



اشباع نقشه ژنتیکی جو با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی و جمعیت دابل هاپلوئیدی حاصل از

تلاقی Clipper×Sahara

فریا قادری^۱، بابک عبدالهی مندولکانی^{۲*}، نادعلی بابائیان جلودار^۱، بهزاد صادقزاده^۳

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

^۲ دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

^۳ دانشیار موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۲۳

چکیده

نقشه‌های ژنتیکی با تراکم و پوشش بالای ژنومی نقش بسزایی در تحقیقات پایه‌ای و کاربردی ژنتیک ایفا می‌کنند. در دهه‌های اخیر با پیدایش نشانگرهای DNA تحول عظیمی در تهیه و اشباع نقشه‌های ژنتیکی در گیاهان مختلف فراهم شده است. در این تحقیق از نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP و نشانگرهای ISSR جهت اشباع نقشه ژنتیکی جو در ۱۴۹ فرد هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی دو والد Clipper و Sahara استفاده شد. از چهارچوب نقشه ژنتیکی این جمعیت به عنوان نقشه پایه در تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد. از ۱۲۰ آغازگر به کار رفته، ۶ آغازگر IRAP، ۷ آغازگر REMAP و ۳ آغازگر ISSR بین والدین چندشکلی نشان دادند که از این میان ۱۱ باند چندشکل برای نشانگر IRAP، ۸ باند چندشکل برای نشانگر REMAP و ۴ باند چندشکل برای نشانگر ISSR بدست آمد. در کل ۱۸ نشانگر چندشکل در جمعیت تفرق نشان دادند که از این تعداد ۱۲ نشانگر به هفت گروه لینکاژی جو متناسب شدند. دو نشانگر از نسبت مندلی ۱:۱ انحراف نشان دادند. بیشترین تعداد نشانگرها به گروه لینکاژی دوم متناسب شدند. نشانگرهای رتروترانسپوزونی در این مطالعه به خوبی توانستند بخشی از نواحی خالی گروه-های لینکاژی ۱، ۳، ۵ و ۶ را در نقشه ژنتیکی جو پر کنند. نتایج تحقیق نشان داد که نشانگرهای رتروترانسپوزونی می‌تواند بطور مؤثری جهت اشباع نقشه ژنتیکی جو مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: جو، نشانگرهای IRAP، نقشه ژنتیکی، جمعیت دابل هاپلوئید.

مقدمه

Heydari *et al.*, 2014). پس از تهیه چهارچوب نقشه، لازم است که با استفاده از نشانگرهای چندشکل نقشه ژنتیکی اشباع شود. نشانگرهای ISSR (Inter-simple sequence repeat) و نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزونها از جمله REMAP (Retrotransposon-amplification microsatellite polymorphism) و IRAP (Inter-retrotransposon amplification polymorphism) به دلیل پوشش ژنومی بالا، تکرار پذیری زیاد و چندشکلی بالا، نشانگرهای ایده‌آلی برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی و اشباع آنها، گزینش به کمک نشانگر، انگشت نگاری ژنتیکی، تجزیه و تحلیل شجره‌ها و تعیین میزان تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم‌های گیاهی هستند (Collard *et al.*, 2005; Basirnia *et al.*, 2014). در پژوهشی (Waugh *et al.*, 1997) اولین نشانگرهای رتروترانسپوزونی را معرفی کردند و نشان دادند که این نشانگرها برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی و درک بهتری از عملکرد ژن و تنظیم آن در گیاهان بسیار مفید هستند. رتروترانسپوزونها نواحی متحرک تکراری در ژنوم هستند که بر خلاف ترانسپوزونها کپی‌های خود را از طریق ساختن cDNA در ژنوم درج می‌کنند و خودشان از محل اولیه‌شان در ژنوم بریده نمی‌شوند. این نشانگرها تکرارپذیر و ساده بوده و چندشکلی زیادی نشان می‌دهند. در برخی مطالعات نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزونها، ۲۵ درصد چندشکلی بیشتری در مقایسه با AFLP

جو با نام علمی *Hordeum vulgare* L. یکی از سازگارترین و ساده‌ترین زراعت‌ها در جهان، از جمله ایران است. این گیاه منبع غذایی بسیار مهمی در برخی از کشورها از جمله خاورمیانه و شمال آفریقا به‌شمار می‌رود. جو بیشتر برای خوراک دام و تهیه فرآورده‌های تخمیری از جمله ماء‌الشعیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ایران زراعت این گیاه مقام دوم را بعد از گندم داراست (Banisadr, 1995). افزایش عملکرد و کیفیت محصول از اهداف اصلی برنامه‌های به‌نژادی جو می‌باشد که نیل به این اهداف نیازمند وجود تنوع کافی و داشتن اطلاعات از نحوه کنترل ژنتیکی صفات و شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تغییرات آنها می‌باشد. تعیین نحوه توارث و محل ژن‌های کنترل‌کننده این صفات از چالش‌های اصلی برنامه‌های اصلاح جو می‌باشد (Li *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2010). امروزه نقشه‌های ژنتیکی با پوشش بالای ژنومی نقش بسزایی در تحقیقات پایه و کاربردی ژنتیک ایفا می‌کنند. در جو نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده‌ای برای تهیه نقشه‌های پیوستگی با پوشش ژنومی بالا، مکان یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، گزینش به کمک نشانگر (Marker assisted selection) و همسانه‌سازی ژن‌ها براساس نقشه استفاده می‌شوند (Marquez-Cedillo *et al.*, 2000; Hearnden *et al.*, 2007; Sadeghzadeh *et al.*,

