مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، سال ۱۳۸۰(۶۱۴-۶۰۷)

ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم با نشانگرهای AFLP

بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی [1] و علی اکبر شاه نجات بوشهری [2]
۱ و ۲- استادیاران گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۲/۵

خلاصه

در روش AFLP، بـه وسـیله پـلی مورفیسمی که مبتنی بر تکثیر قطعات حاوی طول‌های متفاوت است می‌توان ارقـام را از یکدیگـر مـتمایز و روابـط بیـن ژنوتیپ‌های کاملا نزدیک را آشکار ساخت. در این تحقیق بر اساس به کارگیـری نشـانگرهـای AFLP میـزان خویشاوندی ۱۶ رقم گندم مورد بررسی قرار گرفت. نوارهای ظاهر شده بر روی ژل‌هـا از نظـر حضـور و عـدم حضـور بررسی و با تشکیل ماتریس دو دویی روابط بین ارقام توسط ضرایب تطـابق سـاده مـورد سـنجش قـرار گرفت. از طریق ادغام برحسب متوسط گروه، ارقام در دو دسته با ضرایب تشابه متـنوعی از ۰/۴۵۶ تـا ۰/۷۷۶ دسـته‌بندی شدند. این آزمایش نشان داد که ارقام تحت بررسی از تنوع ژنتیکی بالایی بـرخوردار نـبوده و گسـترش پایـه ژنتیکی واریته‌ها نیازی جدی است. با بهینه شدن روش AFLP در این تحقیق، شناسـایی ژرم‌پلاسـم‌هـای مـتفاوت، انـتخاب والدیـن تلاقـی‌ها و تخمین میزان هتروزیس در سطح مولکولی عملی مـی‌گـردد. همچـنین معـلوم شـد که AFLP قادربه ارائه نشانگرهایی است که به خوبی می‌تواند در انگشت‌نگاری ارقام گندم مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: AFLP، نشانگرهای مولکولی، پلی مورفیسم، گندم.

مقدمه

نشـانگرهای مولکولـی مبتـنی بـر تکثیر DNA، تسهیلاتی را در مطالعـات پایـه‌ای و کاربـردی زیسـت شناسـی مولکولی فراهم کـرده اسـت. در بیـن روش‌هـای ابداعـی، AFLP [1] (چند شکلی ناشـی از تکـثیر قطعـات بـرش یافـته بـه صـورت انتخابی)، روش فـوق‌العـاده مطمـئن و تکراریذیری است که می‌تواند به آسانی در جنـبه‌هـای مختـلف از بیولوژی مولکولی تا به کارگیری در اصلاح نباتات و برنامه‌های به نژادی استفاده شود (۱).

نشـانگرهـای AFLP، یکـی از تـازه‌تـرین ابداعـات در زمیـنه فـناوری نشـانگرهای ژنـتیکی اسـت. ایـن نشـانگرها مبتـنی بـر RFLP [2] هـایی مـی‌باشـند کـه پـس از تکـثیر انـتخابی توسـط واکـنش زنجیـره‌ای پـلی مـراز قابل رویت می‌گردند. در این روش پـس از اتصـال دنـباله‌هـایی [3] بـه پایانـه قطعات بریده شده توسط آنـزیم‌هـای برشـی (معمـولاً *EcoRI* و *MseI*)، به تکثیر توسط آغازگـرهایی اقـدام مـی‌شـود کـه همولوگ با دنباله‌های ذکر شده مـی‌باشـند. انتخابی بودن تکثیر را با افزودن نوکلئوتیدهای دلخواه بـه پایانـه‌هـای ۳′ آغازگـرها بـه ثمـر می‌رسانند که ضمن انتخابی کـردن آغازگر از پیچیدگی فرآورده‌های حاصل نیز کاشته می‌شود (۲۶).

