

## **Genetic diversity of backcross families derived from crossing between cultivated and wild barley using molecular markers**

**Farzane Karamzade** 

\*Corresponding author. MSc Graduated, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail: Farzaneh.karamzadeh69@gmail.com

**Ahmad Arzani** 

Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail: a\_arzani@cc.iut.ac.ir

**Seyed Ali Mohammad Mirmohammady-Maibody**

Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail: maibody@cc.iut.ac.ir

**Fateme Ebrahim** 

Phd Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. E-mail: Ebrahim Fateme@gmail.com

---

### ***Abstract***

#### **Objective**

Plant genetic variation, during the long-term domestication of the cultivated barley, especially after the modern breeding and intensive cultivation, reduced significantly, leading to genetic erosion in this crop as well. Wild relatives of cultivated barley are potential source of valuable genetic materials for barley improvement. Genetic variation of wild species belonging to primary gene pool of barley is important in employing in barley breeding program, particularly for tolerance to biotic and abiotic stresses. Being a close relative of wild species (*H. spontaneum* L.)

and the lack of tolerance genes among the cultivated genotypes of barley makes gene introgression the appropriate avenue to transfer desired genes such as abiotic stress tolerance.

### Materials and methods

In this research a backcross populations (BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>) developed from interspecific hybridization between cultivated barley and its wild relative (*H. spontaneum* L.) was assessed for genetic diversity using molecular markers which are valuable to assist background selection for recurrent parent.

### Results

Arlquin and POPGENE softwares were used to analyze genetic diversity and molecular variance (AMOVA) among populations, respectively. G<sub>st</sub> and N<sub>m</sub> parameters had an average of 0.59 and 0.34, respectively, indicating a low gene flow among nine groups of backcross families. The AMOVA results showed that majority of genetic diversity belonged to within population variation (86.48%). Nei's genetic similarity ranged from 0.41 to 0.92 which were consistent with those of genetic distance

### Conclusions

Microsatellite markers have strong differentiation ability to discriminate the resultant genotypes from a bi-parental cross.

**Keywords:** Genetic variation, Backcross population, Molecular marker, Structure.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Karamzade F, Arzani A, Mirmohammady-Maibody S. A.M, Ebrahim F (2021) Genetic diversity of backcross families derived from crossing between cultivated and wild barley using molecular markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 131-154.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (3), 131-154. DOI: 10.22103/jab.2021.15802.1232

Received: July 23, 2021.

Accepted: August 25, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors


## تنوع ژنتیکی فامیل‌های تلاقی برگشتی حاصل از تلاقی جو زراعی و وحشی با نشانگرهای

### مولکولی

فرزانه کرم زاده 

\* نویسنده مسئول، دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان،

اصفهان، ایران. رایانامه: Farzaneh.karamzadeh69@gmail.com

احمد ارزانی 


استاد گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه:

a\_arzani@cc.iut.ac.ir

سیدعلی محمد میرمحمدی میدی

استاد گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه:

maibody@cc.iut.ac.ir

فاطمه ابراهیم 

دانشجوی دکترا گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران. رایانامه: Ebrahim

Fateme@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱

### چکیده

**هدف:** تنوع ژنتیکی در گیاهان در طی مدت طولانی اهلی شدن جو زراعی، بویژه پس از استفاده از روش‌های اصلاحی مدرن و کشت فشرده، به میزان قابل توجهی کاهش یافته و معضل فرسایش ژنتیکی در این گیاه مطرح می‌باشد. خویشاوندان وحشی جو زراعی دارای مواد ژنتیکی با ارزش برای اصلاح جو هستند. تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی متعلق به خزانه ژنی اولیه جو در بکارگیری برنامه‌های اصلاحی جو به خصوص برای تحمل در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده حائز اهمیت بسیاری است. با توجه به قرابت گونه وحشی (*Hordeum. spontaneum* L.) با گونه زراعی و عدم اقبال در یافتن ژن‌های مقاومت در گونه زراعی، اینترگرسیون ژنی راه حلی مناسب برای انتقال ژن‌های مطلوب است.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تنوع ژنتیکی جمعیت تلاقی برگشتی حاصل از تلاقی بین گونه‌ای جو زراعی و وحشی با استفاده از نشانگرهای مولکولی که در تسریع انتخاب برای سهم بیشتر والد دوره‌ای در روند تلاقی برگشتی مفید است، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ارزیابی شده است.

**نتایج:** برای بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) در بین ۱۴۲ فامیل حاصل از تلاقی برگشتی، به ترتیب از دو نرم‌افزار POPGENE و ARIQUIN استفاده شد. میانگین شاخص‌های Gst و Nm که نشان‌دهنده میزان تفرق ژنی و جریان ژنی بین گروه‌ها است به ترتیب معادل ۰/۵۹ و ۰/۳۴ بود، که بیانگر یک تبادل ژنی پایین بین ۹ گروه حاصل از تلاقی برگشتی بوده است. تجزیه واریانس مولکولی گروه‌ها نشان داد که عمده تنوع ژنتیکی ۸۶/۵ شناسایی شده مربوط به درون گروه‌ها بوده است. داده‌های حاصل از تشابه ژنتیکی نی در دامنه‌ای از ۰/۹۲-۰/۴۱ قرار گرفتند، که با نتایج فاصله ژنتیکی تطابق داشت. تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTRE جمعیت را به پنج گروه با تعداد ۴۰، ۲۲، ۲۷، ۲۰ و ۳۵ فامیل برای هر گروه تقسیم کرد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشانگرهای SSR جهت افزایش کارایی برنامه‌های انتقال ژن از گونه‌های خویشاوند جو به منظور اصلاح جو به‌ویژه برای تحمل تنش‌های زنده و غیرزنده دارای پتانسیل ارزشمندی هستند.

**کلیدواژه‌ها:** تنوع ژنتیکی، جمعیت تلاقی برگشتی، نشانگر مولکولی، نرم‌افزار استراکچر.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** کرم زاده فرزانه، ارزانی احمد، میرمحمدی میبدی سیدعلی محمد، ابراهیم فاطمه (۱۴۰۰) تنوع ژنتیکی فامیل‌های تلاقی برگشتی حاصل از تلاقی جو زراعی و وحشی با نشانگرهای مولکولی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۳)، ۱۵۴-۱۳۱.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) یکی از غلات مهم در سراسر جهان است که با افزایش تقاضا برای تولید آن مواجه است. افزون بر اهمیت اقتصادی، ژنوم جو (در حدود ۵/۱ میلیارد جفت باز) مدل مهمی برای بررسی‌های ژنتیکی به شمار می‌رود، زیرا گیاهی است خودگشن، دیپلوئید با تعداد کروموزوم کم ( $2n=2x=14$ ) و به نسبت بزرگ (۸-۶ میکرومتر) و همچنین دورگ‌گیری در آن آسان است (Liu et al. 2020). تنوع ژنتیکی پایه و اساس اصلاح گیاهان است که از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهم‌ترین جز در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است که سازگاری درازمدت و بقای جمعیت گیاهی را تضمین می‌کند (Ali et al.).

2020). ارزیابی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی ژرمپلاسم برای انتخاب والدین مناسب و نیز اعمال روش‌های گزینشی مطلوب گام اول در اغلب برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. در سال‌های اخیر به لحاظ کاربرد ارقام اصلاح شده و یکنواختی کشت، تنوع ژنتیکی گیاهان مختلف در معرض خطر قرار گرفته است. به همین لحاظ ارقام بومی به دلیل تطابق و سازگاری با شرایط محیطی مختلف، ذخایر ژنتیکی با ارزشی برای تقویت تنوع ژرمپلاسم اصلاحی و نیز منابع بالقوه برای ژن‌های مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد (Arzani & Ashraf, 2016). بنابراین اهمیت جمع‌آوری، نگهداری و ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های وحشی بسیار زیاد است (Petkovski, 2018).