IRAP در فاصله ۵/۲ و ۱۲/۶ سانتی مورگان این ژن شناسایی و به نشانگرهای هم‌بارز SNP تبدیل شدند (Tanhuanpaa *et al.*, 2006). با توجه به شناسایی رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم جو و گیاهان نزدیک به آن و کارایی بالای نشانگرهای مبتنی بر این عناصر، تحقیقی با اهداف ذیل پایه گذاری و اجرا گردید: (۱) بررسی الگوی توزیع رتروترنسپوزون‌های LTR دار در ژنوم جو و (۲) اشباع نقشه ژنتیکی جو با نشانگرهای IRAP و REMAP مبتنی بر این خانواده‌های رتروترنسپوزونی.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۱۴۹ لاین هاپلوئید مضاعف جو، حاصل از تلاقی ارقام Clipper (والد مادری) و Sahara3771 (والد پدری) می‌باشد. رقم Clipper دارای تیپ رشدی بهاری و ناکارآمد در جذب Zn و دو ردیفه می‌باشد که به عنوان یک رقم زراعی در استرالیا کشت می‌شود. Sahara3771 رقم بومی الجزایر دارای تیپ رشدی زمستانی، کارآمد در جذب Zn و شش ردیفه می‌باشد. این جمعیت به روش *H. bolbosum* (Islam & Shepherd, 1981) در دانشگاه ادلاید استرالیا تهیه شده و توسط دکتر صادق‌زاده از مؤسسه تحقیقات دیم کشور فراهم شد (Sadeghzadeh, 2008). بذور ارقام والدینی و افراد جمعیت به تعداد ۴ بذر در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند و در مرحله دو برگگی از هرگلدان به میزان ۰/۲ گرم برگ جوان جدا و

نشان داده‌اند (Yu & Wise, 2000). توزیع تصادفی و تعداد متغیر کپی رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم، استفاده از آن‌ها را به عنوان نشانگرهای مولکولی کارا میسر می‌سازد. همچنین بسیاری از مطالعات توالی‌یابی ژنومی حاکی از توزیع و حضور وسیع رتروترنسپوزون‌ها در نواحی یوکروماتینی و اطراف ژن‌ها است، بنابراین شناسایی نشانگرهای بسیار نزدیک با ژن‌های مهم زراعی با استفاده از این نشانگرها امکان‌پذیر است (Kumar & Bennetzen, 1999). با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی IRAP و REMAP، نقشه ژنتیکی اطراف ژن Yr15 (دخیل در مقاومت به زنگ زرد) در گندم دوروم اشباع و نشانگرهایی با فاصله کمتر از ۲ سانتی مورگان با این ژن شناسایی شد (Abdollahi *et al.*, 2008). در جو بیشتر مطالعات در مورد خانواده‌ی رتروترنسپوزونی Bare-1 انجام گرفته است (Suoniemi *et al.*, 1997). نشانگرهای رتروترنسپوزونی IRAP و RAMAP مبتنی بر خانواده‌های Bare1 و Sukkula (از جو) همراه با نشانگرهای ISSR و SSR برای تهیه نقشه ژنتیکی ژنوم گندم در *Aegilops tauschii* استفاده شد. با استفاده از ۱۳ ترکیب آغازگری، ۸۰ نشانگر رتروترنسپوزونی به این نقشه افزوده شد. در این مطالعه مشخص شد که Bare1 به وفور در نزدیکی SSRها دیده می‌شود (Boyko *et al.*, 2001). در مکان‌یابی ژن DW6 در یولاف با استفاده از نشانگرهای IRAP، REMAP و RAPD، دو نشانگر REMAP و

نتایج و بحث

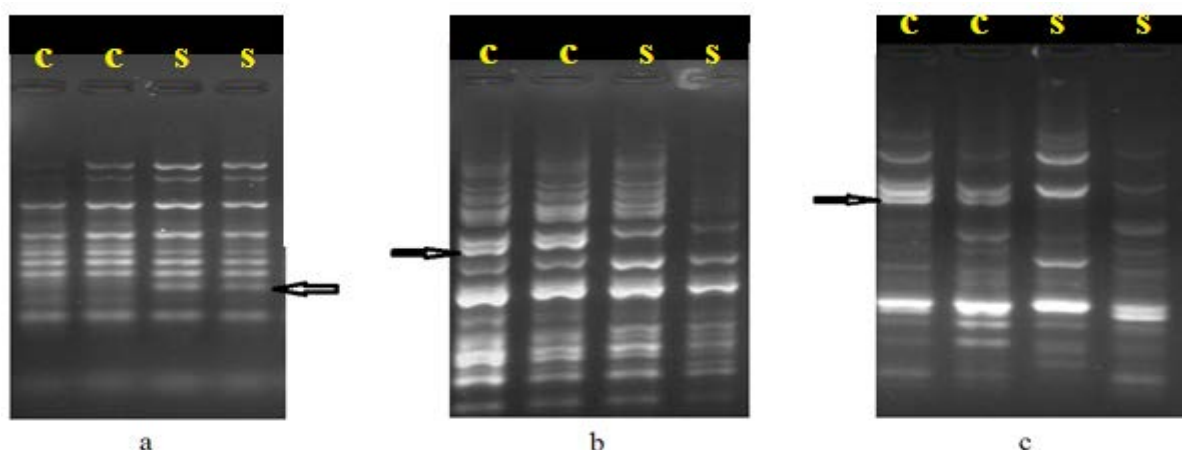
در این بررسی ۳۴ آغازگر IRAP مورد استفاده قرار گرفت. از بین آغازگرهای IRAP، سه آغازگر ترکیبی و سه آغازگر منفرد باندهای چندشکل بین والدین نشان دادند. دامنه باندهای تولید شده از ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز متغیر بود (شکل ۱). آغازگر منفرد مبتنی بر رتروترانسپوزون Sukkula دو باند چند شکل نشان داد که نشانگر فعالیت ادغامی قابل توجه این خانواده رتروترانسپوزونی در ژنوم جو می باشد. تعداد زیاد کپی و فعالیت بالای این خانواده رتروترانسپوزونی در گندم و سایر غلات نیز گزارش شده است (Nasri et al., 2013).

در این مطالعه سه آغازگر ترکیبی 5LTR-Bare1، LTR725-LTR455 و 5LTR-LTR2106، هرکدام به ترتیب ۴، ۲ و ۱ باند چندشکل تولید نمودند. تعداد زیاد باندهای چند شکل تولید شده توسط خانواده رتروترانسپوزونی Bare1 و خانوادگی LTR دار، بیانگر تعداد زیاد و فعالیت ادغامی قابل توجه این رتروترانسپوزون-ها در ژنوم جو می باشد. در این مطالعه آغازگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزونهای LTR دار هم به صورت تکی و هم به صورت ترکیبی باند چند شکل تولید نمودند بنابراین می توان بیان نمود که این عناصر رتروترانسپوزونی در ژنوم جو در نزدیکی هم و یا در داخل یکدیگر به صورت آشیانه ای ادغام شده اند.

