مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۸۲ (۴۶-۳۹)

مکان یابی ژن مقاومت MLP با استفـاده از مارکرهای نیمه خودکار (فلورسنت) AFLP وSSR

محمدرضا نقوی[۱]، کنتور بیکر[۲]، احمد جاهور[۳]، بهمن یزدی صمدی[٤] و محمدرضا قنادها[٥]
۱، ٤، ٥، استادیار، استاد و دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
۲، ۳، استادان بخش بیولوژی و بیوشیمی موسسه تحقیقات ملی ریسو دانمارک
تاریخ پذیرش ۸۱/٤/٥

خلاصه

به منظور مکان یابی ژن مقاومت MLP بر روی کروموزومهای جو، ۹۲ خانواده F_3 تلاقی pallas × (5A × D7B) نسبت به ایزوله سفیدک سطحی مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس با استفاده از مارکرهای نیمه خودکار AFLP وSSR در توالی یاب DNA از نوع ABI prism 377 بررسی گردیدند. تعداد ۹۹ ترکیب پرایمری AFLP و ۶۳ ترکیب پرایمری SSR در تکنیک تجزیه تفرق بالک به منظور تعیین پلی مورفیسم بین والدین و بالک ها مورد غربال اولیه قرار گرفتند. نتایج غربال اولیه ترکیبات پرایمری AFLP وSSR به ترتیب مشاهده ۳ و ۱ درصد پلی مورفیسم بین والدین بود. مارکر AFLP با نام (۱۲۴) M۵۰- E۳۸ و مارکر SSR با نام Bmac ۳۱۶. تفرق همزمان را با ژن MLP بر روی کروموزم شماره ۶ نشان دادند. نتایج تفرق این دو مارکر به ترتیب با نسبت های ۳:۱ و ۱:۲:۱ توافق داشت. همچنین تفرق ۱:۲:۱ ژن MLP در خانواده های F۳ پیوستگی این دو مارکر با ژن MLP را مورد تائید قرار داد.

واژه‌های کلیدی: **AFLP، SSR، توالی یاب DNA ، تجزیه تفرق بالک، خانواده های F۳.**

مقدمه

در سالهـای اخیر از انواع مختلفـی از مارکرهای مولکولی برای مطالعات ژنتیکی استفاده می‌گردد، چنانکه به کارگیری مارکرهای مولکولی به همراه تکنیک تجزیه تفرق بالک و روشهای نیمه خودکار تعیین اندازه و توالی قطعات DNA تا حد بسیار زیادی مطالعات مولکولی را آسان نموده است انتخاب تکنیک انگشت نگاری مناسب DNA بستگی به هدف، امکانات و نوع مواد آزمایشی مورد استفاده دارد.

تکنیک‌هایAFLP[۱] وSSR[۲] بدلیل مقدار بالای چند ترکیبی، از جمله تکنیک‌هایی هستند که برای مکان‌یابی و شناسایی ژنهای مختلف در موجودات زنده به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲). چند ترکیـبی فرایندگی است که توسط آن می‌توان مقدار زیادی از مکانهای ژنی یا آلل‌ها را به طور همزمان در هر آزمایش تجزیه نمود.

تکنیکAFLP بر اساس برش DNA ژنومی با دو نوع آنزیم برشی، اتصال قطعات برش داده شده با آداپتورهای مناسب و تکثیر PCR قطعات DNA استوار است. در این تکنیک از سه نو کلئوئید انتخابی در انتهای ۳ پرایمرها به منظور کاهش در تعداد قطعات تکثیری در مرحله تکثیر انتخابی استفاده می‌گردد. این تکنیک از کارایی، تکرار پذیری و قابلیت اطمینان بالایی برخوردار بوده و تحت تاثیر پارامترهای تکثیری PCR قرار نمی‌گیرد (۱۵). میکروساتلایت‌ها یا مارکرهای SSR توالیهای تکراری ساده‌ای می‌باشند که در بیشتر ژنوم یوکاریوتها و پروکاریوتها دیـــده می‌شوند (۲). این مارکرها خاص یک مکان ژنی بوده و به صورت هم بارز توارث می‌یابند (۹). همچنین این مارکرها علاوه بر تنوع آللی بالایی که نشان می دهند در کل

1 . Amplified fragment length polymorphism
2 . Simple sequence repeats

مکاتبه کننده: محمدرضا نقوی

ژنوم پراکنده می باشند (۲). اگر چه هزینه استفاده از این نوع مارکرها زیاد می باشد. ولی بواسطه پتانسیل بالای آنها در تشخیص پلی مورفیسم و هتروزیگوسیتی در یک گونه به فور در موجودات زنده استفاده می‌شوند. تاکنون بیش از ۶۷۰ مارکر میکروساتلایت بر روی کروموزمهای جو شناسایی گردیده است (۱، ۱۰).

