مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۸۲ (۱۸-۹)

ترسیم نقشه ژنتیکی جو بر اساس نشانگرهای AFLP

بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[۱] و علی اکبر شاه نجات بوشهری[۲]
۱ ، ۲، استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۱۳۸۱/۸/۸

خلاصه

با بکارگیری روش AFLP[1] بر روی ژل‌های کوچک، تعداد ۱۷۱ نوار چند شکل برای دو رقم جو ژاپنی انتخاب گردید. این نوارهای چند شکل روی ۹۹ رگه خالص نوترکیب (RIL) حاصل از تلاقی دو رقم مذکور تفرق مندلی ۱: ۱ را نشان دادند و همه آنها روی هفت کروموزوم جو قرار گرفتند. بنابراین نوارهای مذکور می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی برای تهیه نقشه ژنتیکی بکار روند. مکان یابی ۱۷۳ نشانگر (۱۲۵ مکانی ژنی) که شامل ۱۷۱ نشانگر AFLP و ۲ نشانگر مرفولوژیکی بود طولی به اندازه ۸۷۵ سانتی‌متر مورگان را برای ژنوم جو برآورد نمود.

واژه‌های کلیدی: AFLP، جو، نقشه لینکاژی، RIL، STS.

مقدمه

تهیه نقشه ژنتیکی بر مبنای نشانگرها، گامی ضروری برای تجزیه لینکاژی صفات مهم زیستی و زراعی است. گرچه روش معمول RFLP به طور گسترده‌ای در تهیه نقشه لینکاژی غلاتی مانند جو (۱۷، ۱۸، ۲۰)، برنج (۲۸، ۲۹) و گندم (۸، ۲۴) به کار رفته است، ولی به خاطر نیاز به مقادیر زیاد DNA و هیبریداسیون به وسیله کاوشگر، امروزه نشانگرهای مبتنی بر تکنیک PCR (۳۸) مانند STS (۳۰)، RAPD (۴۳) و یا SSR (۲۳) برای تهیه نقشه ژنتیکی کاربرد بیشتری دارند. اگرچه این روش‌ها ساده و به مقادیر کم DNA احتیاج دارند، با این حال تهیه نقشه ژنتیکی هنوز کاری دشوار است.

نشانگرهای STS می‌تواند به سادگی برای تهیه نقشه ژنتیکی در جوامع مختلف جو به کار رود (۴۱). ولی به علت وجود قسمت‌های کروموزومی فاقد نشانگر، به نشانگرهای زیادی برای تکمیل نقشه ژنتیکی مورد نیاز است. برای این منظور می‌توان از نشانگرهای مولکولی مختلف مانند RAPD، RFLP، AFLP (۳، ۴، ۱۰، ۲۵، ۴۳) استفاده نمود. در این میان روش AFLP (۴۶) کارآمدتر از روش‌های دیگر انگشت‌نگاری DNA است زیرا تعداد زیادتری نوار چند شکل در یک ژل قابل شناسائی است (۳۷). علاوه بر آن، تکرارپذیری و اطمینان به نتایج حاصل از این روش توسط تعداد زیادی از محققین به اثبات رسیده و در تهیه نقشه ژنتیکی جو نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۵، ۳۴، ۴۳). این روش هنوز دارای مشکلاتی است که از آن جمله می‌توان به استفاده از ژل‌های بزرگ، کاربرد رادیوایزوتوپ و زمان‌بر بودن برای آشکارسازی نوارها اشاره کرد. استفاده از رنگ‌آمیزی جیوه در ژل‌های پلی‌آکریل آمید دناتوره شده، می‌تواند جایگزینی برای حذف رادیوایزوتوپ در آشکارسازی نوارها باشد (۷، ۹، ۳۱). در این تحقیق از ژل‌های کوچک تک فازی و رنگ‌آمیزی نقره برای کاهش زمان و هزینه در نتیجه‌گیری استفاده شد.

هدف از این تحقیق مکان‌یابی نشانگرهای AFLP بر روی کروموزوم‌های جو بود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۹۹ رگه خالص نوترکیب حاصل از تلاقی بین دو رقم ژاپنی آزوماموگی[۲] (Az) و کانتونکیت‌گولد[۳] (KNG) از نسل

مکاتبه کننده: علی اکبر شاه‌نجات بوشهری

1. Amplied Fragment length polymorphism
2 . Azumamugi
3 . Kanto Nakate Gold

Archive of SID
www.SID.ir

F9 تهیه شد. رقم Az یک جو شش ردیفه (*vrs*۱) زمستانه ژاپنی و از نوع نیمه پاکوتاه (semi - brachytic) است در حالی که رقم KNG یک رقم دو ردیفه (*vrs*۱) و بهاره و از نوع پاکوتاه می‌باشد. از هر یک از این رگه‌ها، والدین و نتاج F۱ بر اساس روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۵) DNA استخراج گردید.

