

ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گندم با نشانگرهای AFLP

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

خلاصه

در روش AFLP، به وسیله پلی مورفیسمی که مبتنی بر تکثیر قطعات حاوی طولهای متفاوت است می توان ارقام را از یکدیگر متمایز و روابط بین ژنوتیپهای کاملاً نزدیک را آشکار ساخت. در این تحقیق بر اساس به کارگیری نشانگرهای AFLP میزان خویشاوندی ۱۶ رقم گندم مورد بررسی قرار گرفت. نوارهای ظاهر شده بر روی ژلها از نظر حضور و عدم حضور بررسی و با تشکیل ماتریس دو دویی روابط بین ارقام توسط ضرایب تطابق ساده مورد سنجش قرار گرفت. از طریق ادغام برحسب متوسط گروه، ارقام در دو دسته با ضرایب مشابه متنوعی از ۰/۴۵۶ تا ۰/۷۷۶ دسته بندی شدند. این آزمایش نشان داد که ارقام تحت بررسی از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نبوده و گسترش پایه ژنتیکی وارثهها نیازی جدی است. با بهینه شدن روش AFLP در این تحقیق، شناسایی ژرم پلاسسمهای متفاوت، انتخاب والدین تلافیها و تخمین میزان هتروزیس در سطح مولکولی عملی می گردد. همچنین معلوم شد که AFLP قادر به ارائه نشانگرهایی است که به خوبی می تواند در انگشت نگاری ارقام گندم مفید باشد.

واژه های کلیدی: AFLP، نشانگرهای مولکولی، پلی مورفیسم، گندم.

مقدمه

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر تکثیر DNA، تسهیلاتی را در مطالعات پایه ای و کاربردی زیست شناسی مولکولی فراهم کرده است. در بین روش های ابداعی، AFLP^۱ (چند شکلی ناشی از تکثیر قطعات برش یافته به صورت انتخابی)، روش فوق العاده مطمئن و تکرارپذیری است که می تواند به آسانی در جنبه های مختلف از بیولوژی مولکولی تا به کارگیری در اصلاح نباتات و برنامه های به نژادی استفاده شود (۱).

نشانگرهای AFLP، یکی از تازه ترین ابداعات در زمینه فناوری نشانگرهای ژنتیکی است. این نشانگرها مبتنی بر RFLP^۲ هایی می باشند که پس از تکثیر انتخابی توسط واکنش زنجیره ای پلی مرز قابل رویت می گردند. در این روش پس از اتصال دنباله هایی^۳ به پایانه قطعات بریده شده توسط آنزیم های برشی (معمولاً EcoRI و MseI)، به تکثیر توسط

آغازگرهایی اقدام می شود که همولوگ با دنباله های ذکر شده می باشند. انتخابی بودن تکثیر را با افزودن نوکلئوتیدهای دلخواه به پایانه های ۳' آغازگرها به ثمر می رسانند که ضمن انتخابی کردن آغازگر از بیجیدگی فرآورده های حاصل نیز کاشته می شود (۲۶).

علاوه بر تهیه نقشه ژنتیکی، یکی دیگر از کاربردهای مهم فن AFLP، تجزیه و تحلیل های ژنوتیپی و گیاه شناسی است (۵، ۶، ۷، ۱۶، ۱۴، ۱۸ و ۲۰). به دلیل میزان بالای نواردهی و قدرت وضوح این روش می توان به اثر انگشت های ژنتیکی کاملاً اختصاصی با اطلاعات زیاد دست یافت و به تمایز گونه ها، ارقام، اکوتیپها و حتی افراد پرداخت (۱).

به کارگیری نشانگرهای مولکولی در گندم کاربرد گسترده ای در دهه گذشته داشته است. دووس و گاله (۱۹۹۲) با نشانگرهای RAPD^۴ به ارزیابی ۱۲ واریته گندم پرداختند.

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

شستشو با اتانول ۷۰ درصد و خشک کردن، DNA استخراج شده در ۳۰۰ میکرولیتر TE^۵ (تریس ۱۰ میلی مول و EDTA ۰/۱ میلی مول) 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 سانتی گراد عبارت بود از ۲/۵ میکرولیتر بافر راکنش ۵ برابر، ۰/۲۴ میکرولیتر آنزیم برشی *EcoRI* (۱۰ واحد در میکرولیتر)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم برشی *MseI* (۴ واحد در میکرولیتر)، ۳/۱۸ میکرولیتر آب و ۶ میکرولیتر DNA الگو (۲۰ نانوگرم 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 سانتی گراد عبارت بود از ۱۲/۵ میکرولیتر DNA هضم شده، ۱۲ میکرولیتر محلول اتصال دنباله^۶، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم لیگاز^۷ T₄، ۰/۱۲۵ میکرولیتر *EcoRI* (۱۰ واحد در میکرولیتر) و ۰/۳۱۳ میکرولیتر آنزیم *MseI* (۴ واحد در میکرولیتر). بلافاصله پس از اتمام اتصال، برای غیر فعال کردن آنزیم‌های موجود در واکنش (اندونوکلاز^۸ و لیگازها) از حمام آب گرم ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید.