بیوتکنولوژی مدرن به دنبال استفاده گسترده‌تر از تنوع ژنتیکی می‌باشد تا با استفاده از ویژگی‌های مناسب در گونه‌های وحشی، به اصلاح گیاهان زراعی بپردازد (Volk & Byrne, 2020). جو وحشی (*H. vulgare ssp. spontaneum* Koch) دارای خزانه ژنی قوی و کروموزوم‌های همولوگ (HH) با جو زراعی است (Liu et al. 2020)، به طوری که تلاقی‌پذیری کاملی با گونه زراعی دارد. با توجه به جنبه‌های مشترک این گونه وحشی با گونه زراعی، در طی ده‌های اخیر به‌عنوان زیرگونه *H. vulgare* (نه گونه جداگانه) در طبقه‌بندی گیاهشناسی در نظر گرفته می‌شود. گونه اسپانتانئوم از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است از این رو منبع ژرمپلاسم مهمی برای انتقال ژن‌های مفید به جو زراعی محسوب می‌شود (Liu et al. 2020). در سال‌های اخیر، روش‌های ژنتیک مولکولی با استفاده از چند شکلی DNA به طور فزاینده‌ای برای تعیین مشخصه و شناسایی ژرمپلاسم جدید به‌منظور بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاحی گیاهان استفاده شده‌اند. در این راستا، نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی را در اختیار متخصصین قرار داده‌اند (Abbasov et al. 2019). نوع روش مولکولی مورد استفاده برای سنجش فواصل ژنتیکی در ژنوتیپ‌های گیاهی به میزان تفاوت‌های ژنتیکی در حال ارزیابی، وابسته است (Zhang et al. 2014). همچنین، استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و جانداران حفاظت شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است. میزان چندشکلی به‌دست‌آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها است (Vajed Ebrahimi et al. 2017a). در این میان، ریزماهورها به سبب برتری‌هایی که دارند، برای مطالعات ژنتیک جمعیت نسبت به سایر نشانگرها ارجح هستند (Vajed Ebrahimi et al. 2017b). انجمن‌های بین‌المللی ریزماهورها را به‌عنوان بهترین نشانگر جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌ها معرفی کرده است (Mohammadifar and Mohammadabadi 2011; Vajed Ebrahimi et al. 2016). در دهه‌های اخیر ریزماهورها یکی از عمومی‌ترین نشانگرهای مولکولی بوده‌اند که در زمینه‌های مختلف به کار رفته‌اند. ریزماهورها ردیف‌های کوتاه تکراری پیاپی<sup>۱</sup> به طول کمتر از ۶ عدد نوکلئوتید همانند (GT)، (AT)، (ATT) و یا (GACA) هستند که در سرتاسر ژنوم یوکاریوت‌ها پخش شده‌اند (Kashyap et al. 2020). نشانگرهای ریزماهورها به علت پوشش ژنومی مناسب، چند شکلی بالا، تکرارپذیری مناسب،

<sup>1</sup>. simple sequence repeat

توارث‌پذیری، هم‌بارز بودن و فراوانی بالا در گیاهان، نشانگرهای ایده‌آلی برای دامنه وسیعی از کاربردها از جمله تهیه نقشه ژنتیکی، گزینش بر پایه نشانگر، مطالعات ژنتیکی و تکاملی جمعیت، انگشت‌نگاری، مطالعات تنوع ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌نامه و آنالیز QTL ها هستند (AIELLO et al. 2020 ; Sharma et al. 2002). جو وحشی *H. spontaneum* جد جو زراعی است. مرکز تنوع آن در هلال حاصلخیز<sup>۲</sup> در خاور میانه است، جایی که جو وحشی تحت شرایط وسیعی از شرایط محیطی و آب و هوایی رشد می‌کند. جو وحشی ژن‌های مهم را که می‌تواند برای بهبود ارقام زراعی استفاده شود، در اختیار قرار دهد. در پژوهش Shakhathreh et al. (2016) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، ۱۰۳ ژنوتیپ جو وحشی، جمع‌آوری شده از مناطق مختلف اردن همراه با ۲۹ ژنوتیپ جو زراعی با استفاده از توالی‌های تکراری ساده (SSR) مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. مطالعات Von Kor et al. (2006) نشان داد که جو *H. spontaneum* واجد آل‌های ارزشمندی است که می‌تواند پایه ژنتیکی جو زراعی را غنی سازد و صفات زراعی کمی را بهبود بخشد. در پژوهشی Vanhala et al. (2004) به بررسی تنوع ژنتیکی و فنوتیپی موجود در ذخایر ژنی *H. spontaneum* پرداختند و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جو وحشی بومی اقلیم‌های مختلف را برآورد کردند. نتایج برآورد فاصله ژنتیکی و فنوتیپی حاکی از آن بود که تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌ها، بزرگتر از تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها است در حالی که تنوع فنوتیپی داخل جمعیت‌ها بزرگتر از تنوع فنوتیپی بین جمعیت‌ها بوده است. با توجه به اینکه جو گیاهی خودگشن هست، بنابراین همین انتظار هم می‌رود که تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها بیشتر باشد. اما دلیل بیشتر بودن تنوع فنوتیپی درون جمعیت‌ها (بر خلاف روند تنوع ژنتیکی) را در مطالعه Vanhala et al. (2004) می‌توان به بیشتر بودن تنوع محیطی درون جمعیت نسبت به تنوع بین جمعیت نسبت داد. بررسی تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسما) جو برزیل با استفاده از نشانگرهای SSR نشان داد، تعداد آل‌های موجود در ذخایر توارثی سال ۱۹۸۰ بسیار بیشتر بوده است و اغلب رقم‌های آزاد شده پس از سال ۱۹۸۰ ظرفیت اطلاعات چندشکلی<sup>۳</sup> پایینی نسبت به رقم‌های قدیمی‌تر نشان می‌دهند (Ferreira et al. 2016).

تنوع ژنتیکی زیاد موجود در جوامع در حال تفرق بویژه حاصل از تنوع بین‌گونه‌ای امکان گزینش برای ژنوتیپ‌های دارای صفات ترکیبی هر دو والد را فراهم می‌سازد. علی‌رغم مطالعاتی که در گذشته در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی در جو صورت گرفته است، توجه اندکی به ژرم‌پلاسما ایرانی بویژه جوهای وحشی شده است. این درحالی است که استفاده از نمونه‌های ایرانی در تلاقی‌ها و برنامه اصلاحی کشور به دلیل سازگاری با شرایط آب و هوایی ایران نتایج مطلوب‌تری در پی خواهد داشت. بنابراین در این پژوهش از نشانگرهای SSR و EST-SSR استفاده و تنوع ژنتیکی ۱۴۲ نتاج حاصل از تلاقی برگشتی رقم زراعی ریحان ۰۳ با یک ژنوتیپ وحشی متعلق به گونه *H. spontaneum* (BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>) به همراه والدین (جمعاً ۱۴۴) بررسی شد.

<sup>2</sup>. Fertile crescent

<sup>3</sup>. polymorphism information content (PIC)

## مواد و روش‌ها

ژرم پلاسما جو وحشی از غرب ایران جمع‌آوری شد و از هر ناحیه یک بوته را برداشت نموده و سپس آنها را تکثیر کرده. بنابراین هر کدام از نمونه‌های جمع‌آوری شده یک لاین خالص (pure line) بوده‌اند. در مطالعات قبلی متحمل‌ترین ژنوتیپ جو وحشی از ژرم پلاسما نسبت به تنش شوری شناسایی شده و سپس با با والد دوره‌ای (رقم ریحان ۰۳) تلاقی داده شد. در این مطالعه نسل BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> مورد استفاده قرار گرفت که حاوی ۱۴۲ نتاج حاصل از تلاقی رقم جو زراعی ریحان ۰۳ با جو وحشی اسپانتانوم (BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>) به همراه والدین (جمعاً ۱۴۴ فامیل) استفاده شد (شماره ۱۴۳ مربوط به والد زراعی و شماره ۱۴۴ مربوط به والد وحشی است و سایر شماره‌ها (۱ تا ۱۴۲) به فامیل‌های تلاقی برگشتی اختصاص دارد). جو وحشی *H. vulgare ssp. spontaneum* دو ردیفه بوده و در مقایسه با جو اهلی، این گونه وحشی دارای برگ‌های باریک‌تر، بذرهای کمی کوچک‌تر، ساقه‌ها و ریشه‌های بلندتر و محور سنبله شکننده در زمان برداشت است. تفاوت اصلی جو وحشی و اهلی، در شکننده نبودن محور سنبله، وزن بیشتر بذر و وجود سنبله شش ردیفه و دانه‌های برهنه در گونه‌های اهلی است. همچنین رقم ریحان ۰۳ دارای عملکرد بالا، مناسب در شرایط معتدل و معتدل گرم دارای تیپ رشد بهاره و تیپ رسیدگی زودرس و مناسب کشت مناطق خشک و نسبت به بیماری لکه نواری و لکه برگی نیمه مقاوم است (Shahmoradi et al. 2013). بذور فامیل‌ها در گلخانه تحقیقاتی واقع در دانشگاه صنعتی اصفهان درون گلدان‌هایی به قطر ۲۵ سانتیمتر و عمق ۲۰ سانتیمتر کشت (خاک مورد استفاده برای این تحقیق ترکیبی از خاک زراعی و ما سه به نسبت ۱:۲ بود) و نمونه‌های برگی جوان و تازه از هر فامیل بدون داشتن علائم بیماری و بافت‌های نکروزه در مرحله چند برگی برداشت شدند.