مقدار ۱۲۵ نانوگرم از DNA هر یک از نمونه‌ها توسط ۱/۲۵ واحد آنزیمی برشی *Eco*RI و *Mse*I، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به طور کامل برش داده شد. سپس مرحله اتصال آداپتورها به مدت ۳ ساعت و در همان دما با استفاده از کیت Gibco BRL AFLP^{TM} صورت گرفت. در مرحله اتصال آداپتورها، مقدار ۱/۲۵ واحد اضافی از هر یک از آنزیم‌های برشی ذکر شده به مخلوط واکنش اضافه گردید. پس از اتمام مراحل برش و اتصال، به منظور غیر فعال کردن آنزیم‌های برشی و اتصال، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه دردمای ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله تکثیر اولیه، DNAهای برش یافته و متصل به آداپتورها، توسط آغازگرهای عمومی *Eco*RI+0 و *Mse*I+0 که بر اساس توالی آداپتورها طراحی شده بودند، تکثیر شدند (جدول ۱). این آغازگرها فاقد نوکلئوتیدهای اضافی درانتهای ´۳بودند. محصولات حاصل از این تکثیر توسط آغازگرهای انتخابی *Eco*RI+۳ و *Mse*I+۳ که دارای سه نوکلئوتید انتخابی در انتهای ´۳ خود بودند تکثیر شدند (۷، ۳۱). در مجموع تعداد ۲۵۶ جفت آغازگر (۱۶ آغازگر انتخابی *Eco*RI و ۱۶ آغازگر انتخابی *Mse*I، طبق جدول ۱)، به منظور شناسایی نوارهای چند شکل در بین دو والد مورد استفاده قرار گرفت. محصولات تکثیر شده PCR با مقدار مساوی از بافر فرمامید مخلوط شده و پس از ۳ دقیقه حرارت دادن در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد سریعا روی یخ قرار داده شدند.

الکتروفورز محصولات PCR شبیه الکتروفورز پروتئینی انجام شد ولی سیستم خنک کننده مورد استفاده قرار نگرفت. ژل پلی‌آکریل آمید دناتوره در صفحه‌های شیشه‌ای مورد استفاده در تجزیه پروتئینی تهیه شد. ژل ۷٪ پلی‌آکریل‌آمید تهیه شده شامل تریس ۳۷/۵ mM (pH=۷) و ۸/۵ M اوره بود. مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها روی ژل قرار داده شد و در دمای ۵۰ سانتی‌گراد با جریان برق ۳۰۰ ولت به مدت ۳/۵ ساعت الکتروفورز گردید. سپس ژل توسط نقره رنگ‌آمیزی شد.

جدول ۱- فهرست آغازگرهای اولیه و انتخابی مورد استفاده

آغازگر عمومی *Eco*RI (E-000) 5´-GACTGCTACCAATTC-3´			
آغازگرهای انتخابی *Eco*RI			
e1=E-000+AAA	e5=E-000+ACA	e9=E-000+AGA	e13=E-000+ATA
e2=E-000+AAC	e6=E-000+ACC	e10=E-000+AGC	e14=E-000+ATC
e3=E-000+AAG	e7=E-000+ACG	e11=E-000+AGG	e15=E-000+ATG
e4=E-000+AAT	e8=E-000+ACT	e12=E-000+AGT	e16=E-000+ATT
آغازگر عمومی *Mse*I (M-000) 5´-GATGAGTCCTGAGTAA-3´			
آغازگرهای انتخابی *Mse*I			
m17=M-000+CAA	m21=M-000+CCA	m25=M-000+CGA	m29=M-000+CTA
m18=M-000+CAC	m22=M-000+CCC	m26=M-000+CGC	m30=M-000+CTC
m19=M-000+CAG	m23=M-000+CCG	m27=M-000+CGG	m31=M-000+CTG
m20=M-000+CAT	m24=M-000+CCT	m28=M-000+CGT	m32=M-000+CTT