استخراج DNA به روش CTAB انجام شد (Ausubel et al., 1995). کمیت و کیفیت DNA ژنومی با روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل ۰/۸ درصد آگارز تعیین شد و نمونه ها به غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق و در واکنش های زنجیره ای پلیمرز استفاده شدند.

واکنش های PCR و چرخه دمایی آن، الکتروفورز و رنگ آمیزی محصولات PCR مربوط به هر سه نشانگر طبق روش Abdollahi (2012) Mandoulakani et al., انجام گرفت. این مطالعه در کل ۱۲۰ آغازگر شامل ۲۱ آغازگر ISSR، ۶۵ آغازگر REMAP و ۳۴ آغازگر IRAP استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر Bio-RAD (شرکت BioRAD، آمریکا) انجام شد.

الگوی نواری نشانگرهای چند شکل در جمعیت به صورت A برای افراد مشابه والد Clipper و B برای افراد مشابه والد Sahara3771 امتیازدهی شدند. داده های گمشده با علامت - مشخص گردید. به منظور بررسی تبعیت نشانگرها از نسبت ۱:۱ مندلی، آزمون χ^2 با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. نشانگرهایی که از نسبت ۱:۱ انحراف نشان دادند (۲ نشانگر) در مرحله تهیه نقشه استفاده نشدند. تعیین گروه های لینکاژی با در نظر گرفتن میزان LOD برابر ۳ و لحاظ کردن حداکثر فاصله بین دو نشانگر مجاور برابر ۵۰ سانتی مورگان، توسط نرم افزار JoinMap نسخه ۳ انجام گرفت و با استفاده از نرم افزار MapChart نسخه ۲/۱ گروه های لینکاژی رسم شد.



شکل ۱- الگوی بانندی چندشکل بین والدین Clipper (c) و Sahara (s) و 5LTR-440، a: b: c: 825-440، Sukkula-857

Figure 1- Polymorphic banding pattern between parents Clipper (c) and Sahara (s), a: 5LTR-440, b: Sukkula-857, c: 825-440.

های رتروترانسپوزونی مورد استفاده در واکنش-های REMAP باندهای چندشکل تولید کردند که بیانگر حضور و ادغام خانواده‌های رتروترانسپوزونی مورد مطالعه در نزدیکی ریزماهورها در ژنوم جو می‌باشد. درج خانواده‌های رتروترانسپوزونی در نزدیکی توالی‌های ریزماهورهای گیاهان مختلف مانند مرکبات (Biswas *et al.*, 2010) و دیگر غلات مانند گندم گزارش شده است (Boyko *et al.*, 2001). آغازگرهای مبتنی بر خانواده‌های رتروترانسپوزونی 5LTR و Bare1 هم در واکنش‌های IRAP و هم در واکنش‌های REMAP (در ترکیب با آغازگرهای ISSR ۸۱۸، ۴۴۰ و ۸۰۸)، باندهای چندشکل تولید کردند. بنابراین احتمالاً این خانواده‌های رتروترانسپوزونی و سایر رتروترانسپوزون‌های LTR در سازماندهی و

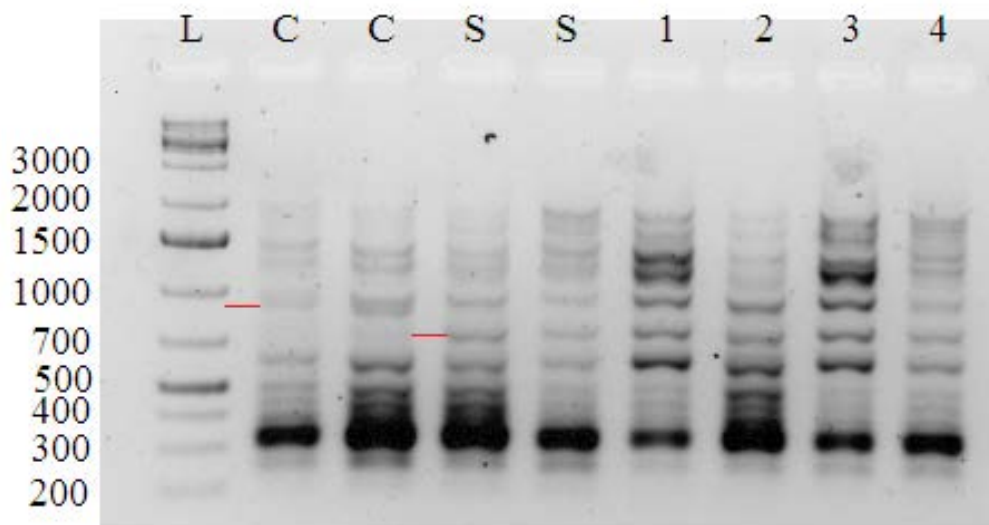
مطالعات قبلی نیز گزارش کردند که رتروترانسپوزون‌های LTR دار چندشکلی ادغامی بالایی در گونه‌های مختلف گیاهی بویژه غلات نشان می‌دهند و می‌توانند به آسانی در گونه‌ها و جنس‌های نزدیک و حتی گاهی بین خانواده‌های گیاهی نزدیک به عنوان نشانگرهای کارا مورد استفاده قرارگیرند (Lou and Chen 2007; Kalendar *et al.*, 2011; Nasri *et al.*, 2013). همچنین حرکت و ادغام خانواده‌های مختلف رتروترانسپوزونی از جمله Bare1 در ژنوم جو نیز گزارش شده است (Shirasu *et al.*, 2000). بطور کلی درصد بالای چندشکلی شناسایی شده توسط آغازگرهای IRAP (۷۵٪) و REMAP (۱۶/۶۶٪)، در این مطالعه نشان دهنده فعالیت بالای خانواده‌های رتروترانسپوزونی مورد استفاده در ژنوم جو می‌باشد. در این تحقیق اکثر خانواده-

