

انتساب نشانگرهای AFLP به گروه‌های پیوستگی در لاین‌های هاپلوئید مضاعف گندم

بهرام حیدری^{۱*}، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی^۲ و مهدی رحیم ملک^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱)

چکیده

تعیین جایگاه نشانگرها و تهیه نقشه پیوستگی ژنوم گیاهان نقش مهمی در انتخاب به کمک نشانگر و به نژادی صفات مورد نظر دارد. به منظور انتساب نشانگرهای AFLP به نقشه پیوستگی گندم از ۱۱ ترکیب آغازگری *PstI* و *MseI* در ۱۰۷ لاین هاپلوئید مضاعف گندم (*Triticum aestivum* L.) استفاده شد. نتایج تجزیه AFLP نشان داد که دامنه اندازه قطعات تکثیر شده (۶۶ نشانگر چند شکل) توسط ترکیبات آغازگری بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز (bp) متغیر بود. از بین ۶۶ نشانگر AFLP شناسایی شده در این مطالعه، ۹ درصد از نشانگرها دارای انحراف از نسبت تفرق ۱:۱ در یک جمعیت هاپلوئید مضاعف بودند و از نقشه پیوستگی کنار گذاشته شدند. نتایج تجزیه پیوستگی نشانگرهای AFLP نشان داد که پس از حذف نشانگرهای دارای انحراف از نسبت ۱:۱، تعداد ۲۱ نشانگر (۴۳ درصد) به ژنوم B، ۲۰ نشانگر (۴۱ درصد) به ژنوم A و تعداد ۶ نشانگر (۱۲ درصد) به ژنوم D اختصاص یافت، ولی تعداد ۱۲ نشانگر به هیچ گروه ژنومی منتسب نشد. تعداد نشانگرهای منتسب به گروه‌های همپولوگی ۱ تا ۷ به ترتیب ۶ (۱۲/۵٪)، ۷ (۱۴/۵٪)، ۶ (۱۲/۵٪)، ۴ (۸/۳٪)، ۵ (۱۰/۴٪)، ۹ (۱۸/۷٪) و ۱۲ (۲۵٪) بود. بیشترین تعداد نشانگرهای AFLP در این مطالعه به کروموزوم‌های ۷A (۷ نشانگر) و ۱B (۵ نشانگر) منتسب گردید. از بین نشانگرهای AFLP، *P01m24-8-4* و *P04m22-9-4* در جایگاه‌هایی از گروه‌های پیوستگی A، B و D مکان‌یابی شدند که در نقشه اولیه دارای تراکم نشانگری کمتری بودند و بنابراین از پوشش بهتری در گروه‌های پیوستگی در مقایسه با سایر نشانگرهای AFLP برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: گندم، گروه‌های پیوستگی، AFLP

۱. گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲. گروه زیست فناوری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bheidari@shirazu.ac.ir

مقدمه

نقشه‌های پیوستگی اساس اولیه برای تشخیص نواحی کروموزومی حامل ژن‌های کنترل کننده صفات کمی (QTL) می‌باشند (۲۴ و ۲۵). از نشانگرهای مولکولی RFLP، RAPD، AFLP، STS، SCAR و SSR به طور گسترده برای تشکیل گروه‌های پیوستگی در جوامع در حال تفرق F_2 ، تلاقی برگشتی، لاین‌های اینبرد نوترکیب (RILs) و هاپلوئیدهای مضاعف (DH) استفاده شده است (۱۲، ۲۲ و ۲۳). چندین نقشه ژنتیکی مبتنی بر نشانگر RFLP با استفاده از تلاقی‌های بین گونه‌ای گندم (۱۱) تشکیل شده است. ولی از آنجا که نشانگرهای RFLP سطح پایینی از چند شکلی را در گندم نشان می‌دهند و بسیار وقت‌گیر و پرهزینه هستند، نشانگرهای مبتنی بر PCR نظیر AFLP و SSR به طور وسیعی برای تشکیل نقشه ژنتیکی استفاده شده‌اند (۱۶ و ۲۳). نشانگرهای AFLP (۲۶) نشانگرهای قابل اعتماد و کارآمدی جهت ایجاد تعداد زیادی نشانگر برای تهیه نقشه‌های پیوستگی هستند. نشانگرهای AFLP و SSR به طور موفقیت آمیزی به منظور اشباع نقشه ژنوم گندم با نقشه‌های حاصل از نشانگرهای RFLP ادغام شده‌اند (۲ و ۱۶). اصولاً دو روش مستقیم و غیر مستقیم برای تعیین کروموزوم مرتبط با نشانگرهای AFLP و شناسایی ژن‌های پیوسته به آنها وجود دارد. در روش مستقیم تجزیه توده‌ای در حال تفرق (Bulk Segregant Analysis) برای شناسایی نشانگرها و انتساب آنها به گروه‌های پیوستگی گندم به کمک آنیوپلوئیدها به کار می‌رود (۷). در روش غیرمستقیم، از طریق یافتن پیوستگی بین نشانگرهای AFLP و نشانگرهای کروموزوم - اختصاصی مانند ریزماهورها جایگاه نشانگرهای AFLP در نقشه پیوستگی تعیین می‌شود.

مطالعه ژنتیک گندم به دلیل اندازه بزرگ ژنوم (حدود ۹۰۰۰ سانتی مورگان یا 16×10^9 bp در واحد هاپلوئید)، داشتن سه ژنوم خویشاوند (A، B و D) و انتساب آنها به ۲۱ گروه پیوستگی و پایین بودن سطح چند شکلی در مقایسه با سایر غلات مشکل‌تر است (۱۱). بنابراین تولید نشانگرهای زیاد با

استفاده از تکنیک AFLP امکان اشباع نقشه ژنتیکی گندم را افزایش می‌دهد. تشکیل نقشه پیوستگی اشباع با استفاده از نشانگرهای SSR در بیشتر گیاهان زراعی به دلیل کار زیاد و پرهزینه بودن جداسازی ریزماهورها در ژنوم، تقریباً مشکل به نظر می‌رسد، ولی اشباع فواصل خالی از نشانگر با استفاده از نشانگرهایی نظیر AFLP هدفی دست یافتنی است. نشانگرهای AFLP توزیع مناسبی بین ژنوم‌های A و B گندم دارند، اما کاهش معنی‌دار در سطح نوترکیبی و چند شکلی در ژنوم D منعکس کننده چند شکلی نسبتاً کم برای نشانگرهای مولکولی در این ژنوم است (۱۹).

تراکم نشانگرها در نواحی سانترومری نشان‌دهنده بازدارندگی نوترکیبی در این نواحی است، اما شواهدی وجود دارد که نشانگر AFLP خارج از نواحی پر تراکم RFLP قرار می‌گیرند و موجب افزایش طول نقشه ژنتیکی و هم‌چنین پر نمودن جایگاه‌های خالی و یا نواحی انتهایی کروموزومی در نقشه‌های غیر اشباع می‌شوند (۲). برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که نشانگرهای AFLP ممکن است دارای جایگاه اختصاصی در ژنوم بوده و لذا قابل انتقال بین جمعیت‌ها و تلاقی‌های مختلف باشند (۲۷ و ۲۸).

شاه و همکاران (۲۰) به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده برخی صفات کمی واقع در کروموزوم ۳A گندم نان از ۱۳ نشانگر AFLP و یک نشانگر مرفولوژیک جهت تشکیل نقشه پیوستگی در ۵۰ لاین خالص نوترکیب استفاده کردند. بوئیف و همکاران (۱) با استفاده از ۱۰۲ لاین هاپلوئید مضاعف گندم نان به بررسی خصوصیات ساختاری کروموزوم‌های گروه هومولوگی ۱ پرداختند. در مطالعه آنها نقشه پیوستگی جمعیت با استفاده از نشانگرهای RFLP و SSR روی کروموزوم‌های هومولوگ گروه ۱ تهیه شد و نتایج نشان داد که کروموزوم ۱A، دارای طویل‌ترین نقشه ژنتیکی با ۲۵ نشانگر و طول ۱۰۲/۸ سانتی مورگان بود. در مقایسه کروموزوم‌ها، کروموزوم ۱D با دارا بودن ۱۸ نشانگر و ۷۱/۳ سانتی مورگان دارای کوتاه‌ترین طول نقشه بود.

