایران	ایران	تعداد نمونه												
						۳'UTR	e2		i1						تعداد نمونه			
						۳۳۷	۳۳۶	۳۳۸	۳۳۴	۳۰۷	۳۰۸	۱۸۱۶	۱۵۹۶	۱۵۹۶	۱۳۸۹	۱۳۵۵	۱۴۰	۱۴۰۷
AF490467						T	G	G	C	T	G	T	C	C	T	A	T	A
۱	۰/۰۵۷۶	۱	۱	۲	۲
۲	۰/۱۱۵	۲	۱	۵	۳	G
۳	۰/۰۷۷	۳	۴	۱	۳	C
۴	۰/۰۱۹	۴	۰	۱	۱	A	.	.	.
۵	۰/۰۱۹	۵	۰	۱	۱	G	A	C	.
۶	۰/۱۵۳	۶	۴	۴	۶	G	C	T	A	C	C	.	.
۷	۰/۰۱۹	۷	۰	۱	۱	G	A	C	C	.
۸	۰/۱۷۳	۸	۴	۵	۶	G	C
۹	۰/۰۱۹	۹	۰	۱	۱	G	A	.	.
۱۰	۰/۱۱۵	۱۰	۴	۲	۵	C	T	A	C	C	.	.
۱۱	۰/۰۵۷	۱۱	۳	۰	۱	.	A	C
۱۲	۰/۰۵۷	۱۲	۲	۱	۲	G	.	.	.	A	C	.	.	A	C	C	.	.
۱۳	۰/۰۴۳	۱۳	۱	۱	۲	G	.	.	G	.	.	C
۱۴	۰/۰۱۹	۱۴	۰	۱	۱	G	.	A	A
۱۵	۰/۰۱۹	۱۵	۱	۰	۱	G	A	C
۱۶	۰/۰۱۹	۱۶	۱	۰	۱	.	A	C	.	.	.	A	C	.
۱۷	۰/۰۱۹	۱۷	۱	۰	۱	A	C	.	.

از نمونه بانک ژنی AF490467 به عنوان توالی مرجع استفاده شده است. i1، ایترون اول و e2 نشاندهنده اگزون دوم هستند علامت (.) نشاندهنده تشابه این جایگاه با توالی مرجع است.

جدول ۷- مکان های چند شکل موجود در قطعه توالی یابی شده ژن *HvGI* در ژرم پلاسما جو مورد مطالعه
جایگاه ژنی مکان های چند شکل

هایلو تیپ	فرکانس	ایران	ایران	ایران	ایران	تعداد نمونه	
						e10	i11
						۶۸۳	۶۸۳
AY740524						G	T
۱	۰/۶۴۷	۱۴	۱۹	۸	۲۵	G	.
۲	۰/۳۱۴	۴	۱۲	۱۲	۴	C	.
۳	۰/۰۳۹	۲	۰	۰	۲	C	A

از نمونه بانک ژنی AY740524 به عنوان توالی مرجع استفاده شده است. i11، ایترون اول و e10 نشاندهنده اگزون دوم هستند. علامت (.) نشاندهنده تشابه این جایگاه با توالی مرجع است.

جدول ۸- روابط بین تنوع در زمان گلدهی و تنوع هایلو تیپی به همراه درصد واریانس ژنتیکی بیان شده در ژنهای *HvCO1* و *G1* و *Ppd-H1*

