

Research Article

Plant Prod., 2020, 43(3), 323-336
DOI: 10.22055/ppd.2019.27840.1684

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

Genetic Diversity and Grouping of Winter Barley Genotypes for Root Characteristics and ISSR Markers

Soheila Shayan¹, Mohammad Moghaddam Vahed^{2*}, Seyed Abolghasem Mohammadi³,
Kazem Ghassemi-Golezani⁴, Fahimeh Sadeghpour⁵ and Ahmad Yousefi⁶

- 1- Ph.D. Graduate of Plant Breeding (Biometrical Genetic), Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran (mmoghaddam@tabrizu.ac.ir)
- 3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 4- Professor, Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 5- M.Sc. Graduate of Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
- 6- Expert, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

Received: 23 November, 2018

Accepted: 16 October, 2019

Abstract

Background and Objectives

Determination of genetic diversity level is fundamental for identification of desirable parents to be used in different breeding programs, and molecular markers have been successfully taken for the analysis of genetic diversity in various crops. The objective of this study was to investigate genetic diversity among 28 genotypes of barley using root and shoot characters and 14 ISSR primers through two separate experiments (greenhouse and molecular experiments).

Materials and Methods

The greenhouse experiment was carried out as randomized complete block design with two replications in the research greenhouse of Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran. The traits measured in the greenhouse were root dry weight, root volume, shoot dry weight and ratio of root to shoot dry weight. The molecular experiment was conducted to study the diversity of barley genotypes using 14 ISSR primers. The polymorphic information content and marker index were calculated for each ISSR primer.

Results

Analysis of variance showed significant differences among the genotypes under study for all traits. According to the mean comparisons, genotypes 3, 5, 9 and 20 had higher mean in terms of all characters. The cluster analysis, based on Ward's algorithm and Euclidean distance, grouped genotypes in four clusters. Group 3 had the highest mean in terms of all of the studied characters. Out of 14 ISSR primers used, 11 primers generated scorable and appropriate banding pattern. A total of 559 polymorphic bands with 80-3000 bp were produced. Polymorphic information content was estimated to be between 0.116 and 0.252 with the average of 0.187. The marker index ranged from 3.528 to 27.972 with the mean of 9.704. Classification of the studied barley

genotypes was conducted by molecular data using neighbor joining algorithm based on distance coefficient of number of differences, which assigned the genotypes into four groups. There was a concordance between the grouping of genotypes based on molecular data and the characters in the greenhouse, but this concordance was not complete. Association analysis of ISSR markers with measured characteristics of barley genotypes showed that ISSR₁ and ISSR₅ had significant relationship with most of the root and shoot traits.

Discussion

High genetic diversity was observed among barley genotypes with respect to root and shoot traits. The results showed that ISSR primers have the ability to separate barley genotypes from each other. Also, it seems that ISSR markers under study can be used in marker assisted selection of barley genotypes in breeding programs.

Keywords: Association analysis, Cluster analysis, ISSR primers, Molecular data, Stepwise regression

Plant Prod., 2020, 43(3), 323-336
DOI: 10.22055/ppd.2019.27840.1684

ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو پاییزه از نظر ویژگی‌های ریشه و نشانه‌های ISSR

سهیلا شایان^۱، محمد مقدم واحد^{۲*}، سیدابوالقاسم محمدی^۳، کاظم قاسمی گلعدانی^۴، فهیمه صادق پور^۵ و احمد یوسفی^۶

- ۱- دانش آموخته دکتری اصلاح نباتات (ژنتیک بیومتری)، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۲- *نویسنده مسئول: استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (mmoghaddam@tabrizu.ac.ir)
- ۳- استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۴- استاد، گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- ۶- کارشناس بخش تحقیقات غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۲

چکیده

هدف این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی میان ۲۸ ژنوتیپ جو پاییزه با استفاده از صفات ریشه و ۱۴ آغازگر ISSR طی دو آزمایش بود. آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه تبریز در سال ۱۳۸۸ صورت گرفت و صفات وزن خشک ریشه، حجم ریشه، وزن خشک بخش هوایی و نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی اندازه‌گیری شدند. آزمایش مولکولی با ۲۸ ژنوتیپ جو و ۱۴ آغازگر ISSR انجام شد. تنوع معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های جو از نظر مشخصات ریشه مشاهده شد. ژنوتیپ‌های ۳، ۵، ۹ و ۲۰ دارای مقادیر بیشتری از نظر مشخصات ریشه بودند. تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و فاصله اقلیدسی، ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد که ژنوتیپ‌های گروه سوم از نظر کلیه صفات دارای میانگین بالاتری بودند. از ۱۴ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۱ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. در مجموع، ۵۵۹ نشانه‌گر چند شکل با طول ۸۰ تا ۳۰۰ جفت باز در ژنوتیپ‌های جو تولید شد. میزان اطلاعات چند شکلی نشانه‌گرها بین ۰/۱۱۶ تا ۰/۲۵۲ و شاخص نشانه‌گر بین ۳/۵۲۸ تا ۲۷/۹۷۲ به‌دست آمد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو بر اساس داده‌های مولکولی ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه متناسب کرد. بین نتایج گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی و صفات مورد مطالعه تا حدودی تطابق وجود داشت. بر مبنای بررسی ارتباط نشانه‌گرهای ISSR با صفات کمی، ISSR‌های ۱ و ۵ دارای رابطه معنی‌داری با اکثر صفات بودند. به نظر می‌رسد که می‌توان از نشانه‌گرهای ISSR مورد مطالعه در امر گزینش به کمک نشانه‌گر در برنامه‌های به‌نژادی جو استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: آغازگر، تجزیه ارتباط، تجزیه خوشه‌ای، داده‌های مولکولی، رگرسیون گام به گام

سبب شده‌است که توجه به‌نژادگران به گزینش صفات ثانویه جلب شود. از آنجایی که ریشه تأثیر مستقیمی بر جذب آب و عناصر غذایی و تجمع زیست‌توده بخش

مقدمه

عملکرد دانه صفتی پیچیده و دارای وراثت چندژنی است. از این‌رو، پیشرفت کم در گزینش برای عملکرد