Sukkula دو باند چند شکل تولید کرد که بعد از امتیازدهی باندها و رسم گروه‌های لینکاژی فقط یک باند چند شکل حاصل روی گروه لینکاژی ۳ جو قرار گرفت. در بین آغازگرهای ترکیبی IRAP، آغازگر Bare1-5LTR با تکثیر ۴ باند چندشکل بیشترین میزان چندشکلی را ایجاد نمود (شکل ۲). ۶۹ ترکیب آغازگری REMAP روی دو والد مورد آزمون قرار گرفت که از این تعداد ۶۰ آغازگر باند واضح ولی مونومورف و تنها ۳ ترکیب آغازگری REMAP باند چندشکل در جمعیت ایجاد نمود (۵/۸۰ درصد)، (جدول ۱، شکل ۳). بعد از انجام آنالیزهای آماری ۲ نشانگر REMAP روی گروه‌های لینکاژی قرار گرفتند و دو نشانگر دیگر به هیچ گروه لینکاژی منتسب نشدند. نشانگرهای REMAP ۱۶/۶۶ درصد از فضای خالی نقشه RFLP را پوشش دادند (جدول ۱)، از بین این نشانگرها یک نشانگر از نسبت مندلی ۱:۱ انحراف نشان داد که به سمت والد Sahara اریب بود. این تحقیق اولین گزارش در مورد اشباع نقشه ژنتیکی جو با نشانگرهای IRAP و REMAP می‌باشد. در این تحقیق خانواده‌های مختلف رتروترانسپوزونی به عنوان نشانگر مولکولی کارایی بالایی نشان دادند. بر اساس گزارشات موجود میزان چندشکلی در غلات متفاوت است. این میزان در برنج ۲۶/۶، ذرت ۴۸، گندم ماکارونی ۲۳/۸، گندم نان ۱۲/۸ و در جو ۱۱/۳ درصد گزارش شده است (Langridge et al., 2001).

تکامل ژنوم جو نقش اساسی دارند (Manninen et al., 2000). بررسی‌های سیتولوژی نشان داده که Bare1 به صورت همگن در سراسر بازوهای کروموزومی جو پراکنده است اما در مناطق سانترومرها، تلومرها و ناحیه سازماندهی هستکی وجود ندارد (Manninen et al., 2000). به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که خانواده‌های رتروترانسپوزونی LTR هم به حالت منفرد و هم به حالت آشیانه‌ای در ژنوم جو ادغام شده‌اند. همچنین این عناصر دارای فعالیت انتقالی و چندشکلی زیادی در ژنوم جو می‌باشند و می‌توان از نشانگرهای IRAP و REMAP مبتنی بر این عناصر در مطالعات ژنتیکی مانند ارزیابی تنوع ژنتیکی، بررسی روابط تکاملی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها استفاده کرد.

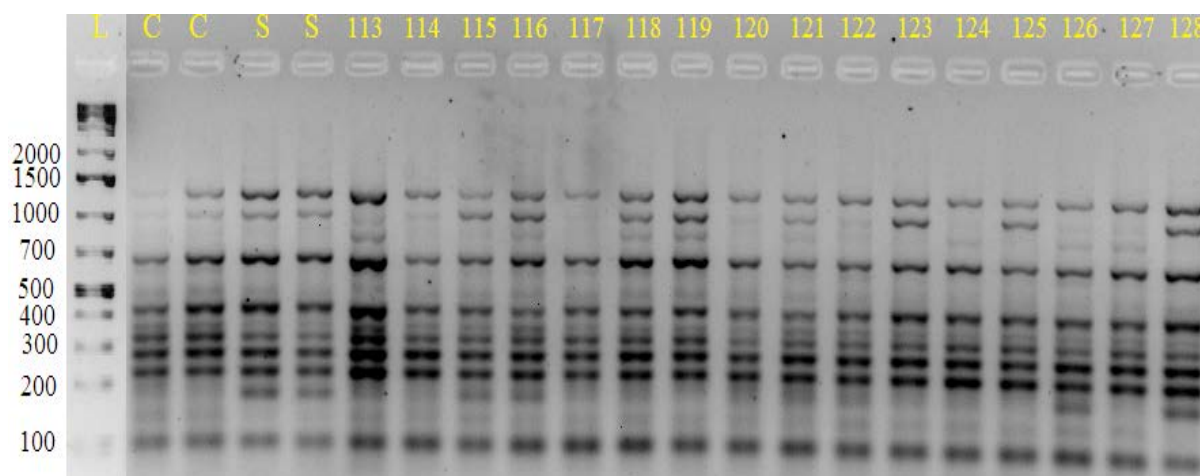
کارایی نشانگرهای رتروترانسپوزونی در شناسایی چندشکلی

از بین آغازگرهای IRAP مورد استفاده، ۳ آغازگر ترکیبی و ۳ آغازگر منفرد به ترتیب ۷ و ۴ باند چندشکل تولید کردند که برای بررسی چندشکلی ۱۴۹ فرد از جمعیت دابل‌هاپلوئیدی حاصل از تلاقی دو والد Clipper×Sahara مورد استفاده قرار گرفتند. در کل ۷۵ درصد پوشش-دهی گروه‌های لینکاژی به آغازگرهای IRAP اختصاص یافت. بعد از گروه بندی داده‌ها از بین ۱۱ نشانگر IRAP، ۹ نشانگر به گروه‌های لینکاژی در جمعیت مورد بررسی منتسب شدند (جدول ۱). از بین آغازگرهای منفرد IRAP، تنها آغازگر



شکل ۲- الگوی بانندی آغازگر SukulaL روی والد‌ها و برخی افراد جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی Clipper×Sahara.

Figure 2- Banding pattern amplified by Sukula primer on parents and some individuals from doubled haploid population derived from a cross of Clipper×Sahara.



شکل ۳- الگوی بانندی آغازگر 5LTR-440 روی والد‌ها و برخی افراد جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی Clipper×Sahara.

Figure 3- Banding pattern amplified by 5LTR-440 primer on parents and some individual of doubled haploid population derived from a cross Clipper×Sahara.

