

ارزیابی تنوع ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgare* L.) بر اساس محتوای بتاگلوکان و نشانگرهای ISSR

راحله عزیزنیا^۱، هدیه بدخشان^{۲*}، تیمور جوادی^۳ و سوما زمانی^۲

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

۳- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹)

چکیده

در این مطالعه، تنوع محتوای بتاگلوکان دانه، در ۲۰ لاین و رقم جو بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، تنوع ژنتیکی بین این ژنوتیپ‌ها، با استفاده از نشانگر ISSR ارزیابی شد. استخراج بتاگلوکان به روش آنزیمی انجام گرفت. از نظر محتوای بتاگلوکان دانه در بین ژنوتیپ‌های جو، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. محتوای بتاگلوکان دانه بین ۷/۲۱ تا ۱۲/۴۸ درصد متغیر بود و بیشترین مقدار محتوای بتاگلوکان، در ژنوتیپ‌های یوسف، E94B3 و E94B17 اندازه‌گیری شد. آغازگرهای ISSR با متوسط درصد چندشکلی ۶۹/۷۹ درصد، تنوع ژنتیکی ۰/۲۵ و شاخص شانون ۰/۳۷ در بررسی تنوع ژنتیکی بسیار کارآمد عمل کردند. لاین‌ها و رقم‌های جو، در دو گروه مجزا با مطابقت زیاد با شجره ژنتیکی، از هم متمایز شدند. تعداد نه آغازگر دارای اطلاعات برای محتوای بتاگلوکان دانه توسط روش‌های ناپارامتری کروسکال-والیس، همبستگی اسپیرمن و تجزیه رگرسیون گام به گام شناسایی شدند. درصد تبیین تغییرات محتوای بتاگلوکان دانه توسط این آغازگرها، بین ۲۴/۳ تا ۴۲/۴ متغیر بود. آغازگرهای ISSR6(700)، ترکیب ISSR1+ISSR4(1400) و ترکیب IS2+ISSR2(1400) دارای ارتباط قوی‌تری با محتوای بتاگلوکان بودند. آغازگرهای دارای اطلاعات، امکان‌پذیر است که کارآمد ژنوتیپ‌های جو با محتوای بتاگلوکان بالاتر را فراهم می‌آورند.

واژگان کلیدی: بتاگلوکان، جو، رگرسیون گام به گام، کروسکال-والیس، نشانگرهای دارای اطلاعات

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: h.badakhshan@uok.ac.ir

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) چهارمین غله‌ی بسیار قدیمی و مهم در جهان محسوب می‌شود که هم‌زمان با گندم، نخود، عدس و در حدود ۱۰۰۰۰ سال قبل در هلال حاصلخیز خاورمیانه اهلی شده است (Baik and Ullrich, 2008). این گیاه، در آمریکای شمالی و اروپا در تغذیه دام و صنایع مالت مورد استفاده قرار گرفته و غذای اصلی بسیاری از مردمان کشورهای آفریقایی، آسیایی و اروپایی را تشکیل می‌دهد (Mohammadi et al., 2014; Ramazani and Abdipour, 2018). دانه جو حاوی کربوهیدرات‌های پیچیده (عمدتاً نشاسته)، سطوح متوازن پروتئین‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها به‌ویژه ویتامین E، آنتی‌اکسیدان‌ها، پلی‌فنول‌های اولیه و فیبرهای محلول یا نامحلول است که از نظر تأمین سلامت انسان بسیار مهم تلقی می‌شوند (Baik and Ullrich, 2008). فیبر محلول بتاگلوکان، جزء اصلی دیواره سلولی آندوسپرم و لایه زیر آلورون در گرامینه‌ها به‌ویژه غلاتی نظیر جو دوسر (۷-۳ درصد) و جو (۱۱-۵ درصد) را تشکیل می‌دهد؛ اما در مقادیر کمتری در سایر غلات نیز یافت می‌شود. بتاگلوکان، ترکیب خطی از پلی‌ساکاریدهای متشکل از مولکول‌های گلوکز است که با پیوندهای (1→3) و (1→4) به هم متصل شده‌اند (Havrlentova and Kraic, 2006) و دارای نقش مؤثری در کاهش بیماری‌های قلبی و عروقی، جلوگیری از دیابت، افزایش سطح ایمنی بدن، پیشگیری از بروز سرطان و زوال حافظه است. بتاگلوکان، به‌عنوان یک منبع پروبیوتیک، جزء مهم تشکیل دهنده غذاهای اختصاصی بیماران دارای اختلالات و سندروم‌های متابولیکی به‌حساب می‌آید (Markovic et al., 2017). ارقام دارای بتاگلوکان بیشتر، در برنامه‌های اصلاحی و صنایع غذایی می‌توانند به‌طور بالقوه، برای تهیه غذاهای عمل‌گرا (Functional food) مورد استفاده قرار بگیرند (Havrlentova and Kraic, 2006; Sofi et al., 2017). بر اساس پیشنهاد FDA حداقل باید ۰/۷۵ گرم از فیبر بتاگلوکان در هر ۲۲۸ گرم فیبر دریافتی در غذای روزانه وجود داشته باشد (Houston et al., 2014).

در مطالعات متعددی، وجود تنوع معنی‌دار در بین ژنوتیپ‌های جو از لحاظ محتوای بتاگلوکان گزارش شده است (Islamovic et al., 2013; Markovic et al., 2017; Ringsted et al., 2017) و از طرفی، محتوای بتاگلوکان در ارقام جو با تیپ رشدی زمستانه بیشتر از ارقام بهاره و به‌علاوه، محتوای بتاگلوکان در جوهای لخت (بدون پوشینه) نیز بیشتر از جوهای با پوشش بوده است (Baik and Ullrich, 2008). دامنه محتوای بتاگلوکان دانه بین ۲/۲ تا ۸/۴ درصد در بین ارقام جو متغیر بوده در حالی که مقدار آن تا بیش از ۱۳ درصد در ژنوتیپ‌های جو وحشی (*Hordeum spontanem*) برآورد شده است (Zhang et al., 2002; Houston et al., 2014). در برخی از مطالعات، سهم عوامل ژنتیکی را در تعیین محتوای بتاگلوکان بیشتر از عوامل محیطی در نظر گرفته‌اند (Morgan and Riggs, 1981; Henry, 1986; Houston et al., 2014). اما در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد که هم محیط و هم ژنوتیپ بر روی محتوای بتاگلوکان دانه جو مؤثر هستند (Yalcin et al., 2007). محتوای بتاگلوکان دانه جو توسط اعضای خانواده ژنی CSIH و CSIF رمز شده (Bourton et al., 2006) که عمدتاً بر روی کروموزوم‌های 1H، 2H، 5H و 7H جو قرار دارند (Bourton et al., 2008). تنوع بین اعضای انفرادی خانواده‌های ژنی CSIH، CSIF و یا ژن‌هایی که تنظیم کننده آن‌ها هستند؛ فراوانی نسبی و ساختار بتاگلوکان را تعیین می‌کنند (Houston et al., 2014).