Archive of SID

www.SID.ir

نامگذاری نوارهای AFLP حاصل بر اساس جفت آغازگرهای مورد استفاده و اندازه نسبی آن نوارها انجام شد. با توجه به استفاده از نشانگر اندازه VIII به عنوان معیار در هر ژل، شماره‌های ۱ تا ۱۳ به ترتیب به نوارهای بزرگتر از ۱۱۱۴ باز، ۱۱۱۴-۹۰۰، ۹۰۰-۶۹۲، ۶۹۲-۵۰۱، ۵۰۱-۴۸۹، ۴۸۹-۴۰۴، ۴۰۴-۳۲۰، ۳۲۰-۲۴۲، ۲۴۲-۱۹۰، ۱۹۰-۱۴۷، ۱۴۷-۱۲۴، ۱۲۴-۱۱۰ و ۱۱۰-۶۷ باز نسبت داده شد. در این روش نامگذاری، e یا m نشان دهنده core آغازگر مورد استفاده می‌باشد. اولین عدد پس از این حروف، نشان دهنده سه باز انتخابی (selective) می‌باشد. به این صورت که AAA=۱، AAG=۲، AAC=۳، AAT=۴، GAA=۵ و ... TTT=۶۴ خواهد بود. عدد بعدی بر اساس اندازه نسبی نوار چند شکل تولید شده انتخاب می‌شود. به این صورت که حد فاصل قطعات بین نشانگر اندازه VIII از شماره ۱ تا ۱۲ (کوچکترین قطعه) شماره‌گذری می‌شود. در صورت وجود بیش از یک نوار چند شکل در هر حد فاصل نشانگر، قطعه بزرگتر عدد ۱ و قطعات دیگر شماره‌های بعدی را به خود نسبت می‌دهند. برای مثال تفسیر e۱۱m۱۹ -۱۰-۲ عبارتست از: eACC:e۱۱m۱۹ mCAA:، ۱۰: حد فاصل قطعه ۱۰ و ۱۱ نشانگر و ۲: دومین نوار چند شکل در این حد فاصل (جدول ۱). چون نشانگرهای AFLP به صورت غالب بودند، نسب تفرق آنها در نسل F۹ با نسبت ۱: ۱ در آزمون X^2 مورد بررسی قرار گرفت و میزان ناخالصی در نسل F۹ کمتر از ۰/۴ بود. داده‌های حاصل از نشانگرها توسط برنامه MAPMAKER (۱۲) مورد تجزیه لینکاژی قرار گرفته و مکان‌یابی شدند. این آزمایش در ژاپن انجام شد و تجزیه و تحلیل آن در ایران صورت گرفته است.

نتایج

در مجموع تعداد ۲۳۴۸ نوار چند شکل شناسائی گردید. تعداد نوارهای تولید شده توسط ۲۵۶ جفت آغازگر AFLP مورد استفاده از ۵۹ تا ۹۱ متغیر بود به طوری که ۱ تا ۱۸ نوار چند شکل برای هر جفت آغازگر در مورد دو والد Az و KNG قابل شناسائی بود. برای مکان‌یابی نشانگرهای حاصل از این نوارها، تعداد ۳۲ جفت آغازگر که بیشترین و واضح‌ترین نوارهای چند شکل را نشان دادند انتخاب و بر این اساس ۱۷۱ نوار چند شکل واضح بر روی ۹۹ رگه خالص نوترکیب (RIL) حاصل از تلاقی Az و KNG مورد آزمایش قرار گرفت.

ضمن اینکه همه نشانگرهای AFLP روی هفت کروموزوم جو قرار گرفتند (جدول ۲) می‌توانند تکمیل کننده نقشه ناقص ژنتیکی تهیه شده بر اساس نشانگرهای STS (۱، ۲۷) در گذشته باشند، که در آن از رگه‌های خالص نوترکیب (RILs) حاصل از تلاقی دو رقم به کار رفته در این آزمایش استفاده شد و نقشهٔ ناقصی از جو با طولی معادل ۳۸۳/۶ سانتی‌مورگان بر اساس ۶۷ مکان ژنی STS و دو مکان ژنی ظاهری تهیه گردید.

در این ترسیم ژنی هنوز قسمتی از کروموزوم ۱H، ۶H و۷H فاقدنشانگرباقی ماند این فواصل بین نشانگرهای۴-e۲-m۱۸ و ۱۱-e۵-m۲۹ روی‌کروموزوم ۱H، ۳-۹-e۱۲-m۲۲ و ۱۲-e۱۱-m۱۸ روی کروموزوم ۶H و ۱۱-e۳-m-۳۰ و ۶-e۱۵-m۳۱ روی کروموزوم ۷H قرار دارند و به ترتیب حدود ۳۵/۵، ۳۰/۱ و ۳۲/۰ سانتی‌مورگان تخمین زده شده‌اند. این مکان‌یابی ژنی بر اساس ۱۷۳ نشانگر (۱۲۵ مکان ژنی) که شامل ۱۷۱ نشانگر AFLP و ۲ نشانگر مورفولوژیک بود (۱*vrs* و *uzu*) انجام گرفت. بر این اساس اندازه کل ژنوم ۸۷۵ سانتی‌مورگان تخمین زده شد. کروموزوم ۳H دارای بیشترین نشانگر AFLP (۳۳ نشانگر) و کروموزوم ۲H کمترین تعداد نشانگر AFLP (۲۰ نشانگر) را دارا بود.

