"مجله علوم زراعی ایران"
جلد نوزدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦

مکان‌یابی دو ژن مستقل کنترل‌کننده مقاومت به زنگ سیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) با استفاده از روش تجزیه هاپلوتایپی و مدل‌سازی ژنتیکی

Mapping chromosome locations of two genes independently controlling stem rust resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) using haplotype analysis and genetic modeling

حبیب اله قزوینی[1]

چکیده

قزوینی، ح. ١٣٩٦. مکان‌یابی دو ژن مستقل کنترل‌کننده مقاومت به زنگ سیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) با استفاده از روش تجزیه هاپلوتایپی و مدل‌سازی ژنتیکی. **مجله علوم زراعی ایران. ١٩(٤): ٣٤٨-٣٣٤.**

با وجود روش‌های متعدد برای مکان‌یابی ژن‌ها/QTLهای کنترل‌کننده صفات کمی، تا کنون روش جامعی جهت ترسیم نقشه ژنتیکی دو ژن کنترل‌کننده یک صفت کیفی که بطور مستقل روی فنوتیپ گیاه اثر می‌گذارند، ارائه نشده است. در این تحقیق جمعیت پایه F2 گندم حاصل از تلاقی دو لاین RL6071 (حساس) و Tr129 (مقاوم) با اسپور قارچ عامل بیماری زنگ سیاه (*Puccinia graminis* Pers.) تلقیح و جمعیت به دو گروه مقاوم و حساس تفکیک شد. نتایج ارزیابی فنوتیپی جمعیت‌های F2 و F2:3 نشان‌دهنده تفرق ١٥:١ جمعیت برای مقاومت به زنگ سیاه و وجود دو ژن غالب و مستقل بود. با استفاده از ٤٢٢ نشانگر مولکولی ریزماهواره که پوشش خوبی برای تمامی نواحی کروموزومی ٢١ کروموزوم گندم نان داشتند، مشابهت بین آلل‌های بالک‌های DNA لاین‌های حساس و والدین حساس و مقاوم مورد ارزیابی قرار گرفت. از نشانگرهایی که تطابق آللی مناسبی بین بالک‌های حساس و والد حساس نشان دادند، برای بررسی تطابق آللی لاین حساس RL6071 با ١٦١ لاین F2 استفاده شد. با استفاده از تفرق نشانگرهای ریزماهواره در جمعیت F2 و مدل‌سازی ژنتیکی، حضور دو ژن غالب و مستقل برای کنترل مقاومت به زنگ سیاه در لاین Tr129 مورد تایید قرار گرفت. بر مبنای نتایج حاصل از تجزیه ژنتیکی و تجزیه هاپلوتایپی، نشانگرهای مولکولی پیوسته با دو ژن، مکان قرار گرفتن این ژن‌ها روی کروموزوم‌های 6A و 2B گندم لاین Tr129 ترسیم شد.

واژه‌های کلیدی: تطابق آللی، زنگ سیاه گندم، نشانگرهای ریزماهواره و نقشه‌های کروموزومی.

تاریخ دریافت: ١٣٩٦/٠٥/١٦ تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/١١/٠٢

١- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران (مکاتبه کننده)
(پست الکترونیک: Habib_ghaz@yahoo.com)

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

مقدمه

تحقیقات انجام شده در اوایل قرن بیستم نشان داد که روی هرکروموزوم تعداد زیادی ژن (لینکاژ ژنی) قرار دارند که این موضوع با فرضیات مندل مبنی بر وجود فقط یک عامل ارثی روی هر واحد وراثتی مغایر بود (Sturtevant, 1913). درسال‌های اولیه کشف پیوستگی ژن‌ها، برای حل روابط ساده‌ای مانند بررسی ترتیب و یا اندازه‌گیری فاصله دو و یا سه ژن پیوسته، با استفاده از فراوانی‌های فنوتیپی نتاج نوترکیب در مقایسه با نتاجی با فنوتیپ والدینی در جمعیت‌های ژنتیکی مانند نسل دوم، نسل سوم و تلاقی‌های برگشتی و محاسبه درصد کیاسما و کراسینگ اوور، فاصله ژنتیکی دو ژن بر حسب واحد سانتی‌مورگان محاسبه می‌شد. با کشف ژن‌های بیشتر روی هر کروموزوم و نیز کشف اثراتی مانند تداخل (Interference) و تطابق (Coincidence)، محاسبه ترتیب ژن‌ها و یا فاصله دقیق ژن‌ها از یکدیگر مشکل‌تر شد. با گذشت زمان استفاده از نرم افزارهای کامپیوتری در محاسبه فواصل ژن‌ها و ترسیم نقشه‌های لینکاژی متداول گردید (Griffiths *et al*., 2000).

امروزه با کشف و توسعه نشانگرهای مولکولی نقشه‌های ژنتیکی گیاهان و جانوران کامل‌تر و بصورت اشباع تهیه و موقعیت ژن‌های کنترل کننده صفات روی کروموزوم‌ها با استفاده از این نشانگرها بطور دقیق مشخص گردیده است (Agarwal *et al*., 2008; Doveri *et al*., 2008; Kumar *et al*., 2009). مهم‌ترین موضوع در مکان‌یابی یک ژن جدید و ترسیم نقشه پیوستگی آن، پیدا کردن کروموزوم محل استقرار آن ژن است. وقتی که محل کروموزومی ژن مشخص شد، نقشه ژنتیکی ژن‌ها به آسانی و با استفاده از نشانگرهای مولکولی قابل رسم است. چندین روش مختلف سیتولوژیکی شامل تجزیه مونوسومیکی (Sears, 1944; Singh, 1967)، تجزیه تلوسنتریکی (Sears, 1966) و مکان‌یابی ژنتیکی با استفاده از کمبودهای هاپلوئیدی (Hiebert *et al*., 2005)، برای شناسایی محل ژن‌ها استفاده شده‌اند. همچنین از روش‌های ژنتیکی نظیر ارزیابی کل ژنوم (Whole-genome mapping, WGM) (Miller, 2013) و تجزیه تفرقی بالک‌ها (Bulked segregant analysis, BSA) (Michelmore *et al*., 1991) برای تشخیص محل ژن‌ها استفاده می‌شود که اولی دارای دقت بسیار بالا، ولی بسیار وقت‌گیر و پر هزینه بوده و دومی سریع، ولی با دقت پایین بوده وتنها قادر به شناسایی ژن‌هایی است که فاصله نزدیکی با نشانگرهای مولکولی دارند (Ghazvini *et al*., 2012a). روش ژنتیکی لاین‌های نسبتا ایزوژن (Near isogenic lines, NILs) نیز روش دقیقی برای شناسایی محل ژن‌ها می‌باشد، ولی تهیه لاین‌های نسبتا ایزوژن وقت‌گیر بوده و نشانگرهای مورد استفاده برای غربالگری این لاین‌ها باید پوشش کروموزومی خوبی برای کل ژنوم داشته باشند تا قادر به شناسایی قطعه‌ای از ژنوم (و ژن موجود) که در لاین‌های مختلف متفاوت است، باشند. در مجموع هر یک از روش‌های یاد شده معایب و محاسنی داشته و شناسایی روشی که بتواند با صرف وقت و هزینه کمتر نسبت به WGM و NILs و دقتی بیشتر از آنچه در روش BSA دیده می‌شود و قادر به شناسایی محل کروموزومی ژن‌های صفات کیفی باشد، برای محققان علم ژنتیک بسیار مطلوب خواهد بود (Ghazvini *et al*., 2012a).

