اشباع نقشه پیوستگی ریزماهواره‌ای گندم نان درجمعیت حاصل از تلاقی Fukuho-Komugi × Oligo-Culm با استفاده از نشانگرهای AFLP

مهدی رحیم ملک [۱]، بدر الدین ابراهیم سید طباطبایی [۲*] و سید ابوالقاسم محمدی [۳]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۲۶)

چکیده

نقشه‌های ژنتیکی با پوشش بالای ژنوم نقش بسزایی در تحقیقات پایه و کاربردی ژنتیک ایفا می‌کنند. در دهه‌های اخیر با پیدایش نشانگرهای DNA تحول عظیمی در تهیه نقشه‌های ژنتیکی در گیاهان مختلف به خصوص گندم بـه وجـود آمـده اسـت. در ایـن تحقیـق، از نـشانگر AFLPبرای اشباع نقشه ژنتیکی ۱۰۷فرد هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی دو والد به نام‌هـای Oligo-Culm × Fukuho-Komugi دریافـت شده از مرکز تحقیقات بین المللی کشاورزی ژاپن استفاده گردید. از چهارچوب نقشه ژنتیکی این جمعیت به عنوان نقشه پایه در تجزیـه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد. تجزیهAFLP با استفاده از آنزیم‌های برشی *MseI/PstI* انجام گرفت. متوسط درصد چند شکلی نشانگر AFLP ۶/۱۶٪ بود. تجزیه داده‌ها توسط نرم افزار Mapmaker/EXP Ver ۳/۳ با معیار حداکثر فاصله ۵۰ سانتی مورگان و حداقل LOD برابـر ۳ و رسم نقشه گروه‌های پیوستگی توسط نرم افزارDrawmap Ver1.1 انجام گرفت. ۱۱۵ نشانگر AFLP به ۱۰ گروه منتسب شدند و تعدادی نیز به صورت غیرپیوسته باقی ماندند. تجزیه تکمیلی داده‌ها به همراه نشانگرهای ریزماهواره، موقعیت کروموزومی نشانگرها را تعیین کـرد. در نهایت ۷۱/۱٪ نشانگرها به ژنوم A، ۵/۱۶٪ به ژنوم B و تنها ۳٪ به ژنوم D تخصیص یافتند. نشانگرهای AFLP مورد استفاده در این تحقیق توانستند در مجموع ۱۱ فاصله خالی را در هفت کروموزوم(۳A،۷A،۲B،۳B،۵B،۷B و۲A) پر نمایند. پوشش کم ژنوم D توسـط نـشانگرها به‌دلیل سطح کم چند شکلی در این ژنوم در جمعیت‌های مختلف و حالت حفظ شـده آن در جمعیـت‌هـای گونـاگون مـی‌باشـد. در بـین کروموزوم‌ها، بیشترین تعداد نشانگر(۶۰) به کروموزوم ۷B تخصیص داده شد. توزیع نشانگرها روی این کروموزوم غیریـک‌نواخـت بـود. توزیع غیریک‌نواخت نشانگر روی این کروموزوم به تجمع نشانگرهایAFLP در نواحی هتروکروماتین به خصوص اطراف سانترومر مربوط می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گندم، جمعیت‌هاپلوئید مضاعف، نقشه پیوستگی، AFLP

مقدمه

گندم اولین غله و مهم‌تـرین گیـاه زراعـی دنیاسـت و خاصـیت نانوایی آن به لحـاظ ویژگـی گلـوتن اسـت .گلـوتن بخـشی از پروتئین‌های سخت آندوسپرم است که باعث افـزایش خاصـیت چسبندگی می‌شود. گندم نان با نـام علمـی *Triticum aestivum* از خـــانواده گرامینـــه و دارای ۴۲ کرومـــوزوم (۲n=۶x=۴۲) و

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. دانشیار بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۳. دانشیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Sayedt@cc.iut.ac.ir

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]

هگزاپلوئید می‌باشد و دارای سه ژنوم A، B و D است (۱).پیشرفت‌های اخیر امکان یافتن ژن‌های خاص را روی کروموزوم‌های موجودات مختلف فراهم ساخته است. نقشه‌های ژنتیکی با پوشش بالای ژنوم نقش بسزایی در تحقیقات پایه و کاربردی ژنتیک ایفا می‌کنند. از کاربردهای نقشه‌های ژنتیکی می‌توان به مکان‌یابی ژن‌های موردنظر، تسهیل در اصلاح گیاهان به کمک نشانگرها، تهیه نقشه‌های براساس کلون اشاره کرد. نقشه پیوستگی موقعیت نسبی نشانگرهای ژنتیکی خاص را در طول کروموزوم‌ها نشان می‌دهد. اصول ایجاد نقشه‌های پیوستگی براساس وقوع نوترکیبی است که درتقسیم میوز به وقوع می‌پیوندند. انواع مختلفی از جمعیت‌های در حال تفرق برای تهیه نقشه ژنتیکی استفاده می‌شوند. تفاوت این جمعیت‌ها در میزان نوترکیبی، تعداد چرخه‌های میوزی و تثبیت نو ترکیبی می‌باشد. یکی از انواع جمعیت‌های در حال تفرق جمعیت هاپلوئید مضاعف است. مهم‌ترین مزیت جمعیت‌های هاپلوئید مضاعف خلوص بالای آنهاست که امکان آزمایش‌های تکراردار را می‌دهد و لذا در برنامه‌های مکان‌یابی امکان بررسی اثر متقابل محیط و مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت کمی وجود دارد (۵، ۲۰ و۲۴). در دهه اخیر با پیدایش نشانگرهای DNA تحول عظیمی در تهیه نقشه‌های ژنتیکی در گیاهان مختلف به خصوص گندم به وجود آمده است.