هدف این پژوهش، تعیین تنوع محتوای بتاگلوکان دانه در برخی ژنوتیپ‌های جو، تنوع بین ارقام جو از لحاظ نشانگر توالی‌های تکراری ساده میانی^۱ (ISSR) و ارتباط احتمالی هر یک از نشانگرهای ISSR با صفت محتوای بتاگلوکان دانه برای شناسایی نشانگرهای دارای اطلاعات بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: تنوع ژنتیکی و صفات فنوتیپی شامل محتوای بتاگلوکان دانه، روز تا گلدهی، ارتفاع بوته، طول

1- Inter simple sequence repeats

(درصد w/w) در هر یک از ژنوتیپ‌های جو به‌روش آنزیمی و با استفاده از کیت تجاری مگازیم، مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده (Megazyme International Ireland Limited; Bray, Irland McCleary and Glennie-Holmes,) و بر اساس روش استاندارد تعیین شد (1985). این روش، توسط انجمن‌های بین‌المللی AOAC (به شماره ۹۹۵/۱۶)، AACC (به شماره ۲۳/۰۱-۳۲) و روش استاندارد ICC (به شماره ۱۶۶) مورد پذیرش و تأیید است. محتوای بتاگلوکان به‌طور دقیق بر اساس روش پیشنهادی مگازیم در سه تکرار محاسبه شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA، از هر یک از ژنوتیپ‌های جو کاشته شده در گلخانه، برگ‌های سالم و جوان نمونه‌برداری، برگ‌ها ادغام و در نیتروژن مایع نگهداری شدند.

سنبله، تعداد دانه در سنبله و طول پدانکل در ۲۰ رقم (شش‌ردیفه و دوردیفه) و لاین (دوردیفه) جو در سال ۹۵-۱۳۹۴ مورد بررسی قرار گرفت. ارقام و لاین‌های مورد استفاده از مرکز تحقیقات کشاورزی استان کردستان تهیه شدند. ژنوتیپ‌های جو، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۵ تکرار در گلدان‌هایی با شرایط کاملاً یکسان در گلخانه تحقیقاتی (به مدت ۲۵۰ روز از زمان کاشت تا برداشت) در دانشگاه کردستان کاشته و فاصله بین بلوک‌ها ۴۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

اندازه‌گیری محتوای بتاگلوکان دانه: بعد از برداشت، دانه‌های جو (پنج گرم) برای هر ژنوتیپ به‌طور مجزا آرد، غربال و تا زمان استفاده، در کیسه‌های پلاستیکی دربسته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت حداکثر یک هفته نگهداری شدند. محتوای بتاگلوکان

جدول ۱- ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده در این پژوهش، والدین و درصد محتوای بتاگلوکان در آن‌ها

Table 1. List of studied barley genotypes, their respected parents and percent of beta-glucan content

لاین‌ها* / ارقام*	والدین	محتوای بتاگلوکان (%)
Lines+ cultivars*	Parents	Beta-glucan content (%)
Zahak*	Poa / Hjo // Qjina	10.00
Hagana*	-	10.50
Izeh*	-	10.25
Yosef*	205 Strain/DI71//106 Deir Alla/3/08-Rhn/4/Gustoe//01-Chn/Lignee527	12.05
Reihan*	-	10.75
Nimrooz*	Trompillo	9.50
Sararoud*	-	7.21
Bahman*	Scotia // F1, 18- Ny 6005/68-2196IWA	8.50
Nosrat*	Karon/Kavir	9.51
Ansar*	Yeasevi 93	10.05
Abidar*	Yeasevi 93	11.00
E94B16+	Lignee131/3/4679/105//Yea168. 4/4/GB 83-7IRDBC05-06-235-OMH-OMh-OMh-OMH-2MH	10.00
E94B14+	Yea168.4/Ywa605.5 Yea206-4A-3//C-25106IRDBC05-06-218-OMH-OMh-OMh-OMH-3MH	11.00
E94B9+	C-25041 /Sahand IRDBC05-06-032-OMH-OMh-OMh-OMH-5MH	10.01
E94B10+	Gara Arpa / C-25041 IRDBC05-06-210-OMH-OMh-OMh-OMH-1MH	10.80
E94B3+	TOKAK/3/Zarjau/80-5151//GKOmega ICB05-1057-OAP-OMh-OMh-OMH-3MH	12.48
E94B20+	EFES32	8.12
E94B17+	Lignee131/3/4679/105//Yea168.4/4/Denmark IRBC05-06-235-OMH-OMh-OMh-OMH-2MH	11.25
E94B6+	Antares/Ky36-1294//Slrlcbh-0383/3/ Sahand IRDBC05-06-295-OMH-OMh-OMh-OMH-4MH	10.25
E94B11+	Yea168.4/Ywa605Yea206/ Dictoo IRDBC0506215-OMH -OMH-5MH	8.13

واریانس‌های ژنتیکی، فنوتیپی، محیطی و تعداد تکرارها است.

نوارهای مشخص و واضح آغازگرهای ISSR به صورت وجود (یک) و عدم وجود (صفر) امتیازدهی شدند. پارامترهای تنوع ژنتیکی نظیر هتروزیگوتی مورد انتظار ($H_e = 2pq$)، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، تعداد نوارها و درصد چندشکلی نوارها با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx v6.5 (Peakall and Smouse, 2012) و نسبت چندگانه مؤثر آغازگرها (EMR) بر اساس معادله

$$EMR = \frac{NP}{N} \times NP$$

ازای هر آغازگر؛ N تعداد کل نوارهای ایجاد شده) محاسبه و برآورد شدند. برای تعیین ارتباط ژنتیکی، ماتریس‌های تشابه ژنتیکی دایس، جاکارد و جفت‌های ساده با استفاده از نرم‌افزار NTSYS v2.1 ایجاد و با استفاده از ضریب همبستگی مانتل و روش Bootstrapping با ۱۰۰۰۰ نمونه‌برداری مجدد تصادفی بین هر یک از ضرایب تشابه و ماتریس کوفنتیک آن‌ها، ضریب جاکارد با بیشترین ضریب همبستگی ($r = 0.713$) انتخاب شد. درخت‌های نیبرجویینینگ و UPGMA با بوت‌استرپ ۱۰۰۰۰ با استفاده از نرم‌افزارهای DARwin6 و

XLSTAT ترسیم شدند و روش UPGMA به دلیل انطباق بیشتر گروه‌های تشکیل شده با شجره انتخاب شد. برای تعیین ارتباط احتمالی محتوای بتاگلوکان دانه با هر یک از نوارهای ISSR به منظور شناسایی نوارهای دارای اطلاعات، آزمون همبستگی ناپارامتری اسپیرمن، روش ناپارامتری کروسکال-والیس و تجزیه رگرسیون گام به گام با استفاده از نرم‌افزار SPSS v18 انجام شد. تجزیه رگرسیون گام به گام برای شناسایی نشانگرهایی که دارای بیشترین ارزش فنوتیپی بودند مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

تنوع محتوای بتاگلوکان دانه: محتوای بتاگلوکان، بین ۷/۲۱ (سرارود) تا ۱۲/۴۸ (E94B3) (درصد در حجم عصاره) متغیر بوده و میانگین آن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، برابر با ۱۰/۰۹ درصد برآورد شد.

DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Saghai-Maaroof *et al.*, 1984) با کمی تغییرات استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفوتومتری (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) مورد بررسی قرار گرفت و DNAهای جداسازی شده برای تجزیه با آغازگرهای ISSR به مقدار ۵۰ ng/μl رقیق شدند.