شرکت Roche (آلمان) انجام شد.

در مرحله تکثیر مقدماتی از آغازگرهای با یک نوکلئوتید تصادفی در انتهای ۳ استفاده شد. در گیاهانی با ژنوم پیچیده نظیر گندم، این مرحله به منظور کاهش تعداد قطعات برشی تکثیر شده استفاده می‌شود. توالی آغازگرهای (P: آغازگر *PstI* و M: آغازگر *MseI*) مورد استفاده در این مرحله به شرح زیر می‌باشند،

P+A: 5'-GAC TGC GTA GGT GCA GA-3' آغازگر

M+C: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3' آغازگر

محصولات تکثیر مقدماتی به نسبت ۱:۵ رقیق شدند و از آنها برای تکثیر انتخابی به کمک آغازگرهای با ۳ نوکلئوتید تصادفی در انتهای ۳ استفاده شد (جدول‌های ۱ و ۲). محصولات تکثیر انتخابی با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید توالی‌یاب (Sequencing Gel) تفکیک شد. دستگاه الکتروفورز مورد استفاده در این تحقیق از نوع Biometra با ابعاد ۳۳×۴۳ سانتی‌متر بود. رنگ آمیزی ژل‌های پلی‌اکریلامید با استفاده از نیترات نقره انجام شد (۴).

نشانگرهای AFLP حاصل از ۱۱ ترکیب آغازگری که بین والدین چند شکلی نشان دادند، جهت تعیین ژنوتیپ ۱۰۷ لاین مورد مطالعه، انتخاب و پس از امتیازدهی چشمی از آنها جهت اشباع نقشه ژنتیکی که از قبل تهیه شده بود (۲۳)، استفاده شد. قطعات نشانگرهای AFLP از طریق مقایسه با نشانگر اندازه مشخص (۵۰bp) و بر اساس ترکیب آغازگرها و دامنه اندازه قطعه مربوط نام‌گذاری شدند (۱۴) به نحوی که قطعات بزرگ‌تر از ۱۰۰۰ bp در دامنه ۱، ۹۰۰-۱۰۰۰bp دامنه ۲، ۶۹۰-۹۰۰bp در دامنه ۳، ۵۰۰-۶۹۰bp (دامنه ۴)، ۴۸۰-۴۰۰bp (دامنه ۵)، ۳۲۰-۴۰۰bp (دامنه ۶)، ۲۴۰-۳۲۰bp (دامنه ۷)، ۱۹۰-۲۴۰bp (دامنه ۸)، ۱۴۰-۱۹۰bp (دامنه ۹) قرار گرفتند. برای مثال P01M19-8-6، قطعه‌ای است که توسط ترکیب آغازگری P+AAA و M+CAG (جدول ۲) تکثیر و ششمین قطعه بزرگ در دامنه ۸ بود.

سوئانگا و همکاران (۲۳) با توجه به قابلیت استفاده از تعداد زیاد ترکیبات آغازگری برای نشانگر AFLP و بالا بودن کارایی چند شکلی آن، استفاده از این نشانگر را برای پرکردن جایگاه‌های خالی نقشه‌های پیوستگی در مواردی که دسترسی به دیگر نشانگرها مشکل است، پیشنهاد نموده‌اند.

با توجه به اهمیت تهیه نقشه‌های پیوستگی در مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صحت کمی در برنامه‌های به‌نژادی، این مطالعه به منظور انتساب و افزودن نشانگرهای AFLP به نقشه پیوستگی چارچوبی از قبل تهیه شده توسط سوئانگا و همکاران (۲۳) در یک جمعیت هاپلوئید مضاعف گندم متشکل از ۱۰۷ لاین انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۰۷ لاین هاپلوئید مضاعف که از تلاقی دو رقم خارجی *Fukuhokumogi* و *Oligoculm* (۲۲ و ۲۳) در ژاپن بدست آمده بود، در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان در سال ۱۳۸۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور انتساب نشانگرهای AFLP به گروه‌های پیوستگی گندم، از نقشه پیوستگی اولیه با استفاده از ۱۰۷ لاین و متشکل از ۳۴۴ نشانگر مرفولوژیک، RAPD، RFLP، SSR که قبلاً توسط سوئانگا و همکاران (۲۳) و هم‌چنین ۱۱۵ نشانگر AFLP که توسط رحیم ملک و همکاران (۱۷) با استفاده از فقط ۴۸ لاین تهیه شده بود، استفاده گردید. با توجه به کارایی بالای نشانگر AFLP در بروز چند شکلی بین ارقام، در این مطالعه نیز سعی بر اشباع نقشه قبلی این جمعیت با استفاده از آغازگرهای ترکیبی AFLP متفاوت از مطالعه رحیم ملک و همکاران (۱۷) و با استفاده از کل جمعیت متشکل از ۱۰۷ لاین شد. بدین منظور ۱۱ ترکیب آغازگری که چندشکلی زیادی بین والدین داشتند، برای ارزیابی لاین‌ها انتخاب گردید.

استخراج DNA ژنومی والدین و ۱۰۷ لاین هاپلوئید مضاعف حاصل از آنها به روش دلاپورتا (۵) صورت گرفت. برش DNA به کمک ترکیب دو آنزیم برشی *PstI* و *MseI* (از

جدول ۱. توالی آغازگرهای (PstI :P و MseI: M) واکنش انتخابی

ترکیب آغازگر	ردیف	ترکیب آغازگر	ردیف
P+AAT-M+CAC	۷	P+AAG-M+CCC	۱
P+ACA- M+CCC	۸	P+ACG-M+CCC	۲
P+AAA-M+CCT	۹	P+AGA- M+CCC	۳
P+AAA- M+CTA	۱۰	P+ACC-M+CAG	۴
P+ACC- M+CCC	۱۱	P+ACT- M+CCC	۵
		P+AAT- M+CCC	۶

5'-GATGAGTCC TGAGTAAC-3' :M و 5'-GACTGCGTAGGTGCAGA-3': P *

جدول ۲. فهرست آغازگرهای انتخابی P و M به منظور استفاده در نام‌گذاری نشانگرهای AFLP

*آغازگر انتخابی P		*آغازگر انتخابی M	
نام	توالی	نام	توالی
P01	P+AAA	M17	M+CAA
P02	P+AAC	M18	M+CAC
P03	P+AAG	M19	M+CAG
P04	P+AAT	M20	M+CAT
P05	P+ACA	M21	M+CCA
P06	P+ACC	M22	M+CCC
P07	P+ACG	M23	M+CCG
P08	P+ACT	M24	M+CCT
P09	P+AGA	M25	M+CGA
P10	P+AGC	M26	M+CGC
P11	P+AGG	M27	M+CGG
P12	P+AGT	M28	M+CGT
P13	P+ATA	M29	M+CTA
P14	P+ATC	M30	M+CTC
P15	P+ATG	M31	M+CTG
P16	P+ATT	M32	M+CTT

5'-GATGAGTCC TGAGTAAC-3' :M و 5'-GACTGCGTAGGTGCAGA-3': P *

بررسی نشانگرهای چندشکل در ۱۰۷ لاین هاپلوئید مضاعف نشان داد که ۵۶ درصد نشانگرها از رقم Oligoculm و ۴۴ درصد آنها از رقم FukuhoKumogi به ارث رسیدند. آزمون مربع کای (χ^2) به منظور بررسی انحراف تفرق نشانگرهای AFLP نشان داد که ۹ درصد نشانگرها (۶ نشانگر از تعداد ۶۶ نشانگر تولید شده) از نسبت ژنتیکی مورد انتظار ۱:۱ برای یک جمعیت هاپلوئید مضاعف در سطح احتمال یک درصد انحراف نشان دادند. سوئانگا و همکاران (۲۳) برخی از علل بروز انحراف تفرق در این جمعیت را کارایی بیشتر رقم FukuhoKumogi در تشکیل جنین بعد از تلاقی با ذرت و هم چنین مضاعف شدن کروموزومها بیان نموده‌اند. از آنجا که انحراف تفرق نشانگرها در تجزیه پیوستگی منجر به برآورد پیوستگی‌هایی می‌شوند که در اصل پیوسته نیستند (۲۳)، بنابراین، این نشانگرها از تجزیه پیوستگی حذف شدند (۸). مانو و همکاران (۱۴) در مطالعه‌ای به منظور اشیاع نقشه ژنتیکی جو با استفاده از نشانگر AFLP میزان انحراف تفرق نشانگرها از نسبت ژنتیکی ۱:۱ در جمعیت لاین‌های خالص نوترکیب جو را ۱۲/۸ درصد گزارش نمودند.