ژن هایلو تیپ	مدل ۱: هایلو تیپ + Qst		مدل ۲: هایلو تیپ + Qst + تیپ خوشه		
	زمان گلدهی	p value	زمان گلدهی	p value	
<i>Ppd-H1</i>	۱	۰/۵۴۹	۱۱۳/۴	۰/۴۵۵	
	۲	۰/۴۷۸	۱۰۹/۱	۰/۴۵۷	
	۳	۰/۰۱۸۲	۱۱۹/۲۹	۰/۰۰۵	
	۵	۰/۳۱۲	۱۰۶/۱	۰/۳۷۶۶	
	۶	۰/۰۱	۱۰۸/۷	۰/۰۱	
	۷	۰/۰۹۳	۹۷/۷	۰/۱۰۵۹	
	۸	۰/۲۸۱	۹۸/۴	۰/۲۹۹	
	۹	۰/۰۶۰	۹۲/۹	۰/۰۷۱۸	
	<i>HvCO1</i>	۱	۰/۱۶۴۳	۱۱۱/۳۸	۰/۱۴۲۱
۲		۰/۰۸۳۶	۱۱۰/۴۱	۰/۰۷۵۳	
۳		۰/۹۳۲۲	۱۰۲/۵۹	۰/۸۹۴۹	
۶		۰/۵۹۲۴	۱۰۱/۰۸	۰/۵۵۶۴	
۸		۰/۹۳۵۲	۱۰۲/۸۹	۰/۹۵۲۷	
۱۰		۰/۰۶۹۹	۹۴/۴۹	۰/۰۵۶۲	
۱۱		۰/۹۴۵۹	۱۰۱/۸	۰/۸۷۵۴	
۱۲		۰/۹۱۱۳	۱۰۴/۷	۰/۸۹۹۱	
۱۳		۰/۶۲	۹۵/۸۶	۰/۵۶	
<i>HvGI</i>		۱	۰/۰۳۲۱	۱۰۵/۵۸	۰/۰۲۵۷
		۲	۰/۰۵۷	۹۷/۰۴	۰/۰۵۳
		۳	۰/۴	۹۷/۲۲	۰/۳۲

معنی‌دار اپیستاتیک بین ژن‌ها بود و بنابراین دلیلی برای تصحیح میانگین هاپلوتیپ‌ها برای اثر متقابل اپیستاتیک وجود نداشت ($P > 0.01$). تنوع نوکلئوتیدی ژن *Ppd-H1* ۳۶/۲۵ درصد از واریانس ژنتیکی را توجیه کرد. هاپلوتیپ ۳ با میانگین گلدھی ۱۱۵/۱۵ روز و هاپلوتیپ ۶ با میانگین ۱۰۸/۲۹ روز در ژن *Ppd-H1* به طور معنی‌دار با گلدھی مرتبط بودند و تفاوت یک هفته‌ای را با هم نشان دادند. تفاوت بین این دو هاپلوتیپ فقط در مکان s-۲۶۹۵ است (جدول ۵). یعنی حضور نوکلئوتید T در این مکان باعث گلدھی دیر هنگام و آلل جایگزین آن یعنی G باعث کاهش زمان گلدھی می‌شود. این مکان که در ناحیه اگزون ۸ قرار دارد قبلاً نیز گزارش شده است (Turner et al. 2005). دو هاپلوتیپ مذکور تقریباً ۲۰ درصد واریانس ژنتیکی را توجیه می‌کنند. زمانی که متغیر کمکی تیپ سنبله نیز به عنوان عامل احتمالی ایجاد ساختار در ژرم پلاسما به مدل اضافه شد (مدل ۲) آزمون معنی‌داری حساس‌تر شد ($P < 0.01$), یعنی درصد واریانس ژنتیکی کل به ۴۲/۸۷ و واریانس ناشی از هاپلوتیپ ۳ و ۶ به ۲۵/۷۹ درصد ارتقا یافت. هاپلوتیپ ۹ نیز ارتباط نسبتاً قوی ولی غیر معنی‌دار با گلدھی زود هنگام نشان داد (جدول ۸). ژن *HvCO1* قادر به تمایز دو نوع تیپ گلدھی زود هنگام و دیر هنگام نبود هر چند روابط ضعیف و غیر معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۸). تقریباً بیش از ۶۰ درصد هاپلوتیپ‌ها فنوتیپ بینابینی را نشان دادند. قوی‌ترین ارتباط مربوط به هاپلوتیپ ۱۰ بود که میانگین پایین‌تری داشت و بنابراین با گلدھی زود هنگام در ارتباط بود. درصد کل واریانس ژنتیکی در مدل اول ۱۶/۳۳ و مدل دوم ۱۸/۳۲ بود. در ژن *HvCO1* هاپلوتیپ ۱ ارتباط معنی‌داری را با گلدھی دیر هنگام در هر دو مدل نشان داد. این هاپلوتیپ در مدل اول ۹/۴۶ و در مدل دوم ۱۰/۳۳ درصد از کل واریانس ژنتیکی را توجیه نمود. نکته قابل توجه اینکه بدون در نظر گرفتن ساختار جمعیت (Qst) در مدل، هاپلوتیپ‌های *Ppd-H1-9* و *HvCO1-2* ارتباط معنی‌داری با گلدھی نشان دادند. مراجعه به جداول ۵ و ۶ نشان می‌دهد که هاپلوتیپ *Ppd-H1-9* فقط در ارقام ایرانی و هاپلوتیپ ۲-*HvCO1* تنها در ارقام خارجی وجود دارند. بنابراین ارتباط آن‌ها به خاطر ایرانی یا خارجی بودن یعنی ساختار جمعیت، یک ارتباط دروغین می‌باشد که با در نظر گرفتن Qst اثر آن برطرف شده