به کارگیری تکنیکهایAFLP وSSR در سیستمهای نیمه خودکار مانند توالی یاب DNA از نوع ABI Prism 377 نه تنها بواسطه تزریق سه نمونه DNA مختلف در هر چاهک، باعث صرفه جویی در زمان و هزینه می گردد، بلکه به واسطه در نظر گرفتن یک اندازه استاندارد داخلی برای هر چاهک، تنوع پذیری در مهاجرت قطعات DNA از یک چاهک به چاهک دیگر و یا از یک ژل به ژل دیگر حذف می گردد.

توالی یاب ABI Prism 377 دارای نرم افزارهای Seqecncer, Genotyper, Genescan جهت تعیین اندازه و توالی یابی قطعات DNA به صورت نیمه خودکار می باشد.

در سالهای اخیر از این تکنیک ها برای شناسائی و مکان یابی ژنها مقاومت به بیماریهای مختلف در گیاهان استفاده گردیده است (۹ و ۱۰). در حقیقت شناسایی مارکرهای مولکولی پیوسته با ژنهای مقاومت یک فاکتور کلیدی برای تشخیص دقیق تر و بهتر ژنهای مقاومت و تعیین اثرات متقابل بین میزبان و پاتوژن می باشد.

بیماری سفیدک سطحی جو که عامل آن *Erysiphe graminis* D. C. f. s p. *hordei* می باشد، از جمله بیماریهای است که تاکنون مطالعات زیادی در مورد آن صورت گرفته است و تعداد زیادی ژن (یا آلل) برای مقاومت به این بیماری مکان یابی گردیده است. از جمله این ژنها MIK, Mla بر روی کروموزوم شماره ۵ Mlo, Mlg, بر روی کروموزوم شماره ۴، MILa بر روی کروموزوم شماره ۲، Mlh بر روی کروموزوم شماره ۶، Mlj بر روی کروموزوم شماره ۷ و Mlf بر روی کروموزوم شماره ۱ می باشند (۵و۱۲). همچنین مارکرهای مولکولیRFLP[1] نزدیک به این مکانهای ژنی نیز شناسایی گردیده است (۱۲). ژنهای Mla و Mlo از جمله اولین ژنهای مقاومت به بیماری هستند که در دو سال اخیر ایزوله، توالی یابی و کلون گردیده اند (۱۳، ۱۶). هدف از این تحقیق مکان یابی ژن MLP (ژن مقاومت به سفیدک سطحی جو) بر روی کروموزوم های جو با استفاده از مارکرهای نیمه خودکار SSR, AFLP و بکارگیری تکنیک تجزیه تفرق بالک می باشد. ژن Mlp از جمله ژنهای مقاومت به سفیدک سطحی جو است که مکان آن بر روی کروموزوم های جو دقیقاً مشخص نشده است.

مواد و روشها

در این تحقیق به منظور مکان یابی ژن Mlp بر روی کروموزومهای جو با استفاده از مارکرهای مولکولی SSR, AFLP و به کمک توالی یاب DNA از نوع ABI prism از ۹۲ خانواده F ۳ تلاقی Pallas ×(D7B×5A) استفاده گردید. والد Pallas یک رقم حساس نسبت به ایزوله سفیدک سطحی جو با نام 184-24 و والد D7B ×5A اینبرد نوترکیب نسل نمونه ای از *Hordeum spontaneum* می باشند (۴) و نسبت به این ایزوله مقاوم می باشد.

الف- ارزیابی خانواده های F۳

تعداد ۹۲ خانواده F۳ حاصل از تلاقی Pallas ×(D7B ×5A) به همراه والدین در واحدهای آزمایشی (گلدانهای) با قطر ۱۵۰ سانتی متر در گلخانه بیماریهای موسسه تحقیقات ریسودانمارک کشف گردیدند. برای هر خانواده یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد و در هر واحد آزمایشی ۱۰ بذر کشت گردید. هفت روز پس از کاشت برگ اول هر گیاه را جدا نموده و در پتریدیشهای حاول آگار قرار گرفتند. به منظور آلودگی مصنوعی برگهای بریده شد از ایزوله 184-21 استفاده شد. والدین Pallas و(D7B×5A) به ترتیب نسبت به این ایزوله عکس العمل بیماریزایی و عدم بیماریزایی نشان می دادند. هفت روز پس از آلودگی، تیپ آلودگی گیاهان بر اساس مقیاس ۰ (کاملاً مقاوم) تا ۴ (کاملاً حساس) Trope و همکاران (۱۹۷۹) یادداشت گردید. جهت شناسایی گیاهان حساس و گیاهان مقاوم، تیپ های آلودگی ۰، ۱، و۲ به عنوان عکس‌العمل مقاومت و تیپ‌های آلودگی ۳ و ۴ به عنوان عکس‌العمل حساسیت در نظر گرفته شد.