دز تجزیه تفرق مندلی، تعداد ۳۵ نشانگر AFLP (۶ نشانگر در سطح ۱٪ و ۲۹ نشانگر در سطح ۵٪) اختلاف معنی‌داری با نسبت ۱: ۱ مورد استفاده در نسل F۹ را نشان دادند. پراکنش این نشانگرها روی کروموزوم‌های جو تصادفی نبود و از این میان ۲۹ نشانگر در اطراف مکان ژنی *uzu* روی کروموزوم ۳H قرارداشتند. علاوه بر آن، خود مکان ژنی *uzu* دارای بیشترین انحراف از نسبت تفرق مندلی بود به طوری که اکثر رگه‌های خالص نوترکیب شبیه والد KNG (نوع غیر *uzu*) بودند. این نتیجه بیانگر آن است که احتمالا نتاج نوع *uzu* قدرت تطابق کمتری در مزرعه را داشته‌اند.

دراین‌آزمایش ژنوم جو با اندازه‌ای معادل ۸۷۵ سانتی‌مورگان طولی کوتاهتر از اندازه برآورد شده بر اساس نقشه‌های حاصل از ارقام Igri و Franka (۱۲۱۴/۲ سانتی‌مورگان، ۱۷) و Steptoe

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مکان نشانگرهای AFLP روی کروموزوم‌های جو و فاصله آنها از نشانگر قبلی خود

کروموزم 1H		کروموزم 2H		کروموزم 3H		کروموزم 4H		کروموزم 5H		کروموزم 6H		کروموزم 7H	
نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)
e15m27-8	--	e11m17-11	--	e09m27-10	--	e03m30-10-2	--	e11m19-10-2	--	e12m22-9-4	--	e05m29-7-2	--
e02m18-9-1	۱۶/۴	e08m18-7	۵/۵	e07m25-7-1	۸/۴	e12m22-12	۶/۴	e07m25-8-4	۱۵/۱	e12m22-9-3	۰/۰	e13m31-10-2	۰/۰
c06m30-8-2	۵/۱	e12m22-7-1	۱۶/۸	e05m18-7	۱۳/۰	e07m25-8-2	۴/۵	e07m25-8-3	۰/۰	e11m18-12	۳۰/۱	e03m30-11	۱۳/۶
e12m22-8	۱۰/۶	e09m30-10	۳/۸	e05m19-4	۱۶/۱	e04m32-2	۱/۴	e06m50-7	۳/۸	e14m26-3	۰/۵	e15m31-6	۳۲/۰
e09m27-9-2	۴/۸	e15m19-10-1	۲/۱	e02m18-10	۰/۵	e05m18-9-4	۲/۹	e11m18-10	۱۱/۲	e13m31-10-1	۰/۵	e15m19-3	۷/۰
e12m19-4-1	۴/۱	c13m23-6	۰/۵	c14m27-4-1	۳/۳	c09m27-8	۰/۰	c11m22-7-2	۳/۸	c01m28-6	۰/۰	c02m18-3-2	۲۰/۷
e09m23-7-2	۹/۱	e13m31-7-1	۷/۷	e15m19-7	۷/۹	e05m18-9-2	۱/۶	e12m26-8	۰/۰	e02m18-8-4	۰/۵	e03m31-4	۳/۶
e09m30-9-1	۰/۰	e15m19-8-1	۷/۷	e06m23-7-2	۰/۰	e06m23-6	۰/۵	e15m28-9-1	۰/۰	e05m18-8	۰/۰	e09m23-8-1	۲/۱
e12m26-4-1	۰/۰	e03m30-8-2	۱۳/۹	e06m18-6	۴/۵	e14m26-9	۰/۰	e09m30-9-2	۰/۰	e06m18-4-1	۰/۰	e09m23-7-1	۱/۰
e13m31-8	۰/۰	e12m19-3-1	۱/۶	e15m19-10-2	۱/۱	e05m18-11	۰/۰	e15m28-7-3	۰/۰	e5m28-8	۰/۰	e06m30-4	۱/۰
e12m19-4-2	۳/۳	*vrs1*	۰/۵	e15m19-10-3	۰/۰	e11m19-9	۱/۶	c09m23-8-2	۲/۷	c06m23-8-2	۰/۰	c06m30-6	۱/۶
e14m26-7-1	۱/۰	e12m22-3	۱۴/۰	e15m28-9-2	۰/۰	e03m30-8-1	۰/۰	e11m17-9-1	۸/۲	e05m18-9-3	۰/۰	e09m30-8	۱/۶
e03m30-3	۱/۶	e15m31-10-3	۱۲/۶	e07m25-11	۲/۳	e05m19-3	۲/۱	e03m30-10-1	۱۷/۱	e11m19-10-1	۰/۰	e15m28-7-2	۱/۰
c06m23-8-1	۱/۰	e11m19-3	۱۶/۴	e05m19-8	۰/۰	e08m18-10	۴/۳	e14m27-4-4	۲۲/۵	e09m27-9-1	۰/۰	e07m25-4-1	۰/۰
e04m32-7	۹/۱	e07m25-8-1	۸/۴	e05m18-9-1	۰/۰	e15m19-8-2	۵/۷	e12m25-9	۱۲/۷	e02m18-8-3	۰/۰	e11m17-10-2	۳/۳
c13m23-8-1	۵/۱	e08m18-1	۱۵/۱	e03m31-7-2	۰/۰	e09m30-6	۰/۰	e07m25-3	۵/۰	e14m27-9-2	۰/۰	e11m17-10-1	۰/۰
e15m31-10-2	۱۱/۵			e12m22-9-1	۰/۰	e15m28-7-1	۲/۱	e12m19-9-1	۸/۴	e15m31-8	۵/۱	e12m19-10-3	۱۲/۳