اگر یک صفت خاص تنها توسط یک ژن کنترل شود، نرم افزارهای ژنتیکی موجود توانایی رسم نقشه ژنتیکی آن ژن (یا صفت فنوتیپی) را در ارتباط با ژن-های دیگر و یا با نشانگرهای مولکولی دارند. در مواردی که دو ژن مستقل بطور هم‌زمان روی یک صفت فنوتیپی اثر می‌گذارند، رسم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی محل این ژن‌ها توسط نرم‌افزارهای موجود امکان‌پذیر نمی‌باشد. تعداد زیادی از محققان روش‌های مختلفی را بکار برده‌اند تا در مواقعی که دو ژن بطور مستقل یک صفت کیفی را کنترل می‌کنند، ب

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

توانند نقشه ژنتیکی ژن‌ها را ترسیم کنند. یو و همکاران (Yue *et al*., 2008) در ارزیابی عامل ژنتیکی رنگ گل‌های لیمویی نسل F_2 در گیاه آفتابگردان، یک نسبت تفرق ۱۵:۱ را مشاهده کردند که نشان می‌داد دو ژن مغلوب بطور مستقل رنگ گل آفتابگردان را کنترل می‌کنند. این محققان با استفاده از خانواده‌های $F_{2:3}$ که بطور تصادفی انتخاب شده و تفرق ۳:۱ داشتند فقط توانستند نقشه ژنتیکی یکی از ژن‌های مذکور را رسم کنند. بدیهی است که بدست آوردن داده‌های فنوتیپی صفت مذکور در خانواده‌های $F_{2:3}$ آفتابگردان نیازمند سطح وسیعی زمین و مستلزم کار عملی بسیار زیادی بوده و بعلاوه جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و استخراج DNA و تحقیقات ژنتیکی روی آنها، کار را غیرممکن جلوه می‌دهد.

یائو و همکاران (Yao *et al*., 1997) گزارش کردند که دو ژن بازگرداننده باروری در برنج نقش اساسی در بازگرداندن باروری در برنج‌های هیبرید با شیوه نرعقیمی سیتوپلاسمی را دارند. این محققان با استفاده از غربال نمودن دو بالک گیاهان کاملا عقیم و گیاهان کاملا بارور با استفاده از نشانگر مولکولی آر اف ال پی و روش‌های تجزیه واریانس، مکان‌یابی مکان‌های کنترل کننده صفات کمی (QTL) و تجزیه حداکثر احتمال (Maximum likelihood) موفق شدند که محل تقریبی ژن‌های بازگرداننده باروری روی کروموزوم-های شماره ۱ و ۱۰ برنج را شناسایی کنند. محققان دیگری (Guo *et al*., 2006) اقدام به رسم نقشه ژنتیکی دو ژن کنترل‌کننده نرعقیمی گندم در روش حساسیت حرارتی-فتوپریودیکی نمودند، ولی آنها برای پیدا کردن نقشه ژنتیکی هریک از این ژن‌ها، تنها از ژنوتیپ‌های کاملا عقیم و کاملا بارور استفاده کردند و کلیه ژنوتیپ‌های حد وسط که باروری ناقص داشتند، از تجزیه‌های ژنتیکی حذف شدند. حذف گزینشی ژنوتیپ‌های خاص از میان جمعیت ژنتیکی، خواه ناخواه باعث پیدایش اریب معنی‌داری در محاسبه محل ژن‌ها روی کروموزوم‌ها و فاصله آنها با نشانگرهای مجاور خواهد شد. وو و همکاران (Wu *et al*., 2007) با استفاده از داده‌های فنوتیپی حاصل از سه سال ارزیابی مزرعه‌ای والدین، نسل F_1، جمعیت F_2 و جمعیت‌های تلاقی برگشتی برای ارزیابی مقاومت به ویروس موزائیک نیشکر در ذرت و طراحی برنامه نرم‌افزاری خاص، موفق شدند محل دو ژن غالب تکمیل کننده که مقاومت به ویروس را کنترل می‌کنند، روی کروموزوم‌های ۳ و ۶ ذرت تعیین کنند.

در این تحقیق، مراحل غربالگری اولیه نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن‌های مقاومت، استفاده از تفرق نشانگرهای مولکولی در جمعیت F_2، تجزیه هاپلوتایپی و مدل سازی ژنتیکی برای مکان‌یابی کروموزومی دو ژن غالب که بطور مستقل از یکدیگر مقاومت به زنگ سیاه در لاین گندم Tr129 را کنترل می‌کنند، انجام شد. هدف اصلی این تحقیق، ارزیابی مراحل مختلف تجزیه‌های ژنتیکی و تجزیه هاپلوتایپی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت بود که بر مبنای آن می‌توان کروموزوم‌های محل قرار گرفتن و نقشه کروموزومی ژن های مستقل کنترل کننده یک صفت کیفی را تعیین نمود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۲۰۱۲ میلادی در مرکز تحقیقات غلات، وزارت کشاورزی کانادا، وینیپگ، کانادا و با استفاده از جمعیت ژنتیکی نسل‌های F_2 و F_3 حاصل از تلاقی لاین RL6071 (بعنوان لاین حساس) با لاین Tr129 (لاین مقاوم به بیماری زنگ سیاه در اثر قارچ پوکسینیا گرامینیس زیر گونه تریتیسی (*Puccinia graminis* Pers.:Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn.) انجام شد. نتایج ارزیابی‌های اولیه نشان داد که پس از تلقیح جمعیت‌های مذکور با نژاد MCCF قارچ، یک تفرق ۱۵:۱ در جمعیت از نظر مقاومت نسبت به نژاد قارچ مزبور وجود داشت($\chi^2_{15:1}$= 1.48, P= 0.22) که

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

نشان‌دهنده وجود دو ژن غالب و مستقل برای القای مقاومت به زنگ سیاه در لاین Tr129 بود (Ghazvini *et al*. 2012b). دی ان آی ژنومی گیاهان F_2 مورد بررسی بر اساس روش پالوتا و همکاران (Pallotta *et al*., 2003) استخراج شد. برای تخمین مکان‌های کروموزومی دو ژن یک روش گام به گام ابداعی بکار گرفته شد. در اولین مرحله از یک روش تغییریافته تجزیه تفرقی بالکی استفاده شد (Ghazvini *et al*., 2012a) تا محل احتمالی ژن‌های مقاومت روی کروموزوم‌های لاین Tr129 تعیین شوند. مراحل مختلف این روش بطور خلاصه شامل قسمت‌های زیر بود:

۱. انتخاب ۴۲۲ نشانگر مولکولی ریزماهواره که پوشش خوبی برای تمامی نواحی کروموزومی ۲۱ کروموزوم گندم داشتند (بطور تقریبی یک نشانگر برای هر پنج سانتی مورگان) (Röder *et al*., 1998; Somers *et al*., 2004; Sourdille *et al*., 2004).

۲. اضافه کردن پرایمرهای نشانگرهای مزبور به میزان لازم برای یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در هر چاهک (۰/۲ پیکومول از پرایمر مستقیم و ۲ پیکومول از پرایمر معکوس). در مجموع ۱۶ چاهک در یک صفحه PCR ۳۸۴ چاهکی (۱۶ ردیف × ۲۴ ستون) بارگذاری شدند، بطوری که در چاهک‌های هر ستون یک پرایمر و در مجموع ۲۴ پرایمر در هر صفحه PCR قرار داده شدند.

۳. قرار دادن صفحه‌های PCR حاوی پرایمرهای نشانگر در یک دستگاه خشک کننده برودتی (یا در زیر هود) به منظور تبخیر آب موجود و باقی ماندن پرایمر در ته هر چاهک.

۴. تهیه بالک‌های دی ان آی چندگانه فقط از دی ان آ لاین‌های حساس که فاقد هر دو ژن مقاومت بودند. برای تهیه هر بالک، دی ان آی دو لاین حساس مخلوط شده و در مجموع ۱۴ بالک دی ان آ (مینی‌بالک) لاین های حساس (۲۸ ژنوتیپ حساس) که در چاهک‌های ردیف یک تا چهارده صفحه PCR به همراه دی ان آی والدین که در چاهک‌های ۱۵ و ۱۶ قرار داده شدند، مورد مقایسه قرار گرفتند.