یکی از اهداف مهم در تهیه نقشه پیوستگی تهیه نقشه ژنتیکی اسکتی یا چهارچوبی است که اغلب بر اساس استفاده از نشانگرهای ریزماهواره استوار است. فواصل بین نشانگرهای ریزماهواره توسط سایر نشانگرهای تصادفی ولی با چند شکلی زیاد همانند نشانگرهای AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) و ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) پر می‌شوند(۱۲). نقشه‌های ریز ماهواره‌ای گندم در سال ۱۹۹۵ و ۱۹۹۸ توسط رودر و همکاران تهیه شد (۱۸و۱۹). در سال ۲۰۰۲، گوپتا و همکاران(۸) ۶۶ نشانگر ریز ماهواره جدید به نقشه ژنتیکی گندم اضافه کردند. باتوجه به این‌که گندم ۲۱ گروه پیوستگی از سه ژنوم متفاوت A، B و D دارد هرچه تعداد نشانگرهای ریزماهواره در نقشه ژنتیکی گندم افزایش یابند چهارچوب نقشه کامل‌تر و اهداف بعدی که شامل اشباع کردن نقشه، و مکان‌یابی ژن‌ها می‌باشد راحت‌تر انجام می‌گیرد (۸). پس از تهیه چهار چوب نقشه لازم است که با استفاده از نشانگرهای چندشکل نقشه ژنتیکی را اشباع کرد. یکی از نشانگرهای متداول و کارا در این زمینه نشانگرهای AFLP می‌باشند. این نشانگر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد که توسط ووس و همکاران (۲۳)در سال ۱۹۹۵ ارائه گردید. این تکنیک براساس تکثیر دستجات خاصی از قطعات برش یافته ژنومی می‌باشد. در این نشانگر در مرحله اول DNA با استفاده از آنزیم‌های محدودگر، برش و سازگارهای (Adapters) دو رشته‌ای به انتهای قطعات DNA متصل می‌شوند تا جایگاه اتصال برای آغازگرها در مرحله تکثیر به وجود آید (۲۳).

تحقیقات متعددی در جهت اشباع نقشه ژنتیکی گندم در جمعیت‌های گوناگون انجام شده است. کادلن و همکاران (۳) به تهیه نقشه بین واریته‌ای در گندم نان و مقایسه آن با نقشه ژنتیکی گندم حاصل از تلاقی‌های مختلف گندم پرداختند. آنها ۱۰۶ لاین هاپلوئید مضاعف حاصل از F_1 تلاقی مونوزومی‌های گندم چینی بهاره و "Courtot" را، مورد استفاده قرار دادند. نقشه حاصل ۱۸ گروه از ۲۱ گروه پیوستگی را پوشش داد. در مورد ژنوم‌های A و B توزیع نشانگرها تقریباً یکسان بود ولی کمترین پوشش متعلق به ژنوم D بود. برایان و همکاران(۲) تعدادی از ریز ماهواره‌های گندم را جداسازی کردند. در این تحقیق نیز کمترین تعداد نشانگرهای مکان‌یابی شده متعلق به ژنوم D گندم بود. نقشه ژنتیکی گندم براساس نشانگر AFLP توسط گِرج و همکاران (۷) با استفاده از جمعیت هاپلوئید مضاعف ۹۳ فردی حاصل از تلاقی ارقام گندم Garnet و Savnders تهیه شد. رقم Garnet مقاومت به باد زدگی بالا و رقم Savnders مقاومت به بادزدگی بسیار کم داشتند. نقشه حاصل بر اساس ۶۲۰ نشانگر AFLP حاصل از ۶۰ ترکیب آغازگرهای *Pst*I/*Mse*I بود. در ضمن ۴۲ نشانگر ریزماهواره نیز در

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]

این نقشه مورد استفاده قرار گرفت. Messmer و همکاران (۱۵) نشانگرهای RFLP را در جمعیت حاصل از تلاقی Swiss winter wheat (*Triticum aestivum*) رقم Frono و Swiss winter Spelt (*Triticum spelta*) واریته Oberculmer استفاده نمودند. آنها ۱۷۶ نشانگر RFLP و ۹ نشانگر ریزماهواره روی ۲۰۴ فرد از جمعیت F_5 را مورد ارزیابی قرار دادند. حدود ۳۵ درصد از این مکان‌ها انحراف از تفرق ۱:۱ نشان دادند. پتگ و همکاران (۱۶) جهت تهیه نقشه اشباع شده در گندم امر (*Triticum dicocoides*)، از نشانگرهای مولکولی AFLP، RAPD و SSR استفاده کردند. در این تحقیق، ۵۴۳ نشانگر مورد استفاده طول نقشه‌ای معادل ۳۰۰۰ سانتی مورگان را پوشش داد و در اکثر ۱۴ کروموزوم تجمع نشانگرها مشاهده شد. تمایز ژنتیکی بین *T. dicocoides* و *T. durum* با استفاده از نشانگرهای AFLP به ژنوم B نسبت داده شد. نشانگرهایی که انحراف از تفرق نشان دادند، اغلب روی کروموزوم‌های 4A، 5A و 5B قرار داشتند. چالمرز و همکاران (۴) سه نقشه پیوستگی را در گندم نان با استفاده از نشانگرهای SSR، AFLP و RFLP تهیه نمودند.