www.SID.ir

ادامه جدول ۲- مکان نشانگرهای AFLP روی کروموزوم‌های جو و فاصله آنها از نشانگر قبلی خود

کروموزم ۱H		کروموزم ۲H		کروموزم ۳H		کروموزم ۴H		کروموزم ۵H		کروموزم ۶H		کروموزم ۷H	
نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)	نشانگر	فاصله (cM)
e15m19-9-1	۰/۰			e09m30-7	۰/۰	e03m31-10	۱/۶	e11m20-10	۲۲/۳	e15m19-9-2	۱/۶	e05m29-9	۶/۵
e02m18-4	۱۲/۳			e12m26-11	۱/۳	e11m17-9-2	۵/۱	e15m28-9-3	۹/۹	e06m30-2	۱/۶	e15m27-4	۵/۳
e05m29-11	۳۵/۵			e04m24-8	۰/۶	e14m27-10	۳/۹	e01m28-10-1	۵/۱	e03m31-8	۴/۴	e11m17-10-3	۰/۰
e06m18-10	۰/۰			e04m24-9	۰/۰	e05m19-9-1	۱/۶			e12m22-7-4	۳/۲	e06m23-9	۳/۳
e05m18-10	۱۴/۸			e01m28-10-3	۰/۰	e15m31-11	۷/۸			e12m22-7-3	۰/۰	e06m18-8	۰/۰
				e15m27-7	۰/۶	e12m19-10-2	۱۹/۰			e05m19-10	۱۱/۴	e15m19-6	۰/۰
				e14m27-9-2	۱/۵	e12m19-10-1	۰/۰			e04m32-12	۳/۸	e12m22-10-2	۳/۹
				uzu	۵/۰	e04m32-8	۳/۵			e13m31-6	۳/۸	e06m30-8-1	۲۰/۷
				e03m31-9-2	۰/۰	e12m19-8	۱۳/۸			e08m18-2	۹/۹	e11m20-8	۲/۲
				e06m18-4-2	۰/۰	e15m31-2-1	۰/۰						
				e06m30-10-1	۶/۴	e15m31-2-2	۰/۰						
				e07m25-4-2	۱۸/۰	e02m18-8-2	۶/۲						
				e04m32-10	۵/۷								
				e06m30-8-3	۲۱/۶								
				e12m19-9-2	۱۰/۷								
				e11m18-3	۱۰/۴								
				e11m17-8-3	۵/۷								

www.SID.ir

و Morex (۱۲۲۶/۳ سانتی‌مورگان، ۲۰) داشت. این اختلاف ممکن است به دلیل ناقص بودن نقشه ژنی در این آزمایش باشد، ولی مطالعات بعدی نشان داد که نقص نقشه ژنی علت اصلی این اختلاف نیست. زیرا برای مثال نشانگرهای مشترک در هر دو جامعه حاصل از Az×KNG و Igri×Franka همه کروموزوم 5H را می‌پوشاند ولی بر اساس جامعه حاصل از Az×KNG اندازه این کروموزوم ۱۴۷/۸ سانتی‌مورگان است. در صورتی که بر اساس جامعه حاصل از Igri×Franka اندازه این کروموزوم ۲۳۸/۷ سانتی‌مورگان تخمین زده شده است، یعنی اندازه تخمینی کروموزوم 5H در این آزمایش ۶۱/۹ درصد اندازه حاصل از آزمایش Igri×Franka است. این کاهش در اندازه کروموزوم 5H در فواصل همه مکان‌های ژنی پراکنده است.

بحث

در این تحقیق، اکثر نوارهای AFLP دارای تفرق مندلی بودند که نشان می‌دهد این نوارها، نشانگرهای مولکولی مناسبی برای تهیه نقشه ژنومی هستند. با توجه به اینکه در این آزمایش ژل کوچک مورد استفاده قرار گرفت لذا روش مناسبی برای ژنوم‌های کوچک است زیرا در آنها تعداد نوارهای تولیدی کمتر است و بررسی آنها آسان‌تر خواهد بود.