آغازگرهای ISSR: در این مطالعه، در مجموع از ۲۰ آغازگر ISSR (Arnau *et al.*, 2002; Hussein *et al.*, 2008) به صورت انفرادی یا ترکیبی استفاده شد (جدول ۲). واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۴/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی به‌عنوان الگو، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۱ میکرولیتر PCR بافر (10X) و ۰/۱ میکرولیتر Tag پلیمرز (۱۰ واحد به ازای یک میکرولیتر) و ۱/۲ میکرولیتر از هر آغازگر ISSR (۵ $\mu\text{mol}\mu\text{L}^{-1}$) انجام شد. واکنش PCR مطابق با برنامه 94°C به مدت ۳ دقیقه و متعاقباً ۳۵ چرخه با شرایط 94°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال (۵۹-۴۸ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه و سرانجام بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد تفکیک شده و تکرارپذیری قطعات در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه داده‌ها: به‌علت عدم صحت مفروضات تجزیه واریانس در مورد صفات محتوای بتاگلوکان دانه و تعداد دانه در سنبله، با روش BoxCox داده‌ها تبدیل و سپس تجزیه واریانس صفات فنوتیپی مورد مطالعه بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS18 انجام شد. وراثت‌پذیری عمومی برای صفات مطالعه بر اساس فرمول $H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \frac{\sigma_e^2}{R}}$ محاسبه شد.

در این فرمول به ترتیب σ_g^2 ، σ_p^2 ، σ_e^2 و R بیانگر

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Characteristics of studied ISSR primers

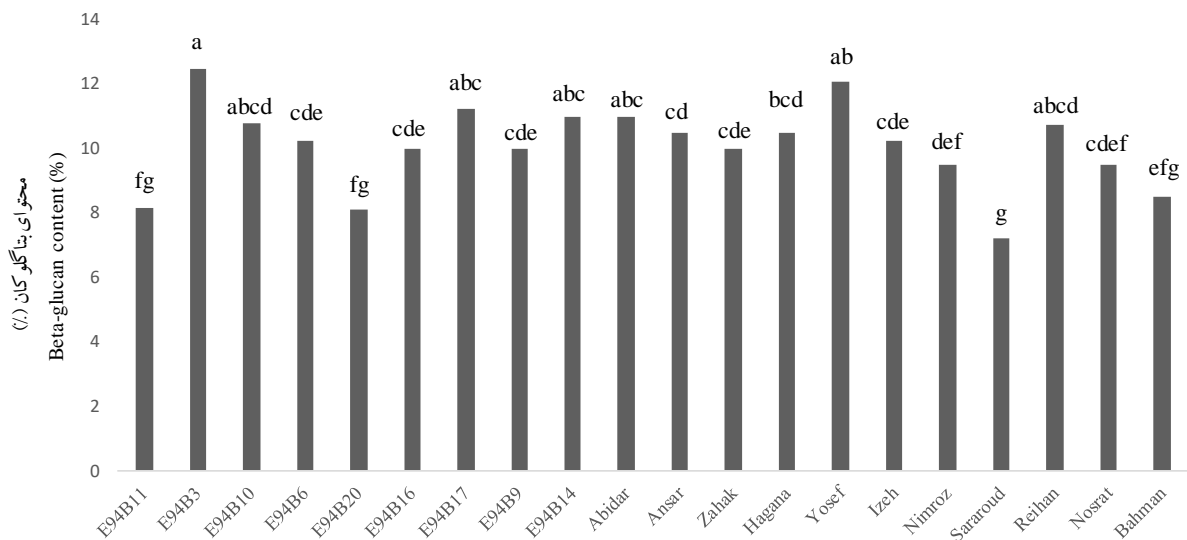
آغازگرها	توالی ۵' به ۳'	اندازه نوارها	دمای اتصال
Primers	5'→3' Sequence*	Bands size (bp)	Annealing temperature (°C)
IS-2	(CA) ₆ GG	400-2800	45
IS-7	(CT) ₈ AC	700-3000	48
IS-11	(GAG) ₃ GC	300-2000	56
ISSR-1	VBV-(AC) ₇	200-1700	59.3
ISSR-2	BDB-(CA) ₇	500-1700	59.3
ISSR-3	HBH-(CT) ₇	400-1700	54
ISSR-4	GCV-(TC) ₇	400-2000	57
ISSR-5	VCG--(TC) ₇	300-2800	58
ISSR-6	BDV-(AG) ₇	400-2000	55
ISSR1+IS11	—	400-1600	57.5
ISSR1+ISSR2	—	300-1900	59.3
IS2+IS7	—	300-1700	50
ISSR4+ISSR5	—	300-2000	57
ISSR4+IS11	—	200-1500	56
ISSR3+ISSR4	—	300-1700	55
ISSR1+ISSR3	—	400-1700	57
ISSR1+ISSR4	—	400-1700	59
IS7+ISSR5	—	300-2000	56
IS2+ISSR2	—	400-1600	50
IS7+ISSR1	—	400-1700	53.5

*V= هر نوع نوکلئوتید غیر از T؛ B: هر نوع نوکلئوتید غیر از A؛ H: هر نوع نوکلئوتید غیر از G و D: هر نوع نوکلئوتید غیر از C

*V= non T; B= non A; H= non G and D= non C

حداقل اختلاف‌های معنی‌دار محافظت شده (PLSD, ۰/۰۱)، مقایسه و بیشترین مقدار محتوای بتاگلوکان در ژنوتیپ‌های E94B3، یوسف و E94B17 محاسبه شد (جدول ۱، شکل ۱). ژنوتیپ‌های با محتوای بالای بتاگلوکان را می‌توان برای دورگ‌گیری و استفاده در برنامه‌های به‌نژادی پیشنهاد کرد. مقدار وراثت‌پذیری عمومی و ضریب تغییرات ژنتیکی برای صفت بتاگلوکان در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب برابر با ۸۸/۹۷ و ۱۶/۴۸ درصد برآورد شدند که نشان دهنده اهمیت ژنتیک در تبیین مقدار و محتوای بتاگلوکان در دانه جو است. مطابق با گزارش‌های پیشین، بیشتر ژن‌های کنترل کننده محتوای بتاگلوکان دانه جو دارای اثرهای غالبیت و یا افزایشی بوده و وراثت‌پذیری بالایی برای محتوای بتاگلوکان گزارش شده است (Zhang et al., 2002). درحالی‌که ژن‌های با اثرهای افزایشی، بیشتر در کنترل محتوای بتاگلوکان دانه جو دوسر (یولاف) نقش دارند (Asima Gazal et al., 2014). در این مطالعه، صفات فنوتیپی روز تا گلدهی، ارتفاع بوته، طول سنبله، تعداد دانه در سنبله و طول پدانکل بررسی شده و ارتباط آن‌ها با محتوای بتاگلوکان دانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه واریانس نشان داد تفاوت معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱)، بین ۲۰ ژنوتیپ جو از لحاظ محتوای بتاگلوکان وجود دارد. در پژوهش‌های دیگر نیز تنوع قابل‌ملاحظه‌ای برای محتوای بتاگلوکان برآورد و در بیشتر موارد دامنه تغییرات محتوای بتاگلوکان دانه در ارقام جو بین ۲ تا ۸ درصد گزارش شده است (Islamovic et al., 2013; Markovic et al., 2017)؛ اما در برخی مطالعات، دامنه تغییرات محتوای بتاگلوکان دانه بین ۳ تا ۱۶/۸ درصد (Ringsted et al., 2017) و یا کمتر از دو درصد و یا بیشتر از ۱۰ درصد تعیین شده است (Zhang et al., 2002). تغییر در محتوای بتاگلوکان دانه می‌تواند متأثر از ژنتیک، محیط (سال و مکان)، اثر متقابل ژنوتیپ و محیط و حتی روش‌های تجزیه محتوای بتاگلوکان باشد (Zhang et al., 2010; Griffy et al., 2002). تنوع در بین ژنوتیپ‌های جو از نظر محتوای بتاگلوکان امکان‌پذیر است؛ بنابراین، برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی و افزایش محتوای بتاگلوکان را فراهم می‌آورد و نتیجه‌گزینه ژنوتیپ‌هایی که دارای محتوای بتاگلوکان بالا هستند؛ بهبود کیفیت غذایی و بهبود ارقامی با مواد مغذی بیشتر خواهد بود. میانگین محتوای بتاگلوکان ژنوتیپ‌های جو با روش



شکل ۱- میانگین محتوای بتاگلوکان در ژنوتیپ‌های جو. مقایسه میانگین بر اساس حداقل اختلاف‌های معنی دار محافظت شده (PLSD) در سطح معنی داری ۰/۰۱ انجام شده است. حروف مشابه بر روی هر ستون، نشانگر عدم اختلاف معنی دار است.