هوایی دارد، ساختار سیستم ریشه‌ای ارقام ممکن است در تفاوت‌های موجود در عملکرد نقش ایفا کنند و لازم است در طول دوره رشد تعادل مناسب بین زیست‌توده اندام‌های زیرزمینی و بخش هوایی حفظ شود. همان‌طور که به نژادی و اصلاح برای خصوصیات مربوط به اندام‌های هوایی موجب افزایش عملکرد می‌شود، انجام مطالعات در مورد ریشه نیز می‌تواند سبب شناخت عوامل مؤثر بر افزایش عملکرد شده و موفقیت تولید را تضمین نماید (Ehlers, 1989). خصوصیات مانند وزن، حجم، طول، قطر، عمق نفوذ، پراکنش ریشه در خاک، درجه انشعاب و تعداد ریشه‌های جنینی جنبه‌های مختلف ساختار ریشه هستند و از معیارهای مهم در ارتباط با جذب آب و مواد غذایی و در نتیجه بهبود عملکرد محسوب می‌شوند (Manschadi et al., 2006). مطالعات متعدد نشان می‌دهند که خصوصیات ریشه مانند عمق ریشه، حجم ریشه، قطر آندهای چوبی و وزن خشک ریشه از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند و به راحتی به گزینش پاسخ می‌دهند (Hoad et al., 2001; Manske and Vlek, 2002; Manschadi et al., 2006). صفات حداکثر طول ریشه و نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی به‌عنوان صفات گزینشی برای بهبود عملکرد دانه تحت شرایط آبیاری نرمال در برنج گزارش شده است (Toorchi et al., 2006). علی‌رغم نقش ضروری سیستم ریشه در رشد و سازگاری گیاه و تنوع بالای آن، به دلیل این که روش‌های ارزیابی ریشه مشکل، زمان‌بر و در شرایط مزرعه با خطای زیادی همراه هستند نسبت به اندام‌های هوایی توجه کمتری به آن شده است. افزون بر این، اغلب صفات مهم ریشه، کمی هستند (Manschadi et al., 2006).

مطالعه تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری ویژه بر اساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند (Mohammadi and Prasanna, 2003). گسترش نشانگرهای DNA سبب به وجود آمدن روش‌های متعددی برای غلبه بر مشکلات اصلاحی و

ژنتیکی موجودات شده است. در بین نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای ISSR به علت چند شکلی بیشتر، تکرار پذیری بالا، توزیع ژنومی بالا و تصادفی، مشخص بودن محل کروموزومی، سهولت استفاده و قابلیت کاربرد آن‌ها در بررسی ژنوتیپ‌ها و تهیه نقشه ژنومی به‌عنوان نشانگرهای مناسبی در مطالعات ژنتیکی محسوب می‌شوند (Liu and Wendel, 2001). (Tanyolac (2003) با بررسی تنوع ژنتیکی ارقام جو وحشی با استفاده از نشانگرهای ISSR گزارش کرد که از ۱۰ آغازگر ISSR مورد استفاده، چهار آغازگر دارای نوارهای چند شکل هستند. از این چهار آغازگر ۳۴ نوار تولید شد که ۱۱ تا از آن‌ها چند شکل (۳۲ درصد) بودند. (Guasmi et al. (2012) برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام جو از نشانگرهای ISSR استفاده کردند. در تجزیه ISSR، از ۱۰ آغازگر مورد استفاده ۳ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند که در مجموع، ۹ نوار تولید شد که ۶ تا از آن‌ها چندشکل (۶۶/۶۷ درصد) بودند. در مطالعه‌ی دیگر توسط (Drine et al. (2016) از نشانگرهای ISSR به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های جو استفاده شد. میزان نوار چند شکل ۷۲/۲ درصد بود. (El-Awady et al. (2012) نیز تنوع ژنتیکی جو را با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد مطالعه قرار دادند. از ۱۰ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۷ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. بر اساس تجزیه ISSR، ۵۳ نوار تولید شد که ۱۶ نوار چند شکل (۳۰/۲ درصد) بودند و تعداد نوار برای هر آغازگر ISSR بین ۵ تا ۱۰ با میانگین ۷/۵۷ تولید شد. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برابر با ۰/۳۷ بود. (Zare Rashnodi et al. (2019) با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی را بررسی کرده و ۷۷ نوار برخوردار از چندشکلی مشاهده نمودند. میانگین میزان اطلاعات چند شکلی (PIC, Polymorphism Information Content) نیز برابر ۰/۷۵ بود. (Hosseini Gheydari (2019) مطالعه ژنوتیپ‌های زیتون به کمک نشانگرهای ISSR، چندشکلی بسیار زیاد و PIC برابر با ۰/۳۰۹ گزارش کردند. هدف از اجرای این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام جو پاییزه با استفاده از صفات ریشه و

نشانگرهای مولکولی و نیز تجزیه ارتباط آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه شامل ۲۸ ژنوتیپ جو پاییزه بودند که اسامی و شجره آن‌ها در جدول (۱) ارائه شده است. این مواد توسط مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر، کرج تأمین شدند.

آزمایش گلخانه‌ای

این آزمایش در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز با متوسط دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در طول شبانه روز اجرا شد. لازم به ذکر است که تنظیم دما با کولرهای آبی انجام شد و تنظیم نور به کمک روشنایی طبیعی و لامپ‌های فلورسنت و التهابی صورت گرفت. ۲۸ ژنوتیپ جو پاییزه در دو تکرار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی مورد مطالعه قرار گرفتند. آزمایش در گلدان‌های ۴ کیلویی (قطر ۲۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۳ سانتی‌متر) و با خاک زراعی مناسب انجام شد. بذرها قبل از کشت در یخچال در دمای دو درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ روز نگهداری شدند تا ورنالیزه شوند. قبل از کشت ظرفیت مزرعه‌ای خاک گلدان‌ها اندازه‌گیری شد تا رطوبت خاک گلدان‌ها در حدود ۸۰-۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای نگهداری شود. کنترل رطوبت از طریق توزین روزانه گلدان‌ها و افزودن مقدار آب مورد نیاز، انجام گرفت. تقریباً ۲۰ روز بعد از کاشت صفات وزن خشک ریشه، حجم ریشه، وزن خشک بخش هوایی و نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی اندازه‌گیری شدند. قبل از تجزیه واریانس برای هر متغیر، ابتدا تجزیه واریانس چندمتغیره به منظور تثبیت خطای نوع اول با استفاده از نرم‌افزار SPSS V20 انجام شد. مقایسه میانگین ژنوتیپ‌ها با استفاده از آزمون LSD (Least Significant Difference) در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار MSTATC صورت گرفت. به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین‌ها به روش Ward و مقیاس فاصله اقلیدسی، با استفاده از داده‌های استاندارد شده با بهره‌گیری از نرم‌افزار

SPSS V20 انجام شد. تعداد گروه‌ها با انجام تجزیه تابع تشخیص مشخص شد. افزون بر این، میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات ریشه، به کمک آزمون LSD مقایسه شدند. خطای مورد استفاده در فرمول LSD نیز از میانگین وزنی واریانس‌های درون گروه‌های حاصل به دست آمد.