در این آزمایش ۱۷۱ نشانگر AFLP مکان‌یابی شد. نقشه تهیه شده تقریبا کامل است زیرا همه این نشانگرها روی هفت کروموزوم قرار گرفته است.

گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد با اضافه شدن نشانگرهای AFLP به نقشه‌های مبتنی بر RFLP، طول ژنوم افزایش یافته است. برای مثال در برنج از ۱۸۱۱ به ۳۰۵۸ سانتی مورگان (۲۶) و در جو از ۱۰۹۶ به ۲۶۷۳ سانتی‌مورگان (۶) افزایش گزارش شده است. این افزایش در اندازه ژنوم می‌تواند به علت وجود قطعات فاقد نشانگر روی ژنوم، مکان‌یابی نشانگرها در انتهای کروموزوم‌ها و یا مشخص شدن تقاطع و تبادل کروموزومی دوگانه باشد. در گزارش مربوط به افزایش اندازه ژنومی در جو (۶) تاثیر روش‌های مختلف تجزیه داده‌ها توسط برنامه MAPMAKER و JOIN MAP گزارش شده است. با افزودن ۴۰ نشانگر AFLP در بین ۱۳ نشانگر STS واقع بر کروموزوم‌های جو، اندازه قطعات کروموزومی تخمین زده از ۲۶۹/۱ سانتی‌مورگان (۲۷) به ۲۷۰/۷ سانتی‌مورگان افزایش یافت که تفاوت معنی‌دار نیست. این نتیجه می‌تواند دلیلی بر مناسب بودن نشانگرهای AFLP به کار برده شده در این آزمایش باشد.

اندازه ژنوم تخمین زده در این آزمایش (Az×KNG) کوتاهتر از اندازه ژنوم تخمین شده در نقشه‌های حاصل تلاقی‌های از Igri×Franka و Steptoe×Franka است. این تفاوت ممکن است به علت کمی فراوانی نوترکیبی در تلاقی Az×KNG نسبت به تلاقی Igri×Franka و Steptoe×Franka باشد. نوترکیبی توسط عوامل محیطی (۲، ۱۹، ۲۳) و ژنتیکی (۲۹، ۴۰)، اختلاف ژنتیکی والدین (۱۴، ۱۵، ۲۸، ۳۵، ۳۶) و همچنین به وسیله روش مطالعه جامعه (۱۲، ۱۳، ۳۲) تحت تاثیر قرار می‌گیرد. بنابراین اندازه نقشه از یک جامعه به جامعه دیگر متفاوت خواهد بود. در مطالعه اخیر، نقشه ژنومی بر مبنای نشانگرهای AFLP و با استفاده از رگه‌های خالص نوترکیب تهیه شد و اندازه ژنوم ۱۰۶۲ سانتی‌مورگان (۳۴) و ۹۶۵ سانتی‌مورگان (۴۵) تخمین زده شده است که شباهت تقریبی با اندازه تخمینی ژنوم در این مطالعه (۸۷۵ سانتی‌مورگان) دارد.

ارقام مورد استفاده آزموماموگی و کانتونکیت‌گولد دارای صفات ظاهری و فیزیولوژیکی متفاوتی از جمله شش و دو ردیفه سنبله (*vrs*۱)، محدودیت رشدی (*uzu*)، زمستانه و بهاره بودن (*sgh*۱، *sgh*۲) شکنندگی محور بذر (*btr*۱، *btr*۲) هستند، که در مطالعه تکاملی جو از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند و لذا این نقشه ژنتیکی می‌تواند در این راستا از اهمیت خاصی برخوردار باشد. تاکنون نشانگرهای مولکولی بسیار نزدیک به مکان ژنی *vrs*۱ مشخص شده‌اند (۲۱، ۴۲) و تعدادی نیز در دست تهیه هستند که می‌تواند در فهم بهتر روند تکاملی جو موثر باشد.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. سید طباطبائی، ب. ا. و ت. کوماتسودا. ۱۳۷۹. بررسی پلی‌مورفیسم در جو با استفاده از روش PCR-STS. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳۱، شماره ۱.