Figure 1. Mean of beta-glucan content in barley genotypes. Mean comparison was performed based on protected least significant differences (PLSD) at the 0.01 significance level. Same letters on each column indicate a non-significant difference.

مطابق با نتیجه تجزیه واریانس مشخص شد که در بین ۲۰ ژنوتیپ جو مورد مطالعه، اختلاف معنی دار ($P < 0.001$) از نظر کلیه صفات فنوتیپی مورد بررسی وجود دارد. مقدار وراثت‌پذیری عمومی به ترتیب برای صفات روز تا گلدهی، ارتفاع بوته، طول سنبله، تعداد دانه در سنبله و طول پدانکل برابر با ۸۵/۰۳، ۸۲/۴۵، ۸۲/۴۵، ۹۰/۹۸ و ۸۶/۶۸ برآورد شد. به‌منظور ارزیابی ارتباط هر یک از صفات فنوتیپی مورد مطالعه با صفت محتوای بتاگلوکان دانه از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. مطابق با این آزمون، همبستگی هر یک از صفات فنوتیپی روز تا گلدهی (۰/۰۵۹)، ارتفاع بوته (۰/۳۵۸)، طول سنبله (۰/۰۸۷)، تعداد دانه در سنبله (۰/۴۴۲) و طول پدانکل غیر معنی دار ($P > 0.05$) برآورد شد که بیانگر عدم تأثیر هر یک از صفات مذکور بر تغییرات محتوای بتاگلوکان دانه است.

ارزیابی تنوع ژنتیکی: از مجموع ۲۰ نشانگر ISSR، ۱۹۲ نوار واضح و مشخص با متوسط تعداد نوارهای چندشکل برابر با ۶/۷ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه جو ایجاد شد. آغازگرهای ISSR1 دارای بیشترین تعداد نوار تکثیرشده (۱۵ نوار) و بیشترین درصد چندشکلی (۵) و IS7 دارای کمترین تعداد نوار چندشکل (۵ نوار) و کمترین درصد چندشکلی (۰) بودند. متوسط درصد نوارهای چندشکل برابر با ۶۹/۷۹ درصد برآورد شد. درصد بالای چندشکلی برآورد شده نشان دهنده قدرت نشانگرهای ISSR در آشکار کردن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های جو است. در مطالعات پیشین نیز به کارایی نشانگرهای ISSR در آشکار کردن تنوع ژنتیکی وسیع در بین ژنوتیپ‌های جو اشاره شده است (Rahimi et al., 2014; Drine et al., 2016; Fernandez et al., 2002). در این و همکاران (Drine et al., 2016)، با به‌کار بردن نشانگرهای ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های زراعی جو، درصد چندشکلی را برابر با ۷۲/۲ و متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برابر با ۰/۳۸ برآورد کردند. با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR برای مطالعه ۱۶ ژنوتیپ جو زراعی، درصد چندشکلی برابر با ۸۳ برآورد شد (Fernandez et al., 2002). همچنین، رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2014) با مطالعه ۲۶۶ ژنوتیپ وحشی جو (*Hordeum spontaneum*) و ۴۴ ژنوتیپ جو زراعی درصد چندشکلی را بیشتر از ۷۸ با

مطابق با نتیجه تجزیه واریانس مشخص شد که در بین ۲۰ ژنوتیپ جو مورد مطالعه، اختلاف معنی دار ($P < 0.001$) از نظر کلیه صفات فنوتیپی مورد بررسی وجود دارد. مقدار وراثت‌پذیری عمومی به ترتیب برای صفات روز تا گلدهی، ارتفاع بوته، طول سنبله، تعداد دانه در سنبله و طول پدانکل برابر با ۸۵/۰۳، ۸۲/۴۵، ۸۲/۴۵، ۹۰/۹۸ و ۸۶/۶۸ برآورد شد. به‌منظور ارزیابی ارتباط هر یک از صفات فنوتیپی مورد مطالعه با صفت محتوای بتاگلوکان دانه از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. مطابق با این آزمون، همبستگی هر یک از صفات فنوتیپی روز تا گلدهی (۰/۰۵۹)، ارتفاع بوته (۰/۳۵۸)، طول سنبله (۰/۰۸۷)، تعداد دانه در سنبله (۰/۴۴۲) و طول پدانکل غیر معنی دار ($P > 0.05$) برآورد شد که بیانگر عدم تأثیر هر یک از صفات مذکور بر تغییرات محتوای بتاگلوکان دانه است.

ارزیابی تنوع ژنتیکی: از مجموع ۲۰ نشانگر ISSR، ۱۹۲ نوار واضح و مشخص با متوسط تعداد نوارهای چندشکل برابر با ۶/۷ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه جو ایجاد شد. آغازگرهای ISSR1 دارای بیشترین تعداد نوار تکثیرشده (۱۵ نوار) و بیشترین درصد چندشکلی (۵) و IS7 دارای کمترین تعداد نوار چندشکل (۵ نوار) و کمترین درصد چندشکلی (۰) بودند. متوسط درصد نوارهای چندشکل برابر با ۶۹/۷۹ درصد برآورد شد. درصد بالای چندشکلی برآورد شده نشان دهنده قدرت نشانگرهای ISSR در آشکار کردن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های جو است. در مطالعات پیشین نیز به کارایی نشانگرهای ISSR در آشکار کردن تنوع ژنتیکی وسیع در بین ژنوتیپ‌های جو اشاره شده است (Rahimi et al., 2014; Drine et al., 2016; Fernandez et al., 2002). در این و همکاران (Drine et al., 2016)، با به‌کار بردن نشانگرهای ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های زراعی جو، درصد چندشکلی را برابر با ۷۲/۲ و متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برابر با ۰/۳۸ برآورد کردند. با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR برای مطالعه ۱۶ ژنوتیپ جو زراعی، درصد چندشکلی برابر با ۸۳ برآورد شد (Fernandez et al., 2002). همچنین، رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2014) با مطالعه ۲۶۶ ژنوتیپ وحشی جو (*Hordeum spontaneum*) و ۴۴ ژنوتیپ جو زراعی درصد چندشکلی را بیشتر از ۷۸ با