آزمایش مولکولی

DNA ژنومی از برگ‌های جوان ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش Saghai-Marooft et al. (1984) استخراج شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. پس از تعیین کمیت DNA، غلظت نمونه‌ها به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز رقیتی شد. در این بررسی از میان ۱۴ آغازگر مورد بررسی، ۱۱ آغازگر چند شکل با الگوهای نواریندی مناسب برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰-۴۹ درجه سانتی‌گراد (بسته به آغازگر) به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در انتها یک چرخه‌ی بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری به وسیله الکتروفورز ژل پلی‌آکرلامید ۴ درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی (Gel-Scan 3000)، ساخت شرکت CORBITT ROBOTICS استرالیا انجام شد. قطعات تکثیری توسط قلم لیزری تشخیص داده شدند. از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی ژل استفاده شد. برای تعیین اندازه نسبی قطعات تکثیری، در چاهک‌های ابتدا، میانی و انتهای ژل، نشانگر وزن مولکولی (DNA Molecular Weight Marker) (# SM0321 Fermentas) بارگذاری شد.

Table 1. Specification of barley genotypes used in the experiment

Pedigree	Genotype	No.
Walfajre/Miraj 1	EC79-10	1
Kmk//Rbr/Wa2196-68/3/EBC(A)	EC79-13	2
Lignee 131//4341 N/Ortolan	EC79-18	3
YEA389.3/YEA475.4	EC80-7	4
Coss/OWB 71080-44-1H	EC81-11	5
Comp 89-9Cr-79-07/Atem/ (Alpha/HC1905//Robur)/3/...	EC81-13	6
Alger/(C110117/Choyo..	EC82-5	7
Np 106/Minn 14133-Gvaxduois//Gi10143	EC82-11	8
L. 131/Gerbel//Ager-Ceres/3/(Scotia/Wa...)	EC83-4	9
Arar/L. 1242	EC83-5	10
K-096M3	EC83-12	11
MAKOUUEE//ZARJOW/80-5151	EC83-17	12
Star/Dundy	A1C84-7	13
F2//Radical/Karat/3/Radical/4/Xemus	A1C84-9	14
Monolit/Plaisant	A1C84-15	15
CWB117-77-9-7/Teran 78	A2C84-5	16
CWB117-77-9-7/Teran 78	A2C84-6	17
Roho/Mazurka//Dyton	A2C84-11	18
Boyer(F356)126//Cem 1413/Kt2085	A2C84-12	19
Cyclone/Arar	A2C84-14	20
Mal/OWB753328-5H//11840-76/3/Radical	A2C84-18	21
Makouee	Makouee	22
Rihane	Rihaneh	23
Kavir	KAVIR	24
73M4-30	73M4-C	25
Schuyler	Schulyer	26
L.1242	L.1242	27
LB. Iran/Una 8271//Gloria"S"/Come"s"-11M/3/Kavir	EM80-9	28

Tabel 2. Specification of ISSR primers under study

Sequence primer	Annealing temperature	ISSR primer
5'-CAC ACA CAC ACA CA (AG) G-3'	52	ISSR ₁
5'-CTC TCT CTC TCT CTC TG-3'	51.5	ISSR ₂
5'-GAG AGA GAG AGA GAG AC-3'	51	ISSR ₃
5'-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3'	50	ISSR ₄
5'-GAG AGA GAG AGA GAG A (CT) C-3'	56	ISSR ₅
5'-GAG AGA GAG AGA GAG A (CT) G-3'	54	ISSR ₆
5'-GAC AGA CAG ACA GAC A-3'	49	ISSR ₇
5'-GAC ACG ACA CGA CAC GAC AC-3'	60	ISSR ₈
5'-(GC) T (AGCT) CTC TCT CTC TCT CTC TCC-3'	55.5	ISSR ₉
5'- TGT GTG TGT GTG TGT GG-3'	51	ISSR ₁₀
5'-TGG ATG GAT GGA TGG A-3'	49	ISSR ₁₁

به منظور برآورد PIC برای هر آغازگر مستقل، میانگین حسابی PIC نشانگرهای تولیدشده، محاسبه شد (Raina et al., 2001). شاخص نشانگر MI (Marker Index) از رابطه $MI = EMR \times PIC$ به دست آمد که در آن EMR (Effective Multiplex Ratio)، نسبت چندگانه مؤثر و

الگوهای نواری حاصل به صورت وجود و عدم وجود نوار امتیازدهی شدند. امتیازدهی ژل‌ها با استفاده از نرم افزار 1Dscan EX 3.1 صورت گرفت. PIC برای هر نشانگر از رابطه $q^2 - p^2 = 1$ به دست آمد که در آن p فراوانی الل تولیدکننده نوار و q فراوانی الل فاقد نوار بود.

استفاده تفاوت معنی دار وجود داشت که بیانگر وجود تفاوت معنی دار بین ژنوتیپ‌های جو حداقل از نظر یکی از صفات مورد مطالعه است. بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی داری مشاهده شد که حاکی از وجود تنوع در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر این صفات است (جدول ۳). از این تنوع می‌توان در ایجاد جمعیت‌های حاصل از دورگ‌گیری و تولید لاین‌های جدید در برنامه‌های به‌نژادی و نیز مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف استفاده کرد.