Archive of SID

www.SID.ir

2. Allard, R. W. 1963. Evidence for genetic restriction of recombination in the lima bean. Genetics 48: 1389-1395.
3. Becker, J. and M. Heum. 1995. Barley microsatellites: Allele variation and mapping. Plant Mol. Biol. 27: 835-845.
4. Becker, J. and M. Heum. 1995. Mapping of digested and undigested random amplified microsatellite polymorphism in barley. Genome 38: 991-998.
5. Becker, J, P. Vos, M. Kuiper, F. Salamini and M. Huen. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol.Gen. Genet. 249-65-73.
6. Castiglioni P., C. Pozzi, M. Huen, V. Terzi, K. J. Muller, W. Rohde and F. Salamini. 1998. An AFLP based procedure for the efficient mapping of mutations and DNA probes in barley. Genetic 149: 2039-2056.
7. Chalhoud B. A., S. Thibaut, V. Laucou, C. Rameau, H. Hofte and R. Cousin. 1997. Silver staining and recovery of AFLP^{TM} amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. Bio Techniques 22: 216-220.
8. Chao, S., P. J. Sharp, A. J. Worland, E. J. Warham, R. M. D. Koebner and M. D. Gale. 1989. RFLP- based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. Theore. Appl. Genet. 78: 495-504.
9. Cho, Y. G., M. W. Blair, O. Panaud and S. R. McCouch. 1996. Cloning and mapping of variety –specific rice genomic DNA sequences: amlified fragment length polymorphisms (AFLPs) from silver-stained polyacrylamide gels. Genome 39: 373-378.
10. Daviia J. A., Y. Loarce and E. Ferrer. 1999. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. Theor. Appl. Genet. 98: 265-273.
11. Dellaporta S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1985. Maize DNA minprep. In: Malmberg R., J. Messing., I. Sussex. Editors. Molecular biology of plants: a loboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. P. 36-37.
12. Devaux, P., A. Kilian and A. Kleinhofs. 1995. Comparative mapping of the barley genome with male and female recombination – derived, doubled haploid populations. Mol. Gen. Genet. 249: 600-608.
13. De Vicente. M. C. and S. D. Tanksley. 1991. Genome – wide reduction in recombination of backcross progeny derived from male versus female gametes in an interspecific cross of tomato. Theor. Appl. Genet. 83: 173-178.
14. Deobley. J. and A. Stee. 1991. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. Genetics 129: 285-295.
15. Gebhardt. C., E. Ritter, A. Barone, T. Debner, B. Walkemeier, U. Schachtschabel, H. Kaufmann, R. D. Thompson, M. W. Bonierbale, M. W. Ganal, S. D. Tanksley and F. Salamini. 1991. RFLP maps of potato and their aligment with the homoeologous tomato genome. Theor. Appl. Genet. 83: 49-57.
16. Giese H., A. G. Holm – Jensen, H. Mathiassen, B. Kjaer, S. K. Rasmussen, H. Bay and J. Jensen. 1994. Distribution of RAPD markers on a linkage map of barley. Hereditas. 120: 267-273.
17. Graner A., A. Jahoor, J. Schondelmaier, H. Siedler, K. Pillen, G. Fischbeck, G. Wenzel and R. G. Herrmann. 1991. Construction of an RFLP map of barley. Theor. Appl. Genet. 83: 250-256.
18. Huen M., A. E. Kennedly, J. A. Anderson, N.L.V. Lapitan, M. E. Sorrells and S. D. Tanksley. 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map of barley (*Hordeum vulgare*). Genome 34: 437-447.
19. Jensen. J. 1981. Effect of temperature on genetic recombination in barley. Hereditas. 94: 215-218.
20. Kleinhofs A., A. Kilian, M. A. Saghai Maroof, R. M. Biyashev, P. Hayes, F. Q. Chen, N. Lapitan, A. Fenwick, T. K. Black, V. Kanazin, E. Ananiev, L. Dahleen, D. Kudrna, J. Bollinger, S. J. Knapp, B. Liu, M. Sorrells, M. Heun, J. D. Franckowiak, D. Hoffman, R. Skadsen and B. J. Steffenson. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. Theor. Appl. Genet. 86: 705-712.
21. Komatsuda. T., W. Li, F. Takaiwa and S. Oka. 1999. High resolution map around the vrs1 locus controlling two- and six – rowed spike in barley, *Hordeum vulgar*. Genome 42: 1-6.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Lander E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: An introductive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and nutural populations. Genomics 1: 174-181.
23. Litt M. and J. A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat withing the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44: 617-633.
24. Liu Y. G., and K. Tsunewaki. 1991. Restriction length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II Linkage map of the RFLP sites in common wheat. Jpn. J. A. Genet. 66: 617-633.
25. Liu Z. W., R. N. Biyashev and M. A. Saghai- Maroof. 1996. Development of simple sequence reapeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theor. Appl. Genet. 93: 869-876.
26. Maheswaran M., P. K. Subudhi, S. Nandji, J. C. Xu, A. Parco, D. C. yang and N. Huang. 1997. Polyumorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. Theor. Appl. Genet. 94: 39-45.
27. Mano, Y., B. E. Sayed – Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka and T. Komatsuda. 1999. Map cosntruction of sequence – tagged sites (STSs) in barley (*Hordeum vulgare L.*) Theor. Appl. Genet. 8: 037-946.
28. McCouch. S. R., G. Kochert, Z., H. Yu Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman and S. D. Tanksley. 1998. Molecular mapping of rice chromosomes, Theor. Appl. Genet. 76: 815-829.
29. Nilsson. N. O. and S. Peleger. 1991. The relationship between natural variation in chiasma frequencies and recombination frequencies in barley. Hereditas 115: 121-126.
30. Olson, M. L. Hood, C. Cantor and D. Doststein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. Science 245: 1434-1435.
31. Penner G. A., L. J. Bezte, A. Tekauz and W. G. Legge. 1996. An amplified fragment length polymorphism (AFLP) map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. Proc. Vth International oat conference & VIIth International Barley Genetica Symposium. Poster Sessions Vol. 1, 373-375.
32. Powell, W., E. M. Borrino, M. J. Allison, D. W. Griffiths, M. J. C. Asher and J. M. Dunnwell. 1986. Genetical analysis of microspore derived plants of barley (*Hordeum vulgare)*. Theor. Apple. Genet. 72: 619-626.
33. Powell. J. B., and R. A. Nilan. 1963. Influence of temperature on crossing over in an inversion heterozygote in barley. Crop Sci. 3: 11-13.
34. Qi X., P. Stam and P. Lindhout. 1998. Use of locus – specific AFLP markers to construct a high – density molecular map in barley. Theor. Appl. Genet. 96: 376-384.
35. Rayapati, P. J., J. W. Gregore, M. Lee and R. P. Wise. 1994. A linkage mape of diploid *Avena* based on RFLP loci and locus conferring resistance to nine isolates of *Puccinia coronata* var. *avena.* Theor. Appl. Genet. 89: 831-837.
36. Rick C. M. 1969. Controlled introgression of crhomosomes of *Solanum pennelli* into *Lycopersicon esculentum:* segregation and recombination. Genetics 26: 753-769.
37. Russell J. R., J. D. Fuller, M. Macualay, B. G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accession detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPD. Theor. Appl. Genet. 95: 714-722.
38. Saiki, P. K., S. Scarf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amlification of B-glubin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. Science 230: 1345-1350.
39. Satio A., M. Yano, N. Kishimoto, M. Nakagahra, A. Yoshimura, K. Saito, S. Kuhara, Y. Ukai, M. Kawase, T. Nagamine, S. Yoshimua, O. Ideta, R. Ohsawa, Y. Hayano, N. Iwata and M. Sugiura. 1991. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice, Jpn. J. Breed. 41: 665-670.
40. Sall, T., J. Flink and B. O. Bengtsson. 1991. Genetic Control of recombination in barley. Hereditas 112: 157-170.
41. Sayed Tabatabaei B. E., Y. Mano, F. Takaiwa, S. Oka, T. Blake and T. Komatuda. 1991. Sequence – tagged sites for barley genome mapping. Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resource. 13: 11-22.