ژنوتیپ جو در دو گروه قرار گرفتند. تعیین نقطه برش دندروگرام و تعداد گروه‌ها بر اساس بیشترین واریانس بین گروه‌ها و مطابقت هر گروه با شجره ژنتیکی انجام گرفت. هشت لاین جو به همراه ارقام انصار، آبیدر و نیمروز گروه اول را تشکیل دادند و در گروه دوم، ارقام زهک، ایذه، یوسف، ریحان، بهمن به همراه لاین E94B20 دسته‌بندی شدند (شکل ۲). همه لاین‌ها و ارقام تشکیل دهنده گروه اول، جوهای دوردیفه و به‌استثنای رقم نیمروز دیم هستند. ژنوتیپ‌های تشکیل دهنده این گروه بیش از ۸۰ درصد با شجره ژنتیکی مطابقت داشتند. در دسته دوم، بیشتر ارقام شش‌ردیفه آبی غالباً با تیپ رشدی بهاره قرار گرفتند؛ همچنین گروه دوم، واجد لاین E94B20 دوردیفه و دیم با شجره ژنتیکی متفاوت نسبت به سایر لاین‌های مورد مطالعه بود. تطابقی بین افراد تشکیل دهنده گروه دوم با شجره ژنتیکی وجود نداشت. بیشتر ژنوتیپ‌های دسته‌بندی شده در گروه دوم، اگرچه از نظر تیپ رشدی و فرم سنبله مشابه بودند؛ اما دارای والدین یکسانی نبوده و این موضوع مجدداً تأیید کننده قدرت نشانگر ISSR در تمایز ژنوتیپ‌ها، به غیر از شجره بر اساس خصوصیات متفاوت دیگری، از جمله تیپ رشدی و یا صفات ریختاری است. در مطالعه حسینی و همکاران (Hosseini et al., 2017) نیز با استفاده از ترکیب آغازگرهای AFLP، ارقام یوسف، ایذه و همچنین ارقام بهمن و نیمروز همراه با هم در گروه‌های مشترکی قرار گرفتند. آرنو و همکاران (Arnaud et al., 2002)، نشان دادند که نشانگرهای ISSR دارای پتانسیل بالایی برای تفکیک بین ژنوتیپ‌ها بوده و از این نشانگرها می‌توان به‌طور بسیار کارآمدی برای دسته‌بندی و تمایز ژنوتیپ‌ها برحسب روابط خویشاوندی، منشأ جغرافیایی و یا خصوصیات مورفولوژیک بهره برد.

آغازگرهای دارای اطلاعات برای محتوای بتاگلوکان
دانه: تجزیه کارکردی به معنی تعیین همبستگی و ارتباط بین تنوع ژنتیکی نشانگرهای DNA و صفات فنوتیپی

متوسط PIC برابر با ۰/۸۵ برآورد کردند.

ژنوتیپ‌های هاگانا، ریحان و E94B20 به‌ترتیب برای آغازگرهای ISSR1 (۲۰۰ bp)، IS2 (۱۵۰۰ bp) و ترکیب آغازگرهای ISSR1+IS11 (۱۰۰۰ bp) و IS2+IS7 (۹۰۰ bp) دارای نوار بی‌همتا بودند. نوارهای بی‌همتا، امکان طراحی آغازگرهای SCAR مبتنی بر PCR را فراهم کرده که می‌توانند ابزار مناسبی برای گزینش به کمک نشانگر (MAS) در برنامه‌های اصلاحی باشند. مقدار شاخص‌های تنوع ژنتیکی (He)، شاخص تنوع شانون (I) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) به‌ترتیب برابر با ۰/۳۳، ۰/۴۹ و ۱۳/۰۷ برای آغازگر ISSR1 و کمترین مقدار این شاخص‌ها به‌ترتیب برابر با ۰/۱۶، ۰/۲۳ و ۰/۸ برای آغازگر IS7 محاسبه شدند. متوسط شاخص‌های I، He و EMR برای کل آغازگرها به‌ترتیب برابر با ۰/۲۵، ۰/۳۷ و ۴/۹۱ به‌دست آمد (جدول ۳). بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی، توسط آغازگرهای بارز ISSR غالباً برابر با ۰/۵ برآورد می‌شود؛ بنابراین، آغازگرهایی مانند ISSR1 و یا ترکیب آغازگرهای ISSR1+ISSR3 با توان ایجاد چندشکلی، تنوع ژنتیکی و نسبت چندگانه مؤثر بیشتر می‌توانند نشانگرهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی و تمایز کردن ژنوتیپ‌های جو باشند. در گیاهان خودباروری مانند جو، احتمال وجود هموزیگوتی و همسانی بین ژنوتیپ‌ها بیشتر بوده؛ با این وجود، نشانگرهای ISSR قادر به تمایز کردن این ژنوتیپ‌ها هستند. طراحی آغازگرهای ISSR بر مبنای توالی‌های تکراری ریزماهواره است که به فراوانی در ژنوم گیاهی یافت شده و می‌توانند مبنایی برای تمایز کردن و آشکار کردن تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی باشند.

بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های جو: بر اساس ضریب جاکارد، ارقام ایذه و زهک (۰/۷۷۹) و ارقام سرارود و هاگانا (۰/۵۳۵) به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار تشابه ژنتیکی بودند. در درخت UPGMA، رقم‌های سرارود، هاگانا و نصرت به‌طور مجزا و سایر ۱۷

کروسکال-والیس و همبستگی اسپیرمن استفاده شد. ژنوتیپ‌های جو برحسب درصد بتاگلوکان دسته‌بندی و اثر هر یک از آغازگرها به‌عنوان متغیر گروه‌بندی کننده مورد بررسی قرار گرفت. بر این اساس، ۹ آغازگر ISSR دارای اطلاعات شناسایی شدند (جدول ۴).

مانند محتوای بتاگلوکان دانه است؛ که بر اساس آن‌ها، روش‌های غربال قابل‌اعتماد و دقیق این صفات در برنامه‌های به‌نژادی فراهم می‌شود (Mirmohammadi, Maibody and Golkar, 2019).

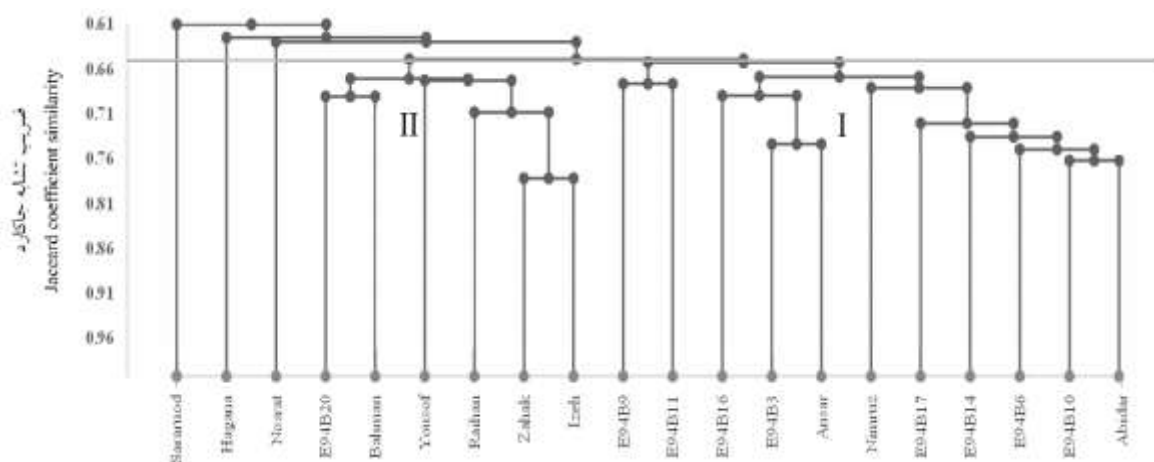
به‌منظور شناسایی آغازگرهای دارای اطلاعات ISSR برای محتوای بتاگلوکان دانه از آزمون‌های ناپارامتری