در گزارش آنها ۱۸۰ لاین هاپلوئید مضاعف حاصل ازسه تلاقی CD87 × Katepwa، Carnbrook × Halberd و Tasman × Sunco مورد استفاده قرار گرفت. در سه تلاقی مذکور به ترتیب ۵۰۵ نشانگر، ۹۰۲ نشانگر و ۳۵۵ نشانگر در این جمعیت‌ها مکان‌یابی شدند و حدود ۲۰-۱۰ درصد نشانگرها به‌صورت ناپیوسته باقی ماندند.

باتوجه به مشکلات ژنومی گندم (چند شکلی کم، پوشش ژنومی کم ژنوم D و پوشش غیر یک‌نواخت کروموزوم‌ها توسط نشانگرها) و وجود ۲۱ گروه لینکاژی در گندم، اشباع کردن نقشه ژنتیکی آن امری ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف اصلی این تحقیق اشباع نقشه ژنتیکی ریزماهواره‌ای گندم با استفاده از نشانگرAFLP و پر کردن فضاهای خالی نقشه ژنتیکی قبلی با استفاده ازاین نشانگر می‌باشد. والدین مورد استفاده در این تحقیق از لحاظ صفات مختلف(از قبیل مقاومت به زنگ‌های گندم و برخی صفات مورفولوژیکی ازجمله طول خوشه، ارتفاع بوته و ...) در دو دامنه مخالف یکدیگر قرار دارند و با توجه به جمعیت هاپلوییدمضاعف حاصله که جمعیت خالص(هموزیگوتی) می‌باشد، امکان مطالعات آتی چون مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و مکان یابی ژنهایی که در مناطق کم نشانگر یا بی نشانگر واقع هستند، پس از اشباع نقشه ژنتیکی تسهیل خواهد گردید.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد استفاده در تحقیق حاضر ۱۰۷ لاین هاپلوییدمضاعف حاصل از تلاقی دو والد گندم *Triticum aestivum* به نام‌های Fukuho-Komugi و Oligo-Culm بود که از مرکز تحقیقات بین المللی کشاورزی ژاپن دریافت شد. استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا (۶) انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد و واکنش AFLP بر اساس روش ووس و همکاران (۲۳) صورت گرفت.

برش DNA با استفاده از دو آنزیم برشی *Pst*I و *Mse*I تهیه شده از شرکت Roche آلمان انجام گرفت. سپس اتصال سازگارها به انتهای قطعات برش یافته با استفاده از آنزیمT4 لیگاز انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر اپندورف Mastercycler gradient با ۳۰ چرخه شامل، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه با استفاده ازآغازگرهای با یک نوکلئوتید انتخابی انجام گرفت. در مرحله دوم تکثیر، محصولات حاصل از مرحله تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۵:۱ رقیق شده و در واکنش تکثیر انتخابی به همراه آغازگرهای با سه نوکلئوتید انتخابی استفاده گردید. چرخه‌های حرارتی شامل دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته کردن اولیه و پس از آن ۳۵ چرخه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه که در ۱۲ چرخه اولیه، دمای اتصال آغازگر به میزان ۰/۷ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه کاهش یافت و در ۲۳ چرخه باقی‌مانده در دمای ۵۶

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]

جدول۱. توالی سازگارها و آغازگرهای MseI و PstI مورد استفاده در این تحقیق

۱ -توالی سازگارهای *Mse*I و *Pst*I

*Pst*I adapter: 5′- GACTGCGTAGGTGCA- 3′
5′- CCTACGCAGTCTACGAG - 3′
*Mse*I adapter: 5′- GACGATGAG TCC TGAG - 3′
5′- TACTCAGACTCAT - 3′

۲-توالی آغازگرهای *Mse*I و *Pst*I با یک نوکلئوتید انتخابی

*Pst*I: 5 ′-GAC TGC GTA GGT GCAG - 3′
*Mse*I: 5′ - GAT GAG TCC TGA GTAA- 3′

۳- توالی‌های سه نوکلئوتیدی انتخابی *Mse*I و *Pst*I که این سه نوکلئوتید در انتهای ۱۶ نوکلئوتید اول گزینه دوم قرار می‌گیرند.

P1= AAG	M17=CAA	M28=CGT
P2=ACC	M18=CAC	M29=CTA
P3=ACG	M19=CAG	M31=CTG
P4=AGC	M21=CCA	
P5=AAC	M22=CCC	
P6=AGA	M24=CCT	

درجه سانتی‌گراد ثابت شد و نهایتا بـه مـدت دو دقیقـه در دمـای ۷۲ °C قرار گرفت. توالی و ترکیب سازگارها وآغازگرهای مـورد استفاده در این تحقیق در (جدول ۱) آمده‌است.

محصولات تکثیری با استفاده از ژل پلی اکریل آمید شـش درصد از نوع واسرشـت و حـاوی هفـت مـولار اوره تفکیـک گردید. قبل از بارگذاری نمونـه‌هـا، الکتروفـورز مقـدماتی بـه مدت ۳۰ دقیقه در شرایط ۱۰۰ وات ثابت و دمای ۵۰-۵۵ °C صورت گرفت. الکتروفورز محصولات تکثیری نیـز در همـان شرایط و به مدت دو ساعت انجام شـد. پـس از الکتروفـورز، رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام گرفت و از الگوی نواری به‌دست آمده عکس‌برداری شد. الکتروفورز بـا دسـتگاه تـوالی یـاب (Biometra (Sequencing gel مـدل S2 انجـام گرفت.