عـلاوه بـر تهیـه نقشـه ژنتیکی، یکی دیگر از کاربردهای مهم فـن AFLP، تجـزیه و تحلیل‌های ژنوتیپی و گیاه شناسی است (۵، ۶، ۷، ۱۴،۱۶، ۱۸ و ۲۰). بـه دلیـل میـزان بـالای نواردهـی و قـدرت وضـوح ایـن روش مـی‌تـوان بـه اثـر انگشـت‌های ژنتیکی کـاملاًاختصاصـی بـا اطلاعـات زیاد دست یافت و به تمایز گونه‌ها، ارقام، اکوتیپ‌ها و حتی افراد پرداخت (۱).

بـه کارگیری نشانگرهای مولکولی در گندم کاربرد گسترده‌ای در دهـه گذشـته داشـته اسـت. دووس و گالـه (۱۹۹۲) بـا نشـانگرهای RAPD [4] بـه ارزیـابی ۱۲ واریـته گـندم پرداختـند.

1 . Amplified Fragment Length Polymorphism
2 . Restriction Fragment Length Polymorphism
3 . Adaptor

. Random Amplified polymorphism DNA

جوشی و همکاران (۱۹۹۳) با استفاده از ۴۰ نشانگر RAPD روابط ژنتیکی بین ۱۵ واریته گندم را بررسی کردند. تالبرت و همکاران (۱۹۹۴)، واکنش زنجیره‌ای مبتنی بر STS [1] را به عنوان نشانگر مولکولی در گندم برگزیدند. چن و همکاران (۱۹۹۴)، با همین روش تنوع ژنتیکی در گندم بهاره را بررسی کردند. لیو و همکاران نیز با بکارگیری نشانگرهای RAPD، رابطه تنوع ژنتیکی و عملکرد هیبریدها را درگندم نان ارزیابی نمودند. روش AFLP در آزمایشات مختلف از جمله بررسی تنوع ژنتیکی عدس (۲۹)، تحمل شوری در جو (۲۰)، تهیه نقشه ژنتیکی سویا (۹) و تهیه نقشه ژنتیکی سیب زمینی (۱۲ و ۲۱) به کار رفته است.

هدف از این تحقیق، معرفی و بهینه‌سازی روش AFLP در سطح کشور، ارزیابی پتانسیل به کارگیری آن و بررسی‌های مولکولی و تعیین روابط ژنتیکی تعدادی از ارقام گندم بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: از گیاهچه‌های ۱۶ رقم زراعی شامل آزادی، خزر ۱، کرج ۱، کرج ۲، کرج ۳، اروند ۱، مغان ۱، مغان ۲، نوید، چناب، رشید، استار، قفقاز، دیهیم، الموت ۱ و الموت ۲ در این تحقیق استفاده گردید.

استخراج DNA: استخراجDNA بر مبنای روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) صورت گرفت. میزان ۰/۱۵ گرم از برگ‌های جوان به همراه ۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج کننده (تریس [2] ۱۰۰ میلی مول با pH=۸ ، EDTA [3] ۵۰ میی مول با pH=۸، کلرور سدیم ۵۰۰ میلی مول و SDS [4] ۱/۲۵ درصد) در یک هاون چینی کوبیده شد. مواد استخراج شده به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل و پس از تکان دادن به مدت ۱۵ دقیقه در حمام ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از استات پتاسیم ۵ مول به هر تیوب، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای صفر قرار گرفتند. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. کلاف DNA تشکیل شده درحد فاصل ایزوپروپانول و نمک توسط سانتریفیوژ رسوب داده شد. پس از شستشو با اتانول ۷۰ درصد و خشک کردن، DNA استخراج شده در ۳۰۰ میکرولیتر TE [5] (تریس ۱۰ میلی مول و EDTA ۰/۱ میلی‌مول) حل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160A تعیین گردید.

اجرای AFLP: مراحل زیر در این تکنیک انجام گردید:

۱-هضم: اجزاء حجمی واکنش ۱۲/۵ میکرولیتری برای هضم هر نمونه در مدت ۱۲ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد عبارت بود از ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵ برابر، ۰/۲۴ میکرولیتر آنزیم برشی *EcoR*I (۱۰ واحد در میکرولیتر)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم برشی *Mse*I (۴ واحد در میکرولیتر)، ۳/۱۸ میکرولیتر آب و ۶ میکرولیتر DNA الگو (۲۰نانوگرم در میکرولیتر).