میزان تنوع نوکلئوتیدی در 'UTR۳ و تنوع هاپلوتیپی در ناحیه اینترون بیشتر بود. در ارقام ایرانی تعداد چند شکلی کمتر ولی تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی بیشتر از ارقام خارجی بودند (جدول ۴). همچنین تعداد چند شکلی و تنوع نوکلئوتیدی در ارقام دو ردیفه کمتر و تعداد هاپلوتیپ‌ها و تنوع هاپلوتیپی بیشتر از ارقام شش ردیفه بودند (جدول ۴). میزان LD بین مکان‌های SNP دارای متوسط $r^2 = 0.27$ بود. یک بلوک LD ($r^2 > 0.8$, $p < 0.001$) در ناحیه اینترون به طول ۱۴۲ جفت باز (بین s-۱۴۵۵ تا s-۱۵۹۶) مشاهده شد (شکل ۴). در ژن *HvGI* تعداد ۳ مکان چندشکل یا معادل یک SNP در هر ۲۸۳ جفت باز شناسایی شد که در مقایسه با دو ژن *Ppd-H1* و *HvCO1* این میزان چند شکلی بسیار پایین بود (جدول ۴). برای این ژن تعداد ۳ هاپلوتیپ در ژرم پلاسما شناسایی شدند و تمام هاپلوتیپ‌ها در ارقام ایرانی وجود داشتند و تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوتیپی در ارقام ایرانی بیش از ارقام خارجی بود. ارقام شش ردیفه نیز هر سه هاپلوتیپ را نشان دادند. تنوع نوکلئوتیدی در ارقام شش ردیفه و تنوع هاپلوتیپی در ارقام دو ردیفه بیشتر بود (جدول ۴). یک بلوک LD ($r^2 = 1$, $p < 0.001$) در ناحیه اگزون بین دو مکان s-۶۰۷۲ تا s-۶۲۱۰ به طول ۱۴۸ جفت باز وجود داشت. میزان LD به طور متوسط در بین جفت مکان‌های چند شکلی دارای متوسط $r^2 = 0.4$ بود (شکل ۴). اثر گزینش بر اساس مقادیر D برای ژن‌های *Ppd-H1* و *CO1* مثبت و برای ژن *HvGI* منفی بودند. مقدار منفی D نشان‌دهنده افزایش چندشکلی‌های نادر و مقدار مثبت نشان‌دهنده افزایش چندشکلی‌های بینابین (تعادل) است. با این حال این مقدار برای هیچ یک از ژن‌ها معنی‌دار نشد ($P > 0.01$). مقدار R_m نیز نشان داد که در ژن *CO1* نوترکیبی بالایی نسبت به ژن‌های دیگر در تاریخچه تکامل این ژن روی داده است، فرآیندی که در گونه‌های خودگشن دارای احتمال کمتری است (جدول ۴).