امتیازدهی داده‌هـا بـه‌صـورت حـروف A و H انجـام شـد و انحراف داده‌ها از نسبت‌های ۱:۱ با اسـتفاده از تـست مربـع کـای صـورت پـذیرفت. تجزیـه داده‌هـا توسـط نـرم افـزار 3.3 Mapmaker/EXP Ver با معیار حداکثر فاصله ۵۰ سانتی مورگـان و حداقل LOD برابر ۳ انجـام گرفـت و از تـابع کوسـامبی(۱۰) بـرای تبـدیل فواصـل نـوترکیبی بـه سـانتی مورگـان اسـتفاده شد(۱۱و۱۳). ترسیم نمای کروموزومی گروه‌های پیوستگی توسط نرم افزارDrawmap Ver1.1 صورت پذیرفت (۲۲).

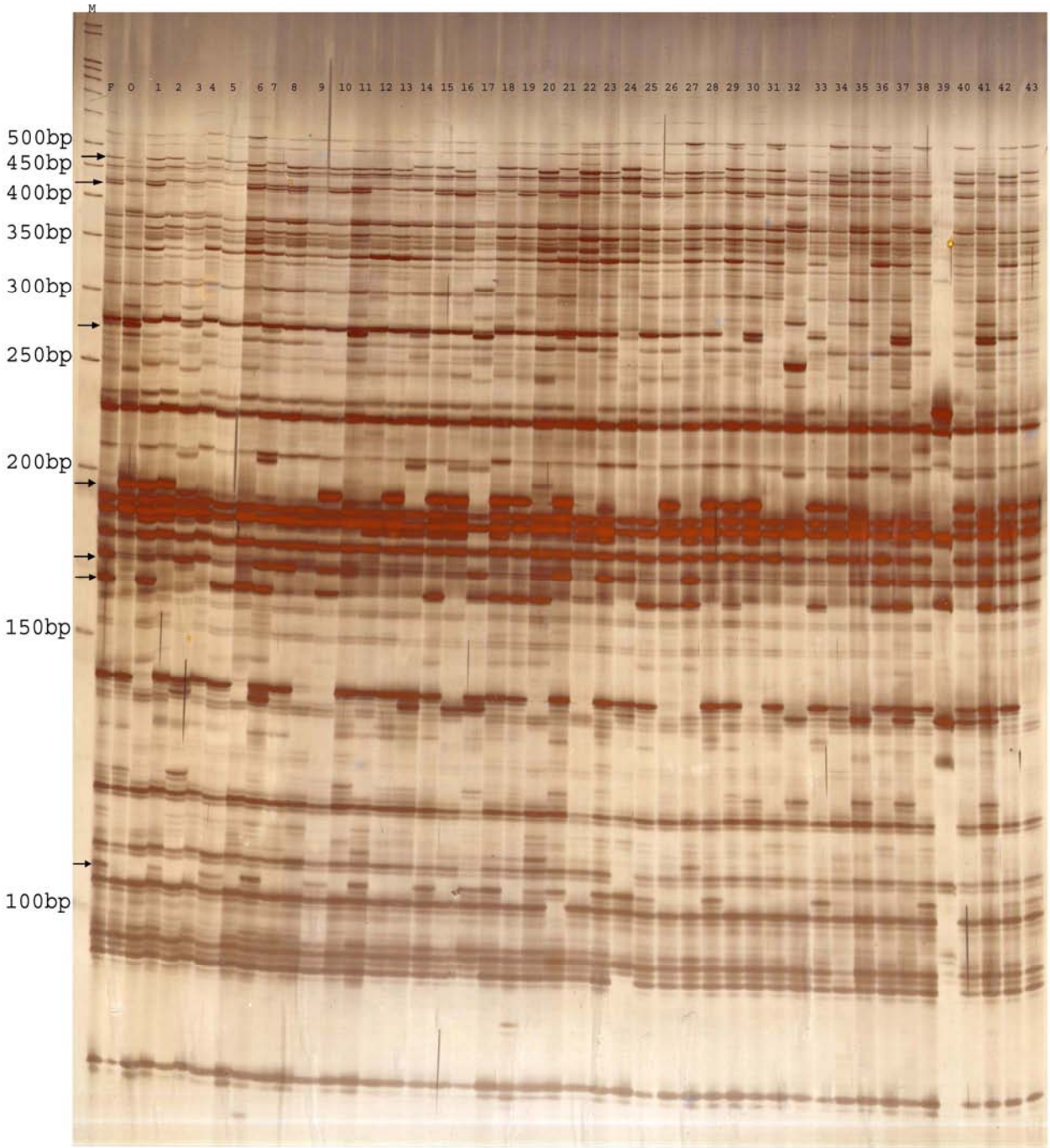
نتایج و بحث

در این تحقیق از ۱۳ ترکیب آغـازگری، در مجمـوع تعـداد ۶۸۴ نوار به‌دست آمد که از این تعداد ۱۱۵ نوار چندشکل بودند. اکثر نوارها بین محدوده ۵۰-۵۰۰ جفت باز قـرار داشـتند(شـکل۱). بیـشترین درصـد چندشـکلی متعلـق بـه ترکیـب آغـازگری P-AGC/M-CGT (۳۲/۵) و کمتـرین آن بـه آغـازگر P-AAC/M-CCC (۷/۵) تعلق داشت. متوسط درصد چندشکلی در نـشانگرهای مـورد اسـتفاده۱۶/۶درصـد بـود. در میـان آغازگرهای انتخاب شده، ترکیـب آغـازگریP-AAC/M- CCC بیـشترین تعـداد نـوار تـک شـکل (۷۳ نـوار) را در مقایـسه بـا سایرآغازگرها نشان داد (جدول۲).