پس از حذف نشانگرهای دارای انحراف تفرق، بقیه نشانگرهای AFLP شناسایی شده در این مطالعه به همراه نشانگرهای اختصاصی در نقشه ژنتیکی موجود (۲۳) به منظور تعیین مکان کروموزومی آنها به کار برده شد. نتایج آزمون پیوستگی نشانگرهای AFLP (جدول ۴) نشان داد که بیشترین تعداد نشانگرها (۴۳ درصد) به ژنوم B و کمترین تعداد (۱۲ درصد) به ژنوم D اختصاص یافت و تعداد ۱۲ نشانگر به هیچ گروه پیوستگی منتسب نشد. در مطالعه رحیم ملک و همکاران (۱۷) از تعداد ۱۱۵ نشانگر AFLP چندشکل در یک جمعیت هاپلوئید مضاعف گندم، ۷۱/۱٪ به ژنوم A، ۵/۱۶٪ به ژنوم B و تنها ۳٪ نشانگرها به ژنوم D تخصیص یافتند. در مطالعه حاضر تعداد نشانگرهای منتسب به گروه‌های هومولوگ ۱ تا ۷ به ترتیب ۶ (۱۲/۵٪)، ۷ (۱۴/۵٪)، ۶ (۱۲/۵٪)، ۴ (۸/۳٪)، ۵ (۱۰/۴٪)، ۹ (۱۸/۷٪) و ۱۲ (۲۵٪) بود، که گویای توزیع

با استفاده از نرم افزار JoinMap 3.0 (۲۰) نقشه اولیه تهیه شد و سپس ضریب تشابه نشانگرها با دستور Similarity of Loci محاسبه و نشانگرهای مشابه با استفاده از گزینه Exclude identical از داده‌های نشانگری حذف شد. هم چنین نشانگرهای با انحراف تفرق معنی دار ($P < 0.001$) از طریق آزمون مربع کای (χ^2) شناسایی و از تجزیه داده‌ها حذف شدند. داده‌های نشانگرهای حاصل از تجزیه اولیه با نرم افزار JoinMap 3.0 (۲۱) به منظور تشکیل گروه‌های پیوستگی و با استفاده از نرم افزار MAPMAKER/EXP 3.0b (۱۲) به کار برده شد و نسبت‌های نوترکیبی نشانگرها از طریق تابع کوسامبی (۱۰) به فاصله بر حسب سانتی مورگان تبدیل شد. از نشانگرهای SSR نقشه برای تعیین جایگاه کروموزومی نشانگرهای AFLP و انتساب آنها به گروه‌های پیوستگی استفاده شد. معیار شناسایی گروه‌های پیوستگی براساس $3/0 = LOD$ و حداکثر فاصله ۴۰ سانتی مورگان بین دو نشانگر در نظر گرفته شد. در هر گروه پیوستگی بهترین ترتیب نشانگرها براساس حداکثر درستنمایی تعیین شدند و سپس فواصل ژنتیکی بین نشانگرها محاسبه شد (۱۳).

نتایج

نتایج حاصل از مطالعه چندشکلی دو رقم والدینی FukuhoKumogi و Oligoculm با استفاده از ۱۱ ترکیب آغازگری در جدول ۳ آورده شده است. اندازه‌گیری طول قطعات تکثیر شده با استفاده از نشانگر اندازه (۵۰bp) نشان داد که ۱۱ ترکیب آغازگری مورد بررسی قطعاتی با اندازه‌های متفاوت در دامنه ۱۰۰bp تا ۱۰۰۰bp تولید نمودند (جدول ۳). میانگین تعداد نشانگرهای چندشکل بین والدین در ترکیب آغازگری مورد استفاده شش نشانگر بود و ترکیبات آغازگری P+AGA-M+CCC و P+AAT-M+CAC، P+AAT-M+CCC هر کدام با ۹ نشانگر بیشترین و ترکیبات آغازگرهای P+ACT-M+CCC و P+ACC-M+CAG، P+ACC-M+CCC هر کدام با چهار نشانگر کمترین تعداد نشانگر را تولید کردند.

جدول ۳. ترکیب آغازگری، آل‌های والدینی و اندازه قطعات تکثیر شده برای ۶۶ نشانگر AFLP

اندازه قطعه (bp)	*نوع والدینی نشانگر	**ترکیب آغازگری	نشانگر
۲۲۰	F	P-AAG+M-CCC	AFLP1
۲۱۰	O	P-AAG+M-CCC	AFLP2
۱۲۰	O	P-AAG+M-CCC	AFLP3
۲۰۰	O	P-AAG+M-CCC	AFLP4
۴۹۰	O	P-ACG+M-CCC	AFLP5
۴۴۷	F	P-ACG+M-CCC	AFLP6
۳۲۰	O	P-ACG+M-CCC	AFLP7
۱۶۰	O	P-ACG+M-CCC	AFLP8
۲۳۵	F	P-ACG+M-CCC	AFLP9
۱۲۵	F	P-ACG+M-CCC	AFLP10
۵۶۰	O	P-AGA+ M-CCC	AFLP11
۴۶۰	O	P-AGA+ M-CCC	AFLP12
۴۷۵	O	P-AGA+ M-CCC	AFLP13
۳۸۰	F	P-AGA+ M-CCC	AFLP14
۳۵۵	O	P-AGA+ M-CCC	AFLP15
۲۳۵	F	P-AGA+ M-CCC	AFLP16
۲۲۵	O	P-AGA+ M-CCC	AFLP17
۲۲۰	F	P-AGA+ M-CCC	AFLP18
۲۲۰	F	P-AGA+ M-CCC	AFLP19
۴۰۵	O	P-ACC+M-CAG	AFLP20
۲۲۵	F	P-ACC+M-CAG	AFLP21
۳۲۵	O	P-ACC+M-CAG	AFLP23
۱۸۰	F	P-ACC+M-CAG	AFLP24
۴۲۰	F	P-ACT+ M-CCC	AFLP25
۱۹۵	O	P-ACT+ M-CCC	AFLP26
۱۸۰	O	P-ACT+ M-CCC	AFLP27
۱۳۰	F	P-ACT+ M-CCC	AFLP28
۴۰۵	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP29
۳۴۵	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP30
۲۲۰	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP31
۲۳۷	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP32
۲۳۵	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP33
۲۲۵	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP34
۲۲۰	F	P-AAT+ M-CCC	AFLP35
۲۱۰	F	P-AAT+ M-CCC	AFLP36
۱۳۵	O	P-AAT+ M-CCC	AFLP37
۳۸۰	O	P-AAT+M-CAC	AFLP38
۲۸۰	F	P-AAT+M-CAC	AFLP39
۲۲۵	F	P-AAT+M-CAC	AFLP40
۲۳۰	O	P-AAT+M-CAC	AFLP41
۲۲۰	O	P-AAT+M-CAC	AFLP42
۱۷۵	F	P-AAT+M-CAC	AFLP42
۱۷۰	O	P-AAT+M-CAC	AFLP43
۱۳۵	F	P-AAT+M-CAC	AFLP44
۵۸۰	O	P-AAT+M-CAC	AFLP45
۳۲۵	O	P-ACA+ M-CCC	AFLP46
۲۹۰	F	P-ACA+ M-CCC	AFLP47
۱۶۰	F	P-ACA+ M-CCC	AFLP48
۱۴۵	F	P-ACA+ M-CCC	AFLP49
۱۱۰	F	P-ACA+ M-CCC	AFLP50
۱۰۰	O	P-ACA+ M-CCC	AFLP51
۱۰۰۰	O	P-AAA+ MCCT	AFLP52
۳۴۰	F	P-AAA+ MCCT	AFLP53
۳۱۵	F	P-AAA+ MCCT	AFLP54
۲۹۰	F	P-AAA+ MCCT	AFLP55
۲۷۵	F	P-AAA+ MCCT	AFLP56
۲۱۵	O	P-AAA+ MCCT	AFLP57
۲۲۵	F	P-AAA+ M-CTA	AFLP58
۲۳۰	O	P-AAA+ M-CTA	AFLP58
۴۶۰	O	P-AAA+ M-CTA	AFLP60
۴۵۰	F	P-AAA+ M-CTA	AFLP61
۳۶۰	O	P-AAA+ M-CTA	AFLP62
۲۴۰	O	P-ACC+ M-CCC	AFLP63
۲۸۰	O	P-ACC+ M-CCC	AFLP64
۱۸۰	F	P-ACC+ M-CCC	AFLP65
۳۷۵	O	P-ACC+ M-CCC	AFLP66