۵. استفاده از صفحه‌های PCR حاوی پرایمرهای نشانگر برای غربال سریع بالک‌های دی ان آی لاین‌های حساس و مقایسه آنها با دی ان آی والدین. برای سهولت در انجام PCR در مجموع ۱۶ مخلوط PCR برای هر مینی‌بالک و یا والدین تهیه شد که هرکدام شامل ۶۰ نانوگرم دی ان آ (۳۰ نانوگرم برای هر لاین حساس در مینی‌بالک‌های حساس)، بافر PCR با غلظت 1x، ۰/۸ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱/۹ پیکومول از پرایمر M13 (Schuelke, 2000) با دنباله‌های فلورسنت با رنگ‌های مختلف (Fam, Vic, Ned, Pet) و یک واحد آنزیم تگ پلیمراز بود. ۱۰ میکرولیتر از هر یک مخلوط‌های PCR شامل دی ان آهای مختلف در چاهک‌های هر یک از ستون‌های هر صفحه PCR اضافه شد. پرایمر M13 استفاده شده در هر صفحه PCR تنها با یک نوع از دنباله‌های فلورسنت رنگی نشاندار شده بود.

۶. پرایمرهای ریزماهواره بر مبنای دمای اتصال مختص هر پرایمر در صفحه‌های PCR مختلف قرار گرفته بودند و بر همین مبنا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هر صفحه PCR بطور اختصاصی (عموما صفحه‌های PCR با دمای اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد و یا ۵۱ درجه سانتیگراد) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (PTC-100 MJ Research thermal cycler, Waltham, MA) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، چرخه‌های حرارتی مورد استفاده در PCR و تجزیه باندهای دی ان آ با استفاده از دستگاه تجزیه ژنتیکی ای بی آی ۳۱۰۰ (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada) مطابق روش‌های سومرز و همکاران (Somers *et al.,* 2004) و سوردیل و همکاران (Sourdille *et al.,* 2004) انجام شد.

برای شناسایی مکان‌های احتمالی حضور هر یک از ژن‌های مقاومت، مقایسه شباهت‌های آللی بین

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

بالک‌های حساس با والد حساس و عدم تشابهات آللی بالک‌های حساس با والد مقاوم، انجام گرفت. ژنوتیپ‌های حساس مورد استفاده برای تهیه بالک‌های حساس در این آزمایش، از میان ۲۳ ژنوتیپ کاملا حساس با تیپ آلودگی ۳ یا بیشتر و پنج ژنوتیپ حساس با تیپ آلودگی $^{+}$۲۲ تا $^{+}$۲۳ پس از ارزیابی فنوتیپی جمعیت اولیه که شامل ۲۸۸ ژنوتیپ F_2 بود، انتخاب شدند (Ghazvini *et al*., 2012b). از نشانگرهایی که تشابهات آللی خوبی بین بالک‌ها و والد حساس نشان دادند، برای بررسی تطابق آللی لاین حساس RL6071 با ۱۵ لاین حساس F_2 بطور جداگانه استفاده شد. در مورد نشانگرهای همبارز آزمون تطابق نسبت آللی مشاهده شده در ۱۵ لاین حساس به والد حساس، والد مقاوم یا هیبرید نسل F1 با نسبت آلل‌های مورد انتظار در گروه-های ژنوتیپی مشاهده شده با استفاده از آزمون کای دو (χ^2) انجام شد. نشانگرهایی که برای آنها تطابق آللی معنی‌داری بین والد حساس و ۱۵ لاین F_2 حساس وجود داشت، به عنوان نشانگرهای امیدبخش شناخته شده و نشانگرهایی که برای آنها تطابق آللی بالایی در بین نتاج حساس و والد حساس وجود نداشت، حذف شدند. نشانگرهای بارز قابل گروه بندی به کلاس‌های حساس و هتروزیگوت نبوده و در نتیجه نسبت‌های آللی ارائه شده قابل ارزیابی توسط آزمون کای دو نبود و در این مورد انتخاب نشانگر تنها براساس نسبت بالای شباهت آللی لاین‌ها به والدین حساس و مقاوم انجام گرفت. در این مرحله از ۱۲ نشانگر امیدبخش انتخابی برای غربال کردن دی ان آی ۱۴۶ گیاه F_2 با فنوتیپ‌های مقاوم استفاده شد. سپس تطابق آللی نتاج هموزیگوت و هتروزیگوت مقاوم با آلل‌های هر دو والد یا هیبرید نسل F1 با استفاده از این نشانگرهای امیدبخش مورد بررسی قرار گرفتند. در این مرحله، با استفاده از آزمون کای دو، تطابق نسبت شباهت آللی مشاهده شده در ۶۹ لاین مقاوم هموزیگوت و همچنین ۷۷ لاین مقاوم در حال تفرق به والد حساس، والد مقاوم یا هیبرید نسل F1 با نسبت آلل‌های مورد انتظار در گروه‌های ژنوتیپی مشاهده شده برای نشانگرهای همبارز، انجام گرفت. در این مورد هم نشانگرهای بارز قابل گروه بندی به کلاس‌های حساس و هتروزیگوت نبوده و در نتیجه نسبت‌های آللی ارائه شده قابل ارزیابی توسط آزمون کای دو نبود. ازمیان نه نشانگر بارز امیدبخش مورد بررسی در این تحقیق، تنها یک نشانگر بارز بر اساس نسبت بالای شباهت آللی لاین‌های مقاوم هموزیگوت و لاین‌های مقاوم در حال تفرق به والدین مقاوم یا حساس و همچنین پیوستگی با یک نشانگر همبارز برای تجزیه هاپلوتایپی انتخاب شد.

بر اساس روش قدم به قدم غربالگری، در انتها فقط نشانگرهای مولکولی مستقر در روی دو کروموزوم مستقل بیشترین همبستگی را با ژن های مقاومت داشتند. در این مرحله از داده‌های هاپلوتایپی بدست آمده از ۱۶۱ گیاه F_2، شامل ۱۵ لاین حساس و ۱۴۶ لاین مقاوم که توسط نشانگرهای ریزماهواره در کروموزوم‌های هدف بدست آمده بود، برای ایجاد یک مدل فرضی تلاقی دی هیبریدی (دو ژنی) استفاده شد. بر اساس داده‌های فنوتیپی و هاپلوتایپی موجود برای هر یک از دو کروموزوم، نتاج F_2 به نه گروه ژنوتیپی مطابق با یک تلاقی دو ژنی تقسیم شدند.آزمون تطابق نسبت‌های تفرقی گروه‌های ژنوتیپی مشاهده شده با استفاده از آزمون کای دو (χ^2) با نسبت‌های مورد انتظار (۱، ۲، ۱، ۲، ۴، ۲، ۱، ۲، ۱) انجام شد. بر مبنای تجزیه هاپلوتایپی، نزدیک‌ترین مکان نشانگرها به هر یک از ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه تخمین زده شد. با فرض حضور فقط یک ژن و عدم حضور ژن دیگر بر مبنای استفاده از نزدیک‌ترین نشانگر مولکولی مرتبط با هر ژن، جمعیت یک بار برای ژن اول و یک بار برای ژن دوم مورد تجزیه ژنتیکی قرار گرفت.