1 . Restriction Fragment Length Polymorphism

ب- تجزیه تفرق بالک (BSA)[1]

به منظور شناسایی مارکرهای AFLP و SSR پیوسته با ژن MLP از تجزیه تفرق بالک (BAS) استفاده گردید. ابتدا DNA خانواده ها و گیاهان داخل خانواده براساس پروتکل تغییر یافته CTAB (۱۱) استخراج گردیده و سپس از مخلوط DNA مربوط به ۸ خانواده کاملاً مقاوم (کلیه گیاهان در هر خانواده عکس العمل ۰ یا ۱) و ۸ خانواده کاملاً حساس (کلیه گیاهان در خانواده های حساس با عکس العمل ۴) به ترتیب بالکهای مقاوم و حساس ایجاد گردید بالک های DNA شامل مخلوط DNA گیاهان داخل و بین خانواده بودند وارزیابی بالک ها و خانواده های F۳ با ترکیبات پرایمری AFLP و SSR در توالی یاب DNA از نوع ABI prism صورت گرفت.

ج- تکنیک SSR یا میکروساتلایت

در این تکنیک از ۶۳ ترکیب پرایمری SSR مخصوص جو جهت غربال اولیه در بالک های مقاوم و حساس استفاده گردید. از دو پرایمر هر ترکیب پرایمری یکی از آنها در انتهای ۵ خود با رنگهای فلورسنت FAM (آبی)، TET (سبز)، HEX (زرد یا سبز بسته به نوع فیلتر مورد استفاده) و NED (زرد) جهت شناسائی در ABI prism نشاندار شده بودند. ترکیبات پرایمری علاوه بر نوع رنگ نشاندار، از نظر توالی، تعداد جفت باز، درجه حرارت مرحله اتصال، تکرار موتیف، نوع کروموزم و مقدار $Mgcl_2$ مورد نیاز با همدیگر متفاوت بودند. پروفیل PCR مورد استفاده شامل دناتوره کردن به مدت ۶۰ ثانیه در ۹۴، اتصال به مدت ۶۰ ثانیه در ۵۰° c، ۵۵°c یا ۶۰°c (بسته به نوع ترکیب پرایمری) و توسعه به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ °c در ۳۵ سیکل انجام گرفت. پس از ارزیابی کلیه ترکیبات پرایمری در والدین و بالک های حساس و مقاوم، از ترکیبات پرایمری که در غربال اولیه پلی مورفیسم بین دو بالک را نشان داده بودند جهت تائید تفرق همزمان ژن و مارکر در ۹۲ خانواده۳ F مورد ارزیابی قرار گرفتند.

د – تکنیک AFLP

در این تکنیک در مرحله تکثیر قبل از انتخاب از دو پرایمر MseI, EcoRI قبل از مرحله انتخاب که به ترتیب دارای باز انتخابی A و C در انتهای ′۳ بودند استفاده گردید. در واکنش مرحله انتخابی از ۹۹ ترکیب پرایمری EcoRI, MseI استفاده شد. هر یک از پرایمرهای مرحله انتخابی دارای سه باز انتخابی در انتهای ′۳ بودند، همچنین پرایمرهای EcoRI در انتخاب ′۵ خود با رنگهای فلورسنت FAM (آبی)، JoE (سبز) و یا NED (زرد) جهت ارزیابی در ABI prism 377 نشاندار شده بودند. پروفیل PCR مورد استفاده برای مرحله انتخابی شامل دناتوره کردن به مدت ۲۰ ثانیه در ۹۴°c ، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در ۶۵ °c و توسعه به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ °c برای ۹ سیکل و پس از آن دناتوره کردن به مدت ۲۰ ثانیه در ۹۴°c ، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در ۵۶ °c و توسعه به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ °c برای ۲۲ سیکل انجام گرفت. پس از ارزیابی کلیه ترکیبات پرایمری AFLP در والدین و بالک ها، از ترکیباتی که بین والدین و بالک ها، پلی مورفیسم نشان داده بودند، جهت تائید تفرق همزمان ژن و مارکر در ۹۲ خانواده F۳ تلاقی (D7B×5A)× Pallas مورد ارزیابی قرار گرفتند.