جدول ۳- شاخص‌های تعداد نوار تکثیر شده (TB)، تعداد نوارهای چندشکل در هر آغازگر (PB)، درصد چندشکلی (PP%)، تعداد نوارهای بی‌همتا (UB)، تنوع ژنتیکی (He)، شاخص شانون (I) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) برآورد شده برای ۲۰

آغازگر ISSR

Table 3. The estimated total number of amplified bands (TB), number of polymorphic bands per each primer (PB), percentage of polymorphism (PP%), number of unique bands (UB), genetic diversity (He), Shannon Index (I) and effective multiplex ratio (EMR) characters for 20 ISSR primers

Marker	TB	PB	PP%	UB	He	I	EMR
ISSR1	15	14	93.33	1	0.33	0.49	13.07
ISSR2	8	5	62.5	0	0.21	0.31	3.125
ISSR3	8	6	75	0	0.29	0.43	4.50
ISSR4	12	9	75	0	0.27	0.40	6.75
ISSR5	11	5	45.45	0	0.21	0.29	2.27
ISSR6	7	4	57.14	0	0.25	0.36	2.29
IS2	8	7	87.5	1	0.29	0.43	6.13
IS7	5	2	40	0	0.16	0.23	0.80
IS11	11	9	81.82	0	0.28	0.42	7.36
ISSR1+ISSR2	14	9	64.29	0	0.24	0.36	5.79
ISSR1+ISSR3	10	9	90	0	0.29	0.44	8.10
ISSR1+ISSR4	9	8	88.89	0	0.29	0.44	7.11
ISSR1+IS7	9	7	77.78	0	0.27	0.41	5.44
ISSR1+IS11	10	7	70	1	0.22	0.33	4.90
IS2+ISSR2	9	5	55.56	0	0.26	0.36	2.78
IS2+IS7	7	5	71.43	1	0.26	0.38	3.57
ISSR3+ISSR4	10	7	70	0	0.33	0.46	4.90
ISSR4+ISSR5	11	6	54.55	0	0.15	0.24	3.27
IS7+ISSR5	10	4	40	0	0.15	0.23	1.60
ISSR4+IS11	8	6	75	0	0.28	0.42	4.50



شکل ۲- دندروگرام UPGMA برای ۲۰ ژنوتیپ جو حاصل از ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد بر مبنای نشانگرهای ISSR
Figure 2. UPGMA dendrogram of the 20 barley genotypes obtained via Jaccard genetic similarity coefficient using ISSR markers

جدول ۴- آغازگرهای ISSR دارای اطلاعات برای محتوای بتاگلوکان در ژنوتیپ‌های جو

Table 4. Informative ISSR primers for beta-glucan content of barley grains

نشانه‌های دارای اطلاعات ISSR	اندازه نوار Band Size (bp)	کای دو Chi-square	درجه آزادی D.F	معنی‌داری تقریبی Asymptotic significance*	همبستگی اسپیرمن Spearman correlation*	ضریب تبیین Coefficient of determination
Effective ISSR markers						
ISSR4	1300	6.506	2	0.036	0.578*	0.243
ISSR5	1700	7.057	2	0.029	-0.552*	0.297
ISSR5	2800	6.075	2	0.048	-0.521*	0.280
ISSR6	700	6.654	2	0.036	-0.638**	0.424
IS2	900	6.274	2	0.043	-0.674**	0.366
ISSR1+ISSR4	1400	7.902	2	0.019	0.622**	0.422
ISSR4+ISSR5	300	8.916	2	0.012	0.594**	0.318
IS2+ISSR2	1300	7.069	2	0.029	-0.646**	0.293
IS2+ISSR2	1400	7.917	2	0.015	0.597**	0.402

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

* and **: Significance at the 5% and 1% probability levels, respectively

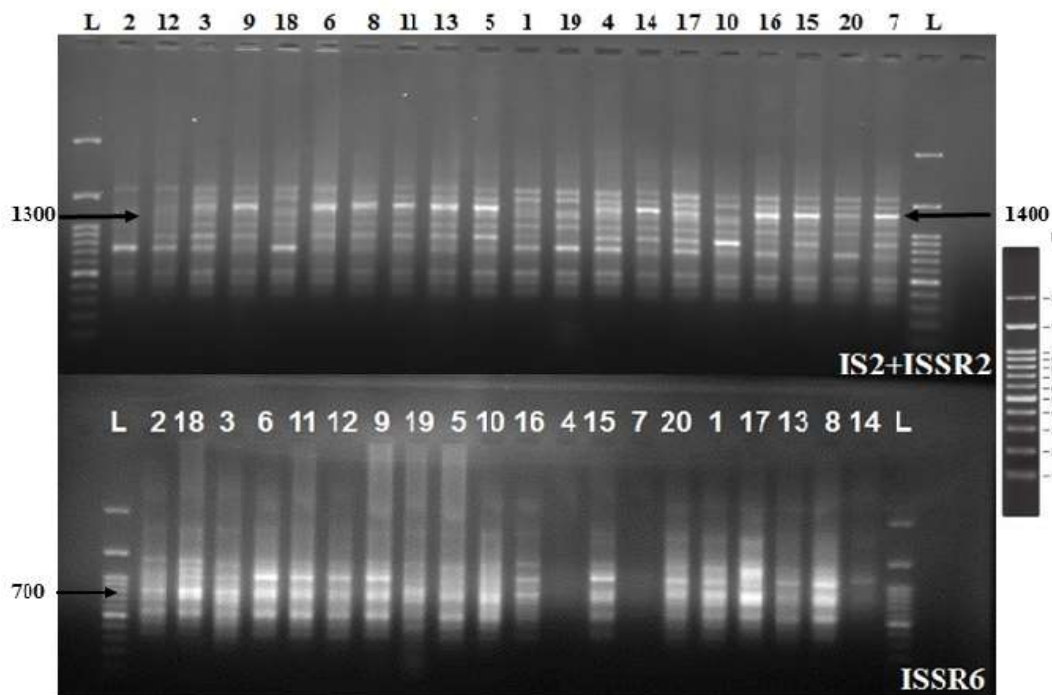
ارزشمند و دارای اطلاعات برای گزینش در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد. برای حصول اطمینان از کارایی و ارتباط این آغازگرها، باید در جمعیت‌های وسیع و با تعداد بیشتری از آغازگرها از روش‌های مکان‌یابی یا تجزیه ارتباطی بهره برد. از طرفی، می‌توان آغازگرهای مرتبط را توالی‌یابی کرده و از توالی‌های حاصل، آغازگرهای اختصاصی (SCAR) و کارآمدتری برای گزینش ژنوتیپ‌های با محتوای بتاگلوکان بالاتر طراحی کرد. ارتباط نشانگرهای DNA با محتوای بتاگلوکان دانه جو در مطالعات متعددی ارزیابی شده است (Li et al., 2008; Islamovic et al., 2013; Shu and Ramsassen, 2014). تاکنون از نشانگرهای ISSR برای ارزیابی ارتباط با محتوای بتاگلوکان در دانه جو استفاده نشده اما در مطالعات پیشین مشخص شده است که این نشانگرها با صفات مورفولوژیک، عملکرد و تنش شوری در جو (Khatib and Samah, 2013; Cheghamirza et al., 2017) و گندم (Khaled et al., 2015) مرتبط بوده‌اند. کنترل محتوای بتاگلوکان دانه در جو به‌صورت چندژنی بوده و توسط چندین QTL بر روی کروموزوم‌های 2H، 3H، 4H، 5H و 7H کنترل می‌شود. در بسیاری از مطالعات، مشخص شده جایگاهی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 7H (HVCsIF6) نزدیک به سانترومر دارای تأثیر بیشتری بر محتوای بتاگلوکان دانه جو بوده است (Li et al., 2008; Mohammadi et al., 2014).