بر مبنای نتایج حاصل از تجزیه ژنتیکی و تجزیه هاپلوتایپی، نشانگرهای مولکولی پیوسته با هر دو ژن مقاومت به زنگ سیاه، دو خانواده $F_{2:3}$ که به ترتیب

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

فقط برای ژن اول و یا فقط برای ژن دوم تفرق نشان دادند انتخاب شده و پس از تلقیح جمعیت‌های مذکور با نژاد MCCF قارچ زنگ سیاه، ارزیابی فنوتیپی این جمعیت بطور جداگانه انجام گرفت. بر مبنای نتایج حاصل از تجزیه ژنتیکی و تجزیه هاپلوتایپی، جمعیت بر اساس تفرق یک ژن گروه‌بندی شده و نقشه‌های ژنتیکی گروه‌های لینکاژی با استفاده از برنامه جوینمپ (JOINMAP) ترسیم و فاصله‌های ژنتیکی بر اساس تابع کوسامبی (Kosambi, 1944) محاسبه شدند.

نتایج و بحث

از ۴۲۲ نشانگر ریزماهواره استفاده شده در آزمایش تجزیه تفرقی بالک‌ها، ۲۰ نشانگر واقع در کروموزوم‌های 1A، 2B، 2D، 3A، 3D، 4A و 6A گندم شباهت بالایی بین آلل‌های والد حساس و بالک‌های حساس نشان دادند (جدول ۱). با توجه به این که بعضی از این نشانگرها توانایی تکثیر بیش از یک مکان ژنی را در کروزوم‌های مختلف دارند، در جدول یک، مکان کروموزومی احتمالی برخی از نشانگرهای مورد استفاده در بیش از یک کروموزوم نشان داده شده است. مراحل غربالگری مورد استفاده در روش تغییر یافته تجزیه تفرقی بالک‌ها (MBSA) و استفاده از این روش برای مکان‌یابی سریع ژن جدید مقاومت به زنگ سیاه *Sr54* توسط قزوینی و همکاران (Ghazvini *et al*., 2012a) توضیح داده شده است.

با استفاده از روش تغییریافته تجزیه تفرقی بالک‌ها، در این تحقیق نیز غربال اولیه نشانگرهای با احتمال پیوستگی ژنی با ژن‌های مقاومت روی کروموزوم‌های مختلف گندم انجام گرفت. با توجه به این که لاین گندم مقاوم Tr129 در قسمت‌هایی از ژنوم خود دارای ریخته ارثی از خویشاوند وحشی گندم، جنس آژیلوپس گونه تریانسیالیس (*Aegilops triuncialis*) می‌باشد (Aung and Kerber, 1994)، تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این تحقیق برخلاف طبیعت همبارز بودن، به علت عدم تشابه کروموزومی در برخی مکان‌های ژنی و تخصصی بودن نشانگرهای ریز ماهواره گندم، قادر به تکثیر آلل‌های موجود روی هر دو کروموزوم ژنوتیپ‌های مورد بررسی نبودند و تکثیر آلل مورد بررسی تنها از روی نسخه کروموزوم به ارث رسیده از والد گندم انجام گرفت و این نشانگرها بصورت بارز ظاهر شدند (جدول ۱). با توجه به تظاهر بارز برخی از نشانگرها، نمره‌دهی باندهای مربوط به این نشانگرها بر اساس حضور یا عدم حضور (آلل نول) باند دی ان آی تکثیرشده انجام گرفت. بر این اساس، در جدول‌های ۱ و ۲ برای نشانگرهای بارز تنها دو آلل (حضور یا عدم حضور باند) و برای نشانگرهای همبارز آلل‌های مرتبط با هر سه وضعیت مقاوم هموزیگوت، هتروزیگوت و حساس هموزیگوت قابل نمره‌دهی بودند.

از نشانگرهای مولکولی همبارز و بارز ریزماهواره که شباهت بالایی بین بالک‌های حساس و والد حساس داشتند، برای غربال نمودن دی ان آی ۱۶۱ گیاه F_2 با فنوتیپ مشخص مقاوم و یا حساس استفاده شد. در این مرحله، در گام اول مشابهت آللی لاین حساس RL6071 با ۱۵ لاین حساس F_2 مورد مقایسه قرار گرفت. تمایز لاین‌های F_2 مقاوم هموزیگوت با لاین‌های F_2 مقاوم هتروزیگوت بر اساس واکنش خانواده‌های $F_{2:3}$ مشتق شده از لاین‌های F_2 به نژاد MCCF زنگ سیاه انجام شد. شباهت آللی ۱۵ لاین حساس F_2 نسبت به والد حساس، والد مقاوم و هیبرید نسل F_1 حاصل از تلاقی والدین مورد مقایسه قرار گرفت (جدول ۱). از میان ۱۱ نشانگر ریزماهواره همبارز مورد استفاده در این مرحله، تنها سه نشانگر cfd73، barc101، gwm388 روی کروموزوم 2BL و یک نشانگر همبارز (gwm334) روی کروموزوم 6AS تطابق معنی‌داری را در بین آلل‌های والد حساس و ۱۵ لاین F_2 حساس نشان دادند. از میان نه نشانگر بارز مورد بررسی، تشابه آللی بالایی (بیش از ۸۰ درصد) در بین والد حساس و ۱۵ لاین F_2

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

حساس در دو نشانگر روی کروموزوم 1A (gpw7395 و gwm135)، یک نشانگر روی کروموزوم 2BL (wmc445)، یک نشانگر روی کروموزوم 2D (barc122)، یک نشانگر روی کروموزوم 6AS (gpw3041) و یک نشانگر روی کروموزوم 3A (cfa2076) مشاهده شد و این نشانگرها نیز به عنوان نشانگرهای امید بخش شناخته شدند (جدول ۱). با توجه به معنی دار بودن تطابق آلل‌های والد حساس و لاین‌های حساس F_2 در چهار نشانگر واقع روی کروموزوم 2BL، دو نشانگر دیگر مستقر روی این کروموزوم (gpw7506 و barc129) نیز که دارای تطابق غیر معنی‌دار آللی بین والد حساس و لاین‌های حساس بودند، جهت بررسی در مرحله بعد انتخاب شدند. نشانگرهای انتخابی اولیه از طریق روش تجزیه تفرقی بالک‌ها روی کروموزوم‌های 3D، 4A و 6AL که برای آنها تطابق آللی قابل قبولی در بین نتاج F_2 حساس و والد حساس RL6071 وجود نداشت، حذف شدند (جدول ۱).