هـ – تجزیه نتایج

به منظور تعیین اندازه قطعات DNA و نمره دهی قطعات از برنامه‌های Genotyper وGenescan استفاده گردید. در نهایت نتایج به صورت یک فایل ASCII شده به برنامهMapmaker منتقل شدند. در نرم افزار Mapmaker از LOD=۳ و از فاصله ژنتیکی ۵۰ سانتی مورگان به عنوان بیشترین فاصله ژنتیکی استفاده شد. فاصله ژنتیکی بین مارکرها و ژن مقاومت MLP از طریق روش Kosambi (۷) تخمین زده شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج عکس العمل ۹۲ خانواده F۳ تلاقی (D7B×5A)× Pallas را نسبت به ایزوله 184-24 را نشان می‌دهد. تعداد خانواده هموزیگوس مقاوم، هتروزیگوس مقاوم و هموزیگوس مغلوب به ترتیب برابر ۲۳، ۴۴، ۲۵ می باشد. که با نسبت مورد انتظار ۱:۲:۱ بر طبق آزمون کای اسکور مطابقت دارد. این نسبت وجود ژن MLP را در والد D7B×5A مورد تائید قرار می دهد. همچنین نتایج تفرق خانوادههای F۳ وجود ژنهای اختصاصی را در اینبرد لاین های نو ترکیب نسل F۷ نمونه های *Hordeum spontancum* که توسط مطالعات قبلی گزارش شده بود را مورد تائید قرار می دهد (۴).

1 . Bulked Seqregant Analysis

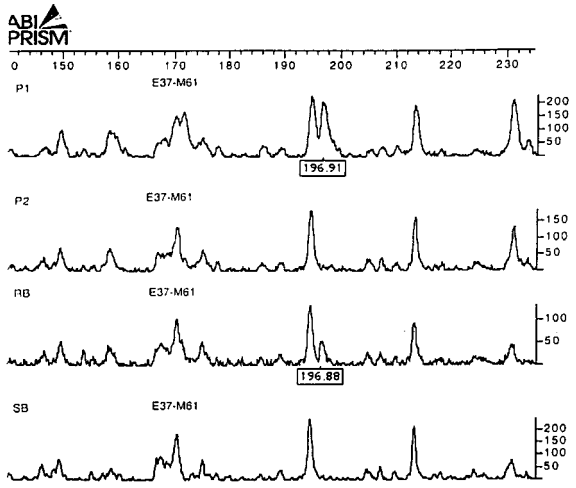
جدول ۱- تجزیه تفرق ژن و مارکرهای AFLP و SSR در جمعیت F3 در تلاقی Pallas × (D7B × 5A)

ژن یا مارکر	تعداد مشاهده شده			تعداد کل	نسبت مورد انتظار	X^2
	مشابه والد مقاوم	هتروزیگوس	مشابه والد حساس			
MLP	۲۳	۴۴	۲۵	۹۲	۱:۲:۱	۰/۲۶
E۳۸-M ۵۰(۱۲۴)	۶۷	—	۲۵	۹۲	۳:۱	۰/۲۳
E۳۷-M ۶۱(۱۹۷)	۸۲	—	۱۰	۹۲	۳:۱	۹/۷۸**
Bamc. ۳۱۶	۲۱	۴۴	۲۷	۹۲	۱:۲:۱	۰/۹۵