بر اساس مقایسه میانگین‌ها ژنوتیپ‌های ۳، ۵، ۹ و ۲۰ در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها دارای میانگین بیشتری از نظر وزن خشک ریشه، حجم ریشه، وزن خشک بخش هوایی و نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک بخش هوایی بودند (جدول ۴).

تنوع بالا برای صفات ریشه توسط Liang et al. (2011) در برنج، Bai et al. (2013) در گندم و Reinert et al. (2016) در جو گزارش شده است.

ضرایب تغییرات برای صفات وزن خشک ریشه، حجم ریشه، وزن خشک بخش هوایی و نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک بخش هوایی به ترتیب ۴۶/۸۳، ۵۰/۰۸، ۱۵/۵۲ و ۳۶/۲۷ درصد بود که نشانگر بالا بودن میزان خطای این صفات است. در مطالعات روی برنج نشان داده شده است که وزن خشک ریشه و نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی دارای بالاترین ضریب تغییرات هستند. بنابراین، اندازه‌گیری‌های مربوط به وزن ریشه در معرض خطای نمونه‌گیری بیش‌تری قرار دارند (Toorchi et al., 2002).

برابر با N_p (N_p/N) بود که در این فرمول N_p تعداد نشانگرهای چند شکل و N ، تعداد کل نشانگرهای حاصل از یک آغازگر بود (Powel et al., 1996). در پژوهش حاضر به علت ساختار مجموعه مورد مطالعه و کیفیت بالای تفکیک سیستم الکتروفورز مورد استفاده، کلیه نشانگرهای تولیدشده، چند شکل بودند. بنابراین چون $N = N_p$ بود، رابطه $EMR = N$ برقرار شد و MI از فرمول $N \times PIC$ به دست آمد. این محاسبات با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، تجزیه کلاستر بر اساس الگوریتم Neighbor Joining و ضریب فاصله Number of Differences برای ژنوتیپ‌های جو مورد استفاده، با استفاده از نرم‌افزار 4 MEGA انجام شد.

ارتباط بین داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی

برای تعیین ارتباط بین داده‌های مولکولی و فنوتیپی در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه و نیز به منظور حذف نشانگرهایی که روی صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش گلخانه‌ای تأثیر نداشتند تجزیه رگرسیون گام به گام با استفاده از نرم‌افزار SPSS V20 انجام گرفت. لازم به ذکر است که نشانگرها به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد مطالعه به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

آزمایش گلخانه‌ای

نتایج آزمون نرمال بودن خطاها و یکنواختی واریانس خطاها صادق بودن این فرض‌ها را برای کلیه صفات نشان داد (داده‌ها درج نشده‌اند). بر اساس تجزیه واریانس چندمتغیره، بین ژنوتیپ‌ها از نظر مجموع متغیرهای مورد

Table 3. Analysis of variance of studied characters for barley genotypes

S.O.V.	df	Mean squares			
		Root dry weight	Root volume	Shoot dry weight	Root to shoot dry weight ratio
Replication	1	0.022*	1.418 ^{ns}	0.018 ^{ns}	0.025**
Genotype	27	0.089**	8.091**	0.816**	0.009**
Error	27	0.004	1.612	0.026	0.002

ns, * and ** non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

Table 4. Means of studied characters of barley genotypes

No.	Genotype	Root dry weight	Root volume	Shoot dry weight	Root to shoot dry weight ratio
1	EC79-10	0.121	1.097	1.152	0.105
2	EC79-13	0.069	1.941	1.141	0.060
3	EC79-18	0.167	3.851	1.436	0.116
4	EC80-7	0.102	2.325	1.012	0.101
5	EC81-11	0.176	3.151	1.462	0.120
6	EC81-13	0.093	2.012	0.853	0.109
7	EC82-5	0.106	2.231	0.932	0.114
8	EC82-11	0.099	1.775	0.869	0.114
9	EC83-4	0.195	3.867	1.492	0.131
10	EC83-5	0.062	0.851	0.876	0.071
11	EC83-12	0.117	1.832	1.161	0.101
12	EC83-17	0.102	2.301	0.885	0.115
13	A1C84-7	0.123	2.525	1.134	0.108
14	A1C84-9	0.071	1.895	1.062	0.067
15	A1C84-15	0.116	1.662	1.111	0.104
16	A2C84-5	0.075	1.231	0.821	0.091
17	A2C84-6	0.118	2.717	1.238	0.095
18	A2C84-11	0.068	0.817	0.843	0.081
19	A2C84-12	0.105	2.212	1.115	0.094
20	A2C84-14	0.201	3.251	1.531	0.131
21	A2C84-18	0.089	1.251	1.171	0.076
22	Makouee	0.133	1.801	1.202	0.111
23	Rihaneh	0.041	0.557	0.771	0.053
24	KAVIR	0.033	0.451	0.879	0.038
25	73M4-C	0.045	0.851	0.879	0.051
26	Schulyer	0.111	1.825	0.989	0.112
27	L.1242	0.115	2.362	1.097	0.105
28	EM80-9	0.099	1.751	0.971	0.102
LSD (5%)		0.129	2.605	0.331	0.092

از هم می‌توان به‌عنوان والدین در تلاقی‌ها به منظور افزایش تنوع در نتاج در حال تفرق استفاده کرد.

آزمایش مولکولی

از ۱۴ آغازگر ISSR مورد استفاده ۱۱ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. در مجموع، ۵۵۹ نشانگر چند شکل با طول ۸۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز در ژنوتیپ‌های جو مورد مطالعه تولید شد (جدول ۷). الگوی نواری نشانگرهای ISSR حاصل از آغازگر ISSR₃ در ژنوتیپ‌های جو در شکل (۲) نشان داده شده است. میزان PIC بین ۰/۱۱۶ تا ۰/۲۵۲ با میانگین ۰/۱۸۷ برآورد شد. ISSR شماره ۴ کمترین و ISSR شماره ۶ بیشترین PIC را داشتند. MI نیز بین ۳/۵۲۸ تا ۲۷/۹۷۲ با میانگین ۹/۷۰۴ برآورد شد. ISSR شماره ۷ از کمترین و ISSR شماره ۶ از بیشترین MI برخوردار بودند. (Rahimi et al. (2014) برای مطالعه

نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های استاندارد شده به روش Ward و فاصله اقلیدسی در شکل (۱) مشاهده می‌شود. تعداد گروه‌ها از طریق انجام تجزیه تابع تشخیص برابر با چهار تعیین شد (جدول ۵). در این گروه‌بندی، ژنوتیپ‌های ۶، ۸، ۱۲، ۷، ۲۶ و ۴ در گروه اول، ژنوتیپ‌های ۱۱، ۱۹، ۱، ۲۲، ۱۵، ۱۷، ۲۷ و ۱۳ در گروه دوم، ژنوتیپ‌های ۳، ۵، ۹ و ۲۰ در گروه سوم و ژنوتیپ‌های ۲، ۲۸، ۱۴، ۲۱، ۲۳، ۲۵، ۱۰، ۱۶، ۱۸ و ۲۴ در گروه چهارم قرار گرفتند. قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در یک گروه نشان‌دهنده شباهت آن‌ها است. ژنوتیپ‌های گروه چهارم از نظر کلیه صفات مورد مطالعه بیشترین درصد انحراف منفی از میانگین کل صفات را داشتند و در مقابل ژنوتیپ‌های گروه سوم از جنبه کلیه صفات از بیشترین درصد انحراف مثبت از میانگین کل برخوردار شدند (جدول ۶). از ژنوتیپ‌های گروه‌های دور

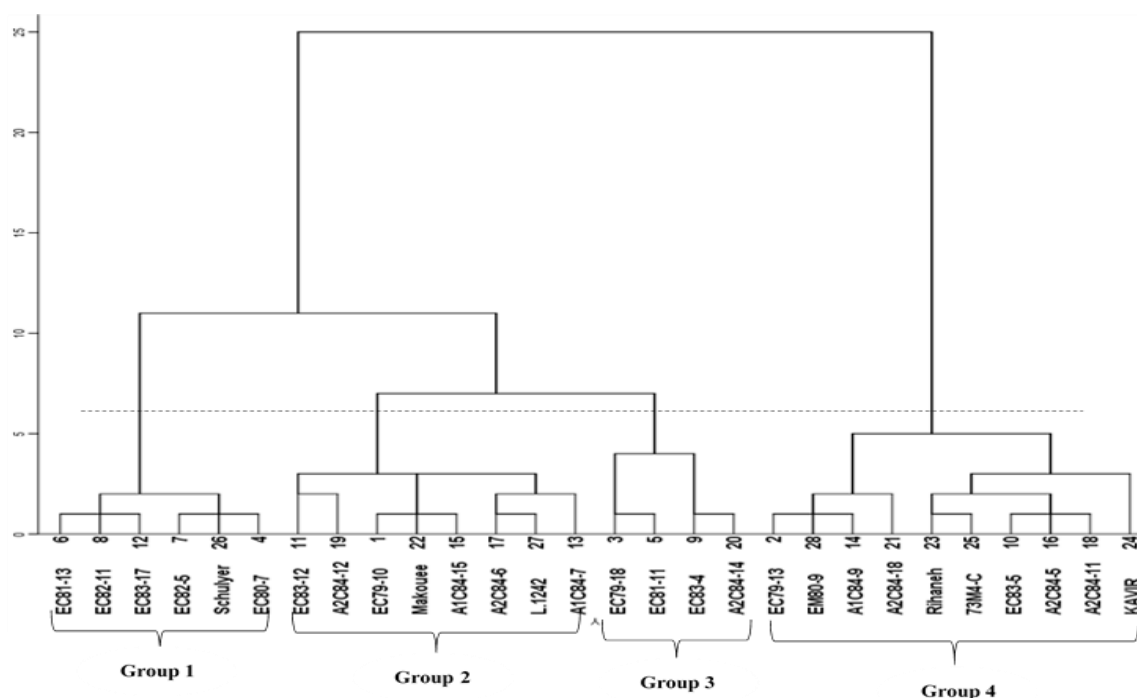


Figure 1. Grouping of the barley genotypes based on studied traits using Ward's method

Table 5. Discriminant function analysis for groups produced from cluster analysis of barley genotypes

Number of groups	Probability	Wilk' Lambda	Eigenvalues
2	0.001	0.437	1.286
3	0.00001	0.114	5.854
4	0.000001	0.063	9.393

Table 6. Mean of the traits in groups produced from cluster analysis of barley genotypes

	Root dry weight (g plant ⁻¹)	Root volume (mL plant ⁻¹)	Shoot dry weight (g plant ⁻¹)	Root to shoot dry weight ratio
(Group 1)	0.126	2.638	0.894	0.140
(Group 2)	0.169	3.033	1.233	0.135
(Group 3)	0.235	4.475	1.342	0.179
(Group 4)	0.071	1.300	0.811	0.076
LSD (5%) ¹	0.112	2.362	0.457	0.021
Total mean	0.135	2.535	1.061	0.121

The error term in LSD was obtained by the weighted average of variances within four groups.

Table 7. Information related to ISSR primers in the studied barley genotypes

Primer	No. of markers	PIC	Marker index
ISSR ₁	133	0.155	20.615
ISSR ₂	26	0.215	5.590
ISSR ₃	48	0.154	7.392
ISSR ₄	40	0.116	4.640
ISSR ₅	32	0.231	7.392
ISSR ₆	111	0.252	27.972
ISSR ₇	24	0.147	3.528
ISSR ₈	28	0.178	4.984
ISSR ₉	22	0.163	3.586
ISSR ₁₀	53	0.226	11.978
ISSR ₁₁	42	0.216	9.072
Mean	50.818	0.187	9.704
Sum	559	-	-