تجزیه ارتباطی

به منظور افزایش حساسیت، هاپلوتیپ‌هایی که حداقل در دو رقم مشاهده شدند در تجزیه ارتباطی منظور شدند. با در نظر گرفتن ساختار جمعیت ($K=2$) روابط هاپلوتیپی معنی‌دار با زمان گلدھی برای دو ژن *Ppd-H1* و *HvGI* شناسایی شدند (جدول ۸). نتیجه مهم دیگر که در این مطالعه حاصل شد عدم وجود اثر متقابل

گزینش برای افراد نوترکیب احتمالی در ۷ ژن مورد مطالعه نسبت دادند که در آنها هاپلوتیپ‌های نوترکیب مشاهده شده بود. به هر حال وجود هاپلوتیپ‌های نوترکیب نشان می‌دهد که این ژن می‌تواند یک نقطه مستعد (hot spot) برای نوترکیبی باشد. چندشکلی پایین *HVGI* در مقایسه با دو ژن دیگر را می‌توان به چند دلیل احتمالی نسبت داد. اول اینکه ژن *HVGI* در یک فاصله ۲/۹cM روی بازوی کوتاه کروموزوم ۳H به همراه ژن‌های مقاومت به ریزش خوشه *btr1* و *btr2* قرار گرفته است که در اهلی شدن جو دارای اهمیت بوده و تحت فشار بالای گزینش هستند (Komatsuda et al. 2004). دلیل دوم را می‌توان به استفاده محدودتر ژن‌های اجدادی در برنامه‌های اصلاحی توسط به نژادگران نسبت داد. دلیل سوم ممکن است به خاطر اندازه ژرم پلاسما باشد. اما دلیل چهارم را می‌توان با مراجعه به مقادیر D (جدول ۴) استنباط کرد، مقدار D برای ژن *HVGI* منفی و برای دو ژن دیگر مثبت است پس طبق تئوری Tajima می‌توان گفت که در این ژن گزینش مثبت و در دو ژن دیگر گزینش از نوع متعادل حکمفرماست (Tajima 1989). این مطلب را می‌توان با توجه به (شکل ۴) نیز نشان داد که چندشکلی‌های ناحیه آگزونی *HVGI* کاملاً در LD هستند. ارقام دو ردیفه نسبت به شش ردیفه سطح پایین تری از تنوع و درجه بالاتری از گزینش (بر اساس مقدار D) را برای هر سه ژن نشان دادند که باز می‌تواند به دلایل فوق باشد. تنوع چشمگیر ارقام ایرانی در مقایسه با ارقام خارجی به خصوص در ژن‌های *HvCOI* و *HVGI* می‌تواند بیانگر کشورمان به عنوان یکی از مراکز مهم تنوع جو برای این ژن‌ها باشد. دقت بسیار بالای تجزیه ارتباطی وابستگی شدیدی به میزان LD دارد. در بسیاری از موارد این میزان به سطح ژن و حتی جفت باز تنزل می‌یابد. نتایج ما با میزان گزارش شده LD در سطح ژنوم (>10cM) با استفاده از نشانگرهای AFLP توسط Kraakman et al. (2004) در تضاد است. هر چند که این گونه مطالعات بستگی به اثرات ساختار جمعیت، ناحیه ژنومی و نوع جمعیت مورد استفاده دارد ولی در مطالعه آن‌ها تنها از ارقام جدید اصلاح شده استفاده شده بود که تحت تاثیر فشار گزینشی بیشتری هستند. بنابراین برای نیل به نقشه‌یابی با وضوح بالا استفاده از جمعیت‌های بومی و یا وحشی که کمتر تحت گزینش مصنوعی هستند