۲-اتصال دنباله: بلافاصله پس از هضم DNA الگو واکنش اتصال صورت گرفت. اجزاء حجمی واکنش ۲۵/۴ میکرولیتری برای اتصال دنباله به هر نمونه به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد عبارت بود از ۱۲/۵ میکرولیتر DNA هضم شده، ۱۲ میکرولیتر محلول اتصال دنباله [6]، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم لیگاز [7] T_4 ، ۰/۱۲۵ میکرولیتر *EcoR*I (۱۰ واحد در میکرولیتر) و ۰/۳۱۳ میکرولیتر آنزیم *Mse*I (۴ واحد در میکرولیتر). بلافاصله پس از اتمام اتصال، برای غیر فعال کردن انزیم‌های موجود در واکنش (اندونوکلئاز [8] و لیگازها) از حمام آب گرم ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید.

۳-تکثیر مقدماتی انتخابی: [9] اجزاء حجمی واکنش ۲۰ میکرولیتری برای تکثیر مقدماتی برای هر نمونه عبارت بود از ۱۲/۳ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر آغازگر انتخابی مقدماتی [10] *EcoR*I (E ، ۴۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغاز گر انتخابی مقدماتی *Mse*I (M ، ۴۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر، ۱/۶ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۲/۵ میلی‌مول)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم تک EX [11] (۵ واحد در میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر DNA هضم و دنباله‌دار شده رقیق

1. Sequenced – Tagged – Site Polymerase Chain Reaction
2. Tris
3. Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
4. Sodium Dodecyl Sulfate
5. Tris - EDTA
6. Adaptor Ligation Solution
7. Ligase
8. Endonuclease
9. Preselective Amplfication
10. Preselective primer
11. EX taq enzyme

(۱:۱۰) در بافر TE، ۲۰ چرخه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تکثیر انتخابی مقدماتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) بود. برای اطمینان از تکثیر مقدماتی به ۱۰ میکرولیتر از DNA هر نمونه پس از الکتروفورز مقدماتی، ۶ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری اضافه و از این مخلوط ۸ میکرولیتر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. رؤیت نوار smear تایید کننده انجام تکثیر مقدماتی بود. توالی آغازگر انتخابی مقدماتی E و M به صورت «۵′ GACTGCGTACCAATTC ۳′» و «۵′ GATGAGTCCTGAGTAA ۳′» بود.

۴-تکثیر انتخابی: اجزاء حجمی واکنش ۱۰ میکرولیتری انتخابی برای هر نمونه عبارت بود از: ۵/۱۵ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر آغازگر انتخابی *EcoRI*[1] (۱۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغاز گر انتخابی *MseI* (۱۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر، ۰/۸ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۲/۵ میلی‌مول)، ۰/۰۵ میکرولیتر آنزیم تک EX (۵ واحد در میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر DNA تکثیر شده مقدماتی رقیق (۱:۲۰). شانزده جفت آغازگر انتخابی مورد استفاده عبارت بودند از ترکیب دو آغاز گر انتخابی *MseI*(M+CAA و M+CAC) و هشت آغازگر انتخابی *EcoRI*(E+AAA ، E+AAC، E+AAG، E+AAT ، E+ACA، E+ACC، E+ACG و E+ACT).

به طور کلی ۳۶ چرخه واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تکثیر انتخابی به کار رفت. نخستین چرخه با دمای تک رشته‌ای کردن ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، اتصال ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)و بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) شروع و در دورهای بعدی در هر چرخه یک درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال کاسته شد. تعداد چرخه در دماهای اتصال ۶۴، ۵۹ و ۵۷ معادل دو و در آخرین دما (۵۶ درجه سانتی‌گراد) شامل ۲۴ چرخه و بقیه تک چرخه‌ای بودند.