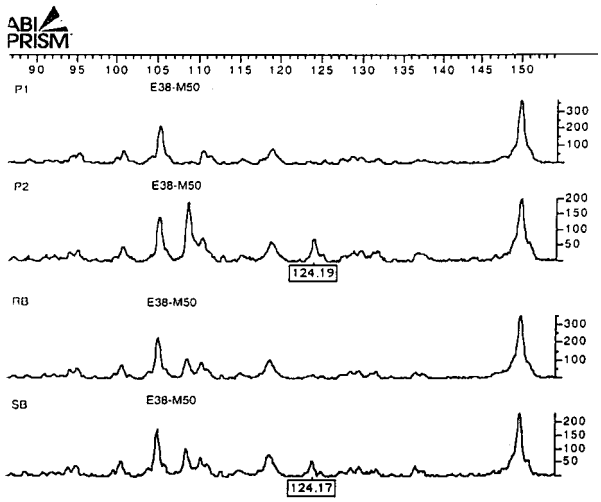
** معنی دار در سطح ۱ درصد

از ۹۹ ترکیب پرایمری E۳۲ - M۶۱ مورد استفاده در کل ۷۹۰۰ نوار (پیک) نمرده دهی گردید که از این تعداد تنها ۲۴۵ نوار (۳ درصد) در بین والدین پلی مورفیسم بودند. بیشترین مقدار پلی مورفیسم مشاهده شده در بین دو والد مربوط به ترکیب پرایمری E۳۲ - M۶۱ با ۱۱ باند پلی مورفیک و کمترین آن مربوط به ترکیب پرایمری E۴۰ -M ۴۸ با ۱ نوار پلی مورفیک بود. نتایج غربال اولیه ترکیبات پرایمری AFLP شناسایی دو ترکیب پرایمری E۳۷ - M۶۱ وE۳۸ - M۵۰ بودند که به ترتیب در قطعات DNA به اندازه های ۱۹۷ و ۱۲۴ جفت باز دربین والدین و بالک ها پلی مورفیسم نشان می دادند. نمایش الکتروفوروگرم این ترکیبات پرایمری در دو والد و بالک های مقاوم و حساس در شکلهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. ترکیب پرایمری E۳۷ - M۶۱ در والد مقاوم D7B ×5A و بالک مقاوم (RB) وجود پیک (نوار) و در والد حساس (Pallas) و بالک حساس (SB) عدم وجود پیک را در قطعه DNA باندازه ۱۹۷ جفت باز نشان می دهد. از این رو مارکر (۱۹۷) M۶۱ - E۳۷ می تواند به صورت بالقوه با ژن MLP در فاز جفت لینکاژ داشته باشد. در صورتیکه ترکیب پرایمری در E۳۸-M۵۰ در والد مقاوم و بالک مقاوم عدم وجود پیک و در والد حساس وجود پیک را در قطعه DNA باندازه ۱۲۴ جفت باز نشان می دهد. در نتیجه مارکر (۱۲۴) E۳۷ -M ۵۰ می تواند به صورت پتانسیل با ژن MLP در فاز ناجفت لینکاژ داشته باشد.

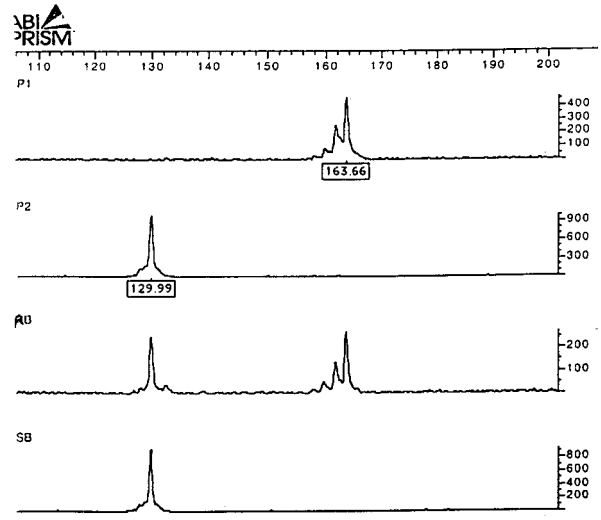
همچنین در استفاده از ۶۳ ترکیب پرایمری SSR تنها ۶ ترکیب پرایمری (۱ درصد) بین دو والد پلی مورفیسم نشان دادند و از این ۶ ترکیب تنها یک ترکیب پرایمری (مارکر) ۳۱۶ Bmac. در بین بالک های پلی مورفیک بود. شکل ۳ الکتروفورگوم مارکر Bmac.۳۱۶ را در والدین و بالک ها نمایش می دهد. والد مقاوم P۱ (D7B×5A) و والد حساس P۲ (Pallas) به ترتیب در قطعات DNA باندازه های ۱۶۳ و ۱۳۰ جفت پازپلی مورفیسم نشان می دهند. الگوی الکتروفورگرم در بالک مقاوم (RB) شامل هر دو قطعه DNA باندازه های ۱۶۳ و ۱۳۰ جفت باز می باشد، در صورتیکه الگوی الکتروفورگرم در بالک حساس مشابه والد حساس (P ۲) می باشد. مشاهده هتروزیگوسیتی (وجود هر دو قطعه DNA) در بالک مقاوم بیانگر حداقل وجود یک فرد هتروزگوس در این بالک می باشد. نتایج الگوهای الکتروفورگرم بیانگر این است که مارکر ۳۱۶. Bmac پتانسیل آن را دارد که با ژن MLP پیوستگی داشته باشد. کم بودن مقدار پلی مورفیسم بین دو والد برای هر دو نوع ترکیب پرایمری AFLP و SSR بیانگر نزدیکی والدین نسبت به همدیگر می باشد. مطالعات قبلی انجام شده بر روی جو با استفاده از ترکیبات پرایمری AFLP و SSR مقدار پلی مورفیسم بیشتری را گزارش کرده بودند (۲، ۱۰).