۳- تکثیر مقدماتی انتخابی: اجزاء حجمی واکنش ۲۰

میکرولیتری برای تکثیر مقدماتی برای هر نمونه عبارت بود از ۱۲/۳ میکرولیتر آب، ۱ میکرولیتر آغازگر انتخابی مقدماتی^۹ *EcoRI* (E، ۴۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر انتخابی مقدماتی *MseI* (M، ۴۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر، ۱/۶ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۲/۵ میلی مول)، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم تک EX^{۱۱} (۵ واحد در میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر DNA هضم و دنباله دار شده رقیق

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^۱ 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 در گندم 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، ارون ۱، مغان ۱، مغان ۲، نوید، چناب، رشید، استار، قفقاز، دیهیم، الموت ۱ و الموت ۲ در این تحقیق استفاده گردید.

استخراج DNA: استخراج DNA 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^۲ ۱۰۰ میلی مول با pH=۸، EDTA^۳ ۵۰ میلی مول با pH=۸، کلرور سدیم ۵۰۰ میلی مول و SDS^۴ 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 در حد فاصل ایزوپروپانول و نمک توسط سانتریفیوژ رسوب داده شد. پس از

5 . Tris - EDTA
6 . Adaptor Ligation Solution
7 . Ligase
8 . Endonuclease
9 . Preselective Amplification
10 . Preselective primer
11 . EX taq enzyme

1 . Sequenced - Tagged - Site Polymerase Chain Reaction
2 . Tris
3 . Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
4 . Sodium Dodecyl Sulfate

بروموفنل بلو^۳ و زیلن سیانول^۴ 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٪ پلی‌آکریل آمید تهیه شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس الکتروفورز مقدماتی (بدون نمونه‌گذاری) 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 عکس برداری 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^۵ دندروگرام مربوطه رسم گردید. روش UPGMA^۶ 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، ارونند ۱، خزر ۱ و آرادی در گروه دیگر گرد آمده‌اند. زیر خوشه

(۱:۱۰) در بافر TE، ۲۰ چرخه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز 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 آغاز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. رویت نوار smear تایید کننده انجام تکثیر مقدماتی بود. توالی آغازگر انتخابی مقدماتی E و M به صورت «۳' GACTGCGTACCAATTC ۵'» و «۳' GATGAGTCCTGAGTAA ۵'» 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*^۱ (۱۵ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر 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 آغازگر انتخابی (*MseI* (M+CAA و M+CAC) و هشت آغازگر انتخابی (*EcoRI* (E+AAA، E+AAAC، E+AAG، E+AAAT، E+ACA، E+ACC، E+ACG و E+ACT).

به طور کلی ۳۶ چرخه واکنش زنجیره‌ای پلی مرز 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 دوره‌های 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 پلی مرز، حجم مساوی تکثیر انتخابی (۱۰ میکرولیتر) از رنگ فرمامید^۱ (فرمامید ۹۶٪ EDTA ۱۰ میلی‌مول،

3. Bromophenole Blue

4. Xylene Cyanole

5. Statistical Package for Social Science

6. Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average

1. Selective Primer

2. Dye Formamide

زد (۸). گندم نان گونه‌ای آلوپلوئید است که دارای ۱۶۰۰۰ میلیون جفت باز در ژنوم (۱۷) خود است. چون حدود ۸۰٪ از ژنوم گندم نان توسط DNA تکراری^۴ اشغال شده و غالباً 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 پلیمرز در حال حاضر مبنای یک رشته از فنون مولکولی قرار گرفته که به تدریج در حال جایگزینی با سیستم‌های کلاسیک نظیر نشانگرهای ظاهری، آیزوزایم^۵ و RFLP است. روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مرز 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^۶ و AP-PCR^۷ 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 پلیمرز 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 کاملاً حساب شده‌ای برای اتصال آغازگر استفاده می‌شود و در آن

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 قبول تری است ولی از آنجا که کشور ما یکی از مراکز تنوع گندم به شمار می‌رود جستجو در جهت یافتن ژرم پلاسماهای 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 شونده‌گی صفات مهم زراعی صورت می‌گیرد ولی اطلاع از تنوع ژنتیکی والدین برای نیل به تفکیک‌های متجاوز^۱ در نتایج امری ضروری است. شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم‌ترین قدم در تهیه محصولات هیبرید است. معمولاً والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید کنند. با اینکه تشکیل گروه‌های هتروتیک^۲ بر مبنای اجزاء عملکرد و فاصله ژنتیکی^۳ 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 معمولاً 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