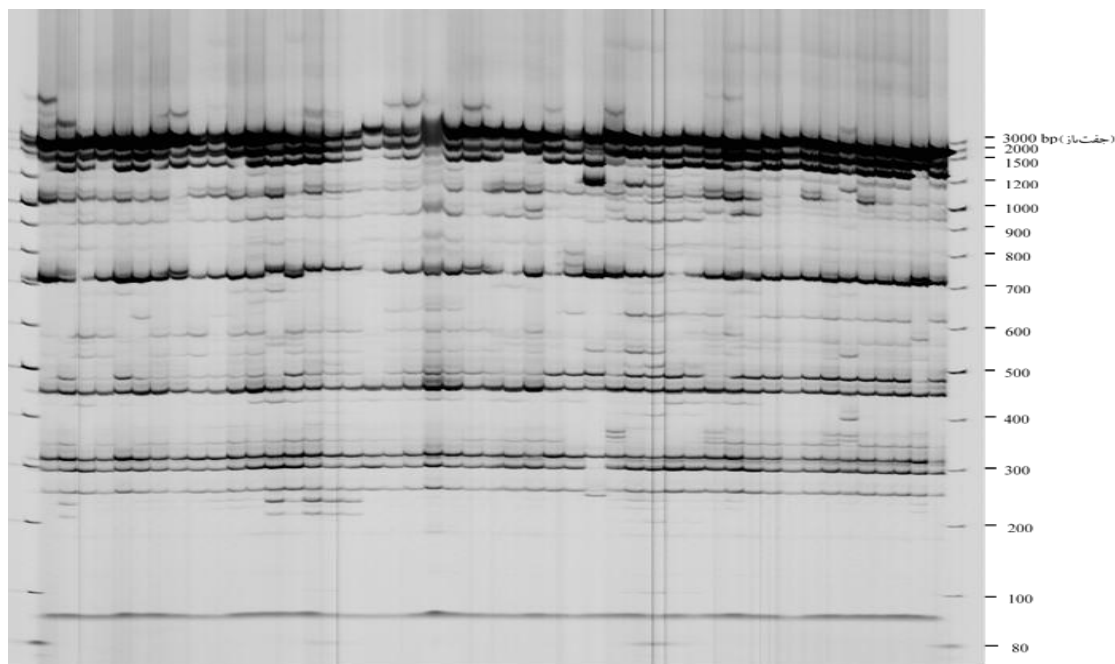


Figure 2. The banding pattern of ISSR₃ primer in the studied barley genotypes

Sofalian and) برآورد شد (۰/۴۶ - ۰/۲۹ و ۰/۹۹ - ۳/۵۱ برآورد شد (Sofalian and Behi, 2013).

تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Neighbor Joining و ضریب Number of Differences ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه متناسب کرد (شکل ۳). در این گروه‌بندی ژنوتیپ‌های شماره‌های ۲۴، ۲۵، ۲۳، ۲۸، ۲۰، ۱۸، ۱۹، ۲۱، ۲۶، ۲۷، ۱۷، ۱۵ و ۱۶ در گروه اول، ژنوتیپ‌های ۱ و ۲۲ در گروه دوم، ژنوتیپ‌های ۱۲، ۱۳ و ۱۴ در گروه سوم و ژنوتیپ‌های ۱۱، ۹، ۱۰، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷ و ۸ در گروه چهارم قرار گرفتند. قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در یک گروه نشان‌دهنده شباهت ژنوتیپ‌ها از نظر الگوهای نواری حاصل از نشانگرهای ISSR است. از این طریق می‌توان ژنوتیپ‌هایی را که در گروه‌های دور از هم قرار گرفته‌اند با توجه به فاصله ژنتیکی آن‌ها به‌عنوان والدین در تلاقی‌ها مورد استفاده قرار داد تا امکان تفکیک متجاوز و تولید نتاج برتر از والدین فراهم شود. در این گروه‌بندی ژنوتیپ‌های شماره‌های ۱۶ و ۱۷ که از لحاظ شجره مشابه هم بودند در داخل گروه ۱ قرار گرفتند. نتایج گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی و صفات مورد مطالعه در آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که بین این دو گروه‌بندی تا حدودی تطابق وجود داشت و

تنوع ژنتیکی جو از نشانگرهای ISSR استفاده و گزارش کردند که در مجموع، ۳۷۸ نوار با طول ۲۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تولید شد که از این میان ۲۹۸ نوار چند شکل بودند. تعداد نوار چند شکل برای هر آغازگر مورد استفاده بین ۸ تا ۱۹ با میانگین ۱۲/۹۵ به‌دست‌آمد. هم‌چنین میزان PIC بین ۰/۷۶۹ تا ۰/۹۰۱ با میانگین ۰/۸۵ برآورد شد. در آزمایشی دیگر در جو، با استفاده از نشانگرهای ISSR، ۶۷ نوار تولید شد که از این میان ۵۲ نوار چندشکل (۷۸ درصد) بودند. در آغازگرهای مورد استفاده ۱۲ نوار منحصر به فرد شناسایی و عنوان شد که می‌توان آن‌ها را به‌عنوان نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی جو مورد استفاده قرار داد (Akladios and Abbas, 2014). (Etminan et al. (2016). نیز با استفاده از نشانگرهای ISSR، توانستند تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گندم دوروم مورد مطالعه را تشخیص دهند. در مطالعه‌ی دیگر در جو، با استفاده از نه آغازگر ISSR، ۶۱ نوار با میانگین ۶/۷۸ نوار برای هر آغازگر تولید شد. از این میان ۵۰ نوار چند شکل با میانگین ۵/۵۶ نوار چند شکل برای هر آغازگر به‌دست‌آمد. میانگین درصد چندشکلی ۸۲/۲۹ درصد بود. در یک بررسی مقادیر PIC و MI برای نشانگرهای ISSR به‌ترتیب

اندازه‌گیری روی ژنوتیپ‌های جو به کمک تجزیه رگرسیون گام به گام نشان داد که برخی از نشانگرهای ISSR دارای رابطه معنی‌دار با صفات مورد اندازه‌گیری هستند. به طوری که ISSR شماره ۱ و ISSR شماره ۵ دارای رابطه معنی‌دار با اکثر صفات بودند. شناسایی نشانگرهای مشترک برای صفات در این آزمایش می‌تواند ناشی از اثرهای پلئوتروپی و یا پیوستگی مکان‌های مربوطه باشد. در این راستا، نشانگرهای واجد بیشترین ضریب تبیین برای هر کدام از صفات اندازه‌گیری شده در جدول (۸) درج شده‌اند.

ژنوتیپ‌های شماره‌های ۱۶، ۱۸، ۲۱، ۲۳، ۲۴، ۲۵ و ۲۸ و ژنوتیپ‌های ۱ و ۲۲ در هر دو گروه بندی در کنار هم قرار گرفتند. بر اساس گزارش‌های متعدد، نشانگرهای ISSR همواره نشانگرهای کارآیی برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد تشخیص داده شده‌اند (Raina et al., 2001; El-Awady et al., 2012; Guasmi et al., 2012; Abou-Deif et al., 2013; Sofalian and Behi, 2013; Drine et al., 2016).