در مرحله بعد مقایسه روابط آللی نتاج هموزیگوت مقاوم با آلل‌های والد مقاوم Tr129 و نتاج هتروزیگوت مقاوم با آلل‌های والد حساس RL6071 و والد مقاوم Tr129، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره واقع در کروموزوم‌های 1A، 2BL، 2D، 6AS و 3A انجام گرفت (جدول ۲). در این مورد هم برای تمایز لاین‌های F_2 مقاوم هموزیگوت از لاین‌های F_2 مقاوم هتروزیگوت، از واکنش خانواده‌های $F_{2:3}$ نسبت به نژاد MCCF زنگ سیاه استفاده شد. در این مرحله فرض شد که اگر نشانگر امیدبخش مورد بررسی پیوستگی بالایی با ژن مقاومت به زنگ سیاه داشته باشد، تعداد زیادی از لاین‌های مقاوم هموزیگوت و هتروزیگوت باید آلل‌های خود را از والد مقاوم Tr129 به ارث برده باشند و تعدد ژنوتیپ‌های مقاومی که آلل‌های خود را از والد حساس به ارث برده بودند، دلیل عدم پیوستگی نشانگر با صفت مقاومت در نظر گرفته شد. به عنوان مثال، در مورد نشانگرهای gpw7395 و gwm135 روی کروزوم 1A، با وجود تطابق آللی خوبی که بین لاین‌های حساس و والد حساس RL6071 وجود داشت (۱۴ ژنوتیپ از ۱۵ ژنوتیپ حساس) (جدول ۱)، مقایسه آلل‌های لاین‌های مقاوم و یا لاین‌های مقاوم هتروزیگوت با والد مقاوم Tr129 نشان داد که تطابق مشاهده شده بین لاین‌های حساس و والد حساس در مرحله اول غربالگری صرفا تصادفی بوده است (جدول ۲). در این مرحله تنها در پنج نشانگر ریزماهواره همبارز روی کروموزوم 2BL (gpw7506، cfd73، barc101، gwm388 و barc129) و دو نشانگر ریزماهواره روی کروموزوم 6AS (gpw3041 و gwm334) تطابق آللی معنی‌داری در بین لاین‌های مقاوم هموزیگوت و یا لاین‌های مقاوم هتروزیگوت با والد مقاوم Tr129 مشاهده شد (جدول ۲). با توجه به این که نشانگر wmc445 روی کروموزوم 2BL در ناحیه تلومر بازوی بلند کروموزوم شماره ۲ گندم قرار دارد (Somers *et al*., 2004)، این نشانگر فاصله قابل توجهی از سایر نشانگرهای مستقر در ناحیه وسط بازوی بلند کروموزوم شماره ۲ داشت و بر اساس نتایج جدول ۲ نیز همبستگی بالایی با ژن احتمالی روی کروموزوم 2BL نشان نداد. نتایج نشان داد که در نشانگرهای barc122 و cfa2076 نیز تطابق قابل قبولی از نظر آلل‌های به ارث رسیده از والد مقاوم Tr129 در لاین‌های مقاوم هموزیگوت یا هتروزیگوت وجود نداشت. بر اساس مقایسه فنوتیپ‌های ۱۶۱ گیاه F_2 با هاپلوتایپ آلل‌های پیوسته با هر ژن، نشانگر cfd73 روی کروموزوم 2BL و نشانگر gpw3041 روی کروموزوم 6AS با داشتن بیشترین آلل‌های مشابه بین لاین‌های حساس با والد حساس و یا بین لاین‌های مقاوم با والد مقاوم، به عنوان نزدیک‌ترین نشانگرها به دو ژن مقاومت به زنگ سیاه شناسایی شدند (جدول‌های ۱ و ۲).

در مرحله بعد از داده‌های هاپلوتایپی بدست آمده از ۱۶۱ گیاه F_2 برای ایجاد یک مدل فرضی تلاقی

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

دی‌هیبریدی استفاده شد و تطابق گروه‌های ژنوتیپی مشاهده شده در مدل مفروض با گروه‌های ژنوتیپی مورد انتظار با آزمون کای دو ارزیابی شد (جدول ۳). نتایج این آزمون نشان داد که مدل مفروض با مدل تلاقی دی‌هیبریدی مطابقت داشت ($\chi^2_{1:1:2:2:4:2:2:1:1}$ = 10.58, p = 0.24). وو و همکاران (Wu *et al.*, 2007) برای تایید مکان مفروض دو ژن دارای اثر متقابل تکمیل کننده که مقاومت به ویروس موزائیک نیشکر در ذرت را کنترل می‌کنند، از آزمون تطابق کای دو در دو خانواده $F_{2:3}$ ذرت که به ترتیب فقط برای ژن اول و یا فقط برای ژن دوم تفرق نشان دادند، استفاده کردند.

بر اساس داده‌های هاپلوتایپی نتاج، بهترین حالت تطابق فنوتیپی و ژنوتیپی جمعیت در این مدل وقتی بدست آمد که فرض بر قرار داشتن ژن مقاومت در کروموزوم 6A (R_AR_A) در ناحیه انتهایی بازوی کوتاه کروموزمو و در موقعیتی دورتر از سنترومر نسبت به دو نشانگر gwm334 و gpw3041 و همچنین قرار داشتن ژن مقاومت در کروموزوم 2B (R_BR_B) در ناحیه میانی بازوی بلند کروموزموم و مابین دو نشانگر cfd73 و gpw7506 بود. همانطور که انتظار می‌رفت، تطابق ژنوتیپ فرضی گیاهان F_2 با ژنوتیپ نزدیک‌ترین نشانگر به ژن مکان یابی شده به صورت صد در صد نبوده و در چند مورد معدود (۲ درصد از ژنوتیپ‌ها) در این مدل فرضی، ژنوتیپ فرضی گیاهان F_2 مورد بررسی با ژنوتیپ نزدیک‌ترین نشانگر به ژن مقاومت، مطابقت نداشت. در مورد ژن مقاومت مکان‌یابی‌شده درکروموزوم 2B، ژنوتیپ این نتاج F_2 با ژنوتیپ نشانگر موجود در طرف دیگر ژن (gpw7506) مطابقت داشته و فرض شد که احتمالا کراسینگ‌اور در ناحیه بین ژن مقاومت و نشانگر cfd73 انجام گرفته باشد. در مورد عدم تطابق ژنوتیپی ژن مقاومت مکان‌یابی‌شده در ناحیه تلومری بازوی کوتاه کروموزوم 6A با نزدیک‌ترین نشانگر ریزماهواره (gpw3041)، فرض شد که در بین این ژن و نشانگر مزبور کراسینگ‌اور انجام گرفته است.

تجزیه ژنتیکی جمعیت‌های تمایز یافته که بر اساس تجزیه هاپلوتایپی نشانگرهای پیوسته با دو ژن و ژنوتیپ نزدیک‌ترین نشانگر مولکولی و با فرض حضور فقط یک ژن و عدم حضور ژن دیگر از جمعیت اصلی مشتق شده بودند، نشان داد که به ترتیب هر پنج نشانگر ریزماهواره امیدبخش در کروموزوم 2BL و دو نشانگر در کروموزوم 6AS پیوستگی نزدیکی با ژن‌های روی هر یک از این کروموزوم‌ها داشته و نقشه ژنتیکی هر یک از این ژن‌ها در کروموزوم‌های مذکور ترسیم شد (شکل ۱).

در یک آزمایش تکمیلی بر مبنای ژنوتیپ نزدیک‌ترین نشانگرها به دو ژن مستقر روی دو کروموزوم 2BL و 6AS در جمعیت F_2، دو خانواده $F_{2:3}$ که هر یک فقط برای ژن اول و یا فقط برای ژن دوم تفرق نشان دادند، انتخاب شدند. این انتخاب به گونه‌ای انجام شد که خانواده اول برای ژن 2B تفرق نشان داده (دارای ژنوتیپ R_Br_B) و فاقد ژن 6A (دارای ژنوتیپ r_Ar_A) درگیاه والدی F_2 بود و خانواده دوم برای ژن 6A تفرق نشان داده (دارای ژنوتیپR_Ar_A) و فاقد ژن 2B (دارای ژنوتیپ r_Br_B) در گیاه والدی F_2 بود.

بررسی فنوتیپی جمعیت‌های جدید احتمال معنی‌داری تفرق ۳:۱ را در هر دو جمعیت تایید نمود. وو و همکاران (Wu *et al.*, 2007) برای ارزیابی مقاومت به ویروس موزائیک نیشکر در ذرت،

بعد از تولید دو خانواده $F_{2:3}$ از جمعیت اولیه F_2 که با توجه به داده‌های مولکولی به ترتیب فقط برای ژن اول و یا فقط برای ژن دوم تفرق نشان دادند و ارزیابی‌های فنوتیپی و آزمون تطابق کای دو (χ^2)، احتمال معنی‌داری تفرق ۳:۱ در هر دو خانواده $F_{2:3}$ را تایید نمودند.