در نقشه اشباع شده جمعیت مورد بررسی، ۸/۳۳ درصد فضای خالی پر شده نقشه به نشانگرهای ISSR اختصاص داشت. از بین نشانگرهای ISSR هم یک نشانگر از نسبت ۱:۱ مندلی انحراف نشان داد. در مجموع دو نشانگر از نسبت ۱:۱ مندلی تبعیت نکردند که یکی از نشانگرها به سمت والد Clipper اریب بود (جدول ۱). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که از بین نشانگرهای مورد استفاده، یک نشانگر از هر کدام از نشانگرهای REMAP و ISSR، در مجموع دو نشانگر یعنی ۱۱/۱۱ درصد از نشانگرها از نسبت ۱:۱ مندلی انحراف معنی داری نشان دادند ($P \leq 0.05$). میزان انحراف بدست آمده در مقایسه با میزان انحراف از نسبت مندلی توسط نشانگرهای AFLP در جو (۶٪ توسط Becker et al., 1995) و RFLP در جو (۱۰٪ توسط Heun et al., 1991) بیشتر است اما در مقایسه با میزان انحراف بدست آمده از نشانگرهای RFLP در تحقیق Kleinhofs et al. (1993) در جمعیت مشابه این جمعیت دابل هاپلوئیدی (۳٪ با $P \leq 0.01$ و ۱۴٪ با $P \leq 0.05$) کمتر است. میزان انحراف از نسبت مندلی بدست آمده در این تحقیق با نتایج گزارش شده از غلات دیگر مانند برنج (۲۲٪ و ۳۳٪ توسط Xu et al., 1997) و گندم نان (۱۸/۲٪ توسط Rahimmalek et al., 2007) نیز نزدیک است.

این نتایج نشان می‌دهد که درصد چندشکلی در جو پایین است. میزان چندشکلی حاصل از این مطالعه (۱۵٪) کمی بالاتر از سایر گزارشات مربوط به بررسی چندشکلی جو می‌باشد که احتمالاً دلیلی بر کارایی بالای نشانگرهای رتروترنسپوزونی برای شناسایی چندشکلی در این گیاه می‌باشد. در مطالعات قبلی نیز گزارش شده که استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی در اصلاح جو همانند برنج مفید بوده است (Castelo et al., 2007). در پژوهشی Kalendar et al. (2010) نشانگرهای IRAP مبتنی بر Bare1 را در گونه‌های مختلف جو، تریتیکوم و آزیلوپس استفاده نمودند و نشان دادند که این خانواده رتروترنسپوزونی در این گونه‌ها چندشکل و فعال می‌باشند. همچنین Carvalho et al. (2010) با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی مبتنی بر Bare1، چندشکلی بالایی را در گندم شناسایی نمودند. در آزیلوپس نیز با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر همین رتروترنسپوزون نتیجه مشابهی بدست آمد (Saeidi et al., 2008). از کل آغازگرهای ISSR به کار رفته در این تحقیق، ۲ آغازگر یعنی ۱۱/۷۶ درصد آغازگرها باند چندشکل در جمعیت تولید کردند. بقیه آغازگرها الگوی بانندی مونومورف بین والدین تولید کردند. با ایجاد گروه‌های لینکاژی، از بین سه نشانگر ISSR یک نشانگر روی گروه لینکاژی ۶ جو قرار گرفت. در نهایت

(Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2009). در این مطالعه نیز بیشترین میزان چندشکلی به آغازگرهای رتروترانسپوزونی اختصاص داشت، ولی تعداد زیادی از آغازگرهای مورد استفاده باند چندشکل بین والدین نشان ندادند. میانگین چند شکلی بدست آمده در این تحقیق (۱۵٪) با ۶ آغازگر ترکیبی کمی پایین‌تر از نتایج گزارش شده توسط Waugh *et al.* (1997) در جمعیت Blenheim × E224/3 جو (۲۶٪) بود. شاید دلیل تفاوت نتایج حاصل از دو مطالعه، سیستمهای نشانگری متفاوتی باشد که در دو پژوهش استفاده شده است.

توزیع نشانگرها در گروههای لینکاژی

از بین ۱۲۰ آغازگر استفاده شده، ۵ نشانگر ISSR، ۱۲ نشانگر IRAP و ۹ نشانگر REMAP در بین والدین چندشکل بودند که از این بین ۱۸ نشانگر در جمعیت تفرق نشان دادند (شکل ۳)، از بین ۱۸ نشانگر چندشکل بدست آمده، ۱۲ نشانگر IRAP، REMAP و ISSR به ۳۹۳ نشانگر RFLP نقشه‌ی پیوستگی این جمعیت اضافه شدند (جدول ۲).

در این مطالعه نشانگرهای IRAP در مقایسه با نشانگرهای REMAP و ISSR میزان چندشکلی بیشتری نشان دادند. در مقایسه میزان چندشکلی و توانایی تمایز نشانگرهای RAPD، ISSR، IRAP و REMAP در مرکبات، سطوح بالایی از چندشکلی برای هر چهار سیستم نشانگری گزارش شد. همچنین در تجزیه و تحلیل گروه‌های لینکاژی طبق نتایج، نشانگرهای IRAP و REMAP به عنوان نشانگرهای قابل اعتمادی برای شناسایی ژرمپلاسم مرکبات و صدور گواهینامه‌های گیاهی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی معرفی شدند. در مقایسه میانگین ارزش چندشکلی حاصل از توزیع رتروترانسپوزونها و نشانگرهای ISSR و RAPD در ژنوم مرکبات، بیشترین و کمترین میانگین ارزش چندشکلی، به ترتیب مربوط به نشانگرهای REMAP (۵/۹۴) و RAPD (۴/۴۸) بود (Biswas *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی رتروترانسپوزونها به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم انجام شد این نشانگرها کارایی بالایی نشان دادند. بیش از ۹۰ درصد آغازگرهای رتروترانسپوزونی، الگوی واضح و قابل امتیازدهی تولید کردند. اکثر آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر اساس نواحی محفوظ LTR طراحی شده بودند

جدول ۱- تعداد و درصد چندشکلی سیستم‌های نشانگری مورد استفاده.

Table 1- Number and polymorphism percentage of the used marker systems.