۵-تک رشته‌ای کردن قطعات تکثیر شده: پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، حجم مساوی تکثیر انتخابی (۱۰ میکرولیتر) از رنگ فرمامید[2] (فرمامید ۹۶٪، EDTA ۱۰ میلی مول، بروموفنل بلو[3] و زیلن سیانول[4]) به هر تیوب اضافه و پس از گرم کردن برای مدت ۳ دقیقه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها بر روی محلول یخ قرار داده شد.

۶-الکتروفورز DNA: ژل ۷٪ پلی آکریل آمید تهیه شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس الکتروفورز مقدماتی (بدون نمونه گذاری) به مدت ۳۰ دقیقه صورت پذیرفت. در مرحله بعدی قطعات تکثیر و تک رشته‌ای شده (به میزان ۱۰ میکرولیتر) بر روی ژل نمونه‌گذاری گردید. ولتاژ الکتروفورز برابر ۳۰۰ ولت بود. پس از الکتروفورز، رنگ آمیزی با نیترات نقره صورت گرفت و از آنها عکس‌برداری شد.

۷-تجزیه داده‌ها: هر یک از قطعات DNA تکثیر شده به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر نمایش و در ماتریس دودویی وارد گردید. از روش ضرایب تطابق ساده، برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوج‌های ژنوتیپی استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS[5] دندروگرام مربوطه رسم گردید. روش UPGMA[6] برای ادغام گروه‌ها به کار رفت.

نتایج و بحث

آغازگرهای به کار رفته مجموعاً ۱۹۹۸ نوار تولید کردند که در محدوده تقریبی ۳۷ الی ۱۱۱۴ جفت بازی واقع شدند (شکل‌های ۱ و ۲). به طور کلی متوسط تعداد نوار چند شکل در آغازگر معادل ۱۲۴/۹ و متوسط آن در رقم برابر ۷/۸ بود. ضرائب تشابه در روش ضرائب تطابق ساده دامنه متغیری از ۰/۴۵۶ تا ۰/۷۶۶ نشان داد (جدول ۱). مغان ۱ با مغان ۲ و الموت ۱ با الموت ۲ تشابه بالایی (۰/۷۰۳) با یکدیگر نشان دادند. کمترین درجه تشابه بین گندم رشید و چناب با کرج ۲ (۰/۴۵۶) مشاهده گردید. گندم رشید مخصوص کشت دیم و چناب نیز گندمی است که برای مناطق جنوب توصیه شده است. در تجزیه خوشه‌ای، ۱۶ رقم زراعی گندم به دو زیر خوشه تقسیم شدند (شکل ۳). زیر خوشه اول شامل ۷ عضو است که ژنوتیپ کرج ۲ به طور انفرادی در یک گروه و ارقام مغان ۲، مغان ۱، کرج ۳، اروند ۱، خزر ۱ و آرادی در گروه دیگر گرد آمده‌اند. زیر خوشه

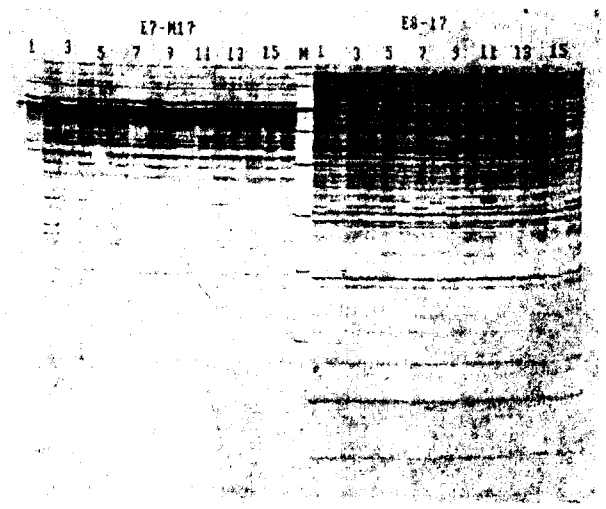
1 . Selective Primer
2 . Dye Formamide
3 . Bromophenole Blue
4 . Xylene Cyanole
5 . Statistical Package for Social Science
6. Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average