اگرچه روش‌های متعددی برای مکان‌یابی ژن‌ها/QTLهای کنترل‌کننده صفات کمی ارائه شده است،

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

جدول ۱- فهرست نشانگرهای ریزماهواره دارای تطابق بالا بین آلل‌های والد حساس و بالک لاین‌های حساس، مکان‌های کروموزومی و وراثت هر نشانگر و احتمال تطابق نسبت‌های آللی ۱۵ لاین F_2 حساس در مقایسه با والد حساس به زنگ سیاه گندم

Table 1. List of SSR markers with high correspondence of alleles between susceptible parent and bulks of susceptible lines, their chromosome locations and modes of inheritance and comparison of alleles among 15 susceptible F_2 lines and susceptible parent to stem rust in wheat

نشانگرهای SSR انتخابی از آزمایش تجزیه تفرقی بالک‌ها Selected SSR markers based on bulked segregant analysis	کروموزوم Chromosome	وضعیت غالبیت نشانگر Modes of inheritance of marker	شباهت آللی لاین های حساس به والد حساس، والد مقاوم یا هیبرید نسل F1 Correspondence of alleles of susceptible homozygote lines to susceptible ,resistant and F1 hybrids			احتمال تطابق P-value	سطح معنی‌داری Probability level	انتخاب نشانگرهای امیدبخش Selection of promising marker
			S[a, b]	Het[a, b]	R[a]			
gpw7395	1A	Dominant		14/15	1/15.	NA	-	Selected
gwm135	1A	Dominant		14/15	1/15.	NA	-	Selected
wmc445	2B, 5A	Dominant		12/15.	3/15.	NA	-	Selected
gpw7506	2B	Co-dominant	9/15.	4/15.	2/15.	0.007	ns	Selected
cfd73	2B	Co-dominant	15/15	0/15	0/15	1.00	**	Selected
barc101	2B	Co-dominant	14/15	1/15.	0/15	0.76	**	Selected
gwm388	2B	Co-dominant	14/15	1/15.	0/15	0.76	**	Selected
barc129	2B, 2D	Co-dominant	6/15.	7/15.	2/15.	0.0002	ns	Selected
barc122	2D, 2A, 5A	Dominant		12/15.	3/15.	NA	-	Selected
barc159	2B, 2D	Co-dominant	5/12.	5/12.	2/12.	0.0000	ns	Deleted
cfa2076	3A	Dominant		13/15.	2/15.	NA	-	Selected
cfd035	3D	Dominant		10/15.	5/15.	NA	-	Deleted
wmc219	4A	Dominant		11/15.	4/15.	NA	-	Deleted
wmc232	4A	Co-dominant	3/15.	6/15.	6/15.	0.0000	ns	Deleted
wmc313	4A	Co-dominant	2/12.	8/12.	2/12.	0.0000	ns	Deleted
gpw2083	4A	Co-dominant	6/15.	8/15.	1/15.	0.0000	ns	Deleted
gwm494	4A	Co-dominant	2/15.	10/15.	3/15.	0.0000	ns	Deleted
cfa2114	6A	Dominant		11/15.	4/15.	NA	-	Deleted
gpw3041	6A	Dominant		15/15.	0/15	NA	-	Selected
gwm334	6A	Co-dominant	15/15	0/15.	0/15	1.00	**	Selected

[a] S، Het و R: به‌ترتیب آلل‌های ریزماهواره مشابه با آلل‌های والد هموزیگوت حساس، هیبرید نسل F_1 و والد هموزیگوت مقاوم

[a] S, Het, and R: SSR marker's allele identical to those of susceptible, resistant and F_1 hybrids, respectively

[b] نسبت‌های آلل‌های نشانگرهای ریزماهواره همبارز که بر مبنای مشاهدات ژنوتیپی سه گروه حساس، هتروزیگوت و مقاوم گروه بندی شده‌اند. آلل‌های نشانگرهای بارز قابل گروه‌بندی به حساس و هتروزیگوت نبوده و در نتیجه نسبت‌های آللی ارائه شده در جدول بر اساس مشاهدات برای هر دو گروه حساس و هتروزیگوت می‌باشند

[b] Codominant SSR markers were scored based on observed alleles four susceptible, heterozygote and resistant genotypes. Dominant SSR markers could not be differentiated into susceptible and heterozygote classes and therefore alleles ratios in table are shown for both susceptible and heterozygote genotypes

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

جدول ۲- مقایسه نشانگرهای ریزماهواره امیدبخش از نظر احتمال تطابق نسبت‌های آللی بین والد مقاوم و لاین‌های F_2 مقاوم هموزیگوت یا هتروزیگوت به زنگ سیاه گندم

Table 2. Comparison of correspondence of alleles in promising SSR markers between resistant parent and homozygote and heterozygote resistant F_2 lines to stem rust in wheat

نشانگر SSR SSR marker	کروموزوم Chromosome	شباهت آللی لاین‌های مقاوم هموزیگوت به والد حساس، والد مقاوم یا هیبرید نسل F_1 Correspondence of alleles of resistant ,homozygote lines to susceptible resistant and F_1 hybrids			شباهت آللی لاین‌های مقاوم در حال تفرق[a] به والد حساس، والد مقاوم یا هیبرید نسل F_1 Correspondence of alleles of segregating resistant lines to susceptible, resistant and F_1 hybrids			احتمال تطابق P-value	سطح معنی داری level Probability	انتخاب نشانگرهای پیوسته با ژن Selection of linked markers to genes
		S[b, c]	Het[b, c]	R[b]	S[b, c]	Het[b, c]	R[b]			
gpw7395	1A		56/69	13/69		67/77	10/77.	-	-	Deleted
gwm135	1A		48/69	21/69		59/77	18/77	-	-	Deleted
wmc445	2B, 5A		46/69	23/69		58/77	19/77	-	-	Deleted
gpw7506	2B	12/68.	25/68	31/68	20/77	50/77	7/77.	0.15	**	Selected
cfd73	2B	13/69.	25/69	31/69	15/77	59/77	3/77.	0.11	**	Selected
barc101	2B	12/69.	29/69	28/69	14/76	57/76	5/76.	0.04	*	Selected
gwm388	2B	12/65.	27/65	26/65	17/73	50/73	6/73.	0.06	**	Selected
barc129	2B, 2D	10/67.	35/67	22/67.	19/71.	41/71	11/71.	0.01	*	Selected
barc122	2D, 2A, 5A		49/69	20/69		56/77	21/77	-	-	Deleted
cfa2076	3A		52/69	17/69		56/77	21/77	-	-	Deleted
gpw3041	6A		21/69	48/69		77/77	0/77	-	-	Selected
gwm334	6A	7/69.	18/69	44/69	19/77	55/77	3/77.	0.21	**	Selected

[a] تمایز لاین‌های F_2 مقاوم هموزیگوت با لاین‌های مقاوم هتروزیگوت بر اساس واکنش خانواده‌های $F_{2:3}$ لاین‌های مزبور به نژاد MCCF قارچ *Puccinia graminis* انجام شد

[a] Differentiation between homozygous and heterozygote resistant F_2 lines was based on reaction of $F_{2:3}$ families of those lines to *Puccinia graminis* race MCCF

[b] S، Het و R: به‌ترتیب آلل‌های ریزماهواره مشابه با آلل‌های والد هموزیگوت حساس، هیبرید نسل F_1 و والد هموزیگوت مقاوم

[b] S, Het, and R: SSR marker's allele identical to those of susceptible, resistant and F_1 hybrids, respectively

[c] نسبت‌های آلل‌های نشانگرهای ریزماهواره همبارز بر مبنای مشاهدات ژنوتیپی سه گروه حساس، هتروزیگوت و مقاوم گروه بندی شده‌اند. آلل‌های نشانگرهای بارز قابل گروه‌بندی به حساس و هتروزیگوت نبوده و در نتیجه نسبت‌های آللی ارائه شده در جدول بر اساس مشاهدات موجود برای هر دو گروه حساس و هتروزیگوت می باشند

