"مجله علوم زراعی ایران"
جلد ۱، شماره ۱، ۱۳۷۷

استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD و RFLP برای تعیین محل کروموزومی ژن‌های کنترل کنندهٔ تحمّل به بُر در نخود فرنگی (*Pisum sativum* L.)

Chromosmal localization of genes mediating tolerance to boron in pea (*Pisum sativum* L.) using molecular markers

عبدالرضا باقری[۱]، جَی پاوول[۲] و اَی. جَی. راتجین[۳]

چکیده

مسمومیت ناشی از غلظت زیاد بُر در بعضی از اراضی مناطق خشک سبب کاهش تولیدات زراعی می‌گردد. تنوع ژنتیکی برای تحمّل به بُر در تعدادی از گیاهان از جمله نخود فرنگی وجود دارد. توارث تحمّل به بُر در این گیاه تحت کنترل ژن‌های بزرگ مندلی با اثر افزایشی می‌باشد و تفکیک ژنتیکی حاصل از تلاقی بین رقم نسبتاً متحمّل Alma با لاین متحمّل SA 310، تفکیک در سطح یک مکان ژنی را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر تعیین پیوستگی بین ژن متحمّل به بُر با مارکرهای مولکولی RAPD وRFLP و امکان استفاده از این مارکرها در برنامه‌های به نژادی برای انتقال آلل متحمّل به واریته‌های حساس مورد بررسی قرار گرفته است. برای تعیین پیوستگی از تفکیک مارکرهای مولکولی در دو جمعیت گیاهی استفاده شد. در این بررسی از روش تجزیه تفکیک بالک در جمعیت نسل دوم حاصل از تلاقی بین دو ژنوتیپ یاد شده استفاده شد. تجزیه مارکرمولکولی RAPD بر اساس تفکیک مولکولی PCR بر روی بافت گیاهی حاصل از گیاهان نسل دوم و عکس العمل گیاهان به بُر در فامیل‌های نسل سوم مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین ۱۲۶ آغازگر (Primer) تصادفی استفاده شده برای تعیین چند شکلی بین والدین، ۸۶ آغازگر، حالت چند شکلی را نشان دادند. پس از آزمون این آغازگرها با روش تجزیه بالک، دو آغازگر این چندشکلی را بین DNA والد حساس و DNA حاصل از مخلوط ۱۰ گیاه هموزیگوس حساس نشان دادند. تجزیه کامل جمعیت گیاهی با این دو آغازگر نشان داد که فرآوردهٔ حاصل از این دو آغازگربا ژن مورد نظر پیوستگی نشان می‌دهد. DNA حاصل از نوارهای این دو آغازگر با روش انتقال در پلاسمید باکتری کلون گردید و در نهایت از قطعات DNA منتقل شده به پلاسمید به عنوان کاوشگر (Probe) برای آنالیز RFLP استفاده شد. نتایج حاصل، چند شکلی بین والدین را نشان دادند ولی داده‌های حاصله پیوستگی با ژن مورد نظر را نشان ندادند.

مطالعهٔ RFLP در جمعیت لاین‌های نوترکیب حاصل از تلاقی JI 15 x JI 399 تفکیک برای تحمّل به بُر در حد یک ژن را نشان داد و مشخص شد که این ژن بر روی کروموزوم شماره ۱ و در حدود ۱۰ واحد نقشه ژنی از مارکر dr7- واقع شده است. این مکان ژنی حدوداً بین دو مارکر معمولی *i-af* و *d-sym-2* واقع است. برای تعیین محل کروموزمی ژن متحمّل به بُر در جمعیت حاصل از تلاقی DNA, Alma x SA 310 حاصل از گیاهان دو جمعیت با تعدادی کاوشگر که در محل‌های نزدیک به این ژن در جمعیت لاین‌های نوترکیب واقع شده‌اند آزمایش گردید. تفکیک این مارکرها مستقل از عکس‌العمل گیاهان به بُر بودند و بنابراین به نظر می‌رسد ژن‌های متفاوتی کنترل تحمّل به بُر را در دو جمعیت به عهده دارند.

مقدمه

بُر یکی از هفت میکروالمنت مورد نیاز برای رشد طبیعی در اکثر گیاهان است. این عنصر در انتقال قند، طویل شدن ریشه، بافت مریستمی، مسیر بیوسنتز پیریمیدین، تقسیم سلولی و دیواره سلولی نقش دارد (Gupta *et al.*, 1985). مقدار مورد نیاز گیاه به این عنصر

تاریخ دریافت: ۷۶/۱۰/۲۱
تاریخ پذیرش: ۷۷/۴/۳۰

۱ - دانشیار دانشگاه فردوسی مشهد - ایران
۲ و ۳ - به ترتیب استادان دانشگاه آدلاید - استرالیا

برای تأمین این فرآیندها بسیار اندک است و به همین دلیل اندکی کمبود یا زیادی آن در خاک موجب بروز علائم کمبود یا مسمومیت در گیاه می‌شود. در طبیعت مسمومیت آن به گستردگی کمبود آن نیست، با این وجود مسمومیت آن در بسیاری از نقاط و بویژه در اراضی نواحی خشک گزارش شده است (Gupta *et al.*, 1985).

در جنوب استرالیا، مسمومیت بُر درخاک به عنوان یکی از مشکلات محدود کننده در بسیاری از گیاهان زراعی و از جمله حبوبات است (Cartwright *et al.*, 1984). مطالعات انجام شده روی نخود فرنگی نشان می‌دهد که در بین ارقام فعلی موجود در آن کشور، تنوع ژنتیکی برای تحمّل به بُر زیاد بود (Toxicity) بُر در خاک بسیار محدود است (Bagheri *et al.*, 1992). ولی لاین‌های با تحمّل بیشتر از این ارقام در کلکسیون‌های ژرم پلاسم جهانی (*Pisum sativum*) وجود دارد (Bagheri *et al.*, 1994). توارث تحمّل به بُر در این گیاه تحت کنترل ژن‌های بزرگ مندلی عمده با اثر افزایشی است و نتایج حاصل از تلاقی بین ارقام نسبتاً متحمّل و نمونه‌های متحمّل، تفکیک برای یک ژن را نشان می‌دهد(Bagheri *et al.*, 1996).