استخراج DNA ژنومی به روش CTAB صورت پذیرفت. برای تعیین کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتوفتومتر Nanodrop (NB80 NPOS 3.0 build 12984) استفاده شد. بر اساس گزارش‌های Zhang et al. (2014)، Maniruzzaman et al. (2014) و Jo et al. (2017) در این مطالعه ۱۸ نشانگر ریزماهواره اختصاصی جو انتخاب و از شرکت متابیون آلمان<sup>۴</sup> تهیه شدند. همچنین از ۲۴ نشانگر گندم در این مطالعه استفاده شد. در مجموع تعداد ۲۹ نشانگر SSR و ۱۳ نشانگر EST-SSR بکار رفت. انتخاب آغازگرها براساس توزیع بر روی کل ژنوم، قرار گیری آن‌ها در بخش‌های مختلف هر کروموزوم، محتوای اطلاعات چند شکل، در صد تنوع ژنتیکی ایجاد شده در آن‌ها صورت گرفت. در نهایت آغازگرها به نسبت ۹:۱ رقیق شده و مورد استفاده قرار گرفتند. برای رقیق سازی آغازگرها، ۱۰ میکرولیتر آغازگر با ۹۰ میکرولیتر آب مقطر استریل ترکیب گردید و غلظت آغازگر پس از رقیق‌سازی ۱۰ pmol/μl بود.

اجزای واکنش PCR برای حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ ng/μl، ۶/۲۵ میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر آغازگر و ۴/۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر<sup>۵</sup> Bio-Rad مدل

4. German Metabion Company

5. Thermocycler

580BR 08334 صورت گرفت. هر چرخه PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ ثانیه چرخه و اسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، زمان اتصال آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه در دمای اتصال بهینه برای هر آغازگر و مرحله بسط به مدت ۱ دقیقه و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها، محصول PCR به چاهک ژل آگارز ۱/۲ درصد و ژل آکریلامید ۱۲ درصد (برای باندها با اندازه کوچک) منتقل شد و الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت برای ژل آگارز و ۲۲۰ ولت برای ژل آکریلامید انجام شد. سپس ژل به مدت ۱۵ دقیقه جهت رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد. عکس برداری از ژل‌ها در زیر نور فراء بنفش در دستگاه ژل خوان انجام گرفت. سپس چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها با اعداد یک و صفر برای حضور و عدم حضور هر نوار امتیازدهی شد. علاوه بر آن، تمامی ماتریس‌های داده با کمک نرم‌افزار Excel 2016 تهیه شد و سپس به نرم‌افزار NTSYS-pc وارد و تجزیه و تحلیل شد. پس از گروه بندی ژنوتیپ‌ها، برآورد پارامترهای مرتبط با ساختار ژنتیکی گروه‌ها تنوع ژنی Nei (H)، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، درصد مکان‌های چند شکلی (PPL)، هتروزیگوسیتی کل (Ht)، جریان ژنی (Nm)، و شاخص تمایز ژنی (Gst) با کمک نرم‌افزار PopGene v.1.32 محاسبه شد (Yeh et al. 1999). برای درک بهتر تنوع ژنتیکی موجود بین و درون ژنوتیپ‌های جو و برآورد میزان تمایز نواحی ژنومی از نرم افزار ARLIQUIN version 3 (Excoffier & Lischer. 2010) استفاده شد. واریانس مولکولی بر پایه شاخص تثبیت (Fst) محاسبه شد. وجود زیرجمعیت‌ها با روش بیس و نرم‌افزار Structure 2.3.4 با ۵۰۰۰ تکرار و ۵۰۰۰۰ جایگشت بررسی شد (Pritchard et al. 2000). تعداد خوشه‌هایی (K) که ساختار جمعیت را بهتر نشان می‌دادند، با نرم‌افزار Structure Harvester تعیین شد (Evanno et al. 2005).

## نتایج و بحث

از ۴۲ جفت آغازگر EST-SSR و SSR مورد استفاده (۱۸ آغازگر اختصاصی جو و ۲۴ آغازگر گندم) در ۱۴۴ فامیل مورد بررسی، ۲۳ آغازگر (۱۱ آغازگر اختصاصی جو و ۱۲ آغازگر گندم) دارای تکثیر چندشکل مطلوبی بودند (جدول ۱). ۲۳ جفت آغازگر در مجموع ۱۳۶ آلل، با میانگین ۵/۹ آلل به ازای هر مکان ژنی تکثیر کردند. تعداد آلل‌های مشاهده شده در مطالعه حاضر در دامنه تعداد آلل گزارش شده در جو قرار دارد. بطوری که میانگین تعداد آلل گزارش شده توسط Varshney et al. (2010) در ژرم پلاسما جوهای زراعی و وحشی اسپونتانئوم ایکاردا برابر با ۷/۹ گزارش کرده اند. در پژوهشی Guo et al. (2012) تعداد آلل مشاهده شده در جایگاه های SSR مورد مطالعه را بین ۲ تا ۱۰ مشاهده کردند. در مطالعه حاضر ریزماهوره های دو نوکلئوتیدی (dinucleotide repeat motif) تعداد باند بیشتری نسبت به ریزماهوره های سه نوکلئوتیدی (trinucleotide repeat motif) ایجاد می‌کنند. در پژوهشی Smith et al. (۱۹۹۷) تعداد بیشتر آلل‌های جایگاه های SSR دو نوکلئوتیدی را تاکید نموده اند. زیرا



احتمال چندشکلی بیشتر به لحاظ کوتاه بودن و سادگی موتیف، تکرار بیشتر در طول ژنوم و همینطور لغزش در طی همانند سازی از جمله حذف و اضافه شدن نوکلئوتید وجود دارد. میزان چند شکلی آغازگرها در نشانگرهای EST-SSR و SSR بین ۳۳/۳۳ تا ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده تنوع بالا بین فامیل‌هاست. متوسط درصد چند شکلی برای آغازگرهای مورد مطالعه برابر با ۶۶/۶۶ درصد بود.



شکل ۱. الگوی نواری آغازگر اختصاصی جو Bmac0040، با استفاده از ژل اکریل‌آمید. مربوط به تعدادی از فامیل‌های گیاه جو همراه با والدین

Figure 1. The band pattern of Bmac0040 primers in barley families



شکل ۲. الگوی نواری آغازگر اختصاصی جو Bmac0134، با استفاده از ژل اکریل‌آمید. مربوط به تعدادی از فامیل‌های گیاه جو همراه با والدین

Figure 2. The band pattern of Bmac0134 primers in barley families

جدول ۱. اطلاعات نشانگرهای مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی فامیل‌های گیاه جو

**Table 1. Data of primers used in present study for evaluation genetic diversity of barley families**

دمای اتصال	توالی موتیف	مکان ژنی	توالی آغازگر	نام آغازگر	نوع	چند شکلی (%)
T.M. (°C)	Motif	Loci	Primer sequence	Name	آغازگر	Polymorphic
56	(AC)7T,(CA)15,(AT)9	5(1H)	F: CCATCAAAGTCCGGCTAG R: GTCGGGCTCATACTGAC	barley	SSR S2	100
56	CA(12)	1(7H)	F: CTCTATAGGCACGAAAAATTCC R: TTGCACATATCTCTCTGTCACA	barley	SSR Hvm49	100
56	AC(11)	-	F: ATCACAAAACAGCCACTGTCCTA R: GTGGTGAACCTTGCCCTTG	barley	SSR P9	66/6
56	(AC)28	2H	F: CCAACTGAGTCGA TCTCG R: CTTCGTTGCTTCTCT ACCTT	barley	SSR Bmac0134	100
52	(CT)28	5(1H)	F: CTGGGATTGGATCACTCTAA R:AAAACAAGTACTGAAAATAGGAG	Barley	SSR S18	100
54	(CT) 16	1H	F: ATICATCGATCTTGTATTAGTCC R: ACATCATGTTCGATCAAAGC	barley	SSR Bmag0211	80
52	(AG)16G(AG)15	3H	F:TTTCAGAAAACGGAGTTTTG R:CCTCCACACAAAAAA TCC	barley	SSR Bmag0131	100
55	(AC)20	6H	F: AGCCCGA TCAGATT ACG R: TTCTCCCTTTGGTCCTTG	barley	SSR Bmac0040	100
57	GT(5)CT(2)GT(27)	7(5H)	F: CTTTTTCTTTGACGATGCACC R: GAGTTTGTGAGAACTGGATGG	barley	SSR GMS027	100
56	(GT)13,(AG)19	1H	F: AAGCTCTTTCTGTATTCGTG R: GTCCATACTTTAACATCCG	barley	SSR S22	100
61	(AT)29	4H	F: ACACCTTCCCAGGACAATCC R: AGAGCACCGAAAAAGTCTGTA	barley	SSR S40	100
58	(GCG)5	2D	F: GATGCTCCCGTCTTGGC R: GGCGGCTATCTCCCTCTT	wheat	EST- SSR Xcinau167	50
62	-	5D	F:ACTTGCACTTGCTATACTTACGAA R: GTGTGTCGGTGTGGAAAG	wheat	SSR Xcfd183	100
60	(TCCTC)5	-	F: GGACGAGGAAATCATCT R: CGGGAACGACAAATCTAT	wheat	EST- SSR EC906222	100
50	(TC)29	3D	F: TTGCACGCACCTAAACTCTG R: CAAGTGTGAGCGTCG	wheat	SSR Xcfd9	87.5
58	(AAC)7	-	F: GTTATGATTTTGTGAGACCGA R: CAGAAGAATTATTAACCGCCA	wheat	EST- SSR BE240888	88.8
56	(AC)7T,(CA)15,(AT)9	5(1H)	F: CCATCAAAGTCCGGCTAG R: GTCGGGCTCATACTGAC	barley	SSR S2	87.5
56	CA(12)	1(7H)	F: CTCTATAGGCACGAAAAATTCC R: TTGCACATATCTCTCTGTCACA	barley	SSR Hvm49	33.3
56	AC(11)	-	F: ATCACAAAACAGCCACTGTCCTA	barley	SSR P9	100