دوم حاوی دو گروه متمایز است که گندم دیم رشید به طور انفرادی یک گروه را تشکیل داده است. میانگین ضرایب تشابه برابر ۰/۵۹۴ و از ۰/۴۵۶ تا ۰/۷۶۷ متغیر است. جوشی و نگوین (۸)، در بررسی ۱۵ واریته گندم به درجه تشابهی از ۰/۶ تا ۰/۹ دست یافتند. چن و همکاران(۲)، نیز در بررسی ۴۵ ژنوتیپ گندم در مطالعات خود درجه تشابه ۰/۶۵ الی ۰/۹۹ را گزارش کردند. با اینکه درجه تشابه به دست آمده در این تحقیق در حد قابل قبول‌تری است ولی از آنجا که کشور ما یکی از مراکز تنوع گندم به شمار می‌رود جستجو در جهت یافتن ژرم‌پلاسم‌های متنوع‌تر نیاز اساسی به شمار می‌رود. با اینکه در اغلب موارد، انتخاب والدین برای تهیه یک لاین خالص و یا یک رقم هیبرید بر اساس عملکرد والدین و میزان تکمیل شوندگی صفات مهم زراعی صورت می‌گیرد ولی اطلاع از تنوع ژنتیکی والدین برای نیل به تفکیک‌های متجاوز[1] در نتاج امری ضروری است. شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم‌ترین قدم در تهیه محصولات هیبرید است. معمولا والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید کنند. با اینکه تشکیل گروه‌های هتروتیک[2] بر مبنای اجزاء عملکرد و فاصله ژنتیکی[3] از طریق تنوع فنوتیپی از ارزش تخمینی برای هتروزیس در گندم بوده است (۱۳) با این وجود ذکر این نکته ضروری است که در مواقعی که تعداد زیادی والد بالقوه در برنامه اصلاحی مد نظر است، تنوع ژنتیکی والدی معمولا توسط خطاهای آزمایشی کنترل نشده (نوسانات اقلیمی و نایکنواختی خاک) تحت الشعاع قرار گرفته و پوشیده باقی می‌ماند. در جهت رفع این مشکل و کاهش هزینه و زمان، به نژادگران به تخمین میزان هتروزیس در سطح مولکولی سوق پیدا کرده‌اند.