O* و F: به ترتیب علامت برای Oligoculm و Fukuho-komugi

** P و M به ترتیب علامت برای آغازگرهای PstI و MseI

جدول ۴. مکان کروموزومی و اندازه قطعه نشانگرهای AFLP متناسب به نقشه چارچوبی

نشانگر AFLP	مکان کروموزومی	LOD	زنوم	اندازه قطعه (bp) و نوع آل والدینی*
p05m22-10-4	1A	۱۱/۲	A	F-۱۶۰
p07m22-5	1A	۱۰/۱	A	O-۴۹۰
p04m22-9-2	2A	۴/۹	A	O-۲۳۵
p06m19-7-4	2A	۳/۲	A	O-۳۲۵
p01m19-8-6	3A1	۳/۳	A	F-۲۷۵
p07m22-6-1	4A	۱۰/۸	A	F-۴۴۷
p04m18-9-5	4A	۱۰/۹	A	O-۲۲۰
p01m24-7-3	5A	۱۰/۸	A	F-۳۴۰
p03m22-9-6	5A	۵/۷	A	O-۲۱۰
p08m22-11-4	6A1	۹/۴	A	F-۱۳۰
p03m22-8-7	6A1	۱۳/۰	A	O-۲۶۰
p01m29-13	6A2	۳/۵	A	O-۳۶۰
p08m22-6-2	6A2	۱۴/۳	A	F-۴۲۰
p03m22-11-2	7A	۱۷/۰	A	O-۱۴۰
p04m18-9-3	7A	۱۰/۳	A	O-۲۳۰
p06m19-6-3	7A	۶/۷	A	O-۴۰۵
p04m18-8-5	7A	۶/۳	A	F-۲۸۰
p05m22-12	7A	۳/۱	A	F-۱۱۰
p01m24-2	7A	۳/۳	A	O-۱۰۰۰
p01m24-8-1	7A	۴/۰	A	F-۳۱۵
p08m22-9-7	1B	۸/۲	B	O-۱۹۵
p04m18-10-2	1B	۶/۰	B	F-۱۷۵
p01m29-9-3	1B	۳/۴	B	O-۲۳۰
p04m22-9-1	1B	۴/۰	B	O-۲۳۷
p04m18-10-3	2B	۴/۰	B	O-۱۷۰
p05m22-8-3	2B	۶/۹	B	F-۲۹۰
p05m22-7-4	2B	۲۱/۲	B	O-۳۲۵
p06m22-7-2	2B	۷/۸	B	O-۳۷۵
p04m22-9-4	2B	۱۹/۴	B	O-۲۲۵
p06m19-8-8	3B	۷/۲	B	F-۲۴۵
p07m22-10-4	3B	۱۰/۰	B	O-۱۶۰
p06m19-10-1	3B	۱۱/۵	B	F-۱۸۰
p04m18-8-8	5B	۱۰/۳	B	F-۲۴۵
p06m22-10-1	5B	۶/۲	B	F-۱۸۰
p05m22-11-1	5B	۱۰/۱	B	F-۱۴۵
p04m18-7-1	6B	۱۰/۳	B	O-۳۸۰
p04m22-9-5	6B	۱۶/۵	B	F-۲۲۰
p04m18-11-3	6B	۸/۰	B	F-۱۳۵
p03m22-9-5	6B	۱۲/۰	B	F-۲۲۰
p04m22-9-6	7B	۴/۲	B	F-۲۱۰
p07m22-7-5	7B	۳/۷	B	O-۳۲۰
p08m22-10-1	2D	۱۰/۶	D	O-۱۸۰
p01m24-8-2	3D1	۱۴/۳	D	F-۲۹۰
p04m18-4	6D	۴/۰	D	O-۵۸۰
p04m22-11-3	7D1	۴/۵	D	O-۱۳۵
p09m22-9-4	7D1	۴/۱	D	O-۲۲۵
p09m22-9-5	7D1	۸/۸	D	F-۲۲۰
p06m22-8-4	3U**	۳/۸	U	O-۲۸۰

O*: علامت برای رقم Oligoculm و F: علامت برای رقم Fukuho-komugi

موجود برابر ۳۲۳۰/۶ سانتی مورگان (با احتساب ۸۴/۴ سانتی مورگان مربوط به چهارگروه پیوستگی منتسب نشده) و میانگین فاصله بین دو نشانگر روی نقشه تقریباً ۷/۴ سانتی مورگان برآورد گردید. لذا طول نقشه پیوستگی در این مطالعه به طول ۴۱۱۰ سانتی مورگان که توسط مارینو و همکاران (۱۵) گزارش شده است، قابل مقایسه است.

شکل ۱ موقعیت مکانی نشانگرهای AFLP که در این مطالعه جهت اشباع نقشه ژنتیکی موجود استفاده شدند و از موقعیت مناسب تری در اشباع فواصل خالی از نشانگر نقشه اولیه سوئانگا و همکاران (۲۳) برخوردار بودند را نشان می‌دهد. بررسی ترتیب نشانگرها روی کروموزوم ۱A مشخص نمود که نشانگر *P05m22-10-4* در موقعیت مکانی ۲۵/۴ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم و بین نشانگرهای ریزماهواره *Xgwm33* (۱۲/۸ سانتی مورگان) و *Xwmc329a* (۲۸/۵ سانتی مورگان) قرار گرفت (شکل ۱). هم‌چنین نشانگر دیگری (*P07m22-5*) با اندازه ۴۹۰bp در موقعیت مکانی ۶۴/۸۰ سانتی مورگان از ابتدای گروه پیوستگی کروموزوم ۱A و بسیار نزدیک به نشانگر *Xgwm135* که در موقعیت مکانی ۶۴/۶۳ قرار داشت، مکان‌یابی شد. نقشه پیوستگی کروموزوم ۲A در این مطالعه نشان داد که نشانگر *P06m19-7-4* حاصل از ترکیب آغازگری -ACC+P+M+CGA به اندازه ۳۲۵bp (جدول ۳) در موقعیت ۱۹۶/۴ سانتی مورگان از ابتدای گروه پیوستگی مربوط به این کروموزوم و بین نشانگرهای ریزماهواره *Xwmc181* (در موقعیت مکانی ۱۷۳/۷ سانتی مورگان) و *Xgwm526* (در موقعیت مکانی ۲۰۲/۱ سانتی مورگان) قرار گرفت. نشانگر *P04m22-9-2* نیز در فاصله بین نشانگرهای ریزماهواره *Xgwm294* و نشانگر *Xwmc181* مکان‌یابی شدند.