Archive of SID

www.SID.ir

42. Tanno K., F. Takaiwa, S. Oka and T. Kimatsuda. 1999. A nucleotide sequence linked to the vrs1 locus for studies of differentiation in cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) Hereditas 130: 77-82.
43. Waugh R., N. Boner, E. Baird, B. Thomas, a. Graner, P. Hayes and W. Powell. 1997. Homology of AFLP products in three mapping population of barley. Mol. Gen. Genet. 255: 311-321.
44. Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrarry primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
45. Yin X., P. Stam, C. Johan Douleijn and M. J. Kropff. 1999. AFLP mapping of quantitative trait loci for yield – determining physiological characters in spring barley. Theor. Appl. Genet. 99: 244-253.
46. Zabeau, M. and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number: 92402629.7, publication number. 0. 534. 858 AI.

Archive of SID

www.SID.ir

Construction of AFLP Map in Barley

B. E. SAYED TABATABAEI[1] AND A. A. SHAHNEJAT BUSHEHRI[2]
1, 2, Assistant Professors, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted Oct. 30, 2002

SUMMARY

Using amplified fragment lengh polymorphism (AFLP) in a small gel, generated 171 polymorphic AFLP fragment segregating 99 recombinant inbred lines (RILs) of barley cultivars "Azumamugi" × "Kanto Nakate Gold". Most of these fragments showed Mendelian segregation of 1: 1 ratio, all being assigned to seven barley chromosomes, indicating that these fragments are reliable as molecular markers for barley genome mapping. Linkage maps were constructed with 173 markers (125 detected loci), consisting of 171 AFLPs and two morphological markers, which covered 875cM.

Key words: Amplified fragment length polymorphism (AFLP), *Hordeum vulgare*, Linkage map,Recombinant inbred line(RIL),Sequence–tagged site (STS)

Archive of SID

www.SID.ir