است. در این مطالعه رابطه تنوع آلی سه ژن کاندیدا در زمان گلدهی جو بررسی شد. با در نظر گرفتن روش ΔK دو زیرجمعیت در جمعیت شناسایی شد که تقریباً با مبدا ایرانی و خارجی در ارتباط بودند. از طرفی تقسیم ارقام به دو زیرجمعیت بر اساس نشانگرهای EST-SSR و افزایش واریانس ژنتیکی پس از اضافه نمودن تیپ سنبله به عنوان متغیر کمکی به روشنی گویای این مطلب است که این دو پارامتر در ساختار ژرم پلاسما جو دارای اهمیت چشمگیری هستند و بایستی در مطالعات تجزیه ارتباطی صفات کمی در جو مد نظر قرار گیرند زیرا احتمال پیوستگی‌های دروغین نشانگر با صفت را به طور موثر کاهش می‌دهند. در حالی که تنوع نوکلئوتیدی در نواحی ایترون سه ژن قابل قیاس بود، توالی‌های آگزونی به ویژه در *Ppd-H1* تنوع چشمگیری نشان دادند. نتیجه‌ای که منطبق با نتیجه گزارش شده توسط Stracke و همکاران بود (Stracke et al. 2009) که در آن تنوع نوکلئوتیدی و چند شکلی‌های عملکردی در ژن‌های *HvCOI* و *HvFT1* در مقایسه با *Ppd-H1* بسیار محدود بودند. ناحیه آگزون *Ppd-H1* متنوع است و با نقش گزارش شده خانواده ژنی *PRR* در آراییدوپسیس منطبق است که در آن هر دو ژن 7 *PRR* (ارتولوگ *Ppd-H1*) و *PRR 5* غنی از تنوع آلی بوده که امکان سازگاری وسیع این گونه را فراهم ساخته است (Michael et al. 2003). بسیاری از چندشکلی‌های نادر در *HvCOI* حضور دارند و این امر باعث ایجاد هاپلوتیپ‌های فراوان و در نتیجه تنوع نوکلئوتیدی کمتری شده است. تمام جهش‌های عملکردی که تا به حال در این ژن گزارش شده‌اند در یک یا دو ناحیه دمین قرار گرفته‌اند که بر اهمیت آن‌ها در زمان گلدهی تاکید دارد (Ben-Naim et al. 2006; Lagercrantz et al. 2000). از آنجایی که توالی‌یابی کامل نبود امکان دارد که تعدادی از مکان‌های چندشکل دیگر وجود داشته باشند که شناسایی نشده‌اند. تنوع هاپلوتیپی بالا در *HvCOI* را می‌توان تا حدود زیادی به وقوع پدیده نوترکیبی در این ژن نسبت داد که در مقایسه با دو ژن دیگر مقدار آن بر اساس Rm (جدول ۴) بسیار چشمگیر است. هر چند که این پدیده در گونه خودگشنی مثل جو نادر است. (Kuitinen et al. 2000) نوترکیبی در آراییدوپسیس (با دگرگشتی ۰/۳ درصد) را به هتروزیس موجود در تعداد نادری از نتاج حاصل از دگرگشتی و