تجزیه مربع کای نشان داد کـه ۲۱ نـشانگر از ۱۱۵ نـشانگر از نسبت‌های مندلی ۱:۱ در جمعیت دابـل هاپلوییـد انحـراف نـشان دادند (P<۰/۰۱). اکثر ۱۸/۲٪ نشانگرهایی که انحراف نشان دادند به سمت والد Fukuho-Komugi اریب بودند. چنـین انحرافـی در جمعیـت‌هـای هاپلوییـد مـضاعف در دامنـه‌هـای متفـاوت در

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]



شکل۱. الگوی نواری آغازگرP-ACG & M-CGT به منظور بررسی نوارهای چندشکل بین والدین و ۴۳ فرد مضاعف هاپلویید

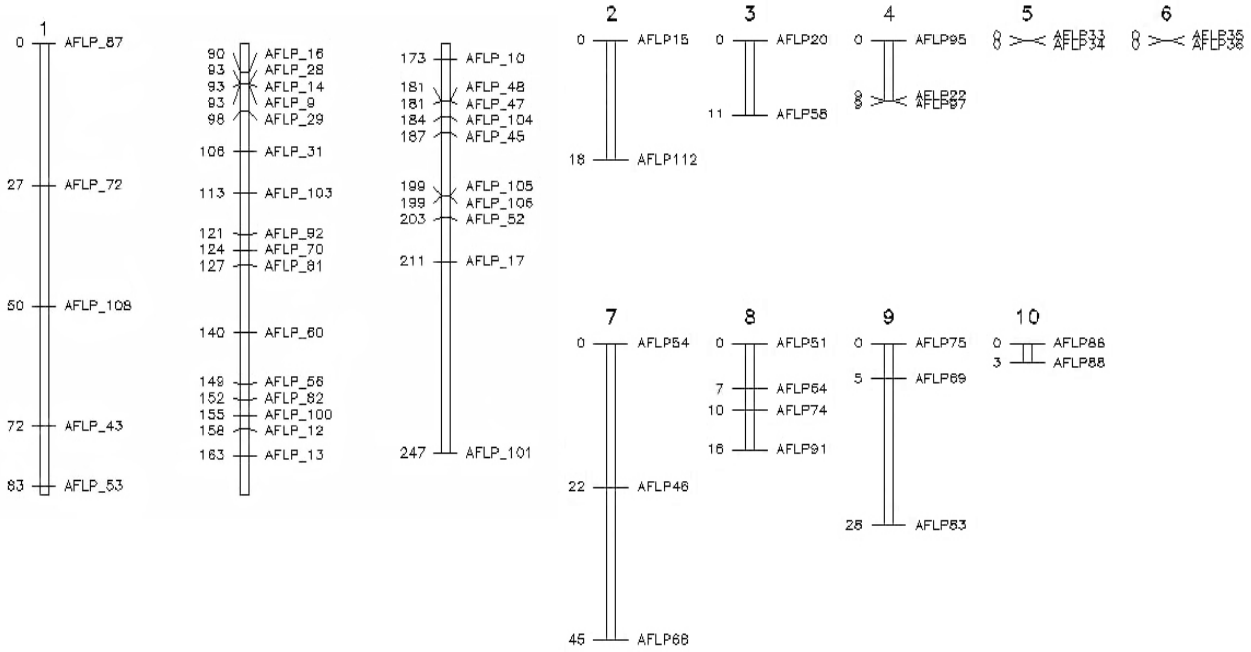
تحقیقات قبلی نیز گزارش شده است (۹). پس از حذف ۲۱ نشانگر مذکور، تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار Mapmaker/EXP Ver 3.3، انجام گرفت و نشانگرهای AFLP را در ۱۰ گروه طبقه‌بندی کرد؛ که برخی از نشانگرها نیز به‌صورت غیرپیوسته باقی‌ماندند (شکل۲). پس از تجزیه مقدماتی و تشکیل گروه‌های پیوستگی اولیه، لازم بود که موقعیت مکانی نشانگرها روی کروموزوم‌ها مشخص گردد. بدین منظور داده‌های AFLP همراه با داده‌های نشانگرهای ریزماهواره ارائه شده توسط سوناجا و همکاران(نتایج منتشر نشده است) تجزیه شد. بر این اساس از ۱۱۵ نشانگر AFLP , ۸۱ نشانگر

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]

جدول۲. تعداد نوارهای چندشکل، تک شکل و درصد چندشکلی مشاهده شده در جمعیت دابل هاپلویید حاصل از تلاقی Fukuho-Komugi و Oligo-Culm با استفاده از آغازگرهای مختلف