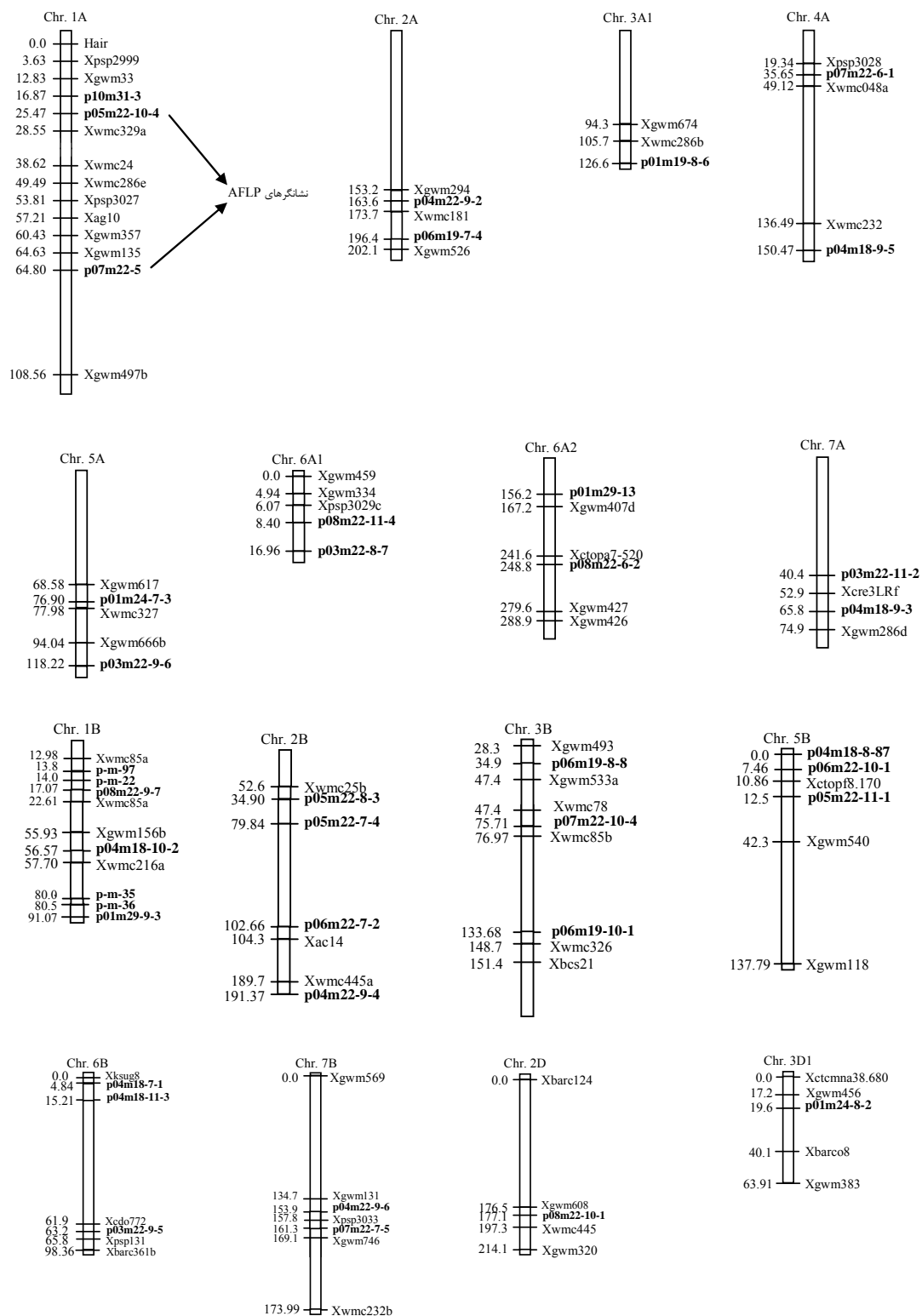
از نشانگرهای AFLP مورد مطالعه، نشانگر *P01m19-8-6* (جدول ۳) در مکان بسیار مناسب و در انتهای گروه پیوستگی ۳A۱ و در موقعیت ۱۲۶/۶ سانتی مورگان قرار گرفت. این در حالی است که نزدیک‌ترین نشانگر از نشانگرهای از قبل مطالعه شده موجود در نقشه در فاصله ۲۰/۹ سانتی مورگان از آن و در

تصادفی نشانگرها بین هفت گروه کروموزومی گندم است. نتایج مطالعه هانگ و همکاران (۷) نیز حاکی از توزیع تصادفی نشانگرهای AFLP بین گروه‌های هفت‌گانه کروموزومی و اختصاص بیشترین (۱۶/۵٪) نشانگر به گروه کروموزومی هفت بود. در این مطالعه هیچ نشانگر AFLP به کروموزوم‌های ۴B، ۱D، ۴D و ۵D منتسب نشد.

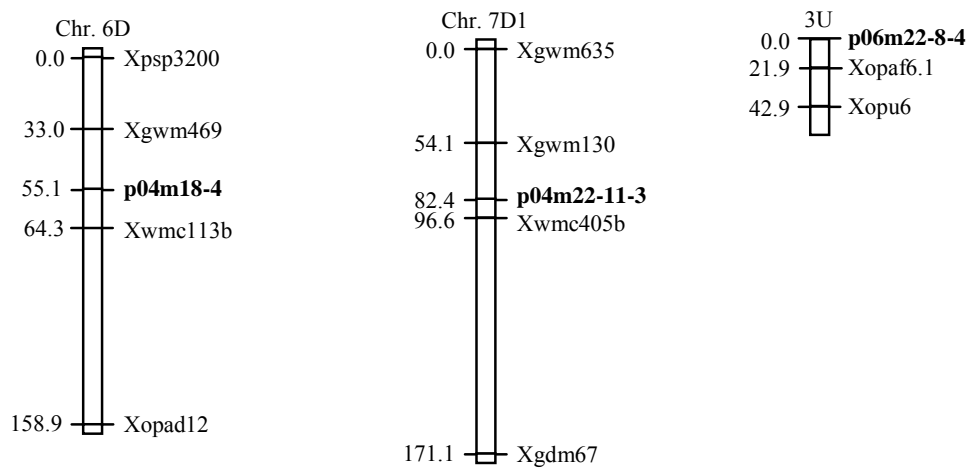
ترکیب آغازگری P+AAAT-M+CCC، ۹ نشانگر تکثیر کرد که از این تعداد دو نشانگر *P04m22-9-2* و *P04m22-9-4* به ترتیب با طول ۲۳۵ bp و ۲۲۵ bp با LOD برابر ۵ و ۲۱/۲ به کروموزوم‌های ۲A و ۲B اختصاص یافتند. هانگ و همکاران (۷) با استفاده از ترکیب آغازگری EcoRI+ACA-MseI+CTA سه نشانگر هومولوگ متعلق به کروموزوم‌های ۳A، ۳B و ۳D را در گندم شناسایی نمودند.

از ۵۲۵ نشانگر (AFLP، SSR، RFLP، RAPD، مورفولوژیک و بیوشیمیایی)، ۴۴۶ نشانگر که خصوصیات مطلوبی (عدم انحراف تفرق و نداشتن داده‌های مبهم و نامطمئن) داشتند جهت تشکیل گروه‌های پیوستگی انتخاب شدند و نشانگرهایی که نتوانستند به مکان ثابتی در ژنوم منتسب شوند، کنار گذاشته شدند. نشانگرهای انتخاب شده برای تشکیل نقشه در ۲۹ گروه پیوستگی قرار گرفتند که از این تعداد، ۲۵ گروه پیوستگی به ۲۱ کروموزوم گندم ارتباط داده شدند (جدول ۵). گروه‌های پیوستگی در صورتی به کروموزوم‌ها منتسب شدند که هر کدام از آنها دارای دو یا تعداد بیشتری نشانگر SSR در نقشه چارچوبی (۲۳) موجود برای لاین‌های مورد مطالعه در این پژوهش بودند.