شکل ۱- نمایش الکتروفورگرم ترکیب پرایمری E۳۷-M ۶۱ در والد مقاوم D7B × 5A(P۱) والد حساس Pallas (P2)، بالک مقاومت (RB) و بالک حساس (SB). در اندازه DNA حدود ۱۹۷ جفت باز والد مقاوم وجود پیک ولی والد حساس و بالک حساس عدم وجود پیک را نشان میدهند. پیکها بیانگر قطعات DNA و درجه بندی افقی و عمودی به ترتیب بیانگر اندازه قطعات (جفت باز) و شدت سیگنالها را نشان می دهند.



شکل ۲- نمایش الکتروفورگرم ترکیب پرایمری ۵۰ E۳۸-M در والد مقاوم B7B × 5A (P۱) والد حساس Pallas (P2)، بالک مقاومت (RB) و بالک حساس (SB). در اندازه DNA حدود ۱۲۴ جفت باز والد مقاوم وجود پیک ولی والد حساس و بالک حساس عدم وجود پیک را نشان میدهند. پیکها بیانگر قطعات DNA و درجه بندی افقی و عمودی به ترتیب بیانگر اندازه قطعات (جفت باز) و شدت سیگنالها را نشان می دهند.



شکل ۳- نمایش الکتروفورگرم مارکر Bmaco316 در والد مقاوم 5A × B7B (P۱) والد حساس Pallas (P2)، بالک مقاومت (RB) و بالک حساس (SB). در قطعات DNA به اندازه های ۱۶۳ و ۱۳۰ جفت باز به ترتیب والد مقاوم وجود پیک ولی والد حساس و بالک حساس عدم وجود پیک را نشان میدهند. بالک مقاوم دارای هر دو قطعه DNA ولی بالک حساس تنها دارای اندازه قطعه ۱۳۰ جفت باز می باشد.پیکها بیانگر قطعات DNA و درجه بندی افقی و عمودی به ترتیب بیانگر اندازه قطعات (جفت باز) و شدت سیگنالها می باشند.

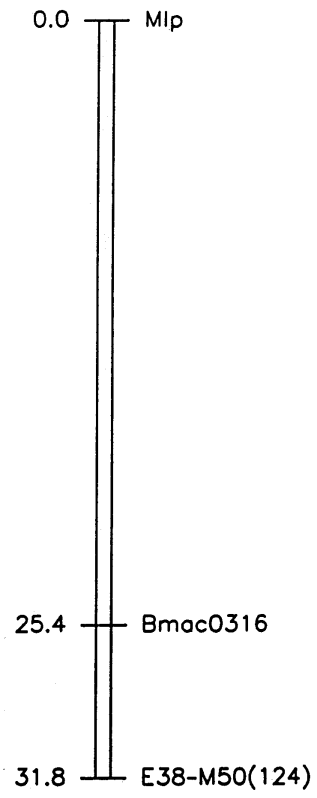
دو ترکیب پرایمری AFLP با نامهای ۶۱ E۳۷-M ۵۰-M- E۳۸ و ترکیب پرایمری SSR با نام Bmac.۳۱۶ که با ژن مقاومت MLP در لاین اینبرد نو ترکیب D7B×5A به طور پتانسیل پیوستگی نشان داده بودند در ۹۲ خانواده F۳ تلاقی (D7B×5A) × Pallas به منظور تائید تفرق همزمان ژن و مارکرها مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج تفرق مارکرهای AFLP و SSR توافق نسبت های ۳:۱ و ۱:۲:۱ را به ترتیب برای مارکرهای (۱۲۴) ۵۰ E۳۸-M و Bmac.۳۱۶ نشـــان می دهد. از آنجائیکه ژن MLP نیز دارای تفرق ۱:۲:۱ در خانواده‌های F۳ می باشد. از این رو میتوان نتیجه گرفت که این دو مارکر با ژن مقاومت MLP تفرق همزمان نشان می دهند. در صورتیکه مارکر (۱۹۷) ۶۱ E۳۷-M با نسبت ۳:۱ اختلاف معنی داری را نشان می دهد (جدول۱). از این رو انتظار می رود که در ترسیم نقشه پیوستگی این مارکر با ژن MLP پیوستگی نداشته باشد. مشاهده پلی مورفیسم مارکری در بالک ها و عدم تفرق همزمان مارکر با ژن در مطالعه قبلی برای مارکر AFLP گزارش شده است(۸).