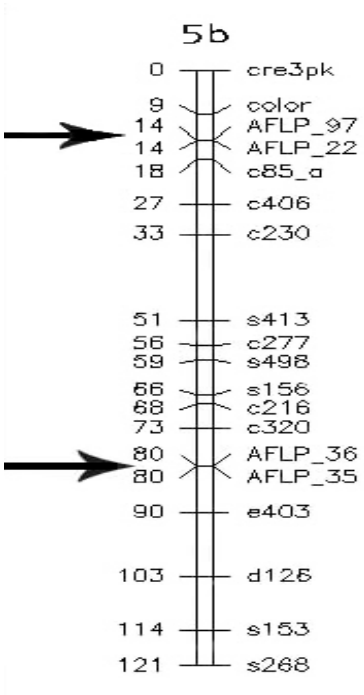
نام آغازگر	تعداد نوار تک شکل	تعداد نوار چندشکل	تعداد کل نوار	درصد چندشکلی
P1/M17	۶۰	۹	۶۹	۱۳
P1/M26	۳۱	۳	۳۴	۸/۸
P1/M18	۳۹	۵	۴۴	۱۱/۳
P2/M19	۳۴	۶	۴۰	۱۵
P2/M31	۳۴	۱۴	۴۸	۲۹
P2/M29	۴۸	۶	۵۴	۱۱/۱
P3/M29	۴۳	۱۶	۵۹	۲۷/۱
P3/M28	۵۹	۱۱	۷۰	۱۵/۷
P3/M24	۳۹	۸	۴۷	۱۷
P4/M31	۵۵	۱۵	۷۵	۲۰
P4/M28	۲۷	۱۳	۴۰	۳۲/۵
P5/M22	۷۳	۶	۷۹	۷/۵
P6/M21	۳۰	۳	۳۳	۹
مجموع	۵۶۹	۱۱۵	۶۸۴	–
میانگین	۴۳/۷	۸/۸	۵۲/۶	۱۶/۶



شکل۲. نقشه پیوستگی نشانگرهای AFLP با معیار حداکثر فاصله ۵۰ سانتی مورگان و حداقل LOD برابر ۳ و تابع نقشه کوسامبی

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]



شکل۳. موقعیت نشانگرهای AFLP بین سایر نشانگرهای نقشه ژنتیکی قبلی در کروموزوم 5B

(۷۱/۱٪) به ژنوم A ، ۱۹ نشانگر (۱۶/۵٪) به ژنوم B ، ۳ نشانگر(۲/۶٪) به ژنوم D منتسب شدند. در این میان ۴۹ نشانگر AFLP در مکان‌های مناسب نقشه قرار گرفتند و ۱۱ نشانگر در نواحی بسیار مناسب (با تراکم کم نشانگرهای قبلی) واقع شدند. تجزیه نهایی داده‌ها نشان داد که تعداد زیادی از نشانگرهای AFLP روی کروموزوم 7A واقع شدند و تعدادی نیز به هیچ گروه پیوستگی منتسب نشدند. تعدادی از گروه‌های ایجاد شده در تجزیه اولیه داده‌های AFLP ،در تجزیه تکمیلی داده‌ها با به یکدیگر پیوسته و فضاهای خالی یک کروموزوم را پر کردند. از آن جمله می‌توان به نشانگرهای AFLP-۳۵ و AFLP-۳۶ از گروه شش ونشانگرهای AFLP-۲۲ و AFLP-۹۷ از گروه چهار اشاره کرد که هر چهار نشانگر به‌خوبی توانستند فواصل خالی سایر نشانگرها را در نقشه قبلی در کروموزوم 5B پرکنند(شکل۳). نشانگرهای AFLP مورد استفاده در این تحقیق توانستند در مجموع ۱۱ فاصله خالی را در هفت کروموزوم(۲A،۳A،۷A،۲B،۳B،۵B و۷B) پر نمایند.

نتایج نشان می‌دهند که در صد چند شکلی در گندم نان پایین می‌باشد. در نتیجه لازم است که نشانگرهای با سطح چند شکلی بالا به منظور تهیه نقشه ژنتیکی گندم استفاده شوند. براساس گزارشات موجود میزان چند شکلی در غلات متفاوت است. این میزان در برنج ۲۶/۶٪، ذرت ۴۸٪، جو ۱۱/۳، گندم ماکارونی ۲۳/۸٪ و گندم نان ۱۲/۸٪ گزارش شده‌است(۱۲). از طرفی میزان چند شکلی نشانگرهای AFLP نیز در گندم متفاوت ذکر شده‌است و در تحقیقات انجام شده بین ۱ تا ۱۴ و متوسط ۷/۷ نوار چند شکل متغیر بوده است (۴). داده‌های این تحقیق نیز با گزارش‌های مذکور مطابقت دارد.

یکی از مواردی که در تحقیق حاضر مشاهده می‌شود عدم توزیع یک‌نواخت نشانگرها در سه ژنوم بود. توزیع و فراوانی نشانگرهای AFLP در طول ژنوم یکنواخت نیست و همانند سایر غلات انتخاب ترکیب آغازگرها به‌طور مستقیم روی توزیع مکانی نشانگرهای AFLP تأثیر می‌گذارد. دلیل توزیع غیریک‌نواخت این نشانگر به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگر، نسبت داده می‌شود. وقایعی مانند جهش، حذف و اضافه شدن قطعات در ایجاد چند شکلی در این نشانگر دخیل می‌باشند(۱۳). اکثر این وقایع به‌طور تصادفی در طول ژنوم به وقوع می‌پیوندند و بنابراین می‌توان انتظار داشت که نشانگرهای AFLP نیز به صورت تصادفی در طول ژنوم قرار گرفته باشند. عموماً نشانگرهای AFLP که با ترکیب‌های مختلف آنزیم‌های برشی حاصل شده‌اند، توزیع مناسب‌تری در طول ژنوم داشته‌اند. تجمع نشانگرها به خصوص AFLP در نواحی سانترومری اغلب گزارش شده است (۱۲و۲۱). تجمع نشانگرهای AFLP و RFLP در نواحی سانترومری شاید به‌دلیل کاهش یا ممانعت از نوترکیبی در این مناطق باشد (۱۲)و این عقیده در مورد سایر نقشه‌های ژنتیکی منتشر شده در سایر غلات نیز صادق است. لانگرلیگ و همکاران(۱۲) اشاره نمودند که نشانگرهای AFLP در اکثر مواقع خارج از مناطقی قرار می‌گیرند که توسط نشانگرهای RFLP به‌طور متراکم اشغال شده‌اند. این عامل موجب افزایش طول نقشه می‌شود که در نهایت باعث پدیده

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]

طویل شدن نقشه‌ها با فواصل غیرمتراکم می‌گردد که نیاز به پرکردن و اشباع این نقشه‌ها را بیش از پیش مطرح می‌نماید.