			R: GTGGTGAACCTTGCCCTTG			
56	(AC)28	2H	F: CCAACTGAGTCGA TCTCG	barley	SSR Bmac0134	100
			R: CTTCGTTGCTTCTCT ACCTT			
52	(CT)28	5(1H)	F: CTGGGATTGGATCACTCTAA	Barley	SSR S18	66/6
			R:AAAACAAGTACTGAAAATAGGAG			
54	(CT) 16	1H	F: ATICATCGATCTTGTATTAGTCC	barley	SSR Bmag0211	100
			R: ACATCATGTTCGATCAAAGC			

انتخاب آغازگرهای دارای چندشکلی بالا کمک قابل توجهی در مطالعات تنوع ژنتیکی می‌نماید ( Alinaghizadeh et al. 2010). حسن استفاده از نشانگرهای دارای چندشکلی بالا افزایش کارایی آغازگر در برآورد تنوع ژنتیکی می‌باشد.

### بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها: میانگین آلل‌های مؤثر برابر ۱/۵۹ بود. تعداد آلل مؤثر رابطه مستقیمی با تنوع

ژنی دارد و مقدار آن در محدوده ۲ تا ۹ می‌باشد. بنابراین، مقادیر اندک اعداد آلل مؤثر منجر به کاهش تنوع ژنی می‌شود و اگر کمترین مقدار خود (نزدیک به ۱) باشد، بدین معنی است که یک آلل بیشترین فراوانی آللی را به خود اختصاص داده است و فراوانی آلل‌های دیگر اندک است (Weir 1990). پائین بودن آلل‌های مؤثر در مطالعه حاضر ناشی از تلاقی برگشتی با والد زراعی بوده است که بیشتر آلل‌ها شبیه به آلل والد زراعی شده‌اند.

میانگین در صد چند شکلی مکان‌ها برای ۹ گروه برابر ۴۲/۵۴ در صد محاسبه شد که کمترین مقدار آن در گروه ۶، ۷ و ۹ برابر با صفر درصد و بیشترین مقدار آن مربوط به گروه اول برابر با ۹۹/۱۹ درصد بود (جدول ۲). در گروه ۶، ۷ و ۹ به ترتیب فامیل‌های ۲۶، ۱۲ و والد وحشی قرار داشت، اما در گروه اول فامیل‌های حاصل از تلاقی و والد زراعی بودند. بنابراین گروه اول دارای بیشترین میزان تنوع و گروه ۶، ۷ و ۹ دارای کمترین مقدار تنوع درون گروهی بوده‌اند. دلیل این وضعیت قبلاً بحث شد و علت آن شباهت بیشتر فامیل‌ها با والد دوره‌ای (زراعی) در تلاقی برگشتی نسبت داده شد.

میانگین شاخص اطلاعات شانون برای ۹ گروه ۰/۲۲ بود که بیشترین مقدار آن ۰/۵۲ برای گروه ۱ کمترین مقدار آن برابر صفر برای گروه ۶، ۷ و ۹ بود (جدول ۲). شاخص اطلاعات شانون بیانگر تنوع ژنتیکی در درون گروه‌ها می‌باشد. بنابراین گروه ۱ (مشمول بر والد زراعی و ۱۱۱ فامیل حاصل از تلاقی) دارای بیشترین میزان تنوع و گروه ۶، ۷ و ۹ دارای کمترین میزان تنوع بود که این نتایج با تنوع ژنی یا هتروزیگوتی مورد انتظار در زیرگروه‌ها تطابق داشت. همچنین بر اساس شاخص تنوع ژنتیکی نی تنوع ژنتیکی درون گروه‌ها از صفر تا ۰/۳۴ برآورد گردید بیشترین میانگین سطح این تنوع در گروه اول و کمترین میانگین سطح این تنوع در گروه ۶، ۷، ۹ بود. نتایج نشان داد بیشترین تنوع ژنتیکی جمعیت تلاقی برگشتی به درون گروه‌ها اختصاص داشت.

جدول ۲. میانگین پارامترهای ژنتیکی درون گروه‌های فامیل‌های جو با استفاده از نشانگر ریزماهواره

Table 2. Mean of genetic parameters in barley families using molecular marker

Group number	شماره گروه	(Na) ± SD	(Ne) ± SD	Nei ± SD (H)	(I) ±SD	(%PPL)
1		1.99±0.09	1.58±0.08	0.34±0.11	0.52±0.04	19.99
2		1.40±0.09	1.30±0.15	0.16±0.01	0.24±0.08	40.65
3		1.89±0.10	1.46±0.12	0.28±0.06	0.42±0.03	89.43
4		1.39±0.13	1.27±0.04	0.16±0.02	0.23±0.02	39.02
5		1.68±0.12	1.36±0.05	0.21±0.08	0.33±0.06	68.29
6		1±0	1±0	0±0	0±0	0
7		1±0	1±0	0±0	0±0	0
8		1.48±0.50	1.29±0.35	0.17±0.19	0.26±0.28	46.34
9		1±0	1±0	0±0	0±0	0
Total کل		1.99+ 0.09	1.59+0.27	0.35+0.11	0.53+0.14	42.54

(Na) تعداد آلل‌های مشاهده شده، (Ne) تعداد آلل‌های مؤثر، (H) Nei's تنوع ژنی، (I) شاخص اطلاعاتی شانون، Ne/Na نسبت تعداد آلل‌های مؤثر به آلل‌های مشاهده شده، (%PPL) درصد مکان‌های ژنی چندشکلی.

(Na) Observed number of alleles, (Ne) Effective number of alleles, (H) Nei's gene diversity, (I) Shannon's information index, (Ne/Na, (%PPL) The percentage of polymorphic loci, SD=standard deviation

**بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها:** تعیین فاصله ژنتیکی ژرم‌پلاسما و روابط ژنتیکی بین افراد یکی از اهداف ارزشمند به‌نژادی گونه‌های گیاهی است. فاصله ژنتیکی عبارت است از هرگونه مقیاس کمی از تفاوت ژنتیکی، چه در سطح توالی ژن‌ها یا در سطح فراوانی‌های آلی که بین افراد، جمعیت‌ها یا گونه‌ها قابل محاسبه باشد (Mohammadi & Prasanna. 2003). برای برآورد تمایز ژنی بین جمعیت‌ها با استفاده از تخمین هتروزیگوسیتی درون گروه‌ها (Hs)، هتروزیگوسیتی بین گروه‌ها (Dst)، هتروزیگوسیتی کل (Ht)، ضرایب تمایز ژنی (Gst)، و جریان ژنی (Nm) استفاده شد. در ضمن با کمک Ht و Hs به دست آمده شاخص (Fst) از طریق رابطه زیر حساب شد:

$$Fst = 1 - Hs/Ht \quad (\text{رابطه ۱})$$

هتروزیگوسیتی کل / هتروزیگوسیتی درون گروه‌ها - ۱ = تمایز ژنی

این شاخص ساختار دوری و نزدیکی بین جمعیت‌ها را از طریق محاسبه هتروزیگوسیتی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها و تنوع در

توده‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۳. تنوع ژنتیکی در گروه‌های جو با استفاده از روش نی

Table 3. Genetic diversity in barley groups using Nei's method

گروه‌ها	تعداد نمونه	Ht± SD	Hs± SD	Gst	Dst	Nm	Fst
Group	Number of sample						
Total کل	144	0.373±0.014	0.149±0.004	0.599	0.224	0.340	0.6

(Hs) هتروزیگوت سیتی درون گروه‌ها، (Dst) هتروزیگوت سیتی بین گروه‌ها، (Ht) هتروزیگوت سیتی کل، (Gst) ضرایب تمایز ژنی و (Nm) جریان ژنی و شاخص (Fst)

(Hs) Within population diversity, (Dst) Genetic diversity among populations (Dst = Ht - Hs), (Ht) Total genetic diversity (Ht = Hs + Dst), (Gst) Genetic differentiation among populations (Gst = Dst/Ht), (Nm) estimate of gene flow from Gst or Gcs. E.g., Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst, (Fst) F-statistics, SD=standard deviation

ضریب تمایز ژنی (Gst) معیاری آماری از تفرق ژنی است و دامنه آن از صفر تا یک متغیر است (Trindade et al. 2012) که به منظور بررسی تمایز بین فامیل‌ها استفاده شد. این شاخص در محدوده ۰-۰/۰۵-۰/۱۵ تمایز ژنتیکی متوسط، ۰/۱۵-۰/۲۵ تمایز ژنتیکی بالا و بالاتر از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی بسیار بالا می‌باشد (Vanhala et al. 2004). اگر  $Gst = 0/5$  نشان‌دهنده این است که تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت با هم برابر است (Liao et al. 2012). در مطالعه حاضر  $Gst = 0/59$  برآورد شد که نشان‌دهنده تمایز ژنی بسیار بالایی جمعیت مورد مطالعه است. در گیاهان خودگشن مانند جو، با پیشرفت نسل مقدار تمایز ژنی بین گروه‌ها افزایش و تمایز درون گروه‌ها کاهش می‌یابد. عدد صفر  $Gst$  مربوط به زمانی است که تمایز ژنی بین گروه‌ها وجود ندارد و عدد یک  $Gst$  مربوط به زمانی است که گروه‌ها کاملاً از هم متمایز هستند (Vanhala et al. 2004).