سیستم نشانگری	تعداد آغازگر	تعداد مکان-های چندشکل	تعداد نشانگر چندشکل	تعداد آغازگر	درصد آغازگرهای چند شکل
Marker system	Number of primers	Polymorphic loci between parents	Number of polymorphic markers	Polymorphic primers in population	The percentage of polymorphic primers
IRAP	34	15	11	6	32.35 (75)*
REMAP	69	12	4	4	5.8 (16.66)
ISSR	17	9	3	2	17.64 (8.33)
ISSR+IRAP+REMAP	120	36	18	12	

*: درصد اول، درصد چند شکلی آغازگرهای هر سیستم نشانگری از مجموع آغازگرهای به کار رفته همان سیستم می‌باشد. درصد داخل پرانتز، درصد پوشش گروه‌های لینکازی توسط آغازگرهای هر سیستم می‌باشد.

از این مطالعه با قرار گرفتن در میان نشانگرهای نقشه پایه، فضاهاى خالی روی گروه‌های لینکازی را به خوبی پوشش دادند. در نقشه لینکازی پایه حاصل از این جمعیت، در گروه لینکازی ۶ نشانگرهای IR-1B، IR-1C و IR-1D بین نشانگرهای Bmag0807 و Bmac0144، نشانگر IR-3 بین نشانگرهای psr627 و ksuA3b و نشانگرهای IR-8 و RE-4 در ابتدای گروه لینکازی ۶ قرار گرفتند.

نشانگرها در چهار گروه لینکازی ۱، ۳، ۵ و ۶ توزیع شدند و بیشترین نشانگرهای چندشکل روی گروه لینکازی ۶ قرار گرفتند. در گروه‌های لینکازی ۲، ۴ و ۷ هیچ نشانگری قرار نگرفت. نشانگرهای IR-1B، IR-1C و IR-1D با اختلاف ۰/۱ سانتی مورگان در مجاورت یکدیگر روی گروه لینکازی ۶ قرار گرفتند ولی بقیه نشانگرها با فاصله‌های بیشتری از هم در گروه‌های لینکازی توزیع شدند. براساس نتایج، نشانگرهای حاصل

جدول ۲- نام، کد و موقعیت آغازگرهای چندشکل مورد استفاده در جمعیت هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی دو والد Clipper×Sahara.

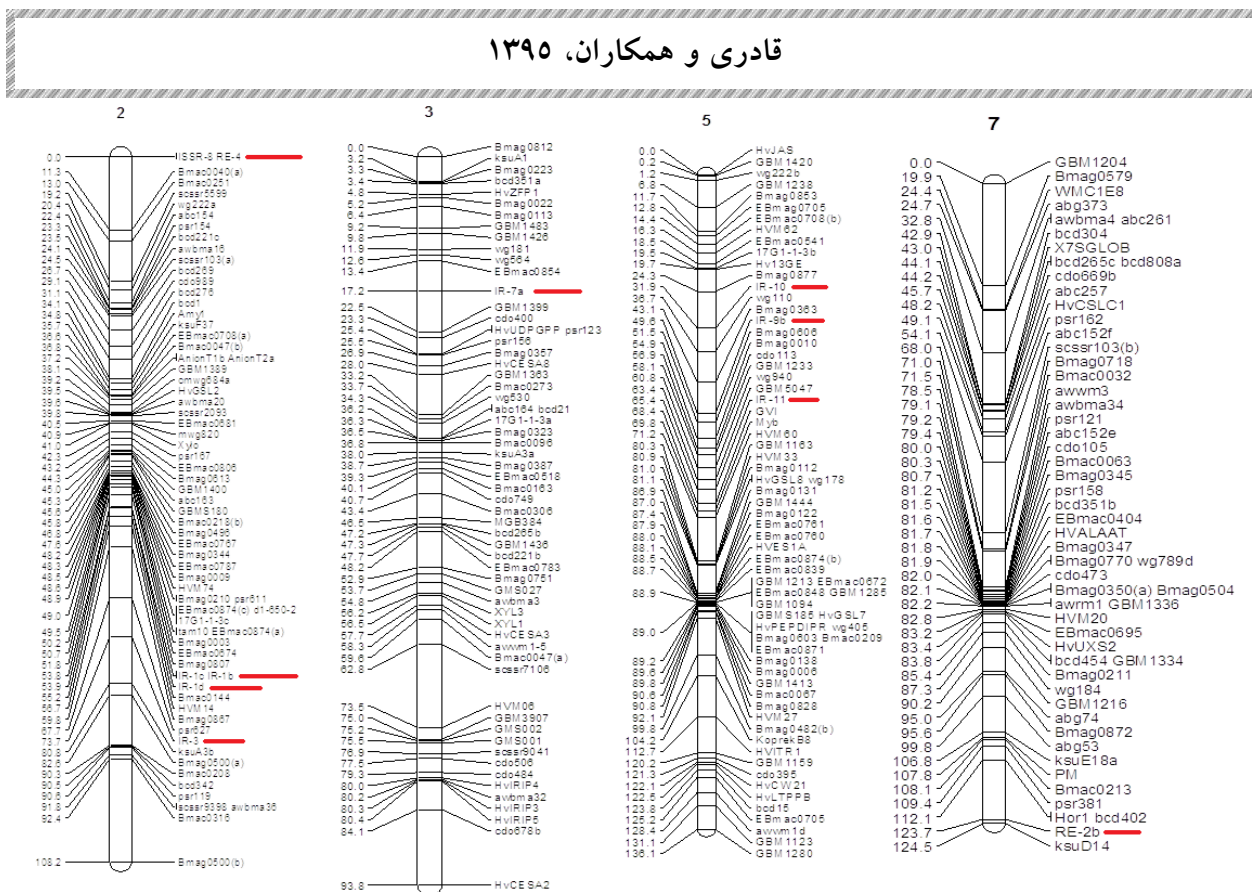
Table 2- Name, code and position of the polymorphic markers used in doubled haploid population derived from a cross of Clipper×Sahara.