محل قرار گرفتن ژن مقاومت MLP نسبت به مارکرهای (۱۲۴)۵۰ E۳۸-M و ۳۱۶ .Bamc در شکل ۴ نشان داده شده است. بر طبق این نقشه مارکرهای (۱۲۴)۵۰ E۳۸-M و ۳۱۶ .Bamc به ترتیب با فاصله های ۳۱/۸ و ۲۵/۴ سانتی مورگان از ژن مقاومت MLP فاصله دارند. اگرچه هر دو مارکر در فاصله نزدیک نسبت به ژن مقاومت قرار ندارند ولی بواسطه هم بارز بودن مارکر ۳۱۶ .Bamc و همچنین پیوستگی مارکر (۱۲۴) ۵۰ E۳۸-M با ژن مقاومت در فاز ناجفت هر دو مارکر از اهمیت خاصی برخوردار می باشند. مارکرهایی که در فاز ناجفت نسبت به ژن مقاومت قرار دارند در مقایسه با مارکرهایی که در فاز جفت هستند جهت انتخاب غیر مستقیم ژن مقاومت از اهمیت بیشتری برخوردارند اگر چه مقدار نوترکیبی بین ژن مقاومت و مارکر در فاز جفت به ۹۲ درصد برای مارکر در فاز ناجفت و همچنین به ۹۵ درصد برای مارکر هم بارز ثابت شده است (۳).

از آنجائیکه مکان مارکرهای میکروساتلایت بر روی کروموزومهای مشخص بوده و به اصطلاح خاص ژنومی می‌باشند از این رو می‌توانند برای مکان یابی ژنهای مختلف مورد استفاده

قرار گیرند (۱۱) بر طبق نقشه میکروساتلایت ها در جو که بوسیله رامسی و همکاران (۲۰۰۰) منتشر شده است مارکر میکروساتلایت Bamc. ۳۱۶ بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۶ قرار دارد، همچنین این نقشه محل مارکر (۱۲۴)۵۰ E۳۸-M را بر روی بازوی کروموزم ۶ تعیین نموده است. از این رو می توان نتیجه گرفت که ژن مقاومت MLP در اینبرد نوترکیب D7B×5A به احتمال زیاد بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۶ قرار دارد.

اگر چه در این مطالعه از ۹۹ ترکیب پرایمری AFLP و ۶۳ ترکیب پرایمری SSR مورد استفاده در تکنیک تجزیه تفرق بالک در نسل F۳ تلاقی Pallas × (D7B × 5A) تنها دو مارکر با ژن مقاومت MLP تفرق همزمان نشان دادند ولی مسلماً با بررسی ترکیبات پرایمری دیگر امکان شناسائی مارکرهای بسیار نزدیک به این ژن وجود خواهد داشت. مطالعه قبلی انجام شده در سال ۱۹۸۷ از طریق روشهای تجزیه جمعیت های F ۲ نشان داده بود که ژن MLP بر روی کروموزم شماره ۵ قرار دارد (۴). درصورتیکه در این تحقیق مکان ژن MLP بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۶ تعیین می گردد. از آنجائیکه مارکرهای SSR خاص ژنوم می باشند (۱۱) مسلماً نتایج این تحقیق بسیار دقیق تر از روشهای جمعیت های F ۲ و عدم استفاده از مارکرهای مولکولی در مکان یابی ژن می باشد.



شکل ۴- فاصله مارکرهای مولکولی AFLP و SSR نسبت به ژن MLP بر روی بازوی بلند کروموزم ۶(۶H). فواصل ژنتیکی بر حسب سانتی مورگان در سمت چپ و مارکرهای مولکولی در سمت راست گروه لینکاژی نشان داده شده اند.