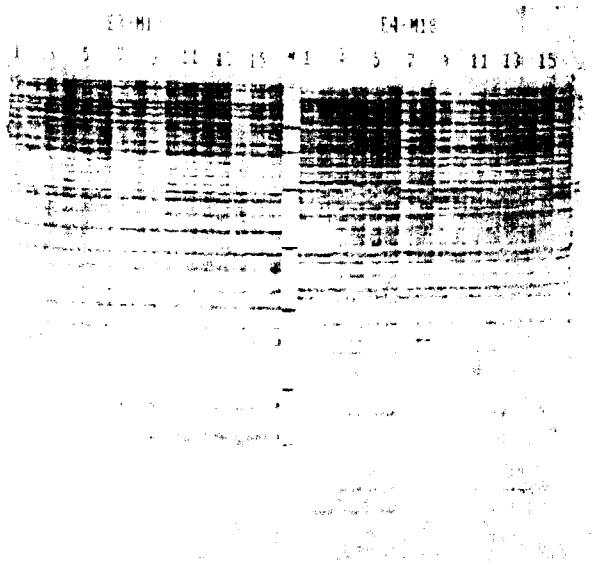
یکی از نشانگرهای مولکولی RFLP است که بررسی‌های گسترده‌ای بر مبنای آن صورت گرفته و گیاهان مختلفی را با آن محک زده‌اند. در مطالعاتی که بر روی ذرت و منداب انجام شده، تنوع ژنتیکی از نظر نشانگرهای RFLP به طور معنی‌داری با عملکرد هیبریدها رابطه نشان داده به طوری که میزان هتروزیس را می‌توان با استفاده از نشانگرهای مولکولی تخمین زد (۸). گندم نان گونه‌ای آلوهگزاپلوئید است که دارای ۱۶۰۰۰ میلیون جفت باز در ژنوم (1c) خود است. چون حدود ۸۰٪ از ژنوم گندم نان توسط DNA تکراری[4] اشغال شده و غالبا برای فناوری RFLP غیر قابل دسترسی است (۸)، بنابراین استفاده از آن چندان مثمر ثمر نیست زیرا میزان پلی مورفیسم در آن کمتر از محصولات دیگر است (۱۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حال حاضر مبنای یک رشته از فنون مولکولی قرار گرفته که به تدریج در حال جایگزینی با سیستم‌های کلاسیک نظیر نشانگرهای ظاهری،آیزوزایم[5] و RFLP است. روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز نسبت به نشانگرهای کلاسیک دارای مزایای متعدد نظری و عملی است. با این روش‌های تعداد زیادی نشانگر تولید می‌گردد که در طول ژنوم پراکنده هستند. در انگشت‌نگاری، فنونی مطلوبند که به تدارکات قبلی نظیر آنالیز توالی‌ها، طراحی آغازگر و تعیین کاوشگر نیازی ندارند. در چند سال گذشته روش‌های متعددی در این رابطه ابداع شدند که RAPD، DAF[6] و AP-PCR[7] از آن جمله‌اند و از مزایای ذکر شده نیز برخوردارند. از آنجا که فنون ذکر شده به شرایط واکنش، کیفیت DNA و الگوهای دما در PCR بسیار حساس‌اند، کاربرد آنها را با محدودیت مواجه می‌کند. یکی دیگر از اهداف این تحقیق، بهینه کردن و مطالعه استعداد به کارگیری نشانگرهای AFLP در ارائه تصویری روشن از وسعت زمینه ژنتیکی تعدادی ارقام گندم بود. این روش مبتنی بر آشکارسازی قطعات بریده شده ژنومی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که می‌تواند برای DNA هر موجودی با هر مقدار پیچیدگی به کار رود. تکثیر قطعات DNA با این روش که نیازی به اطلاع قبلی از توالی ندارد با تعداد محدودی جفت آغازگر صورت می‌گیرد. تعداد قطعات آشکار شده در یک واکنش را می‌توان از طریق آغازگرهای زوج به خصوص تنظیم نمود. روش AFLP مطمئن و از قابلیت بالایی برخوردار است زیرا از شرایط واکنش کاملاًحساب‌شده‌ای برای اتصال آغازگر استفاده می‌شود ودر آن

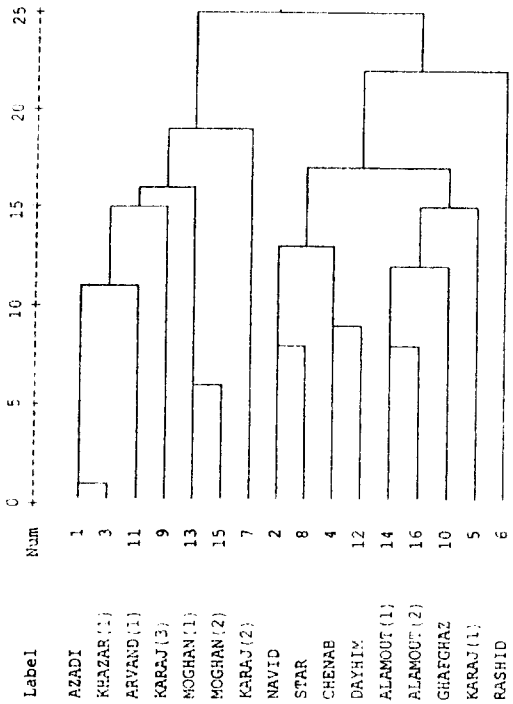
1. Transgressive Segregation
2. Heterotic Groups
3. Genetic Distance
4. Repeatitive DNA
5. Isozyme
6. DNA Amplification Fingerprinting
7. Arbitrary – Primed PCR



شکل ۱- فرآورده‌های AFLP در ژنوتیپ‌های آزادی، نوید، خزر ۱، چناب، کرج ۱، رشید، کرج ۲، استار، کرج ۳، قفقاز، اروند ۱، دیهیم، مغان ۱، الموت ۱، مغان ۲، الموت ۲، (به ترتیب از ۱ الی ۱۶). آغازگرهای مورد استفاده شامل جفت آغازگر E+ACG و M+CAA (چپ) و جفت آغازگر E+ACT و M+CAA (راست). نشانگر اندازه VII.