به دلیل آن‌که برخی نشانگرها در چهار کروموزوم (۳A، ۶A، ۳D، ۷D) دارای گسستگی یا گپ بودند، لذا هرکدام از طریق دو گروه پیوستگی (۱ و ۲) معرفی شدند (جدول ۵). چهار گروه پیوسته (۱U، ۲U، ۳U و ۴U) به دلیل عدم پیوستگی با نشانگرهای لنگری (SSR) به هیچ کروموزومی منتسب نگردیدند. با استفاده از نشانگرهای نقشه اولیه (۲۳) و نشانگرهای AFLP به دست آمده در این مطالعه، طول کل نقشه



شکل ۱. نمودار گروه‌های پیوستگی منتسب شده به کروموزوم‌های مختلف در گندم نان. نشانگرهای AFLP منتسب شده به گروه‌های پیوستگی با حرف p آغاز می‌گردد. گروه پیوستگی U به هیچ کروموزومی منتسب نشد و برخی کروموزوم‌ها با دو گروه پیوستگی نشان داده شده‌اند.



ادامه شکل ۱.

ترکیب آغازگری P+ACT-M+CCC بود، بین نشانگرهای *Xgwm427* و *Xctopa7-520* مکانی ۲۴۸/۸ سانتی مورگان و نزدیک به انتهای این کروموزوم مکان‌یابی شد. نشانگرهای *P04m18-9-3* و *P03m22-11-2* به ترتیب با اندازه‌های ۱۴۰bp و ۲۳۰bp هر کدام با LOD برابر ۱۷/۰ و ۱۰/۳ در موقعیت‌های مکانی ۴۰/۴ و ۶۵/۸ سانتی مورگان روی کروموزوم ۷A گندم قرار گرفتند. در مطالعه رحیم ملک و همکاران (۱۷) بیشترین تعداد نشانگر به صورت گروهی از نشانگرهای AFLP بسیار نزدیک به هم در ابتدای گروه پیوستگی ۷A مکان‌یابی شد ولی ارزش چندانی در اشباع نقشه اولیه و اشباع فواصل خالی از نشانگر روی این کروموزوم نداشت. از نشانگرهایی که روی کروموزوم ۱B مکان‌یابی شدند، نشانگرهای *P04m18-10-2* و *P08m22-9-7* (جدول ۳) به ترتیب در موقعیت‌های مکانی ۱۷/۰۷ و ۵۶/۵۷ سانتی مورگان و با فاصله‌ای به ترتیب ۴ و کمتر از یک سانتی مورگان و در نزدیکی نشانگرهای *Xwmc85a* و *Xwmc216a* بودند و به نظر می‌رسد از اهمیت نسبتاً بالایی جهت ادغام در نقشه ژنتیکی موجود برخوردار نباشند. در مطالعه‌ای که توسط رحیم ملک و همکاران (۱۷) روی جمعیت مورد بررسی در این تحقیق انجام شد، نتایج تجزیه AFLP نشان داد که چهار نشانگر *p-m-۹۷*، *p-m-۲۲*، *p-m-۳۶* و *p-m-۳۵* (شکل ۱) در نزدیکی نشانگرهای

موقعیت مکانی ۱۰۵/۷ سانتی مورگان قرار داشت. دو نشانگر *P07m22-6-1* و *P04m18-9-5* به ترتیب روی بازوی کوتاه و بلند کروموزوم ۴A قرار گرفتند، که نشانگر *P04m18-9-5* از ویژگی مناسب‌تری جهت اشباع نقشه برخوردار بود. این نشانگر در بازوی بلند و انتهای کروموزوم ۴A در موقعیت مکانی ۱۵۰/۵ سانتی مورگان و نزدیک نشانگر ریزماهواره *Xwmc232* و با فاصله ۱۴ سانتی مورگان از آن قرار گرفت و از نشانگرهای مناسب جهت ادغام در نقشه چارچوبی قبلی بود.

تعداد دو AFLP در گروه پیوستگی ۵A مکان‌یابی شدند که از این بین نشانگر *P03m22-9-6* روی بازوی بلند و انتهای کروموزوم ۵A در موقعیت مکانی ۱۱۸/۲ سانتی مورگان مکان‌یابی شد که فاصله آن تا نشانگر *Xgwm666b* ۲۴/۲ سانتی مورگان بود و از نشانگرهای با موقعیت مکانی مناسب به شمار می‌رود.

در نقشه ژنتیکی قبلی (۲۳) فقط سه نشانگر روی گروه پیوستگی کروموزوم ۶A وجود داشت. در این مطالعه دو نشانگر دیگر شامل *P03m22-8-7* و *P08m22-11-4* در انتهای این کروموزوم قرار گرفتند و از نشانگرهای مناسب و مطلوب جهت ادغام در نقشه پیوستگی قبلی بودند.

در کروموزوم ۶A۲ نزدیک‌ترین نشانگر به *P01m29-13* نشانگر *Xgwm497d* بود. نشانگر *P08m22-6-2* که حاصل از

۶D و ۷D۱ مکان‌یابی شدند. نشانگر *P06m22-8-4* در ابتدای گروه پیوستگی ۱U (گروه پیوستگی متناسب نشده به کروموزوم‌ها) و در موقعیت مکانی مناسب (ناحیه فاقد نشانگر) قرار گرفت و نزدیک‌ترین نشانگر به آن، نشانگر *Xopaf6.1* (در مکان ۲۱/۹ سانتی مورگان از ابتدای گروه پیوستگی) بود.

بحث

در این مطالعه، کمترین تعداد نشانگرهای AFLP (۶ نشانگر) به ژنوم D تعلق یافت و ژنوم‌های A و B هرکدام با ۲۰ و ۲۱ نشانگر، بیشترین تعداد نشانگر را به خود اختصاص دادند. اختصاص کمتر نشانگرهای مولکولی به ژنوم D که توسط دیگر محققان (۲، ۷ و ۲۳) نیز گزارش شده است احتمالاً به دلیل نوترکیبی کمتر در ژنوم D در مقایسه با ژنوم‌های A و B بود. در مطالعه‌ای که هانگ و همکاران (۷) جهت مکان‌یابی کروموزومی نشانگرهای AFLP در گندم انجام داده‌اند، بیشترین تعداد نشانگر به ژنوم B (۳۸/۳ درصد) تعلق یافت، در حالی که به ترتیب ۳۲ و ۳۰/۰ درصد از نشانگرها روی ژنوم‌های A و D قرار گرفتند. رودر و همکاران (۱۸) گزارش نمودند که از ۲۷۹ نشانگر مورد مطالعه در گندم تنها ۷۱ نشانگر به ژنوم D اختصاص یافته است. آنها همچنین پیشنهاد نموده‌اند که به منظور افزایش تعداد نشانگرها در ژنوم D، بهتر است از نشانگرهای ریز ماهواره اجداد دیپلوئید گندم و یا گونه‌های *Triticum monococum* و *T. tauschii* استفاده شود.

در این مطالعه ترکیبات آغازگری P+AAT-M+CCC، P+AAT-M+CAC و P+AGA-M+CCC بیشترین تعداد نشانگر AFLP را در مقایسه با سایر ترکیبات تولید نمودند. در بین نشانگرهای تولید شده توسط ترکیب آغازگری P+AAT-M+CCC، دو نشانگر *P04m22-9-2* و *P04m22-9-4* که هر دو از رقم والدینی Oligoculum مشتق شده بودند روی کروموزوم‌های گروه همیولوگ ۲ (به ترتیب ۲A و ۲B) قرار گرفتند که احتمال دارد آلل‌های همیولوگ این گروه باشند. بقیه نشانگرهای تکثیر شده توسط این ترکیب آغازگری نیز روی

به‌دست آمده در این مطالعه (*P08m22-9-7*، *P04m18-10-2* و *P01m29-9-3*) و در نواحی خالی از نشانگر در نقشه اولیه (۲۳) مکان‌یابی شدند.

نشانگرهای *P05m22-8-3*، *P05m22-7-4*، *P06m22-7-2* و *P04m22-9-4* در روی کروموزوم ۲B جهت ادغام در نقشه چارچوبی موجود مناسب بودند (شکل ۱). بررسی گروه پیوستگی ۳B نشان داد که نشانگرهای *P06m19-8-8* و *P06m19-10-1* به ترتیب در فواصل نشانگرهای *Xgwm493*-*Xgwm533a* و *Xbcd21*-*Xwmc326* قرار گرفتند. نشانگر *P07m22-10-4* نیز در موقعیت مکانی ۷۵/۷۱ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم و در نزدیکی نشانگر *Xwmc85a* مکان‌یابی شد.