REFERENCES

1. Becker, J., V. Pieter, M. Kuiper, F. Salamini & M. Heun (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol Gen Genet 249: 65-73.
2. Becker, J. & M. Heun (1995) Barley microsatellites: allel Variation and mapping. Plant Moccular Biology 27: 835-845.
3. Haley, S. D., L. Afanador & J. D. Kelly (1994) Selection for monogenic pest resistance traits With coupling – and repulsion- phase RAPD markers. Crop Sci 34: 1061-1066.
4. Jahoor, A. & G. Fischbeck (1987) Localization of resistance genes against powdery mildew in *Hordeum spontaneunt* c. Koch . Barley Genetics V: 679- 683.
5. Jorgensen, J. H. (1994) Genetics of powdery mildew resistance in barley, CRC Critical Reviews in Plant Sciences 13: 97-119.
6. Kjaer, B., H. P. Jensen, J. Jensen & J. H. Jorgensen (1990). Associations between three *ml-o* powdery mildew resistance genes and agronomic traits in barley. Euphytica 46: 185-193.
7. Kosambi, D. D. (1944). The estimation of map distances from recombination values. Ann Euges. 12: 172-175.
8. Li, X., H. J. Vaneck, J. N. A. M. Rouppevan. D. J. Huigen. P. Stam & E. Jacobsen. 1998. Autotetraploid and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele confering resistance to phytophthora infestans mapped on potato chromosome 4. Theor Appl Genet 96: 1121-1128.

9. Powell. W., G. C. Machray & J. Provan. 1996. Polymorphism rovealed by simple sequence repeats. Trends Plant Sci. 1: 215-222.
10. Ramsay. L., M. Macaulay. S. Degliivanissevich. K. Maclean. L. Cardle. J. Fuller. K. J. Edwards. S. Tuvesson. M. Morgante. A. Massari. E. Maestri, N. Marmiroli. T. Sjakste. M. Ganal. W. Powell & R. Waugh. 2000. A simple sequence repeat – based linkage map of barley. Genetics 156: 1997-2005.
11. Saghai Marrof. M. A., R. M. Biyashev. G. P. Yang, Q. Zhang & R. W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Speciees diversity, Chromosom locations, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5466-5470.
12. Schonfeld, M., A. Ragni. G. Fischbock & A. Jahoor. 1996. RFLP mapping of three new loci for resistance genes to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*) in barley. Theor Appl Genet. 93: 48-56.
13. Simons, G., T. Vanderlee, P. Diergaarde, R. Vandaclen, J. Groenedijk, A. Frijters, R. Buschges, K. Hollrichers. S. Topsch, P. Schulze-Lefert, F. Salamini, M. Zabeau & P. Vos. 1997. AFLP – based fine mapping of the MLO gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. Genomics 44: 61-70.
14. Trop, J., H. P. Jensen & H. J. H. Jorgensen. 1978. Powdery mildew resistance genes in 106 northwest European spring barley variaties. Kgl Vet-og Landbohysk Arsskr 1978: 75-102.
15. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vandelee, M. Hornes, A. Frijters, J. Plot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting Nucleic Acids Res. 21: 4407-414.
16. Wei. F., K. Gobleman – Werner, S. M. Morroll, J. Kurtth, L. Mao, R. Wing & D. Leister. 1999. The Mla Powdery mildew resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240 –kb DNA interval on chromosome 5S (1HS) of barley. Genetics 153: 1929-1948.

Localization of Mlp Resistance Gene Using Semi-Automated (Flourescent) AFLP and SSR Markers

M. NAGHAVI[1], K. BAKER[2], A. JAHVAR[3], B. YAZDI-SAMADI[4] AND M. R. GHANNADHA[5]

1, 4, 5, Assistant Professor, Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture,University of Tehran 2, 3, Professors of Biology and Biochemistery Dept, RISO, Denmark

Accepted June, 26, 2002

SUMMARY

In order to localize Mlp (a powdery mildew resistance gene) on barley, 92 F3 families of D7B×5A Pallas cross were evaluated for their resistance to powdery mildew. Semi- automated AFLP and SSR techniques, with ABI prism 377 DNA sequencer were applied to genotype these families. Ninety nine AFLP and 63 SSR primer combinations were employed to recognize the polymorphism between the parents through bulked segregant analysis (BSA). AFLP and SSR primer combinations showed 1 and 3 percent polymorphism between parents, respectively. One AFLP marker, E38- M50 (124), and one SSR marker, Bmac 0316, were found to be associated with Mlp gene on the long arm of chromosome 6. The segregation ratio 3:1 and 1:2:1 for AFLP and SSR markers respectively and the ratio 3:1 for Mlp gene on F3 population verified the co- segregation between Mlp and molecular markers.

Key words: AFLP, SSR, DNA sequencer, Bulked, Segregant analysis, F_3 family, Barley powdery mildew.