شکل ۲- فرآورده‌های AFLP در ژنوتیپ‌های آزادی، نوید، خزر ۱، چناب، کرج ۱، رشید، کرج ۲، استار، کرج ۳، قفقاز، اروند ۱، دیهیم، مغان ۱، الموت ۱، مغان ۲، الموت ۲، (به ترتیب از ۱ الی ۱۶) آغازگرهای مورد استفاده شامل جفت آغازگر E+AAG و M+CAC (چپ) و جفت آغازگر E+AAT و M+CAC (راست). نشانگر اندازه VII.



شکل ۳- دندروگرام ۱۶ رقم گندم بر مبنای نشانگرهای AFLP

تکرارپذیری RFLP و توانمندی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با هم توام می‌گردد.

با توجه به بهینه شدن روش AFLP در داخل کشور و همچنین اثبات کارآیی نشانگرهای مولکولی در ارزیابی میزان هتروزیس و هتروزیگوسیتی در گیاهان دیپلوئید (۱۷) و پلی پلوئید (۱۵) می‌توان در آینده از این فن جدید و مطمئن به دور از معایب روش‌های کلاسیک استفاده نمود. همچنین این امکان فراهم شده است که بر مبنای تعدادی آغازگر زوج، گروهی از آنها را برای تفکیک و شناسایی ارقام مختلف در اینده پیدا نمود. تهیه اثر انگشت واریته‌ای با موفقیت در محصولاتی نظیر پنبه (۱۹)، آفتابگردان (۱۱)، کرفس (۲۷)، سیب (۱۰) و غیره به کار گرفته شده است. در این آزمایش بعضی از آغازگرها از این نظر استعداد خوبی بروز داده‌اند.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

1. Breyne, P., W. Boerjan, T. Gerats, M. Van Montague and A. Van Gysel. 1997. Application of AFLP in breeding molecular biology and genetics. Bleg. Journ. Bot. 129 (20): 107-117.
2. Chen, H. B., J. M. Martin, M. Lavin and L. E. Talbert . 1994. Genetic diversity in hard red spring wheat based on sequence – Tagged site PCR markers. Crop Sci. 34: 1628-1632.
3. Dellaporta, S. L., J. Wood and . B. Hickes. 1983. A Plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.