جریان ژنی (Nm) به عنوان شاخص حرکت و انتقال ژن‌ها در داخل و بین گروه‌ها می‌باشد که همبستگی منفی با تمایز ژن دارد (Grant 1991). اگر مقدار جریان ژنی کمتر از یک باشد جریان ژنی کم و بیشتر از یک متوسط و میانه و اگر بیشتر از ۴ باشد جریان ژنی زیاد است (Kummar et al. 2013). البته در بیشتر موارد جریان ژنی بالای ۱ وجود یک تبادل ژنی مناسب بین گروه‌ها را نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر جریان ژنی  $Nm = 0/34$  به دست آمد.  $Nm$  زمانی که از یک بالاتر باشد گروه‌ها در حال حفظ ارتباط ژنتیکی در طول زمان هستند و زمانی که کوچکتر از یک برآورد گردد گروه‌ها در طول زمان در حال واگرایی و دور شدن ژنتیکی هستند. به طور کلی گروه‌ها با تمایز بالاتر میزان جریان ژنی کمتری دارند (Low et al. 2004). جریان ژنی متوسط ۱/۴۹ در مطالعه Allel et al. (2017) برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه جو با استفاده از نشانگرهای RAPD دیده شد. تفرق ژنی نیز (Gst=0/۲۵) مشاهده شد. در حالی که جریان ژنی بالا (Nm=۸) و تفرق ژنی کم (Gst=0/۰۵) در گیاه سورگوم مشاهده شده است (Nunag et al. 2019). در مطالعه‌ای (Rufo et al. 2019) برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام زراعی و ارقام بومی

گندم *Gst* و *Nm* در ارقام زراعی به ترتیب ۰/۱۶ و ۲/۴۹ و در ارقام بومی ۰/۱۱ و ۳/۶۷ برآورد شد. نتایج نشان داد که تمایز ژنی در ارقام زراعی نسبت به ارقام بومی بیشتر بوده ضمن اینکه جریان ژنی کمتری داشته است. در این مطالعه به دلیل اینکه جمعیت در حال تفکیک، در نسل‌های اولیه می‌باشد، تمایز ژنی بالا و جریان ژنی پایین دارد. انتظار می‌رود پس از چند نسل خوگوشنی تمایز ژنی درون جمعیت کاهش یابد و جریان ژنی افزایش یابد. میزان جریان ژنی (*Nm*) بین گروه‌ها ۰/۳۴ بود که نشان‌دهنده تبادل ژنی کم بین گروه‌ها می‌باشد. برای محاسبه تفرق ژنتیکی در بین جمعیت‌ها از شاخص *Fst* استفاده شد که مقدار آن برای نشانگرهای *SSR* و *EST-SSR*، ۰/۶ برآورد شد که سطح بالایی از تفرق ژنتیکی در جمعیت (*BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>*) مورد مطالعه را نشان می‌دهد (جدول ۳).

ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی پیامد برهم‌کنش عوامل متعددی می‌باشد که خود این عوامل منجر به ساختار ژنتیکی پیچیده در داخل جمعیت‌ها می‌شوند از جمله این فاکتورها می‌توان تاریخچه طولانی تکامل گونه‌ها (تغییر در پراکنش، قطعه شدن زیستگاه‌ها و جدایی جمعیت‌ها)، سیستم گرده‌افشانی، رانده‌شدگی ژنتیکی، گزینش و جریان ژنی را نام برد (Schaal et al. 1998; Slatkin 1987). البته جمعیت مورد مطالعه حاصل تلاقی دو والدی است که هرکدام از والدین ممکن است تاریخچه تکاملی متفاوتی را سپری کرده باشد. در تحقیق حاضر  $F_{st} = 0.06$  می‌باشد که نشانگر تمایز ژنتیکی بالا می‌باشد که با مقدار *Gst* تقریباً برابر است که بدان معناست که تفرق ژنتیکی در این گروه‌ها بالا است و گروه‌ها از هم دور می‌باشند که با نتایج بوس دُورف و همکاران مطابقت داشت. این تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها ممکن است به علت تغییر شرایط محیطی و انتخاب یا به خاطر فرآیندهای تصادفی مثل جهش باشد (Bossdorf et al. 2005). نتایج مطالعه حاضر با گزارش Ozkan et al. (2005) که در بررسی تنوع ژنتیکی جوهای وحشی میزان *Fst* را ۰/۶۵ برآورد کردند. میانگین تنوع ژنتیکی درون (*Hs*)، بین (*Dst*) و کل (*HT*) به ترتیب ۰/۱۴۹، ۰/۵۹۹ و ۰/۳۷۳ برآورد شد. مقدار *Dst* کمتر از *Hs* بود، این امر را می‌توان به تنوع زیاد در درون گروه‌ها انتساب داد. در مطالعه‌ای (Liao et al. 2012) برای بررسی تنوع ژنتیکی سورگوم هتروزیگوسیتی کل ( $H_t = 0.42$ ) و هتروزیگوسیتی درون گروه‌ها ( $H_s = 0.39$ ) برآورد شد. در مطالعه Hajmansoor et al. (2013) نیز تنوع ژنتیکی جوهای ایرانی با جوهای ژاپنی با استفاده از نشانگرهای مولکولی *SSR* بررسی شد. مقدار هتروزیگوتی درون ( $H_s = 0.147$ ) و هتروزیگوتی کل ( $H_t = 0.151$ ) برآورد شد و نتایج نشان داد که جوهای ایرانی دارای تنوع ژنتیکی درون و بین، بیشتری نسبت به ژنوتیپ‌های ژاپنی بوده‌اند. میانگین فاصله ژنتیکی بین ۹ گروه بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی Nei (1987)، برابر ۰/۳۸ و ماتریس شباهت ۰/۷ بدست آمد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه‌های شماره ۷ و ۹ (۰/۸۸) و کمترین مقدار آن (۰/۰۷۵) بین گروه‌های ۱ و ۳ مشاهده شد (جدول ۴). نتایج حاصل با نتایج Singh (2019) که بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی نی را در دامنه‌ای بین ۰/۱۲ تا ۰/۸۳ برآورد کردند، مطابقت داشت. در مطالعه Li et al. (2014) نیز میانگین تنوع ژنتیکی با میانگین ۰/۵۶ برآورد شد. گروه ۱ که مشتمل بر

والد زراعی است فاصله کمتری با گروه‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ داشت در حالی که والد وحشی دارای فاصله بیشتری با گروه‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ بود. علت این امر را می‌توان به شباهت بیشتر فامیل‌ها با والد دوره‌ای (زراعی) در تلاقی برگشتی نسبت داد. جدول ۴. شاخص تنوع ژنی نی در نه گروه فامیل‌های جو براساس ماتریس شباهت (بالای قطر) و بر اساس ماتریس فاصله (پایین قطر)

**Table 4. Nei's Gene variation Index of barley families based on Genetic Identity and Genetic distance**

Number	شماره گروه	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	1	****	0.873	0.927	0.820	0.903	0.760	0.789	0.859	0.584
2	2	0.135	****	0.836	0.694	0.835	0.688	0.679	0.684	0.575
3	3	0.075	0.178	****	0.795	0.875	0.772	0.748	0.778	0.634
4	4	0.198	0.364	0.228	****	0.792	0.631	0.648	0.694	0.570
5	5	0.101	0.174	0.132	0.233	****	0.698	0.691	0.717	0.531
6	6	0.273	0.372	0.258	0.459	0.359	****	0.617	0.649	0.504
7	7	0.235	0.387	0.290	0.432	0.369	0.481	****	0.717	0.414
8	8	0.161	0.379	0.251	0.364	0.332	0.431	0.332	****	0.487
9	9	0.537	0.552	0.454	0.561	0.631	0.685	0.880	0.717	****