بر اساس تجزیه رگرسیون گام به گام، آغازگر ISSR6 (bp) 700، ترکیب آغازگرهای ISSR1+ISSR4 (bp) 1400 و IS2+ISSR2 (bp) 1400 بیشترین تغییرات محتوای بتاگلوکان دانه به‌ترتیب برابر با ۴۲/۴، ۴۲/۲ و ۴۰/۲ درصد را تبیین کردند (جدول ۴). بر اساس آغازگرهای دارای اطلاعات ISSR، ارقام جو از هم متمایز شدند که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های جو از لحاظ محتوای بتاگلوکان و قدرت تفکیک این آغازگرهاست. نوارهای ISSR4 (bp) 1300، ترکیب آغازگرهای ISSR1+ISSR4 (bp) 1400، IS2+ISSR2 (bp) 1400 و SSR4+ISSR5 (bp) 300 در بسیاری از ژنوتیپ‌های با محتوای بتاگلوکان بالا از جمله یوسف، E94B3، E94B17، E94B14 و آیدر حضور داشتند (شکل ۳). درحالی‌که نوارهای ISSR6 (bp) 700، ISSR5 (bp) 1700، ISSR5 (bp) 2800، IS2 (bp) 900 و IS2 + ISSR2 (bp) 1300 در ژنوتیپ‌های سرارود، نصرت، E94B11، نیمروز با محتوای کمتر بتاگلوکان وجود داشتند (شکل ۳). آغازگرهایی که با مقادیر بالا و کمتر محتوای بتاگلوکان دانه مرتبط هستند؛ می‌توانند به‌طور مؤثری در شناسایی والدین با اختلاف ژنتیکی زیاد برای تهیه جمعیت‌های لازم برای مکان‌یابی و افزایش احتمال تفکیک متجاوز ژنتیکی مفید باشند. با توجه به اندک بودن تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه؛ می‌توان به‌طور محدود از این نشانگرهای مرتبط شناسایی شده به‌عنوان نشانگرهای

گزینش ژنوتیپ‌های با محتوای بتاگلوکان بیشتر را فراهم می‌آورد. ژنوتیپ‌های داری محتوای بتاگلوکان بالای جو از جمله یوسف، E94B3 و E94B17 می‌توانند منابع با ارزشی در برنامه‌های به‌نژادی و یا مکان‌یابی ژن‌ها باشند. در این مطالعه، تعدادی آغازگر دارای اطلاعات برای محتوای بتاگلوکان شناسایی شدند. شناسایی نشانگرهای مولکولی دارای اطلاعات برای صفات کمی مانند محتوای بتاگلوکان، ابزار مناسبی برای گزینش غیرمستقیم، ساده و کارآمد ژنوتیپ‌های گیاهی بوده و بنابراین، امکان توسعه سریع‌تر ژنوتیپ‌هایی با داشتن خصوصیات کیفی و مغذی مناسب همچون، محتوای بتاگلوکان برای تأمین سلامت انسان ایجاد می‌شود.

(CeSA)، ابرخانواده‌های ژنی مشابه سلولزسینتاز (CSL) و خانواده‌های ژنی مشابه گلوکان‌سینتاز (GSL) در سنتز بیشتر پلی‌ساکاریدهای با پیوستگی بتا در دیواره سلولی نقش دارند (Shu and Ramsassen, 2014). تنوع بین اعضای انفرادی خانواده‌های ژنی CSLF و CSLH و یا ژن‌های تنظیم کننده آن‌ها، تعیین کننده فراوانی نسبی و ساختار بتاگلوکان در دانه هستند (Houston *et al.*, 2014).

نشانگر مولکولی ISSR، تنوع ژنتیکی بالایی را در بین ژنوتیپ‌های جو آشکار کرد و از طرفی، تنوع معنی‌داری از لحاظ محتوای بتاگلوکان در بین ژنوتیپ‌های جو وجود داشت؛ بنابراین، تنوع ژنتیکی کافی در بین ژنوتیپ‌های جو از لحاظ محتوای بتاگلوکان دانه وجود دارد که امکان



شکل ۳- الگوی نواری آغازگرهای ISSR6 و ترکیب IS2+ISSR2 در ۲۰ رقم جو به‌ترتیب شامل ژنوتیپ‌های ۱: زهک؛ ۲: هاگانا؛ ۳: ایزه؛ ۴: یوسف؛ ۵: E94B16؛ ۶: E94B14؛ ۷: E94B9؛ ۸: E94B10؛ ۹: E94B3؛ ۱۰: E94B20؛ ۱۱: انصار؛ ۱۲: E94B17؛ ۱۳: آبیدر؛ ۱۴: E94B6؛ ۱۵: E94B11؛ ۱۶: ریحان؛ ۱۷: نیمروز؛ ۱۸: سرارود؛ ۱۹: بهمن؛ ۲۰: نصرت. فلش‌ها مشخص کننده نوارهای دارای اطلاعات یا مرتبط با مقادیر بالا (۱۴۰۰ bp) و مقادیر پایین (۷۰۰ و ۱۳۰۰ bp) محتوای بتاگلوکان دانه هستند.

Figure 3. Banding pattern of ISSR6 and IS2+ISSR2 primers in 20 barley genotypes. 1: Zahak; 2: Hagana; 3: Izeh; 4: Yosef; 5: E94B16; 6: E94B3; 7: E94B9; 8: E94B10; 9: E94B3; 10: E94B20; 11: Ansar; 12: E94B17; 13: Abidar; 14: E94B6; 15: E94B11; 16: Reyhan; 17: Nimrooz; 18: Sararood; 19: Bahman; 20: Nosrat. The arrows show informative bands related to high (1400bp) and low (1300 and 700 bp) contents of seed's beta-glucan, respectively.