متقابلی وجود نداشته باشد می‌توان گفت که گزینش برای آلل یک ژن در برنامه‌های به نژادی صرف‌نظر از ترکیب آلی ژن‌های دیگر امکان پذیر است. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع بالایی در ژرم پلاسما و به ویژه در ارقام ایرانی از نظر ژن‌های مورد مطالعه وجود دارد، وجود SNP گزارش شده (Turner et al. 2005) در بین ارقام یکی از نمونه‌های بارز تنوع در ژرم پلاسما مورد مطالعه و اهمیت آن از نظر تنوع در زمان گلدهی محسوب می‌شود و می‌تواند در برنامه‌های به نژادی برای زمان گلدهی مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه هاپلوטיפ‌هایی شناسایی شدند که ارتباط معنی‌داری با گلدهی زود هنگام و یا با گلدهی دیر هنگام در ژن‌های *Ppd-H1* و *HVGI* نشان دادند و باعث تسریع یک هفته‌ای یا تاخیر یک هفته‌ای در گلدهی می‌شوند، پس می‌توان با طراحی آغازگرهای مناسب از این آلل‌ها در برنامه‌های به نژادی برای زمان گلدهی و یا برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود. از طرفی با توجه عدم وجود اثر متقابل اپیستاتیک می‌توان آلل‌های مطلوب ژن‌های مختلف را در یک ژنوتیپ ترکیب نمود.

سیاسگزاری

از همکاری بسیار ارزنده موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به ویژه بخش تحقیقات غلات و بخش ژنتیک و ذخایر توارثی و همچنین موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی IPK آلمان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimising parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186.
- Ben-Naim O, Eshed R, Parnis A, Teper-Bamnolker P, Shalit A, Coupland G, Samach A, Lifschitz E (2006) The CCAAT binding factor can mediate interactions between *CONSTANS*-like proteins and DNA. *Plant J* 46: 462-476.
- Buckler ES and Thornsberry JM (2002) Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr Opin Plant Biol* 5: 107-111.
- Cockram J, Jones H, Leigh FJ, O'Sullivan D, Powell W, Laurie DA, Greenland AJ (2007) Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J Exp Bot* 58: 1231-1244.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dunford RP, Griffiths S, Christodoulou V, Laurie DA (2005) Characterization of a barley (*Hordeum vulgare* L.) homologue of the Arabidopsis flowering time regulator *HVGI*. *Theor Appl Genet* 110: 925-931.

بایستی مد نظر قرار گیرند (Stracke et al. 2009). برآوردهای LD در مطالعه ما براساس ژن‌های کاندید الگوهای متفاوتی را نشان داد. مقدار LD در ژن‌های *Ppd-H1* و *HvCO1* بسیار کمتر از مقدار آستانه و در ژن *HVGI* بیشتر بود. نقش عمده *Ppd-H1* در واکنش به طول روز در جو معلوم شده است (Turner et al. 2005). با توالی‌یابی ناحیه دومین CCT در این ژن مشخص شد که هاپلوטיפ ۳ دارای یک آلل مغلوب گلدهی دیر هنگام *ppd-H1* است در حالی‌که هاپلوטיפ ۶ حامل آلل غالب گلدهی زود هنگام *Ppd-H1* است و تعداد روز تا گلدهی در هاپلوטיפ غالب به میزان ۱۱/۸۵ درصد و معادل یک هفته کاهش یافت. بعلاوه این ژن دارای اثر پلیوتروپی بر روی ارتفاع بوته و اجزای عملکرد است که نتیجه اثر مستقیم زمان گلدهی است (Laurie et al. 1994). در مناطق با فصول رشد طولانی آلل گلدهی دیر هنگام به ارقام بهاره امکان می‌دهد که دوره رویشی و ظرفیت ذخیره‌ای خود را افزایش دهند. در مقابل آلل غالب *Ppd-H1* که در گونه وحشی یافت می‌شود احتمالاً به عنوان راه‌کاری برای فرار از خشکی تکامل یافته است (Lister et al. 2009). همان‌طور که در این مطالعه نشان داده شد تفاوت بین آلل‌های مختلف در گلدهی مستقل از ترکیب آلی در ژن‌های دیگر است البته تصمیم در مورد اینکه آیا عدم اثر متقابل بین ژن‌ها در نتیجه تکامل مستقل ژن‌ها بوده و یا به خاطر نمونه برداری، مشکل است. اگر اثر