نکته قابل توجه دیگر در تهیه نقشه ژنتیکی گندم آن است که سه ژنوم گندم از نظر پوشش نشانگرها متفاوت می‌باشند و گزارشات متعددی در این زمینه ارائه شده است. توزیع نشانگرهای AFLP در دو ژنوم A و B تفاوتی نشان نداد ولی تعداد نشانگرهای منتسب شده به ژنومD در مقایسه با ژنومA وB بسیار کم بود، به‌طوری‌که در نقشه ریزماهواره‌ای گندم نیز پوشش بسیار کم ژنوم D مشاهده می‌شود و دلیل آن سطح پایین چند شکلی ژنوم D در جمعیت‌های مختلف می‌تواند باشد(۴و۱۲). پستوا و همکاران(۱۷) در تحقیقات خود متذکر شدند که اگر نشانگرهای تصادفی در نقشه ژنتیکی گندم استفاده شوند، ژنوم D کمترین پوشش را خواهد داشت و استفاده از نشانگرهای اختصاصی برای پوشش دادن ژنوم D بهترین راه حل می‌باشد. براساس گزارش‌های موجود، انحرافات زیاد دیگری نیز در فراوانی نشانگرها وجود دارد، که این انحرافات مبین تفاوت در تنوع کروموزومی بین والدین است (۴).Chalmers و همکاران (۴)تجمع تعداد زیادی از نشانگرها را در کروموزوم ۲B (۴۴ نشانگر) و ۷A (۲۷ نشانگر) در جمعیت حاصل از تلاقی Tasman×Sunoco گزارش کردند. آنها تجمع این نشانگرها را به یک جابه‌جایی بزرگ از *T. timopheevi* روی کروموزم (۲B) نسبت دادند.

چالمرز و همکاران (۴) بیان کردند که توزیع نشانگرها حتی در طول کروموزم نیز به‌طور یک‌نواخت نیست. در برخی از مناطق کروموزومی مثل نواحی انتهایی تجمع زیاد نشانگرها مشاهده می‌شود و در سه تلاقی مورد استفاده سه ناحیه با تجمع نشانگرهای متعلق به کروموزوم ۷A بودند، که این نتیجه با تجمع نشانگرهای AFLP روی کروموزم ۷A در تحقیق حاضر مشابه بود. آنها نشان دادند که در بین نشانگرهای AFLP، RFLP و SSR، دو نشانگر RFLP و SSR پراکندگی یک‌نواخت‌تری در طول ژنوم داشتند، در حالی که تمایل نشانگرهای AFLP به نواحی تلومری بیشتر از RFLP بود.

تجمع نشانگرهای AFLP در نواحی سانترومری نشان دهنده کاهش سطح نوترکیبی میوزی در آن مناطق است. بنابراین تراکم بالای نشانگرها در نواحی نزدیک سانترومر می‌تواند مربوط به کاهش نوترکیبی باشد. در ضمن نواحی هتروکروماتین کروموزوم میزان نوترکیبی کمتری در مقایسه با نواحی یوکروماتین دارندکه احتمالاً مربوط به حالت متراکم‌تر هتروکروماتین در مرحلهٔ کراسینگ آور میوز می‌باشد(۱۴). این نواحی از ژنوم معمولاً جزء نواحی خاموش و کم فعالیت ژنوم محسوب می‌شوند و معمولاً دارای ژن‌های فعال نیستند. در مقابل، برخی از نواحی کروموزوم که نقاط داغ نوترکیبی هستند؛ دارای توزیع متنوع‌تری از نشانگرها می‌باشند(۱۴). تهیه نقشه‌های ژنتیکی با تراکم بالای نشانگر و توزیع مناسب در مناطق با سطح نوترکیبی بالا به راحتی امکان‌پذیر است ولی در مناطقی که نوترکیبی کاهش می‌یابد، استفاده از جمعیت بزرگ‌تر برای افزایش دقت نقشه ژنتیکی ضروری می‌باشد. (۲۱).

بنابراین، ضروری به‌نظر می‌رسد که نواحی با تراکم کم نشانگر توسط نشانگرهای چند شکل تا حد امکان پوشش داده شود تا مکان‌یابی ژن‌ها با سهولت و دقت بیشتری صورت پذیرد. باتوجه به این‌که گندم گیاهی خود گشن است و میزان دگرگشنی پایینی دارد و نظر به این‌که جمعیت مورد استفاده در این تحقیق جمعیت هاپلوئید مضاعف با هموزیگوسیتی بالا می‌باشد، از این رو، امکان مطالعات تکرار دار و بررسی اثر متقابل محیط و مکان‌های کنترل کننده صفات کمی با این جمعیت امکان‌پذیر می‌باشد. پس به منظور تعیین موقعیت ژن‌های صفات کمی و سایر ژن‌های مفید اشباع هرچه بیشتر این نقشه لازم به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

امکانات مالی و تجهیزات این تحقیق بر اساس طرح بین دانشگاهی صنعتی اصفهان فراهم گردیده است و جمعیت مورد استفاده در این تحقیق از مرکز تحقیقات بین المللی ژاپن تهیه شده است که بدین‌وسیله مراتب قدردانی اعلام می‌گردد.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]

منابع مورد استفاده

۱. یزدی صمدی، ب. و س. عبد میشانی. ۱۳۷۵. *اصلاح نباتات زراعی*. انتشارات دانشگاه تهران.