نتایج تجزیه واریانس مولکولی<sup>۶</sup> (AMOVA) نشان داد که تنوع درون گروه‌ها بیشتر از تنوع بین گروه‌ها است بطوریکه مشخص گردید تنوع درون گروهی ۸۰/۷۴ درصد و تنوع بین گروهی ۱۳/۵۲ درصد از کل تنوع فامیل‌ها را بطور بسیار معنی‌داری تشکیل داده است. در مطالعه Hajmansoor et al. (2013) تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌ها (۸۹/۱۳) بیشتر از بین جمعیت‌ها (۱۰/۸۷) بود. طبق تجزیه واریانس، گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری از یکدیگر نشان دادند و  $F_{st}$ ، ۰/۱۳۵۱۵ برآورد شد. محققان گزارش کردند که مقادیر  $F_{st}$  بین صفر و ۰/۰۵ تفاوت اندک، ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تفاوت متوسط، ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ تفاوت زیاد و ۰/۲۵ تا ۱ تفاوت بسیار زیادی را بین گروه‌های تعریف شده نشان می‌دهد (Mohammadi & Prasanna, 2003). شاخص  $F_{st}$  (شاخص تثبیت) متوسط هتروزیگوسیتی درون گروه‌ها را با کل گروه‌ها مقایسه می‌کند و مقدار آن بین ۰-۱ می‌باشد. در گیاهان خودگشن مانند جو با پیشرفت نسل مقدار هتروزیگوسیتی بین افراد جامعه افزایش و هتروزیگوسیتی درون جامعه کاهش می‌یابد. عدد صفر  $F_{st}$  مربوط به زمانی است که زیر جمعیت‌ها از نظر فراوانی آلل‌ها یکسان هستند، عدد یک  $F_{st}$  نیز مربوط به زمانی است که زیر جمعیت‌ها آلل‌های متفاوتی دارند (Nei 1978).

<sup>6</sup> - Molecular variance Analysis

بررسی ساختار جمعیت و انتخاب K بهینه: دسته‌بندی دقیق جمعیت حاصل از تلاقی به زیرجمعیت‌های مناسب و تشخیص فامیل‌های مختلط با استفاده از روش بی‌زین<sup>۷</sup> در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت. (Pritchard et al. 2000). مقدار اولیه K (زیرجمعیت فرضی اولیه) بین ۲ تا ۱۲ در نظر گرفته شد و برای افزایش دقت برای هر یک از زیر جمعیت‌ها ۱۵ تکرار منظور شد. برای این منظور از مدل Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۵۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۵۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) یک ماتریس به نام Qst را محاسبه می‌کند که این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر فامیل در هر یک از زیر جمعیت‌ها می‌باشد. در بارپلات حاصل، وقتی درصد عضویت یک ژنوتیپ به آن کلاستر بیشتر یا مساوی ۰/۷ باشد، ژنوتیپ به آن کلاستر نسبت داده می‌شود، ولی در صورتی که درصد عضویت آن کمتر از این مقدار باشد، به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) تعریف می‌شود (Spataro et al. 2011).

#### جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR و EST-SSR

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) Based on data from molecular markers

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	تنوع (%)
Source of variation	df	SS	MS	Variation
بین گروه‌ها	8	396.79	3.68	13.52
درون گروه‌ها	135	3182.54	23.57	86.48
مجموع	143	3579.34	27.25	----

Fst = ۰/۱۳۵۱۵ شاخص تثبیت

تعداد واقعی زیر جمعیت (K) براساس روش (2005) Evanno et al. مشخص شد این روش براساس آماره  $\Delta K$  استوار است که شیب تابع احتمالی  $LnP(D)$  را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. روش اندازه‌گیری میزان  $\Delta K$  در روش ایوانو به طریقه زیر انجام می‌شود:

$$L(k) = \text{average of } LnP(D) \text{ in each } K \quad \text{رابطه ۲}$$

$$L'(k) = L(k)_n - L(k)_{n-1} \quad \text{رابطه ۳}$$

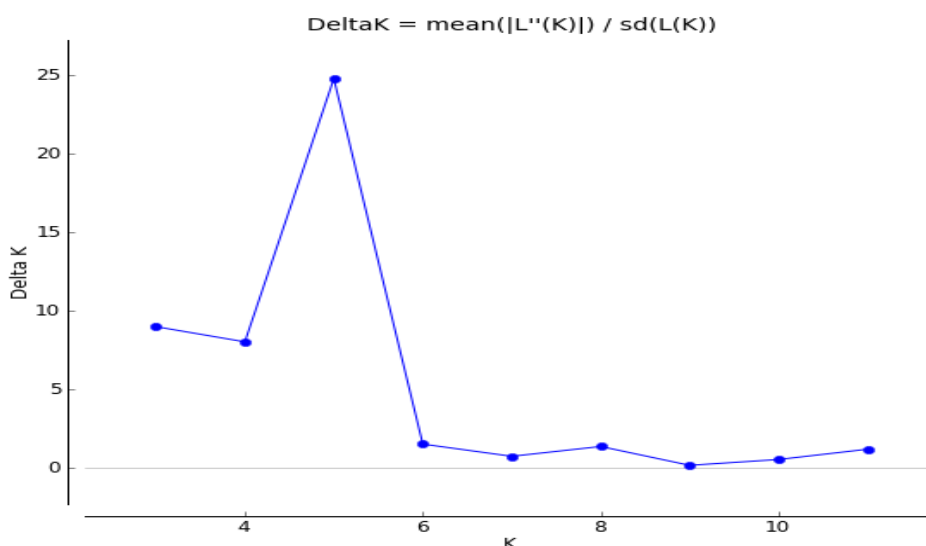
$$L''(k) = L'(k)_n - L'(k)_{n-1} \quad \text{رابطه ۴}$$

<sup>7</sup> - Bayesian



$$\Delta K = \frac{L''(k)}{\text{stdev of } k \text{ replication}} \quad (\text{رابطه ۵})$$

نتایج نشان داد که براساس شاخص  $\Delta K$  و  $\text{LnP}(D)$  عدد ۵ به عنوان بهترین  $K$  ( $K=5$ ) شناسایی شد (شکل ۳) که به عنوان  $K$  بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس سهم عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس  $Q$ ) در نظر گرفته شد.



شکل ۳. بررسی عضویت افراد در  $K=5$  به وسیله نرم افزار Structure 2.3.4

Figure 3. Determination of optimum subpopulations number using the plot of  $K$  vs.  $\Delta K$

جدول ۶. نتایج روش ایوانو در انتخاب  $K$  بهینه برای بررسی ساختار جمعیت تلاقی برگشتی

Table 6. Results of the Evanno Method for Determination of optimum subpopulations number in backcross population

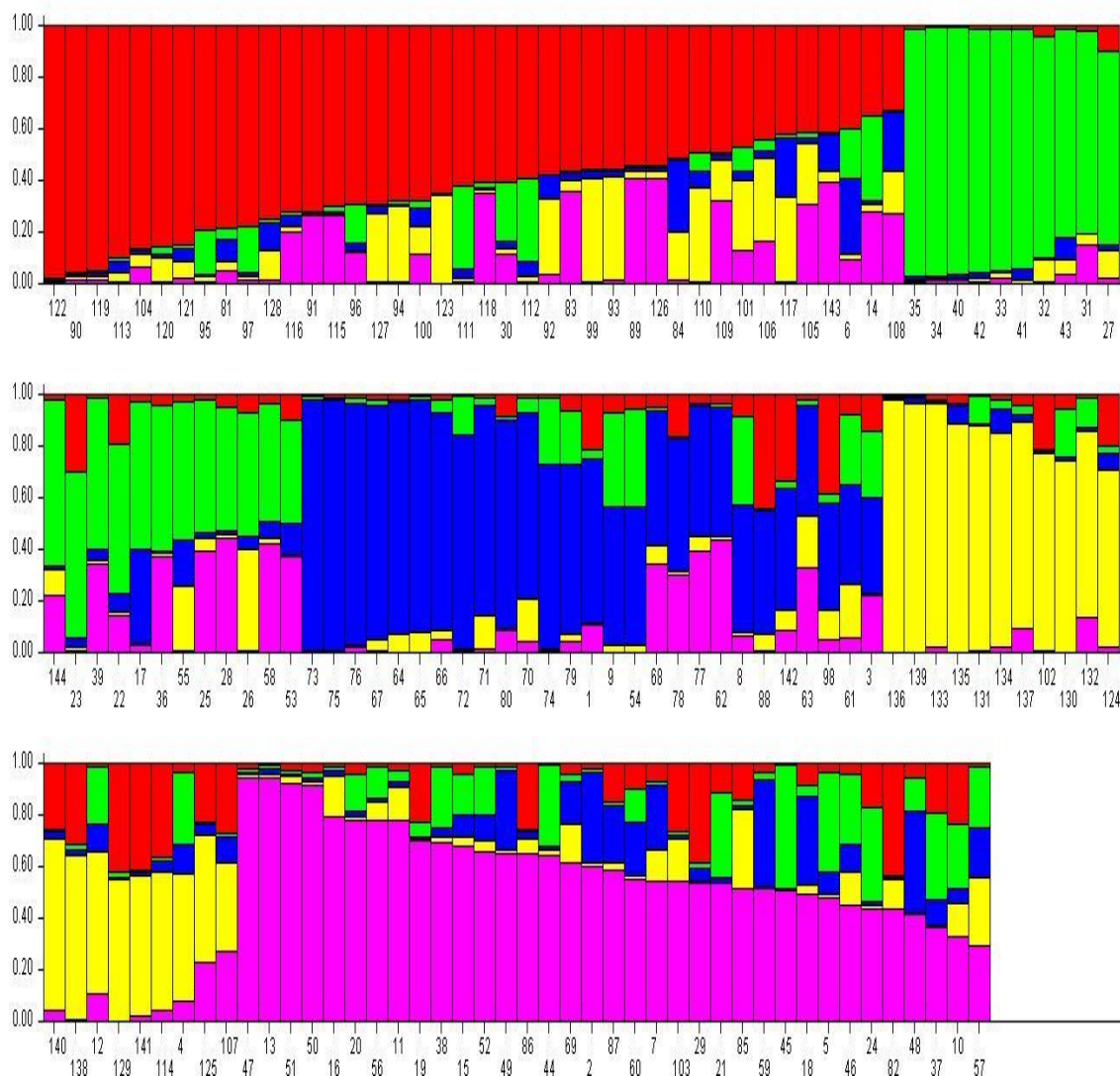
K	Reps	Mean $\text{LnP}(K)$	Stdev $\text{LnP}(K)$	$\text{Ln}'(K)$	$ \text{Ln}''(K) $	Delta K
2	15	-20131.180	1.396	—	—	—
3	15	-19637.780	7.807	493.400	70.120	8.981
4	15	-19214.500	4.638	423.280	37.170	8.012
5	15	-18828.390	5.156	386.110	127.710	24.767
6	15	-18569.990	14.857	258.400	22.350	1.504
7	15	-18333.940	34.406	236.050	25.030	0.727
8	15	-18072.860	29.857	261.080	40.380	1.352
9	15	-17852.160	58.941	220.700	8.980	0.152