موقعیت نشانگر در گروه لینکازی (cM) Marker position on linkage group	گروه لینکازی Linkage group	کد آغازگر Primer code	نام آغازگر Primer name	ردیف Row
-	-	IR-1A	5LTR-Bare1a	1
53.9	6	IR-1B	5LTR-Bare1b	2
53.8	6	IR-1C	5LTR-Bare1c	3
53.8	6	IR-1D	5LTR-Bare1d	4
73.7	6	IR-3	5LTR-LTR2106	5
17.2	5	IR-7A	LTR725-LTR455a	6
0	5	IR-7B	LTR725-LTR455b	7
-	-	IR-9A	Sukula a	8
49.6	3	IR-9B	Sukula b	9
31.9	3	IR-10	LTR725	10
65.4	3	IR-11	LTR2108	11
-	-	RE-2A	5LTR-818a	12
123.7	1	RE-2B	5LTR-818b	13
0	6	RE-4	5LTR-440	14
-	-	RE-5	Bare1-808	15
-	-	ISSR-6A	857-425a	16
-	-	ISSR-6B	857-425b	17
0	6	ISSR-8	825-440	18

استفاده کرد (Castelo *et al.*, 2007). نشانگرهای نزدیک به QTLهای کنترل کننده صفات روی یک نقشه با تراکم نشانگری بالا، می‌تواند وسیله قدرتمندی برای گزینش به وسیله نشانگر مولکولی باشد. 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 (Tanksley *et al.*, 1989). بنابراین ضروری به نظر می‌رسد که نواحی با تراکم کم نشانگر توسط نشانگرهای چندشکل تا حد امکان پوشش داده شود تا مکان‌یابی ژن‌ها با سهولت و دقت بیشتری صورت پذیرد. با توجه به این‌که جو گیاهی خودگشن است و میزان دگرگشتی کمی دارد و نظر به این‌که جمعیت مورد استفاده در این تحقیق جمعیت هاپلوئید مضاعف با هموزیگوسیتی بالا می‌باشد، از این‌رو امکان مطالعات تکراردار 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 به نظر می‌رسد.

در گروه لینکاژی ۵ نشانگر IR-7A با قرارگیری بین نشانگرهای EBmac0854 و GBM1399 فاصله زیاد این دو نشانگر را پوشش داد. در گروه لینکاژی ۳ نشانگر IR-10 بین نشانگرهای Bmag0877 و wg110، نشانگر IR-9B بین Bmag0363 و Bmag0606 و نشانگر IR-11 فضای خالی بین دو نشانگر GBM5047 و GV1 را پر کرد و در گروه لینکاژی یک نشانگر RE-2B فضای خالی بین نشانگرهای bcd402 و ksuD14 را پوشش داد (شکل ۵).

یکی از مواردی که از اشباع نقشه ژنتیکی گندم با استفاده از نشانگرهای AFLP بدست آمد عدم توزیع یکنواخت نشانگرها در طول ژنوم بود که دلیل توزیع غیر یکنواخت این نشانگر به مکانیسم‌های ایجاد چندشکلی در این نشانگر، نسبت داده می‌شود. تجمع نشانگرهای AFLP و RFLP در نواحی سانترومیری شاید به دلیل کاهش یا ممانعت از نوترکیبی در این مناطق باشد (Rahimmalek *et al.*, 2007) با توجه به توزیع رتروترانسپوزن‌ها در سرتاسر کروموزوم، قابلیت انتقال آنها در طول ژنوم و قرارگیری آنها در نواحی هتروکروماتین کروموزوم (Manninen *et al.*, 2000) می‌توان از این نشانگرها به طور جداگانه یا ترکیبی جهت نقشه‌یابی کامل ژنوم



شکل ۵- تعیین گروه‌های لینکاژی جو در جمعیت دابل هاپلوئیدی حاصل از تلاقی Clipper×Sahara. نشانگرهایی که به نقشه اضافه شدند با خطوط قرمز در شکل مشخص شدند و گروه‌های لینکاژی ۲، ۳، ۵ و ۷ که نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق به آنها منتسب شدند در شکل نشان شده است.

Figure 5- Determination of barley linkage groups in doubled haploid population derived from a cross of Clipper×Sahara. New markers, highlighted with red color, assigned to the linkage groups 2, 3, 5 and 7.

منابع

Abdollahi Mandoulakani B, Bihamta MR, Zali AA, Yazdi Samadi B, Naghavi MR, Schulman A (2008). Fine mapping of stripe rust resistance gene Yr15 in durum wheat. Seed and Plant Improvement Journal 3: 371-387 (In Farsi).

Abdollahi Mandoulakani B, Bihamta MR, Schulman A, Zali AA, Naghavi MR (2009). Retrotransposons assessment as molecular markers in wheat. Modern Genetics Journal 1: 17- 25 (In Farsi).

Abdollahi Mandoulakani B, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012). Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. Plant Molecular Biology Reporter 30: 286-296.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A (1995). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York.

- Banisadr N (1995). Study of heat and cold tolerance in some barley cultivar. Seed and Plant Improvement Journal 99: 43-46 (In Farsi).
- Basirnia A, Darvishzadeh R, Abdollahi Mandoulakani B, Nabipur A (2014). Assessment of genetic diversity in Iranian confectionary sunflower (*Helianthus annuus* L.) populations using retrotransposon based IRAP markers. Journal of Agricultural Biotechnology 1: 19-35 (In Farsi).
- Becker J, Vos P, Kuiper M, Salamini F, Heun M (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Molecular and General Genetics. 249: 65-73.
- Biswas MK, Xu Q, Deng X (2010). Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp. Scientia Horticulturae 124: 254-261.
- Boyko E, Kalendar R, Korzun V, Gill B, Schulman AH (2002). Combined mapping of *Aegilops tauschii* by retrotransposon, microsatellite, and gene markers. Plant Molecular Biology 48: 767-790.
- Carvalho A, Guedes-Pinto H, Martins-Lopes P, Lima-Brito J (2010). Genetic variability of old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers. Annals of Applied Biology 156:337-345.
- Castelo JSB, Eduardo AV, Malon G, Mauricio MK, Malone E, Bernarde A, Mistur CC, Carvalho FIF, Oliveira CA (2007). IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. Journal of Applied Genetics 48: 107-113.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica 142: 169-196.
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, *et al* (1998). A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. Genetics 148: 479-494.
- Hassan M, Oldach K, Baumann U, Langridge P, Sutton T (2010). Genes mapping to boron tolerance QTL in barley identified by suppression subtractive hybridization. Plant Cell Physiology 33: 118-198.
- Hearnden PR, Eckermann PJ, McMichael GL, Hayden MJ, Eglinton JK, Chalmer KJ (2007). A genetic map of 1000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. Theoretical and Applied Genetics 115: 383-391.
- Heun M, Kennedy AE, Anderson JA, Lapitan NLV, Sorrells ME, Tanksley SD (1991). Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). Genome 35: 1019-1025.
- Heydari R, Sabouri A, Sabouri H, Fallahi HA, Dadras AR (2014). Identification of AFLP markers related to tolerance to flooding stress in barley. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 41-60 (In Farsi).
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 7783-7788.
- Islam AKMR, Shepherd KW (1981). Wheat-barley addition lines: their use in genetic and evolutionary studies of barley. In: Asher MJC, Ellis RP, Hayter AM, Whitehouse RNH (eds) Barley genetics IV. (Proc 4th Int. Barley Genet Symp). Edinburgh University Press, Edinburgh, pp 729-739.
- Kalendar R, Antonius K, Smykal P, Schulman AH (2010). iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. Theoretical and Applied Genetics 121:1419-1430.
- Kalendar R, Flavell AJ, Ellis THN, Sjakste T, Moisy C, Schulman AH (2011). Analysis of plant diversity with retrotransposon- based molecular markers. Heredity 106: 520-