ارتباط بین داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی

تجزیه ارتباط نشانگرهای ISSR با صفات مورد

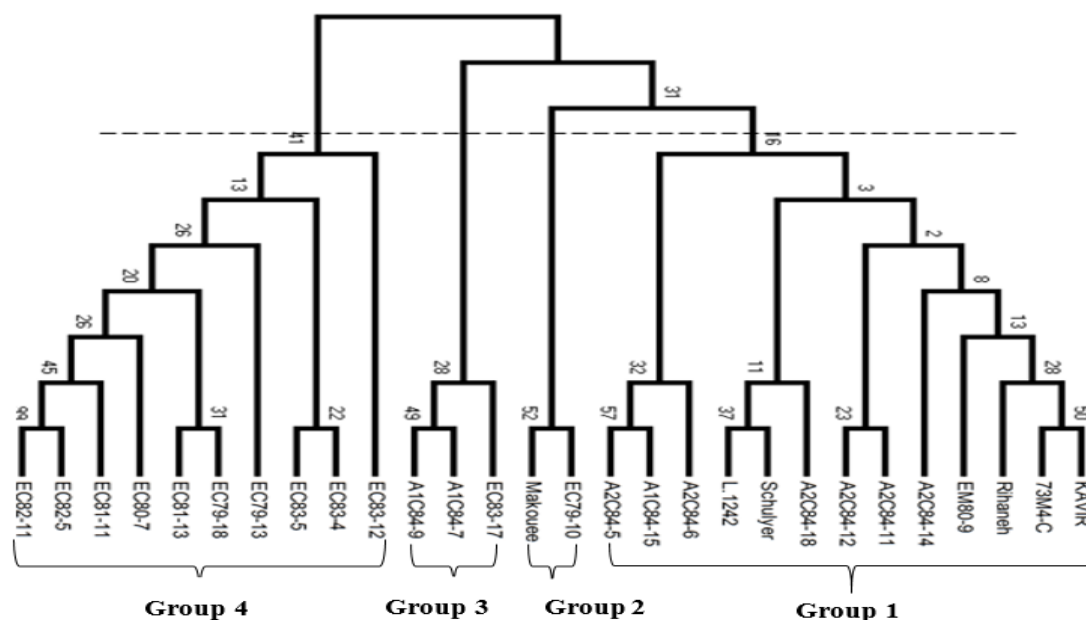


Figure 3. Grouping of the barley genotypes using neighbor joining algorithm and number of difference distance

Table 8. Results of association analysis between ISSR markers and root traits of barley genotypes using stepwise regression analysis

Trait	Marker	Band size range (bp)	Standardized regression coefficient	Adjusted coefficient of determination (%)
Root dry weight	ISSR ₅₋₉ ⁺	2000-3000	0.131**	36.9
	ISSR ₅₋₁₁	2000-3000	0.115**	
	ISSR ₁₋₃₇	1000-1200	-2.279**	
Root volume	ISSR ₆₋₃₇	700-800	-1.805**	39.5
	ISSR ₁₁₋₁₀	1200-1500	1.881**	
	ISSR ₁₋₈₀	700-800	0.318**	
Shoot dry weight	ISSR ₅₋₉	2000-3000	0.349**	43.7
	ISSR ₉₋₈	2000-3000	-0.211**	
Root to shoot dry weight ratio	ISSR ₁₋₃₂	1200-1500	-0.058**	30.2
	ISSR ₅₋₉	2000-3000	0.055**	

+ : Marker number generated by each primer.

** : Significant at 1% probability level.

با استفاده از رگرسیون در گندم نان، ارتباط بالا و معنی‌دار گزارش شده است (Motawea et al., 2015). به‌طور کلی به نظر می‌رسد در صورت استفاده از آغازگرهای بیش‌تر و در جمعیت‌های بزرگ‌تر می‌توان به شناسایی نشانگرهایی که دارای ارتباط بالاتری با صفات ریشه باشند، دست یافت.

نتیجه‌گیری

به علت اهمیت کلی گیاه جو در ک ساختار ژنتیکی این گیاه برای استفاده از ذخایر توارثی گسترده آن در برنامه‌های به‌نژادی ضروری است. در این پژوهش از ۱۴ آغازگر ISSR و صفات ریشه برای بررسی ۲۸ ژنوتیپ جو استفاده شد. نتایج نشان دادند که تنوع ژنتیکی مطلوبی از نظر صفات ریشه بین ژنوتیپ‌های جو وجود دارد. همچنین آغازگرهای ISSR مورد استفاده برای بررسی ساختار ژنتیکی جو مناسب بوده و توانایی تفکیک ژنوتیپ‌های جو را از یکدیگر دارا بودند. از این آغازگرها می‌توان برای هدف‌های مختلف از جمله گزینش ژنوتیپ‌های والدی به منظور ایجاد جمعیت‌های در حال تفرق و یا گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد. همچنین بر اساس بررسی ارتباط نشانگرهای ISSR با صفات مورد اندازه‌گیری در جو، ISSRهای ۱ و ۵ دارای رابطه معنی‌داری با اکثر صفات بودند. به نظر می‌رسد که از این نشانگرهای ISSR می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی آینده جو برای شناسایی ژنوتیپ‌های مناسب از نظر صفات ریشه استفاده کرد.

سیاس‌گذاری

این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز انجام شد.