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
10	15	-17640.440	52.794	211.720	27.690	0.524
11	15	-17456.410	104.710	184.030	123.520	1.1796
12	15	-17395.900	260.163	60.510	—	—

بر اساس نتایج مشاهده شده در بار پلات (شکل ۴)، از کل ۱۴۴ فامیل جو مورد مطالعه ۴۰ فامیل (۲۷/۷ درصد) به ساختار اول، ۲۲

فامیل (۱۵/۲ درصد) به ساختار دوم، ۲۷ فامیل (۱۸/۷ درصد) به ساختار سوم، ۲۰ فامیل (۱۳/۸ درصد) به ساختار چهارم، ۳۵ فامیل (۲۴/۳

درصد) به ساختار پنجم تعلق پیدا کرد.



شکل ۴. ساختار جمعیت ۱۴۴ فامیل جو مورد مطالعه بر اساس روش بیزین ( $K=5$ ). محور عمودی ضریب تعلق

هر فرد به هر زیر جمعیت را نشان می دهد

**Figure 4. Population structure of 144 barley families obtained by Bayesian-based clustering approach using admixture model. (K = 5) The vertical coordinate of each subpopulation indicates the membership coefficients for each individual**

گروه‌های اول و چهارم به ترتیب بیشترین (۴۰) و کمترین (۲۰) تعداد فرد را به خود اختصاص دادند. در این مطالعه از والد وحشی به عنوان والد بخشنده و از والد زراعی به عنوان والد دوره‌ای استفاده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشتر افراد جمعیت حاصل از تلاقی در گروه اول که شامل والد زراعی است قرار گرفته‌اند و این نشان‌دهنده این است که فامیل‌ها بیشتر شبیه به والدی هستند که تلاقی برگشتی دوره‌ای با آن داشته‌اند. زیرگروه پنجم دارای بیشترین هتروزیگوسیتی (۰/۳۵) و زیر گروه چهارم دارای کمترین هتروزیگوسیتی (۰/۲۷) بوده است. در پژوهشی Ferreira et al. (2016) در بررسی تنوع ژنتیکی جوهای برزیلی (۶ نمونه جو وحشی اسپانتانوم، ۳۵ رقم و ۱۶ لاین اصلاحی) دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها را با استفاده از نرم‌افزار Structure انجام دادند و بر اساس روش ایوانو و همکاران ۲ زیر جمعیت را تشخیص دادند. زیر گروه اول شامل جو وحشی و لاین‌های اصلاحی و زیرگروه دوم شامل جوهای برزیلی بود که تنوع بسیار پایینی داشتند. در مطالعه Milner et al. (2019) با استفاده از نمونه‌های جو زراعی و جو وحشی و بکارگیری نشانگرهای SNP و در نظر گرفتن زیرجمعیت فرضی اولیه را بین ۲ تا ۱۲ اقدام به مقایسه مقدار  $K=3$  را با  $K=12$  کردند و نشان دادند با افزایش تعداد  $K$ ، خطای The cross validation کاهش می‌یابد. در تحقیقی (Gordon et al. 2019) برای بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۱۹۴ نمونه گندم هگزابلوئید ساختگی از (*Triticum aestivum*. L) با استفاده از نشانگرهای SNP هفت زیر جمعیت ( $K=7$ ) تشخیص داده شد. مشاهده کردند که استفاده از روش‌های مبتنی بر مدل تخمین قوی‌تر از ساختار جمعیت فراهم می‌کند. درک تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت برای گرفتن یک تصمیم مؤثر در برنامه‌های اصلاحی بسیار مهم است.

**نتیجه‌گیری:** تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی مرتبط با خزانه ژنی اولیه جو در به‌کارگیری برنامه‌های اصلاحی، پایداری در راستای افزایش تولید و پایداری تحت شرایط مختلف حائز اهمیت بسیاری است. برای مطالعات ژنتیکی و اصلاح رقم مناسب‌تر با عملکرد بالا و سازگارتر ابتدا باید میزان تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ها تعیین و سپس اقدام به اصلاح آن نمود. خویشاوندان وحشی، دامنه پراکنش وسیعی داشته و از صفات منحصر به فرد و مطلوبی برخوردار می‌باشند، از این رو شناسایی این تنوع، ارزیابی خصوصیات کمی و کیفی این ذخایر توارثی و بررسی آن‌ها از لحاظ مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده در به‌کارگیری برنامه‌های اصلاحی نقش ارز شمندی دارد. با توجه به اینکه گونه وحشی (*H. spontaneum*) با گونه زراعی تلاقی‌پذیر بوده و عدم اقبال در یافتن ژن‌های مقاومت در گونه زراعی، اینترگرسیون ژنی راه حلی مناسب برای انتقال ژن‌های مطلوب است.

هدف تلاقی در این مطالعه انتگراسیون ( ادغام) بخشی از تنوع ژنتیکی موجود در جو اسپانتانوم با جو زراعی از طریق ایجاد جمعیت تلاقی برگشتی حاصل از تلاقی ژنوتیپ متحمل به شوری جو وحشی با ارقام زراعی جو و در نتیجه افزایش دسترسی

به تنوع ژنتیکی جهت برنامه های به نژادی جو و معرفی یک یا چند ژنوتیپ با تحمل بالای شوری بوده است. جهت استفاده در مطالعات ژنتیکی و برنامه های به نژادی و در مطالعه حاضر هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> و همچنین استفاده از اطلاعات مطالعات حاضر بمنظور تعیین ارتباط نشانگرهای EST-SSR و SSR با صفات زراعی و فیزیولوژی مرتبط با تحمل به شوری بوده است. چنانچه تنوع ژنوتیپها با استفاده از صفات زراعی نیز بررسی شود، می توان از این تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی که بین فامیل های جو مورد مطالعه مشاهده شده است، برای کارهای اصلاحی بعدی بمنظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد که هدف نهایی در اصلاح گیاهان است و همچنین سایر صفات استفاده کرد. پیشنهاد می شود تنوع فامیلها با استفاده از صفات زراعی نیز بررسی شود تا با تلفیق نتایج دو روش، بتوان نتیجه بهتری گرفت و از آن بهره بیشتری برد.

**سیاسگزاری:** بدین وسیله از دانشگاه صنعتی اصفهان برای فراهم آوردن هزینه های پژوهش قدردانی می گردد. از داوران محترم به لحاظ نظرات ارزشمند قدردانی می شود.