2. Bryan, G.J., A.J. Collins, O. Stephenson, J.B. Smith and M.D. Gale.1997. Isolation and characterization of micro satellites from hexaploid bread wheat. Theor. Appl. Genet. 94: 557-563.
3. Cadalen, T., C. Boeuf, S. Bernard and M. Bernard. 1997. An Intervarietal molecular map in *Triticum aestivum* L. and comparison with a map From A Wide Cross. Theor. Appl. Genet. 94:367-377.
4. Chalmers, K. J., W. Canobell, J. Kretschmer, A. Karakousis, P. H. enschke, S.Pierns,.Harker, M. Pallota, G. B. Cornish, M. R. Shariflou, L. R.ampling, A. Mclauchlan, G. Daggard, P. J. Sharp, T. A. Holton, M. W. Sutherland, R. Apples and P. Landrige. 2001. Construction of three linkage maps in bread wheat, *Triticum aestivum*. Aust. J. Agric. Res. 52: 1089-1119.
5. Cowen, N. M. 1988. The use of replicated progenies in marker-based mapping of QTL.Theor. Appl. Genet. 75:857-862.
6. Dellaporta, S. L. and J. B. Wood. 1983. A Plant DNA minipreparation: Ver II. Plant. Mol. Biol. Rep. 4:19-21.
7. Greg, A. P. 1998. An AFLP based genome map of wheat (*Triticum aestivum*). Plant & Animal Genome VI Conference. San Diego, CA, January 18-22.
8. Gupta, P. K., H. S. Balyan, K. J. Edwards, P. Isaac, V. Korzun, M. S. Roder, F.Gautier, P. Joudrier, A. R. Schlatter, J. Dobcovsky, R. Delapena, M. Khairallah, G. Penner, M. J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R. C.Wang, J. P. Hardouin, P. Jack and P. leory. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. Theor. Appl. Genet. 105:413-422.
9. Kammholz, s. J., A. W. Campbell, M. W. Sutherland, G. J. hollamby, P. J artin, R.F. Estwood, I. Barclay, R.E. Wilson, P. S. Brennan and J. A. Sheppard. 2001. Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations. Aust. J. Agric. Res 52:1079-1088.
10. Kosambi, D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Anals of Eugenics. 12:172-175.
11. Lander, E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow and M. Daley.1987. MAPMAKER: an intractive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181.
12. Langridge, P., E. S. Lagudah, T. A. Holton, P. J. Sharp and K. Chalmers. 2001. Ttrends in genetic and genome analysis of wheat:a review. Aust. J. Agric. Res 2:1043-1077.
13. Lincoln, S., M. Daly and E. Lander. 1992. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER\EXP. Whitehead Institute Technical Report.http://www- genome. wi. mit. edu/ftp/distribution/software.
14. Mather, K. 1938. Crossing over heterochromatin in X chromosome of *Drosphila melanogaster*. Genetics 24:413-435.
15. Messmer. M. M., M. Keller, S. Zanetti and B. Keller .1999. Genetic Linkage map of wheat × spelt cross. Theor. Appl. Genet. 98:1163-1170 .
16. Peng, J., T. Fahima, M. S. Roddr, Y. Ronin, L. Youchun, J. Cheng, A. B. Korol and E. Nevo. 2000. Molecular genetic maps in wild Emmer wheat, *Triticum dicoccoides*: genome –wide coverage, massive negative interference and putative quasi-linkage. Genome 10:1509-1531.
17. Pestova, E, M. W. Ganal and M. S. Rodder. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. Genome 43:689-697.
18. Roder MS, V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, MH. Tixier, P. Leroy and M.Ganal. 1998a. A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007-2023.
19. Roder, M. S., J. Plaschke, SU. Konig, A. Borner, ME. Sorrels, SD. Tanksley and MW. Ganal .1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. and Gen. Genet. 246:327-333.
20. Suenaga, K. and K. Nakajima. 1993. Segregation of genetic markers among wheat double haploid lines derived from wheat × maize crosses. Euphytica 65:145-152.
21. Tanksley, S. D., M. W. Ganal, J. P. Prince, M. C. Vicente, M. W. Bonierbale, P. Broun, T. M. Fulton, J. Giovannoni, S. Grandillo, G. B. Martin, R. Messiguer, J. C. miller, L. Miller, A. H. Paterson, O. pineda, M. S. oder, R. A. Wing and N. D Young. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132:1141-1160.
22. Van Ooijen, J. W. 1994. Draw Map a computer program for drawing genetic linkage maps. J. Hered. 85:66.
23. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, D. L. Theovan, M. Hornes, A. Frijers, M. Kuiper and M. Zabeau .1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.
24. Young, N.D. 2001. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers, PP 31-47. *In*: R. Phillipsond and Z. Vasil(Eds.), DNA- Based Markers in Plants. Kluwer Academic Pub., The Netherland.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1387.12.43.48.1]