References

- Arnau, G., Lallemand, J. and Bourgoïn, M.** (2002). Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica*, **129**: 69-79.
- Asima Gazal, Z.A., Zaffar, D., Lone, I., Abidi, A.S. and Khan, N.Y.** (2014). Trends in breeding oat for nutritional grain quality. *Journal of Applied and Natural Science*, **6(2)**: 904-912
- Baik, B.K., and Ullrich, S.E.** (2008). Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, **48**: 233-242.
- Bourton, R.A., Jobling, S.A., Harvey, A.J., Shirley, N.J., Mather, D.E., Bacic, A. and Fincher, G.B.** (2008). The genetics and transcriptional profiles of the cellulose synthase- like HvCSLF gene family in barley. *Plant Physiology*, **146**: 1821-1833.
- Bourton, R.A., Wilson, S.M., Hrmva, M., Harvey, A.J., Shirley, N.J., Medhurst, A., Stone, B.A., Newbigin, E.J., Bacic, A. and Fincher, G.B.** (2006). Cellulose synthase-like CslF genes mediate the synthesis of cell wall (1,3; 1,4)- β - D-glucans. *Science*, **311**: 1940-1942.
- Cheghamirza, K., Zarei, L., Zebarjadi, A.R. and Jalali Honarmand, S.** (2017). A study of the association between ISSR and RAPD markers and some agronomic traits in barley using a multiple regression analysis. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Biotechnology*, **98(1)**: 33-40.
- Drine, S., Guasmi, F., Ben Ali, S., Triki, T., Boussorra, F. and 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*, **34(2)**: 1930-1939.
- Fernandez, M.E., Figueiras, C. and Benito, C.** (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 845-851.
- Griffy, C., Brooks, W., Kurantz, M., Thomason, W., Taylor, F., Obert, D., Moreau, R., Flores, R., Sohn, M. and Hicks, K.** (2010). Grain composition of Virginia winter barley and implications for use in feed, food, and biofuels production. *Journal of Cereal Science*, **51**: 41-49.
- Havrlentova, M. and Kraic, J.** (2006). Content of β -glucan in cereal grains. *Journal of Food and Nutrition Research*, **45(3)**: 97-103.
- Henry, R.J.** (1986). Genetic and environmental variation in the pentosan and β - glucan contents of barley and their relation to malting quality. *Journal of Cereal Science*, **4**: 269-277.
- Hosseini, M., Ghorbanli, M., Sabouri, H., Dadras, A.R., Sattarian, A. and Fallahian, H.A.** (2017). Investigation the genetic diversity in some of cultivated and wild barley. *Cereal Research*, **6(4)**: 533-544 (In Persian).
- Houston, K., Russel, J., Schreiber, M., Halpin, C., Oakey, H., Washington, J.M., Booth, A., Shirley, N., Burton, R.A., Fincher, G. and Waugh, R.** (2014). A genome wide association scan for (1,3 ;1,4)- β -glucan content in the grain of contemporary 2-row spring and winter barleys. *BMC Genomics*, **15**: 907.
- Hussein, T.S., Tawfik, A.A. and Khalifa, M.A.** (2008). Molecular identification and genetic relationships of six strawberry varieties using ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Biology*, **10**: 677-680.

- Islamovic, E., Obert, D.E., Oliver, R.E., Harrison, S.A., Ibrahim, A., Marshall, J.M., Miclaus, K.J., Hu, G. and Jackson, E.W.** (2013). Genetic dissection of grain beta-glucan and amylose content in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Molecular Breeding*, **31**: 15-25.
- Khaled, A.G.A., Motawea, M.H. and Said, A.A.** (2015). Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought condition. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **13**: 243-252.
- Khatab, I.A. and Samah, M.A.** (2013). Development of agronomical and molecular genetic markers associated with salt stress tolerance in some barley genotypes. *Current Research Journal of Biological Sciences*, **5(5)**: 198-204.
- Li, J., Baga, M., Rossnagel, B.C., Legge, W.G. and Chibbar, R.N.** (2008). Identification of quantitative trait loci for β -glucan concentration in barley. *Journal of Cereal Science*, **48(3)**: 647-655.
- Markovic, S.M., Dukic, N.H., Knezevic, D. and Lekovic, S.V.** (2017). Divergence of barley and oat varieties according to their content of β -glucan. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **82(4)**: 379-788.
- McCleary, B.V. and Glennie-Holmes, M.** (1985). Enzymic quantification of (1-3)(1-4)- β -D-glucan in barley and malt. *Journal of Institute Brewing*, **91**: 285-295.
- Mirmohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P.** (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 1-30 (In Persian).
- Mohammadi, M., Endelman, J.B., Nair, S., Chao, S., Jones, S.S., Muehlbauer, G.J., Ullrich, S.E., Baik, B.K., Wise, M.L. and Smith, K.P.** (2014). Association mapping of grain hardness, polyphenol oxidase, total phenolics, amylose content and β -glucan in US barley breeding germplasm. *Molecular Breeding*, **34**: 1229-1243.
- Morgan, A.G. and Riggs, T.J.** (1981). Effects of drought on yields, on grain, and on malt characters in spring barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **22**: 339-46.
- Peakall, R. and Smouse, P.E.** (2012). Genalex 6.5. Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, an update. *Bioinformatics*, **28**: 2537.
- Rahimi, M., Majidi Hervan, I., Valizadeh, M., Darvish Kajori, F. and Ebrahimpour, F.** (2014). Genetic diversity among wild and cultivated barley by ISSR marker. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, **3(10)**: 57-62.
- Ramazani, S.H.R. and Abdipour, M.** (2018). Statistical analysis of grain yield in Iranian cultivars of barley (*Hordeum vulgare*). *Agricultural Research*, **8**: 239-246.
- Ringsted, T., Ramsay, J., Jespersen, B.M., Keiding, S.R. and Engelsen, S.B.** (2017). Long wavelength near-infrared transmission spectroscopy of barley seeds using a supercontinuum laser: Prediction of mixed-linkage betaglucan content. *Analytica Chimica Acta*, **986**: 101-108.
- Saghai-Maarroof, M.A., Soleiman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W.** (1984). Ribosomal spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**: 8014-8018.
- Shu, X. and Ramussen, S.K.** (2014). Quantification of amylose, amylopectin, and β -glucan in search for genes controlling the three major quality traits in barley by genome-wide association studies. *Frontiers in Plant Science*, **5**: 197.
- Sofi, S.A., Singh, J. and Rafiq, S.** (2017). β -glucan and functionality: A review. *Ecronicon Nutrition*, **10(2)**: 67-74.

Yalcin, E., Celik, S., Akar, T., Sayim, I. and Koksel, H. (2007). Effects of genotype and environment on β -glucan and dietary fiber contents of hull-less barleys grown in Turkey. *Food Chemistry*, **101**: 171-176.

Zhang, G., Janmei, W. and Jinxin, C. (2002). Analysis of β -glucan content in barley cultivars from different locations of China. *Food Chemistry*, **79**: 251-254.

Assessment of Diversity in Barley Genotypes (*Hordeum vulgare* L) Based on Beta-Glucan Content and ISSR Markers

Raheleh Aziznia¹, Hedieh Badakhshan^{2,*}, Taimoor Javadi³ and Soma Zamani²

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

(Received: October 8, 2019 – Accepted: January 19, 2020)

Abstract

In this study, variation of beta-glucan content was assessed in 20 barley line and cultivars based on complete block design with three replications. Genetic diversity of these genotypes was also evaluated using ISSR markers. Beta-glucan extracted by an enzymatic method. Significant differences were found at the level of 1% among barley genotypes for beta-glucan content. The beta glucan content was variable from 7.21 to 12.48 and, the Yosef, E94B3 and E94B17 genotypes hold the highest content of the beta-glucan. ISSR primers with average polymorphism of 66.79%, genetic diversity of 0.25 and Shannon index of 0.37 were determined as efficient markers for studying genetic diversity. The barley lines and cultivars were assigned in two distinct groups according to their genetic pedigree. On the basis of non-parametric Kruskal-Wallis, Spearman correlation, and stepwise regression analysis, nine informative primers were detected explaining highest seed's beta-glucan content variations ranging from 24.3 to 42.4 percent. The ISSR6 (700), the combination of ISSR1+ISSR4 (1400) and IS2+ISSR2 (1400) primers were the most informative primers for the beta-glucan content. The informative markers provide possible functional and efficient marker based selection method and, screening the barley germplasms for the highest beta-glucan content.

Keywords: Barley, Beta-glucan, Informative markers, Kruskal-Wallis, Stepwise regression

* Corresponding Author, E-mail: h.badakhshan@uok.ac.ir