[c] Codominant SSR markers were scored based on observed alleles four susceptible, heterozygote and resistant genotypes. Dominant SSR markers could not be differentiated into susceptible and heterozygote classes and therefore alleles ratios in table are shown for both susceptible and heterozygote genotypes

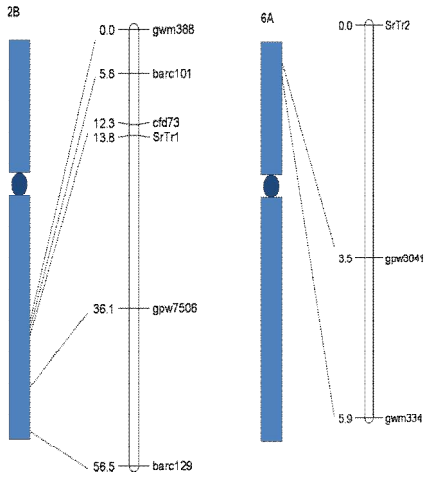
[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

جدول ۳- تطابق گروه‌های ژنوتیپی مشاهده شده در مدل فرضی تلاقی دی هیبریدی با گروه‌های ژنوتیپی مورد انتظار با استفاده از آزمون کای دو (χ^2) برای زنگ سیاه گندم

Table 3. Chi-square test of goodness-of-fit between the observed and expected numbers of genotypes in the hypothetical dihybrid model to stem rust in wheat

تعداد گیاهان مورد انتظار Number of expected plants	تعداد گیاهان مشاهده شده Number of observed plants	نسبت‌های دی هیبریدی Dihybrid ratios	ژنوتیپ Genotype
10.06	15	1	rrr'r'
10.06	11	1	RRR'R'
20.13	25	2	RRR'r'
20.13	13	2	RrR'R'
10.06	7	1	rrR'R'
10.06	13	1	RRr'r'
20.13	17	2	rrR'r'
40.25	45	4	RrR'r
20.13	15	2	Rrr'r'
χ^2=89.25	*P* value= 0.241		

ولی در مورد مکان‌یابی کروموزومی دو ژن مستقل کنترل‌کننده یک صفت کیفی، تحقیقات محدودی انجام شده است. پنگ و همکاران (Peng *et al*., 2008) گزارش کردند که دو ژن مغلوب کنترل نر عقیمی ژنتیکی در اثر حساسیت معکوس فتوپریودیکی در برنج را به عهده دارند. همانند بررسی‌های انجام شده توسط یائو و همکاران (Yao *et al*., 1997) وگیوئو و همکاران (Guo *et al*., 2006)، این محققین نیز با استفاده از غربال نمودن دو بالک گیاهان بسیار عقیم و گیاهان بسیار بارور با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریزماهواره موفق شدند که محل تقریبی ژن‌های کنترل کننده نرعقیمی را در برنج شناسایی کنند. در کلیه تحقیقات



شکل ۱- نقشه پیوستگی ژنتیکی ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه Sr_{Tr1} (سمت چپ) و Sr_{Tr2} (سمت راست) به‌ترتیب روی کروموزوم‌های 2BL و 6AS لاین گندم Tr129

Fig.1. Genetic linkage map of stem rusts resistance genes Sr_{Tr1} (left) and Sr_{Tr2} (right) on mapped on chromosomes 2BL and 6AS of wheat line Tr129, respectively.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

کروموزومی، بطور ناخواسته باعث اریب معنی دار در محاسبه محل ژن‌ها شده و تنها برآورد تقریبی ذکر شده عدم توجه کافی به تفکیک کلاس‌های ژنوتیپی متفاوت ولی با فنوتیپ یکسان در تهیه نقشه‌های محل هر یک از دو ژن مستقل در روی کروموزوم‌ها امکان پذیر شده است. رفیعی بروجنی و همکاران (Rafiei Boroujeni *et al*., 2011) در یک آزمایش روی یک جمعیت F_2 حاصل از رقم گندم مرودشت دو ژن مستقل مقاومت به نژاد 1-84 قارچ *Puccinia triticina* عامل زنگ قهوه‌ای گندم را شناسایی کردند. تحقیقات تکمیلی نشان داد که ژن‌های عامل مقاومت به زنگ قهوه‌ای در رقم مرودشت *Lr1* و *Lr17a* می‌باشند. با توجه به شناسایی نشانگر مولکولی اختصاصی برای ژن *Lr1* (RGA-567-5) این محققان با استفاده از این نشانگر اقدام به حذف کلیه نتاجی که حامل ژن مزبور بودند نموده و سپس نقشه ژنتیکی ژن *Lr17a* را در جمعیت باقیمانده که دارای تفرق تک ژنی برای ژن *Lr17a* بود رسم کردند.

در این تحقیق با استفاده از تجزیه هاپلوتایپی جمعیت پایه، در مرحله اول مکان‌یابی دو ژن کنترل‌کننده مقاومت به زنگ سیاه انجام شد و سپس با استفاده از هاپلوتایپ افراد F_2 و مدل‌سازی ژنتیکی محل قرار گرفتن این ژن‌ها روی کروموزوم‌های 6A و 2B گندم لاین Tr129 ترسیم شد. تحقیق بیشتر برای ترسیم نقشه پیوستگی اشباع شده هر ژن، ارزیابی جدید بودن این ژن‌ها با استفاده از آزمون قیاس ژنی (Gene postulation)، بررسی توارث احتمالی ژن‌ها از خویشاوند وحشی آژیلوپس تریانسیالیس (*Aegilops triuncialis*) و بررسی‌های دیگر روی جمعیت در حال انجام می‌باشد که در صورت تکمیل شدن در قالب گزارش دیگری منتشر خواهد شد.

استفاده از تجزیه هاپلوتایپی برای ردیابی دو QTL مرتبط با میزان آنزیم آلفاآمیلاز ناشی از دیررسی در کروموزوم‌های 3B و 7B گندم نیز گزارش شده است (McNeil *et al.,* 2009).

با استفاده از تجزیه هاپلوتایپی و مدل‌سازی، در این تحقیق طبقه‌بندی ژنوتیپ‌های مشاهده شده در کلاس‌های مورد انتظار در یک جمعیت دی‌هیبریدی انجام شد، ولی روش استفاده شده حتی قادر به تفکیک گروه‌های ژنوتیپی در جمعیت‌های تری‌هیبریدی و بالاتر نیز خواهد بود. بدیهی است شرط اساسی در تهیه مدل دقیق ژنتیکی جمعیت، فاصله ژنتیکی بسیار اندک نشانگرهای پیوسته با ژن‌های کنترل‌کننده صفت در جمعیت پایه می‌باشد، بطوری که در تهیه مدل ژنتیکی بتوان از جایگزینی ژنوتیپ نزدیک‌ترین نشانگر پیوسته به هر ژن با ژنوتیپ خود ژن بهره برد. در صورت فاصله زیاد ژن‌ها با نشانگرهای پیوسته، احتمال کراسینگ‌اور در بین ژن‌ها و نشانگرهای پیوسته مجاور افزایش یافته و طبقه بندی کلاس‌های ژنوتیپی به کلاس‌های مورد انتظار مندلی در جمعیت پیچیده‌تر خواهد شد، بنابراین احتمال برآورد غلط مکان ژن و انتخاب نادرست جمعیت جدید دارای تفرق تک ژنی دور از انتظار نیست. غربال جمعیت پایه با نشانگرهایی که حداکثر پنج سانتی مورگان از یکدیگر فاصله داشته باشند و در طول کلیه کروموزم‌های گیاه گسترده شده باشند، تضمینی برای شناسایی دقیق محل ژن‌ها در جمعیت پایه خواهد بود. استفاده از تجزیه هاپلوتایپی و مدل سازی ژنتیکی برای برآورد دقیق محل ژن‌های کنترل کننده صفات کیفی همچنین قابل تعمیم به سایر جمعیت‌های ژنتیکی از قبیل لاین‌های خالص نوترکیب و لاین‌های دابل‌هاپلوئید است.