4 . Repeattive DNA

5 . Isozyme

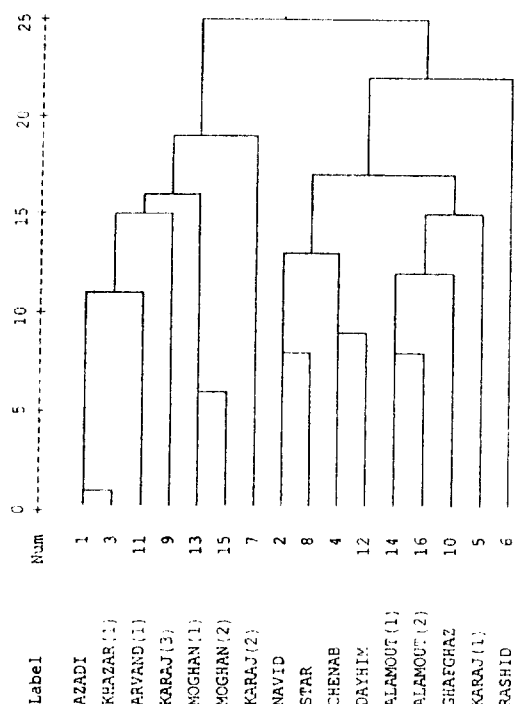
6 . DNA Amplification Fingerprinting

7 . Arbitrary - Primed PCR

1. Transgressive Segregation

2 . Heterotic Groups

3 . Genetic Distance



شکل ۳- دندروگرام ۱۶ رقم گندم بر مبنای نشانگرهای AFLP

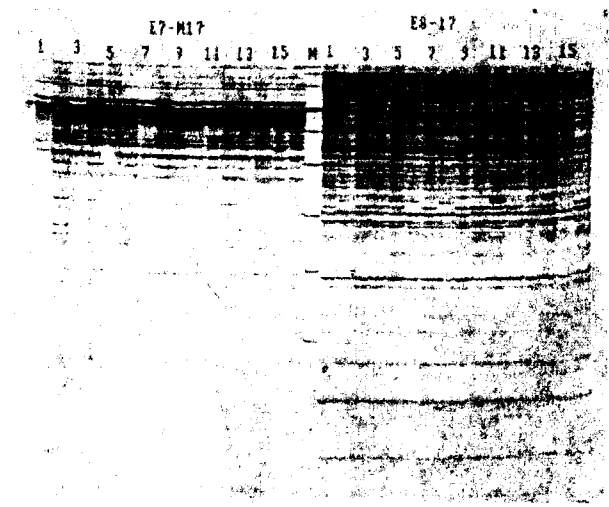
تکرارپذیری RFLP و توانمندی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با هم توأم می‌گردد.

با توجه به بهینه شدن روش AFLP در داخل کشور و همچنین اثبات کارایی 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 آینده پیدا نمود. تهیه اثر انگشت وارپته‌ای 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.

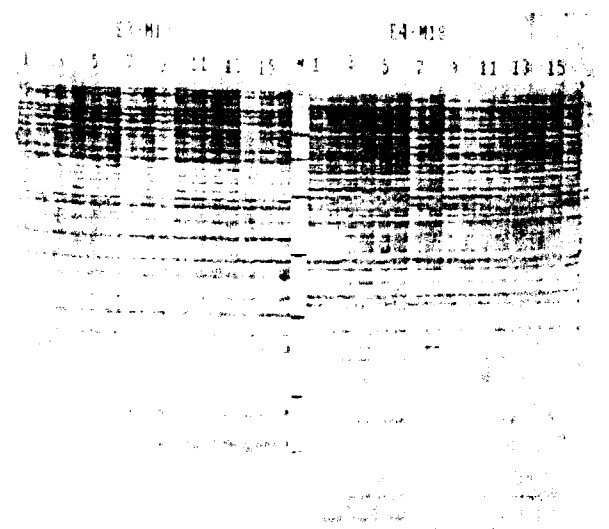
REFERENCES

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 miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.

مراجع مورد استفاده



شکل ۱- فرآورده‌های AFLP در ژنوتیپ‌های آزادی، نوید، خزر ۱، چناب، کرج ۱، رشید، کرج ۲، استار، کرج ۳، قفقاز، اروند ۱، دبهیم، 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، دبهیم، 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.

4. Devos, K. M. and M. D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in 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. Comparison of outbreak and non – outbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1519-1525.
6. Folker, R., J. Rouppe, K. De Groot, 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 annuus* 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 effects 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. Rouppe, 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. Falbert, 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.

Evaluation of Genetic Variation Among Wheat Cultivars Using AFLP Markers

B. E. SAYED- TABATABAEI¹ AND

A. A. SHAHNEJAT- BUSHEHRI²

**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 genetic 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.