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620.
- Greenup A, Peacock WJ, Dennis ES, Trevaskis B (2009) The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals. *Ann Bot* 103: 1165-1172.
- Griffiths S, Dunford RP, Coupland G, Laurie DA (2003) The evolution of *CONSTANS*-like gene families in barley (*Hordeum vulgare*), rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 131: 1855-1867.
- Hardy, O. J., and X. Vekemans (2002) SPAGEDi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol Ecol Notes* 2: 618-620.
- Haseneyer, G., S. Stracke, C. Paul, C. Einfeldt, A. Broda, H.-P. Piepho, A. Graner & H.H. Geiger (2010) Population structure and phenotypic variation of a spring barley world collection set up for association studies. *Plant Breeding*. 129: 271-279.

- Hayes P, Szucs P (2006) Disequilibrium and association in barley: thinking outside the glass. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18385–18386.
- Hill WG, Robertson A (1968) Effects of inbreeding at loci with heterozygote advantage. *Genetics* 60: 615–628
- Hudson RR, Kaplan NL (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics*. 111: 147–164.
- Jones H, Leigh FJ, Mackay I, Bower MA, Smith LMJ, Charles MP, Jones G, Jones MK, Brown TA, Powell W (2008) Population Based Re-sequencing Reveals that the Flowering Time Adaptation of Cultivated Barley Originated East of the Fertile Crescent. *Mol Biol Evol* 25(10): 2211–2219.
- Komatsuda T, Maxim P, Senthil N, Mano Y (2004) High-density AFLP map of nonbrittle rachis 1 (*btr1*) and 2 (*btr2*) genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 109: 986–995.
- Kraakman, A. T., R. E. Niks, P.M. Van Den Berg, P. Stam and F. A. Van Eeuwijk (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168: 435–446.
- Kuittinen H, Aguade M (2000) Nucleotide variation at the chalcone isomerase locus in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 155: 863–872.
- Lagercrantz U, Axelsson T (2000) Rapid evolution of the family of *CONSTANS* like genes in plants. *Mol Biol Evol* 17: 1499–1507.
- Laird, N. M., and J. H. Ware (1982) Random-Effects Models for Longitudinal Data. *Biometrics* 38: 963–974.
- Laurie DA, Prachett N, Bezant JH, Snape JW (1994) Genetic analysis of a photoperiod-response gene on the short arm of chromosome 2 (2H) of *Hordeum vulgare* (barley). *Heredity* 72: 619–627.
- Lister DL, Thaw S, Bower MA, Jones H, Charles MP, Jones G, Smith LMJ, Howe CJ, Brown TA, Jones MK (2009) Latitudinal variation in a photoperiod response gene in European barley: insight into the dynamics of agricultural spread from 'historic' specimens. *J Archaeol Sci* 36: 1092–1098.
- Matus IA, Hayes PM (2002) Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome* 45: 1095–1106.
- Michael TP, Salome PA, Yu HJ, Spencer TR, El Sharp, Mcpeek MA, Alonso JM, Ecker JR, McClung CR (2003) Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock. *Science* 302: 1049–1053.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rozas J, Rozas R (1999) DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15: 174–175
- Stracke S, Presterl T, Stein N, Perovic D, Ordon F, Graner A (2007) Effects of introgression and recombination on haplotype structure and linkage disequilibrium surrounding a locus encoding Bymovirus resistance in barley. *Genetics* 175: 805–817.
- Stracke S., G. Haseneyer, J.-B. Veyrieras, H.-H. Geiger, S. Sauer, A. Graner & H.-P. Piepho (2009) Association mapping reveals gene action and interactions in the determination of flowering time in barley. *Theor Appl Genet* 118(2): 259–273.
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116–1120.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585–595.
- Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A (2003) Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 106: 411–422.
- Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA (2005) The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310: 1031–1034.
- Yu J, Pressoir G, Briggs W, Vroh BI, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland J, Kresovich S, Buckler ES (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet* 38: 203–208.