530.

- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman AH (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704-711.
- Kleinhofs A, Kilian A, Saghai-Marroof MA, Biyashev RM, Hayes P, Chen FQ, Lapitan N, Fenwick A, Blake TK, Kanazin V, Ananiev E, Dahleen L, Kudra D, Bollinger J, Knapp SJ, Liu B, Sorrells M, Heun M, Franckowiak JD, Hoffman D, Skadsen R, Steffenson BJ (1993). A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 705-712.
- Kumar A, Bennetzen J (1999). Plant retrotransposons. *Annual Review Genetics* 33:479-532.
- Langridge P, Lagudah ES, Holton TA, Sharp PJ, Chalmers K (2001). Trends in genetic and genome analysis of wheat: a review. *Australian Journal of Agricultural Research* 2:1043-1077.
- Li JZ, Huang XQ, Heinrichs F, Ganai M, Roder MS (2005). Analysis of QTLs for yield, yield components and malting quality in a BC3-DH population of spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 356-363.
- Lou Q, Chen J (2007). Ty 1-copia retrotransposon- based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits. *Genome* 50: 802- 810.
- Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman AH (2000). Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular and General Genetics* 264: 325- 334.
- Marquez-Cedillo LA, Hayes PM, Jones BL, Kleinhofs A, Legge G, Rossnagel BG, Sato K, Ullrich SE, Wesenberg DM (2000). QTL analysis of malting quality in barley based on the doubled haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 173-184.
- Mather K (1938). Crossing over heterochromatin in X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 24:413-435.
- Nasri S, Abdollahi Mandoulakani B, Darvishzadeh R, Bernousi I (2013). Retrotransposon insertional polymorphism in Iranian bread wheat cultivars and breeding lines revealed by IRAP and REMAP Markers. *Biochemical Genetics* 51: 927-943.
- Rahimmalek M, Seyed Tabatabayi BE, Mohammadi SA (2007). Saturating microsatellite linkage map of wheat in Fukuho-Komugi×Oligo-Culm cross population using AFLP markers. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 43: 567-575.
- Sadeghzadeh B (2008). Mapping of chromosome regions associated with seed Zn accumulation in barley, PhD thesis, The University of Western Australia, Perth.
- Sadeghzadeh B, Rengel Z, Li C, Yang H (2010) Molecular marker linked to a chromosome region regulating seed Zn accumulation in barley. *Molecular Breeding* 25, 167-177.
- Saeidi H, Rahiminejad MR, Heslop-Harrison JS (2008). Retroelement insertional polymorphisms, diversity and phylogeography within diploid, D-genome *Aegilops tauschii* (Triticeae, Poaceae) sub-taxa in Iran. *Annals of Botany* 101: 855-861.
- Shirasu K, Schulman AH, Lahaye T, Schulze- Lefert P (2000). A contiguous 66 kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion. *Genome Resources* 10: 908-915.
- Suoniemi A, Schmidt D, Schulman AH (1997). BARE-1 insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites. *Genetica* 100: 219-230.
- Tanhuanpaa P, Kalendar R, Laurila J, Schulman AH, Manninen O, Kiviharju E (2006). Generation of SNP markers for short straw in oat (*Avena sativa L.*). *Genome* 49: 282-

287.

- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni J, Grandillo S, Martin GB, Messiguer R, miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Young ND (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Waugh R, McLean K, Flavell A.J, Pearce S, Kumar A, Thomas BBT, Powell W (1997). Genetic distribution of *BARE-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genetics* 253:687-694.
- Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N, McCouch SR (1997). Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 253: 535-545.
- Yu G-X, Wise RP (2000). An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid *Avena*. *Genome* 43: 736-749.

Saturation of barley genetic map using retrotransposon-based markers and doubled haploid population derived from a cross of Clipper×Sahara

Ghaderi F.¹, Abdollahi Mandoulakani B.², Babaeian Jelodar N.A.¹, Sadeghzadeh B.³

¹ MSc graduate of plant breeding and professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran.

² Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Iran.

³ Associate professor, Dryland Agricultural Research Institute, Maragheh, Iran.

Abstract

Genetic maps with high density and wide genome coverage play significant role in basic and applied genetic researches. In recent decades, with the advent of DNA markers, the huge development has been created in genetic map preparation and saturation in various plant species. In this study, IRAP, REMAP and ISSR markers were applied to saturate the genetic map of barley in a population with 149 double haploid individuals derived from a cross of Clipper and Sahara. The basic genetic map of this population was used as a frame for further analysis. In general, among the 120 primers used, 6 IRAP, 7 REMAP and 3 ISSR primers showed polymorphism between parents which generated 11 IRAP, 7 REMAP and 4 ISSR markers. Eighteen markers segregated in population, out of which 12 markers assigned to 7 barley linkage groups. Two markers deviated from the ratio of 1:1. The maximum number of markers was assigned to linkage group 2. In the current investigation, retrotransposon-based markers were able to saturate the gaps of barley genetic map on linkage groups 1, 3, 5 and 6. The results showed that retrotransposon markers can be effectively used for saturation of barley genetic maps.

Keywords: *barley, IRAP markers, genetic map, doubled haploid population.*

* Corresponding Author: Abdollahi Mandoulakani B. Tel: 09122386990 Email: b.abdollahi@urmia.ac.ir