4. Devos, K. M. and M. D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers n wheat. Theor. Appl. Genet. 84: 567-572.
5. Dukshoorn, L., H. Aucken, P. Gerner – Smidt, P. Janssen, M. Kaufmann, J. Garaizer, J. Ursing and T. Pitt. 1996. Comparision of outbreak and non – outbreak *Acinetobacter baummannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J. Clin. Microbiol. 34: 1519-1525.
6. Folker, R., J. Rouppe, K. De Groote, P. Van Zandvoort, A. Schots, F. Gommers, J. Helder and J. Bakker. 1996. Gene pool similarities of potato to cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. Mol. Plant – Microbe Interactions. 9: 47-54.
7. Huys, G., R. Coopman, P. Janssen and K. Kersters. 1996. High resolution genotypic of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 572-580.
8.Joshi, C. P. and H. t. Nguyen. 1993. RAPD analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats. Plant Science 93: 95-103.
9. Keim, P., J. M. Schupp, S. E. Travis, K. Clayton, T. Zhu, L. Shi, A. Ferreira and D. M. Webb. 1997. A high – density soybean genetic map based on AFLP markers. Crop Sci. 37: 537-543.
10. Koller, B., A. Lehmann, J. M. McDermott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85: 901-904.
11. Lawson, W. R., R. J. Henry, J. K. Kochman and G. A. Kong. 1994. Genetic diversity in sunflower (*Helianthus annus* L.). as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. Aus. J. Agric. Res. 45: 1319-1327.
12. Li, X., H. J. van Eck, J. N. A. M. Rouppe van der Voort, D. J. Huigen, P. Stam and E. Jacobsen. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: The R2 allele conferring resistance to *phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. Theor. Appl. Genet. 96: 1121-1128.
13. Liu, Z. Q., Y. Pei and J. Pu. 1999. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum*. L. Plant Breeding 118: 119-123.
14. Mackill, D., E. Zhang, E. Redona and P. Colowtt. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome 39: 969-977.
15. Martin, J. M., E. Talbert, S. P. Lanning and N. K. Blake. 1995. Hybrid performance in wheat as related to parental diversity. Crop Sci. 35: 104-108.
16. Maughan, P., M. Saghai Maroof, G. Buss and G. Huestis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity inheritance, and near – isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet. 93: 392-401.
17. Melchinger, A. E., M. E. Lee, K. R. Lamkey and W. L. Woodman. 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: Relation to genetic effecs in maize inbreds. Crop Sci. 30: 1033-1040.
18. Mueller, U., S. Lipari and M. Milgroom. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus – growing Cyphomyrmex minutus. Mol. Eco. 5: 119-122.
19. Multani, D. S. and B. R. Lyon. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome 38: 1005-1008.
20. Pakniyat, H., W. Powell, E. Baird, L. L. Handley, D. Robinson, C. M. Scrimgeour, E. Nevo, C. A. Hackett, P. D. s. Caligari and B. P. Forster. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* c. Koch) With reference to salt tolerance and associated ecogeography. Genome 40: 332-341.
21. Roupp, J. N. A., P. van Zandvoort, H. J. van Eck, R. T. Folkertsma, R. C. B. Hutten, J. Draaistra, F. J. Gommers, E. Jacobsen, J. Helder and J. Bakker. 1997. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. Mol. Gen. Genet. 255: 438-447.
22. Sharma, S. K, M. R. Knox and T. H. N. Ellis. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 93: 751-758.
23. Smith, O. S., J. S. C. Smith, S. L. Bowen, R. A. Tenborg and S. J. Wall. 1990. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, heterosis and RFLPs. Theor. Appl. Genet. 80: 823-839.

24. Stuber, C. W., S. E. Lincoln, D. W. Wolff, T. Helentjaris and E. S. Lander. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. Genetics 132: 823-839.
25. Talbert, L. E., N. K. Blake, P. W. Chee, T. K. Blake and G. M. Magyer. 1994. Evolution of sequence – tagged – site PCR products as molecular markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 87: 789-794.
26. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research 21: 4407-4414.
27. Yang, X. and C. F. Quiros. 1993. Identification and classification of celery with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86: 205-212.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol.32, No.3, 2001

Evaluation of Genetic Variation Among Wheat Cultivars Using AFLP Markers

B. E. SAYED- TABATABAEI[1] AND
A. A. SHAHNEJAT- BUSHEHRI[2]
1& 2- Assistant Professors, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.
Accepted. April.24, 2001

SUMMARY

AFLP is based on the selective amplification of a restricted number of genomic fragments. Through this technology, cultivars can be indentified and relationships between closely related plant accessions specified. The genetic relationships among 16 cultivars of wheat were investigated using AFLP markers as discriminating characters. Resolved bands were scored for the presence or absence in a binary matrix and relationships among cultivars assessed, using simple matching coefficients. The results have assisted in the development of a dendrogram suggesting genetic relationships among genotypes. Cluster analysis by UPGMA showed that 16 cultivars can be placed in two main groups with a similarity ranging from 0.456 to 0.776. Variability observed had a narrow genentic base and it is necessary to expand the diversity of the wheat genetic base. With optimizing AFLP in this study, identification of diverse germplasms, selection of parents and estimating heterosis at molecular level will be possible. Also, results indicated that through AFLP technology one can generate molecular markers that can be used reliably for DNA fingerprinting of important cultivars.

Key words: AFLP , Molecular markers, Polymorphism, Genetic fingerprinting, Wheat.