ضریب تبیین تصحیح شده بین ۳۰/۲ درصد (نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی) و ۴۳/۷ درصد (وزن خشک بخش هوایی) متغیر بود. اگرچه ضریب تبیین مربوط به صفات ریشه بالا نبود ولی ضریب تبیین تصحیح‌شده برای وزن خشک بخش هوایی نسبت به سایر صفات بیشتر بود که نشان‌دهنده کارایی نسبی بالاتر نشانگرهای مورد استفاده در توجیه تغییرات این صفت است. نشانگرهای ISSR₅₋₉ و ISSR₅₋₁₁ دارای رابطه مثبت با وزن خشک ریشه بودند. نشانگر ISSR₁₁₋₁₀ از رابطه مثبت با حجم ریشه و نشانگرهای ISSR₁₋₃₇ و ISSR₆₋₃₇ از رابطه منفی با این صفت برخوردار بودند. نشانگرهای ISSR₁₋₈₀ و ISSR₅₋₉ دارای رابطه مثبت و نشانگر ISSR₉₋₈ دارای رابطه منفی با وزن خشک بخش هوایی بودند. در نهایت نشانگر ISSR₁₋₃₂ رابطه منفی و نشانگر ISSR₅₋₉ رابطه مثبت با نسبت وزن خشک ریشه به بخش هوایی را دارا بودند. از این‌رو، به نظر می‌رسد که با توجه به وجود ارتباط معنی‌دار این نشانگرها با صفات مورد مطالعه از آن‌ها می‌توان طی آزمایش‌های تکمیلی برای شناسایی ژن‌های درگیر در کنترل صفات مورد نظر استفاده کرد. (Sofalian and Behi (2013) موفولوژیک و نشانگرهای ISSR را با استفاده از رگرسیون چندگانه در جو انجام و نتیجه گرفتند که تعدادی از نشانگرها دارای رابطه معنی‌دار با برخی از صفات هستند. (Akladious and Abbas (2014) نیز با بررسی ارتباط بین صفات مورد مطالعه و نشانگرهای ISSR در جو نشان دادند که برخی از نشانگرها دارای رابطه معنی‌دار با صفات مورد مطالعه از جمله عملکرد دانه هستند. در مطالعه‌ای دیگر بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی (نشانگرهای ISSR)

References

- Abou-Deif, M. H., Rashed, M. A., Sallam, M. A. A., Mostafa, E. A. H. and Ramadan, W. A. (2013). Characterization of twenty wheat varieties by ISSR markers. *Middle East Journal of Scientific Research*, 15(2), 168-175.

- Akladios, S. A. and Abbas, S. M. (2014). Inter simple sequence repeat (ISSR) markers and some physiological attributes of barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes to drought and potassium nutrition. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(2), 620-633.
- Bai, C., Liang, Y. and Hawkesford, M. J. (2013). Identification of QTLs associated with seedling root traits and their correlation with plant height in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1745-1753.
- 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, Agriculture and Biotechnology*, 34(2), 1930-1939.
- Ehlers, W. (1989). Transpiration efficiency of oat. *Agronomy Journal*, 81(5), 810-817.
- El-Awady, M. A. H. M., El-Tarras, A. A. E. S. and El-Assal, S. E. D. (2012). Genetic diversity of some Saudi barley (*Hordeum Vulgare* L.) landraces based on two types of molecular markers. *American Journal of Applied Sciences*, 9(5), 752-758.
- Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Noori, A., Mahdavian, Z. and Moradi, Z. (2016). Applicability of start codon targeted (SCoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1075-1081.
- Guasmi, F., Elfalleh, W., Hannachi, H., Feres, K., Touil, L., Marzougui, N., Triki, T. and Ferchichi, A. (2012). The use of ISSR and RAPD markers for genetic diversity among south Tunisian barley. *International Scholarly Research Notices*, 2012(952196), 1-10. <https://doi.org/10.5402/2012/952196>.
- Hoad, S. P., Russell, G., Lucas, M. E. and Bingham, I. J. (2001). The management of wheat, barley and oat root systems. *Advances in Agronomy*, 74, 193-246.
- Hosseini Gheydari, F. and Tahernezhad, Z. (2019). Genetic analysis of some genotypes and varieties of olive in Qom province using morphological and ISSR markers. *Plant Productions*, 42(3), 373-386. [In Farsi]
- Liang, Y. S., Gao, Z. Q., Zhan, X. D., Chen, Y. L., Chen, D. B., Shen, X. H., Cao, L. Y. and Cheng, S. H. (2011). Phenotypic correlation among root and shoot traits in an Elite Chinese hybrid rice combination and its three derived populations. *Acta Agronomica Sinica*, 37(10), 1711-1723.
- Liu, B. and Wendel, J. F. (2001). Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, 1(3), 205-208.
- Manschadi, A. M., Christopher, J., Devoil, P. and Hammer, G. L. (2006). The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Functional Plant Biology*, 33(9), 823-837.
- Manske, G. G. B. and Vlek, P. L. G. (2002). Root architecture wheat as a model plant. In Waisel, Y., Eshel, A. and Kafkafi, U. (Eds.), *Plant roots: The hidden half* (pp. 249-259.). New York, USA: Marcel Dekker.
- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248.
- Motawea, M. H., Said, A. A. and Khaled, A. G. A. (2015). ISSR marker-trait associations and stability analysis in bread wheat varieties. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3(2), 167-177.
- Powel, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RAPD, ISSR, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2(3), 225-238.

- Rahimi, M., Majidi Hervan, I., Valizadeh, M., Kajori, F. D. 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.
- Raina, S. N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K. P. and Devarumath, R. M. (2001). RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44(5), 763-772.
- Reinert, S., Kortz, A., Léon, J. and Naz, A. A. (2016). Genome-wide association mapping in the global diversity set reveals new QTL controlling root system and related shoot variation in barley. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1061. doi: 10.3389/fpls.2016.01061.
- Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K., Jorgensen, R. A. and Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), 8014-8018.
- Sofalian, O. and Behi, M. (2013). Assessment of winter survival in barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using molecular markers and some physiological traits. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University*, 30(2), 45-54.
- Tanyolac, B. (2003). Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) populatins from west Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(6), 611-614.
- Toorchi, M., Shashidhar, H. E. and Sridhara, H. (2006). Influence of the root system on grain yield and related characters in rainfed lowland rice (*Oryza sativa* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(12), 2267-2272.
- Toorchi, M., Shashidhar, H. E., Hittalmani, S. and Gireesha, T. M. (2002). Rice root morphology under contrasting moisture regimes and contributing of molecular marker heterozygosity. *Euphytica*, 126(2), 251-257.
- Zare Rashnodi, N., Erfani Moghadam, J. and Fazeli, A. (2019). The screening of persian walnut genotypes based on the quantitative and qualitative characters and the investigation of genetic diversity among promising samples using ISSR marker. *Plant Productions*, 42(2), 279-294. [In Farsi]