منابع مورد استفاده

References

Agarwal, M., N. Shrivastava and H. Padh. **2008**. Advances in molecular marker techniques and their

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

applications in plant sciences. Plant Cell Rep. 27: 617–631.

Aung, T. and E. R. Kerber. **1994**. Incorporation of leaf rust resistance from wild tetraploid into cultivated hexaploid wheat. Ann. Wheat Newslet. 40: 83–84.

Doveri, S., D. Lee, M. Maheswaran and W. Powell. 2008. Molecular Markers: History, Features and Applications. *In:* C. Kole and A. G. Abbott (Eds.), Principles and Practices of Plant Genomics, 17–34. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.

Ghazvini, H., C. W. Hiebert, J. Thomas and T. Fetch. **2012a**. Development of a multiple bulked segregant analysis (MBSA) method used to locate a new stem rust resistance gene (*Sr54*) in the winter wheat cultivar Norin 40. Theor. Appl. Genet. 126: 443-449.

Ghazvini, H., C. W. Hiebert, T. Zegeye and T. Fetch. **2012b**. Inheritance of stem rust resistance derived from *Aegilops triuncialis* in wheat line Tr129. Can. J. Plant Sci. 92(6): 1037–1041.

Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin and W. M. Gelbart. **2000**. An Introduction to Genetic Analysis (7th Ed.). W. H. Freeman & Company. New York, USA.

Guo. R. X., D. F. Sun, Z. B. Tan, D. F. Rong and C. D. Li. **2006**. Two recessive genes controlling thermophotoperiod-sensitive male sterility in wheat. Theor. Appl. Genet. 112: 1271–1276.

Hiebert, C., J. Thomas and B. McCallum. **2005**. Locating the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene *Lr52* (*LrW*) to chromosome 5B by a new cytogenetic method. Theor. Appl. Genet. 110: 1453–1457.

Kosambi, D. D. **1944**. The estimation of map distances from recombination values. Annals of Eugenics 12: 172–175.

Kumar, P., V. K. Gupta, A. K. Misra, D. R Modi and B. K. Pandey. **2009**. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics. 2(4): 141-162.

McNeil, M. D., D. Diepeveen, R. Wilson, I. Barclay, R. McLean, B. Chalhoub and R. Appels. **2009**. Haplotype analyses in wheat for complex traits: tracking the chromosome 3B and 7B regions associated with late maturity alpha amylase (LMA) in breeding programs. Crop Pasture Sci. 60: 463–471.

Miller, J. M. 2013. Whole-genome mapping: a new paradigm in strain-typing technology. J. Clin. Microbiol. 51(4): 1066–1070.

Michelmore, R. W., I. Paran and R. V. Kesseli. **1991**. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 9828–9832.

Pallotta, M. A., P. Warner, R. L. Fox, H. Kuchel, S. J. Jefferies and P. Langridge. 2003. Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. *In:* Pogna, N. E., M. Romano, E. A. Pogna and G. Galerio (Eds.). Proceedings of 10th International Wheat Genetics Symposium, September 1-6, 2003. Instituto Sperimentale per la Cerealcoltura, Rome, Italy.

Peng, H. F., Z. F. Zhang, B. Wu, X. H. Chen, G. Q. Zhang, Z. M. Zhang, B. H. Wan and Y. P. Lu. **2008**.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

Molecular mapping of two reverse photoperiod-sensitive genic male sterility genes (*rpms1* and *rpms2*) in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 118: 77–83.

Rafiei Boroujeni, F., A. Arzani, F. Afshari and M. Torabi. **2011**. Identification and inheritance of leaf rust resistance genes in the wheat cultivar 'Marvdasht'. Cereal Res. Commun. 39: 67–76.

Röder, M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M. Tixier, P. Leroy and M. W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149: 2007–2023.

Schuelke, M. **2000**. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments, a poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. Nat. Biotechnol. 18: 233–234.

Sears, E. R. **1944**. Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. II. Additional chromosomal aberrations in *Triticum vulgarœ*. Genetics, 29: 237–247.

Sears, E. R. 1966. Chromosome mapping with the aid of telocentrics, p.370-381. *In:* J. MacKey (Ed.). Proc. 2nd International Wheat Genetic Symposium. Hereditas Supplementary. Vol. 2, August 18-24, 1963. Lund, Sweden.

Singh, M. P. **1967**. Monosomic analysis in wheat. Heredity, 22: 591–596.

Somers, D. J., P. Isaac and K. Edwards. **2004**. A high density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 109: 1105–1114.

Sourdille, P., S. Singh, T. Cadalen, G. L. Brown-Guedira, G. Gay, L. Qi, B. S. Gill, P. Dufour, A. Murigneux and M. Bernard. **2004**. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). Func. Integr. Genomics, 4: 12–25.

Sturtevant, A. H. **1913**. The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. J. Exp. Zoolog. 14: 43–59.

Wu, J. Y., J. Q. Ding, Y. X. Du, Y. B. Xu and X. C. Zhang. **2007**. Genetic analysis and molecular mapping of two dominant complementary genes determining resistance to sugarcane mosaic virus in maize. Euphytica, 156: 355-364.

Yao, F. Y., C. G. Xu, S. B. Yu, J. X. Li, Y. J. Gao, X. H. Li and Q. Zhang. **1997**. Mapping and genetic analysis of two fertility restorer loci in the wild-abortive cytoplasmic male sterility system of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica, 98: 183–187.

Yue, B., B. A. Vick, W. Yuan and J. Hu. **2008**. Mapping one of the 2 genes controlling lemon ray flower color in sunflower (*Helianthus annuus* L.). J. Heredity, 99: 564–567.

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]

Mapping chromosome locations of two genes independently controlling stem rust resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) using haplotype analysis and genetic modeling

Ghazvini, H.[1]

ABSTRACT

Ghazvini, H. 2018. Mapping chromosome locations of two genes independently controlling stem rust resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) using haplotype analysis and genetic modeling**. Iranian Journal of Crop Sciences. 19(4): 334-348. (In Persian).**

In spite of various methods which have been developed to identify and map quantitative trait loci (QTL) on genomes, mapping chromosome locations of two independent genes simultaneously controlling a qualitative trait in a genetic population have not been reported. In this study, F_2 population derived from a cross between RL6071 (susceptible) and Tr129 (resistant) was inoculated with spores of *Puccinia graminis* Pers. causal agents of stem rust in wheat and population was classified into resistance and susceptible groups. Phenotypic assessment of F_2 and $F_{2:3}$ populations showed that there was a 15:1 segregation ratio for stem rust resistance indicating presence of two dominant resistance genes independently controlling this trait. Four hundred twenty two SSR markers which had a good coverage for all 21 chromosomes of wheat were used to evaluate the correspondences of alleles between bulked DNA from susceptible lines with those of both parents. Markers, showing good correspondence of alleles between bulked susceptible lines with susceptible parent, were used to compare alleles of susceptible parent RL6071 with those of 161 F_2 progenies. Using segregation of alleles for SSR markers in F_2 population and genetic modeling, the presence of two dominant resistance genes independently controlling rust resistance in Tr129 was confirmed. Based on genetic analysis of data and haplotype analysis of linked markers to each gene, the stem rust resistance genes in line Tr129 were mapped on chromosomes 6A and 2B of line Tr129.

Key words: Haplotype analysis, Genetic modeling, Stem rust of wheat, SSR markers and Genetic maps

Received: August, 2017 Accepted: January, 2018

1. Associate Prof., Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: Habib_ghaz@yahoo.com)

[DOR: 20.1001.1.15625540.1396.19.4.7.9]