از نشانگرهای AFLP بررسی شده در این مطالعه، نشانگری روی کروموزوم ۴B قرار نگرفت ولی دو نشانگر *P04m18-8-8* و *P06m22-10-1* در ابتدای گروه پیوستگی ۵B و نشانگر *P05m22-11-1* بین نشانگرهای *Xctopf8-170* و *Xgwm540* مکان‌یابی شد و میانگین گپ این فاصله را از ۴ به ۲ سانتی مورگان کاهش داد.

از بین نشانگرهای AFLP مکان‌یابی شده روی کروموزوم ۶B نشانگر *P03m22-9-5* در فاصله نشانگرهای *Xcdo772* و *Xpsp3131* مکان‌یابی شد و گسستگی (فاقد نشانگر) را از ۴ به ۲/۰۵ سانتی مورگان کاهش داد. روی کروموزوم ۲D و در فاصله بین نشانگرهای *Xgwm608c* و *Xwmc445b* گسستگی به طول ۱۶/۵۹ سانتی مورگان وجود داشت که نشانگر *P08m22-10-1* در موقعیت مکانی ۱۷۷/۱ سانتی مورگان از ابتدای کروموزوم و بین دو نشانگر مذکور قرار گرفت.

از نشانگرهای متناسب شده به کروموزوم ۳D۱ یکی از آنها نشانگر *P01m24-8-2* بود که در فاصله بین نشانگرهای *Xgwm456* و *Xbarc08* مکان‌یابی شد. نشانگرهای *P04m18-4* و *P04m22-11-3* نیز به ترتیب در نزدیکی نشانگرهای *Xgwm469* و *Xwmc405b* روی کروموزوم‌های

جدول ۵. طول گروه پیوستگی، تعداد و میانگین فاصله بین نشانگرها در نقشه پیوستگی گندم

میانگین فاصله (سانتی مورگان)	طول گروه پیوستگی (سانتی مورگان)	تعداد نشانگر	کروموزوم
۵/۱۷	۱۰۸/۵۶	۲۱	1A
۱۱/۱۱	۲۱۱/۱۰	۱۹	2A
۱۱/۵۱	۱۲۶/۶۰	۱۱	3A1
۷/۱۶	۲۸/۶۲	۴	3A2
۱۰/۰۳	۱۵۰/۴۷	۱۵	4A
۷/۸۸	۱۱۸/۲۲	۱۵	5A
۳/۳۹	۱۶/۹۶	۱۵	6A1
۹/۶۷	۲۶۱/۲۰	۲۷	6A2
۷/۳۴	۱۵۴/۰۵	۲۱	7A
۳/۹۶	۹۱/۰۷	۲۳	1B
۵/۹۶	۱۹۶/۵۶	۳۳	2B
۵/۶۶	۲۰۳/۷۶	۳۶	3B
۵/۶۴	۸۴/۵۳	۱۵	4B
۴/۹۲	۱۳۷/۷۹	۲۸	5B
۵/۱۸	۹۸/۳۶	۱۹	6B
۵/۸۰	۱۳۷/۹۹	۳۰	7B
۱۱/۳۹	۱۵۹/۴۰	۱۴	1D
۴/۱۷	۱۰۰/۲۰	۲۴	2D
۹/۱۳	۶۳/۹۱	۷	3D1
۸/۴۰	۲۵/۱۹	۳	3D2
۸/۳۲	۵۸/۲۵	۷	4D
۱۱/۳۱	۱۸۰/۹۰	۱۶	5D
۱۴/۴۵	۱۵۸/۹۰	۱۱	6D
۱۱/۴۱	۱۷۱/۱۰	۱۵	7D1
۱۳/۳۲	۶۶/۶۰	۵	7D2
۹/۵۶	۴۷/۸۰	۵	1U*
۱/۵	۳/۰	۲	2U
۴/۲۵	۱۷/۰	۴	3U
۸/۲۵	۱۶/۵	۲	4U

U علامت برای Unassigned یا گروه‌های پیوستگی تعلق نیافته به کروموزومها

از بین ۶۶ نشانگر AFLP دارای چند شکلی در این مطالعه، ۹ درصد نشانگرها انحراف تفرق نشان دادند که به منظور جلوگیری از ایجاد اربیی در نقشه پیوستگی و برآورد میزان نوترکیبی بین نشانگرها، از نقشه لینکاژ حذف شدند. در مطالعه خومالز و همکاران (۹) نسبت کل نشانگرهای با انحراف تفرق به سوی هر یک از ژنوتیپ‌های والدینی در سه جمعیت مورد بررسی بین ۱/۸ تا ۱۲/۵ درصد متغیر بود و این نسبت مطابق با تعداد نشانگرهای (RFLP, AFLP, SSR) مورد استفاده بود و هیچ ارتباطی به نوع نشانگر نداشته است. در بیشتر مطالعاتی که در جوامع بزرگ‌تر از ۵۰ لاین هاپلوئید مضاعف انجام شده و بیشتر از ۱۰ نشانگر برای تهیه نقشه استفاده نموده‌اند، میزانی از تفرق غیر مندلی وجود داشته است (۹). چندین دلیل برای توجیه تفرق غیرمندلی و انحراف از نسبت ۱:۱ در جوامع هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی گندم و ذرت، پیشنهاد شده است که می‌توان به هتروژنی والدین انتخابی در فرآیند تولید هاپلوئیدهای مضاعف، دگرگرده افشانی و مخلوط شدن بذور در طی آزمایش، رانده شدن ژنتیکی و اشتباه در امتیازدهی نوارهای چند شکل اشاره نمود (۹). از آنجا که انحراف تفرق نشانگرها موجب ایجاد نقشه‌های ژنتیکی کاذب می‌شود و انحراف‌های کوچک اما معنی‌دار می‌تواند منجر به کاهش برآوردهای نوترکیبی شود، آثار و تبعات انحراف تفرق باید مورد توجه قرار گیرد (۳). با توجه به نقش مهم تعداد افراد جمعیت در حال تفرق، استفاده از تعداد بیشتر لاین‌ها در جمعیت و تعداد بیشتری نشانگرهای مولکولی امکان اشباع بیشتر نقشه پیوستگی را فراهم می‌کند.

به‌طور کلی نتایج نشان داد که برخی از نشانگرهای AFLP مکانی‌بایی شده در این مطالعه در جایگاه‌هایی از ژنوم یا گروه‌های پیوستگی قرار گرفتند که در نقشه اولیه (۲۳) تراکم نشانگری کمتری داشتند و توانستند فواصل بین نشانگرها در نقشه اولیه را کاهش دهند. از جمله این نشانگرها می‌توان به *P06m19-7-4*, *P03m22-9-6*, *P04m18-9-5*, *P01m19-8-6*, *P01m24-8-2*, *P04m22-9-4*, *P03m22-8-3*, *P08m22-11-4*

کروموزوم‌های ۱D، ۶B، ۷B و ۷D قرار گرفتند. ترکیب آغازگری P+AAT-M+CAC سه قطعه به اندازه‌های ۱۳۵bp، ۳۸۰bp و ۵۸۰bp تولید نمود که از هر دو رقم والدینی مشتق شده بودند و روی کروموزوم‌های ۶B و ۶D مکان‌بایی شدند. از چهار نشانگری که توسط ترکیب آغازگری P+AAG-M+CCC تکثیر شده بود، سه نشانگر که همگی از رقم والدینی Oligoculm به ارث رسیده بودند، روی ژنوم A (۵A، ۶A و ۷A) قرار گرفتند و یک نشانگر با اندازه ۲۲۰bp از رقم Fukuho kumogi نیز به کروموزوم ۶B منتسب شد. در مطالعه گوپتا و همکاران (۶) نشانگر *Xwmc96* در دو جایگاه تکثیر یافته و روی کروموزوم‌های غیر همیولوگ ۴AS و ۵AS قرار گرفتند و به‌طور مشابه نشانگر *Xwmc166* دو جایگاه را در کروموزوم‌های ۲DS و ۷BL تکثیر کرد. اگر فرض شود که جایگاه‌های چندتایی در گندم نان می‌بایست همیولوکوس و یا لوکوس‌های مضاعف باشند، لذا جایگاه‌های مربوط به یک نشانگر ممکن است در اثر جابجایی و یا مضاعف‌شدگی روی کروموزوم‌های غیر همیولوگ قرار گیرند (۶).