## منابع

- علینقی زاده روح الله، محمدآبادی محمدرضا، زکی زاده سونیا (۱۳۸۹) چند شکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز قرمز جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۲(۱)، ۸۰-۶۹.
- واجدابراهیمی محمدتقی، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کاشکوئیه علی (۱۳۹۴) بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گو سفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۷(۴)، ۱۵۸-۱۴۳.
- واجدابراهیمی محمدتقی، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کاشکوئیه علی (۱۳۹۶) بررسی تنوع ژنتیکی چهار نژاد از گوسفندان موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهورهای. فناوری زیستی در کشاورزی ۱۶(۱)، ۶۷-۵۹.
- محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) کاربرد نشانگرهای ریزماهور برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. فصلنامه علوم دامی ایران ۴۲(۴)، ۳۴۴-۳۳۷.

## References

- Abbasov M, Sansaloni CP, Burgueño J et al. (2019) Genetic diversity analysis using DArTseq and SNP markers in populations of *Aegilops* species from Azerbaijan. *Genet Resour Crop Evol* 67, 281-291.
- Ali M, Hussain M, Abdullah S et al. (2020). Integrated scoring of salinity stress on agromorphometric and seed storage proteins in barley landraces. *Pure Appl Biol (PAB)* 9, 963-978.
- Alinaghizadeh R, Mohammadabadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Agric Biotechnol J* 2, 69-80 (In Persian).

- Aiello D, Ferradini N, Torelli L et al. (2020) Evaluation of Cross-Species Transferability of SSR Markers in *Foeniculum vulgare*. *Plants* 9(2), p.175.
- Allel D, Ben-Amar A, Lamine M, Abdelly C (2017) Relationships and genetic structure of North African barley (*Hordeum vulgare* L.) germplasm revealed by morphological and molecular markers: Biogeographical considerations. *South Afr J Bot* 112, 1-10.
- Arzani A, Ashraf M (2016) Smart engineering of genetic resources for enhanced salinity tolerance in crop plants. *Crit Rev Plant Sci* 35, 146-189.
- Bossdorf O, Auge H, Rogers WE et al. (2005) Phytotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144, 1-11.
- 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.
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10, 564-567.
- Ferreira JR, Pereira JF, Turchetto C et al. (2016) Assessment genetic diversity in Brazilian barley using SSR markers. *Genet Mole Biol* 39, 86-96.
- Gordon E, Kaviani M, Kagale S et al. (2019) Genetic diversity and population structure of synthetic hexaploid-derived wheat (*Triticum aestivum* L.) accessions. *Genet. Resour Crop Evol* 66, 335-348.
- Grant V (1991) *The Evolutionary Process: A critical Study of Evolutionary Theory*. Columbia University Press, New York.
- Guo Y, Li Y, Huang Y et al. (2012) Genetic diversity analysis of hullless barley from Shangri-la region revealed by SSR and AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol* 59, 1543-1552.
- Hajmansoor S, Bihanta MR, Alisoltani A (2013) Genetic diversity among and within Iranian and non-Iranian barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using SSR and storage proteins markers. *Biochem Syst Ecol* 46, 7-17.
- Jo WS, Kim HY, Kim KM (2017) Development and characterization of polymorphic EST based SSR markers in barley (*Hordeum vulgare*). *3 Biotech* 7, 265-277.
- Kashyap PL, Kumar S, Kumar RS et al. (2020) Identification of Novel Microsatellite Markers to Assess the Population Structure and Genetic Differentiation of *Ustilago hordei* Causing Covered Smut of Barley. *Front Microbiol* 19, 1-10.
- Kumar A, Mishra P, Singh SC, Sundaresan V (2013) Efficiency of ISSR and RAPD markers in genetic divergence analysis and conservation management of *Justicia adhatoda* L., a medicinal plant. *Plant Syst Evol* 300, 1409-1420.

- Liao L, Guo QS, Wang Z et al. (2012) Genetic diversity analysis of *Prunella vulgaris* in China using ISSR and SRAP markers. *Biochem Syst Ecol* 45, 209-217.
- Li FQ, Peng JH (2014) Genetic and association mapping study of English grain aphid resistance and tolerance in bread wheat germplasm. *J Int Agric* 13, 40-53.
- Low A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological genetics: design, analysis and Application*. Black-Well Publishing. Oxford.
- Maniruzzaman M, Talukder ZA, Rohman S et al. (2014) Polymorphism study in barley (*Hordeum vulgare*) genotypes using microsatellite (SSR) markers. *Bangladesh. J Agric Res* 39, 33-45.
- Milner SG, Jost M, Taketa S et al. (2019) Genebank genomics highlights the diversity of a global barley collection. *Nat Genet* 51, 319-326.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iran J Anim Sci* 42, 337-344 (In Persian).
- Mohammadi SA, Prasanna BM (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Sci* 43, 1235-1248.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet* 89, 583-590.
- Nunay IMY, Chikmawati T, Miftahudin M (2019) Morphological diversity of local sorghum cultivar (*Sorghum bicolor*) of East Nusa Tenggara, Indonesia. *Biosaintifika: J Biol Biol Educ* 11, 47-54.
- Ozkan H, Kafkas S, Ozer MS, Brandolini A (2005) Genetic relationships among South-East Turkey wild barley populations and sampling strategies of *Hordeum spontaneum*. *Theor Appl Genet* 112, 12-20.
- Liu M, Li Y, Ma Y et al. (2020) The draft genome of a wild barley genotype reveals its enrichment in genes related to biotic and abiotic stresses compared to cultivated barley. *Plant Biotechnol J* 18, 443-456.
- Petkovski N, Mihajlov L, Ruzdik NM (2018) Genetic and environmental effect on the grain yield of spring barley varieties cultivated in the Republic of Macedonia. *J Agric Plant Sci* 16, 97-102.
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet* 155, 945-959.
- Rufo R, Alvaro F, Royo C, Soriano J M (2019) From landraces to improved cultivars: Assessment of genetic diversity and population structure of Mediterranean wheat using SNP markers. *PloS One* 14, 1-19.

- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM et al. (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7, 465-474.
- Shahmoradi SM, Chaichi J, Mozafari D et al. (2013) Evaluation of genetic diversity and geographical in *Hordeum spontaneum* ecotypes of Iran. *Iran J Crop Sci* 44, 209-225 (In Persian).
- Shakhatreh Y, Baum M, Haddad N et al. (2016) Assessment of genetic diversity among Jordanian wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes revealed by SSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 63, 813-822.
- Sharma HC, Crouch JH, Sharma KK et al. (2002) Application of biotechnology for crop improvement: prospects and constraints. *Plant Sci* 163, 381-395.
- Singh YT (2019) Genetic Diversity and Population Structure in Upland Rice (*Oryza sativa* L.) of Mizoram, North East India as Revealed by Morphological, Biochemical and Molecular Markers. *Biochem Genet* 57, 421-442.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of populations. *Science* 236, 787-792.
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, et al. (1997) An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet* 95, 163-173.
- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, Bellucci E (2011) Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theor Appl Genet* 122, 1281-1291.
- Vajed Ebrahimi MT, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK (2017a) Genetic Diversity Analysis of Four Sheep Breeds Existing in Iran Using Microsatellite Markers. *Agric Biotechnol* 8, 59-66 (In Persian).
- Vajed Ebrahimi MT, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK (2017b). Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. *Archive Anim Breed* 60, 183-189.
- Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailzadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. *Agric Biotechnol J* 7, 143-158 (In Persian).
- Vanhala TK, Van Rijn CPE, Buntjer J (2004) Environmental, phenotypic and genetic variation of wild barley (*Hordeum spontaneum*) from Israel. *Euphytica* 137, 297-309.
- Varshney RK, Baum M, Guo P et al. (2010) Features of SNP and SSR diversity in a set of ICARDA barley germplasm collection. *Mol Breed* 26, 229–242.
- Von Kor M, Wang H, Leon J, Pillen K (2006) AB-QTL analysis in spring barley: II. Detection of favourable exotic alleles for agronomic traits introgressed from wild barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum*). *Theor Appl Genet* 112, 1221-1231.

- Volk G, Byrne P (2020) From wild species to landraces and cultivars. In: Volk, G.M., Byrne, P., editors. Crop Wild Relatives and their use in Plant Breeding. Colorado State University.
- Trindade H, Sena I, Goncalves S, Romano A (2012) Genetic diversity of wild populations of *Tuberaria major* (*Cistaceae*), an endangered species endemic to the Algarve region (Portugal), using ISSR markers. *Biochem Syst Ecol* 45, 49-56.
- Weir S (1990) Genetic data analysis: Methods for Discrete Population Genetic data. Sunderland, Sinauer Associates. Inc. Publishers, Massachusetts.
- Yeh F, Yang C, Boyle R (1999). POPGENE, version 1.32: the user-friendly software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- Zavinon F, Adoukonou-Sagbadja H, Keilwagen J (2019) Genetic diversity and population structure in Beninese pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Huth] landraces collection revealed by SSR and genome wide SNP markers. *Genet Resour Crop Evol*, 67, 191-208.
- Zhang M, Mao W, Zhang J, Wu F (2014) Development and characterization of polymorphic EST-SSR and genomic SSR markers for Tibetan annual wild barley. *PLoS One* 9, 1-10.