با توجه به خصوصیات یک نشانگر جهت انتخاب آن برای قرار گرفتن در نقشه چارچوبی (برای مثال قرار گرفتن در نواحی خالی از نشانگر)، در این مطالعه از بین نشانگرهای AFLP مکان‌بایی شده می‌توان به نشانگرهای *P06m19-7-4*, *P08m22-11-4*, *P03m22-9-6*, *P04m18-9-5*, *P01m19-8-6*, *P01m24-8-4* و *P01m24-8-2*, *P04m22-9-4*, *P03m22-8-3* که پوشش مناسب‌تری را در هر سه ژنوم A، B و D نشان دادند، تأکید بیشتری نمود. با توجه به فواصل فاقد نشانگر روی کروموزوم ۳D در نقشه تهیه شده توسط سوئناگا و همکاران (۲۳)، استفاده از نشانگرهای AFLP برای پر کردن آن پیشنهاد شده است. در این مطالعه یکی از نشانگرهای AFLP (*P01m24-8-2*) مربوط به ترکیب آغازگری P+AAA-M+CCT بین دو نشانگر SSR که ۲۱/۰۵ سانتی مورگان از یکدیگر فاصله داشتند، در فاصله ۶/۲ سانتی مورگان از نشانگر *Xgwm456* قرار گرفت.

پیوستگی و در نتیجه در برنامه‌های به نژادی به منظور انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود.

سیاسگزاری

بدین وسیله از پژوهش‌گر موسسه ملی تحقیقات کشاورزی ژاپن آقای دکتر کازوهیرو سوئناگا، به دلیل همکاری در اجرای پژوهش قدردانی می‌شود.

و P01m24-8-4 اشاره کرد. هم‌چنین از بین نشانگرهای AFLP به‌دست آمده در این مطالعه سه نشانگر P08m22-9-7، P01m29-9-3 و P04m18-10-2 در نزدیکی چهار نشانگر AFLP به‌دست آمده در مطالعه رحیم ملک و همکاران (۱۷) بر روی کروموزوم ۱B مکان‌یابی شدند و میانگین گپ بین نشانگرها در نقشه اولیه را کاهش دادند. بنابراین استنباط می‌شود نشانگر AFLP با توجه به درجه چند شکلی بالا از پتانسیل بالایی جهت اشباع و افزایش تراکم نشانگرها در نواحی کم تراکم ژنوم برخوردار است و از آن می‌توان در تهیه نقشه

منابع مورد استفاده

1. Boeuf, C., S. Prodanovic, G. Gay and M. Bernard. 2003. Structural organization of the group-1 chromosomes of two bread wheat sister lines. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 938-946.
2. Chalmers, K. J., A. W. Campbell, J. Kerstchmer, A. Karakousis, P. H. Henscke, S. Pierens, N. Harker, M. Pollatta, G. B. Cornish, M. R. Shariflou, L. R. Rampling, A. McLauchlan, G. Deggard, P. J. Sharp, T. A. Holton, M. W. Sutherland, R. Appels and P. Langridge. 2001. Construction of three linkage maps in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 52:1089-1119.
3. Cloutier, S., M. Cappadocia and B. Landry. 1997. Analysis of RFLP mapping inaccuracy in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 83-91.
4. CIMMYT. 2005. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. 3rd ed., D. F. CIMMYT, Mexico.
5. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 4: 19-21.
6. Gupta, P. K., H. S. Balyan, K. J. Edwards, P. Isaac, V. Korzun, M. Roder, M. F. Guatier, P. A. Joudrier, R. Schaller, J., Dubcovsky, R. C. Pena, M. Khairallah, G. Penner, M. J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R. C. C. Wang, J. P. Hardouin, P. Jack and P. Leory. 2002. Genetic map of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105:413-422.
7. Huang, X. Q., J. Friedrich, L. K. Hsam, G. Wenzel and V. Mohler. 2000. Chromosomal location of AFLP markers in common wheat utilizing nulli-tetrasomic stocks. *Genome* 43: 298-305.
8. Jiang, C. and Z. B. Zeng. 1995. Multiple-trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140: 1111-1127.
9. Kammholz, S. J., A. W. Campbell, M. W. Sutherland, G. J. Hollamby, P. J. Martin, R. F. Eastwood, I. Barclay, R. E., Wilson, P. S. Brennan and J. A. Sheppard. 2001. Establishment and characterization of wheat genetic mapping population. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1079-1088.
10. Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12: 172-175.
11. Langridge, P., E. Lagudah, T. Holton, R. Apples, P. Sharp and K. Chalmers. 2001. Trends in genetic and genome analyses in wheat: A review. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1043-1077.
12. Li, Z., L. Jakkula, R. S. Hussey, J. P. Tamulonis and H. R. Boerma. 2001. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96345 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1167-1173.
13. Lincoln, S., M. Daly, and E. Lander. 1993a. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version 3.0 *Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report*, 3rd Edn. Whitehead Institute, USA.
14. Mano, Y., S. Kawasaki, F. Takaiwa and T. Komatsuda. 2001. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) crosses Azumamugi × Kanto Nakate Gold using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system. *Genome* 44: 284-292.
15. Marino, C. L., C. N. James, Y. H. Lu, M. E. Sorrells, P. N. Leroy, A. Tuleen, C. R. Lopes, and G. E. Hart. 1996. Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 39: 359-366.

16. Nelson, J. C., M. E. Sorrels, A. E. van Deynze, Y. H. Lu, M. Atkinson, M. Bernard, P. Leory, J. D. Faris and J. A. Anderson. 1995a. Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoelogenous group 4, 5 and 7. *Genetics* 141: 721-731.
17. Rahimmalek, M., B. E. Sayed Tabatabaei and S. A. Mohammadi. 2008. Saturation of wheat micro satellites map in population derived from Fukuho-kumogi × Oligo-Culm using AFLP markers. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 43: 567-575.
18. Roder, M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M. H. Tixier, P. Leory and M. W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
19. Sakamoto, Y., M. Ishiguro and G. Kitagawa. 1986. Akaike Information Criterion Statistics. KTK Scientific Pub., Tokyo.
20. Shah, M. M., K. S. Gill, P. S. Baenziger, Y. S. Yen, M. Kaeppler and H. M. Ariyaratne. 1999. Molecular mapping of loci for agronomic traits on chromosome 3A of bread wheat. *Crop Science* 39: 1728-1732.
21. Stam, P. M. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3: 739-744.
22. Suenaga, K. and K. Nakajima. 1989. Efficient production of haploid wheat (*Triticum aestivum* L.) through crosses between Japanese wheat and maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 65: 145-152
23. Suenaga, K., K. Khairallah, H. M. William and A. Hoisington. 2005. A new interval linkage map and its application for quantitative trait locus analysis of gigas features in bread wheat. *Genome* 48: 67-75.
24. van Sanford, D., J. Anderson, K. Campbell, J. Costa, P. Cregan, C. Griffey, P. Hayes and R. Ward. 2001. Discovery and deployment of molecular markers linked to fusarium head blight resistance: An integrated system for wheat and barley. *Crop Science* 41: 638-644.
25. Verma, V., M. J. Foulkes, A. J. Worland, R. Sylvester-Bradley, P. D. S. Caligari and J. W. Snape. 2004. Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stresses environments. *Euphytica* 135: 255-263.
26. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, D. L. Theo van, M. Hornes, A. Frijers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting . *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414.
27. Waugh, R., N. Bonar, E. Baird, B. Thomas, A. Graner, P. Hayse and W. Pwell. 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Molecular and General Genetics* 255: 311-321.
28. Zhu, J., H. P. Stephenson, D. Laurie, W. Li, D. Tang and M. D. Gale. 1999. Towards genome scanning by map-based AFLP fingerprinting. *Molecular and General Genetics* 261: 184-195.