به منظور تعیین محل کروموزمی ژن(های) کنترل‌کننده تحمّل به بُر و بدست آوردن مارکرهای مناسب، این تحقیق با استفاده از دو روش مارکر ملکولی RAPD (Ramdom Amplified Polymorphic DNA) و (Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP) انجام شده است. در برنامه‌های به نژادی، استفاده از چنین مارکرهایی اصلاح کننده را در گزینش لاین‌های متحمّل کمک خواهد کرد. تا چند سال گذشته مارکرهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی (ایزوآنزیمی) به عنوان ابزارهای باارزشی برای آنالیز پیوستگی بشمار می‌رفتند (در این تحقیق نیز از این دو روش استفاده شد ولی بعلت عدم وجود پیوستگی بین این مارکرها با ژن متحمّل از ذکر نتایج خودداری شده است) ولی امروزه با پیدایش فن آوریهای موجود بر پایه DNA، ابزارهای مناسبتری برای آنالیز ژنتیکی سریع و دقیق در موجودات عالی و از جمله گیاهان فراهم شده است.

روش‌های ملکولی RFLP، RAPD و سایر روش‌های مبتنی بر PCR قادرند تا گسترهٔ مشخصی از قطعات چند شکلی (Polymorphism) را در اختیار قرار دهند که می‌توان اندازهٔ الگوی نوارهای آنها را به سرعت با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز تعیین کرد و لذا می‌توان گفت این مارکرهای مولکولی ابزار بالقوه قدرتمندی برای مطالعه پیوستگی ژنهای مورد نظر هستند (Tanksley, 1983).

تاکنون نقشه پیوستگی ژنتیکی بر پایه مارکرهای مولکولی برای تعدادی از گونه‌های گیاهی و از جمله نخود فرنگی تهیه شده است (Ellis *et al.*, 1992) و حتی در مواردی مارکرهای پیوسته با برخی صفات زراعی نیز گزارش شده است. برای مثال مارکرهای RFLPهایی یافت شده‌اند که کاملاً متصل به ژن‌های کنترل کنندهٔ سفیدک پودری در کاهو (Landry *et al.*, 1987) و فوزاریوم در گوجه فرنگی (Sarfatti *et al.*, 1989) هستند که در حال حاضر از آنها در برنامه‌های به نژادی این گیاهان استفاده می‌شود.

روش مولکولی RAPD جدیدتر از روش RFLP است. با این روش می‌توان بر بعضی از محدودیت‌های تکنیکی موجود در روش RFLP فائق آمد (Raflaski *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1990). این روش براساس استفاده از آغازگرهایی با طول ۹ تا ۱۰ نوکلئوتید در یک واکنش تکثیر DNA است و برای انجام واکنش نیاز به هیچگونه اطلاعاتی از توالی بازی ژنوم موجود مورد نظر نمی‌باشد. چند شکلی‌های حاصل از گیاهان متفاوت را که توسط این آغازگرها تولید می‌شود می‌توان بعد از الکتروفورز مشاهده کرد. با استفاده از RAPD نیز می‌توان نقشه پیوستگی ژن‌ها با این مارکرها را تعیین نمود(Raflaski *et al.*, 1991). در سال‌های اخیر

مطالعات متعددی مبنی بر استفاده از این مارکر برای تعیین مارکرهای مولکولی پیوسته با صفات مورد نظر گزارش شده است (Haley *et al.*, 1993; Martini *et al.*, 1991 and Williams *et al.*, 1991). میچل مور و همکاران با استفاده از این روش پیوستگی بین ژن مقاومت به بیماری و مارکرهای RAPD را با استفاده از دو مخلوط از نمونه‌های DNA گیاهان هموزیگوس متفاوت از جمعیت F_2 تعیین کرده‌اند (Michelmore *et al.*, 1991). در این روش DNA بالک تعدادی از افراد هموزیگوس برای هر دو صفت بصورت جداگانه مخلوط و پس از انجام RAPD، نوارهای حاصل با نوارهای حاصل از والدین مقایسه و در صورت تشخیص پیوستگی، جمعیت F_2 مورد بررسی قرار می‌گیرد.

این تحقیق با هدف تعیین محل کروموزومی ژن(های) کنترل کنندهٔ تحمّل به بُر و در صورت امکان دست یابی به مارکرهای مولکولی پیوسته با این ژنها انجام گرفته است تا در صورت دستیابی به چنین مارکرهایی بتوان از آنها در برنامه‌های به نژادی برای انتقال آلل‌های متحمّل به واریته‌های حساس استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

جمعیتی متشکل از ۸۲ گیاه F_2 و فامیلهای مشتق شده از F_2 (نسل F_3) حاصل از تلاقی بین واریته Alma با ژنوتیپ SA 310 برای آزمون پیوستگی بین محل‌های ژنی مارکر و ژن کنترل‌کننده متحمّل به بُر استفاده شد. Alma و SA 310 به ترتیب نسبتاً متحمّل و متحمّل به مسمومیت بُر هستند واین تفاوت در عکس العمل به بُر توسط یک ژن کنترل می‌شود.

برای بررسی‌های ایزوآنزیمی، RAPD و RFLP نمونه از بافت گیاهی مرحلهٔ گیاهچه جمعیت F_2 استفاده شد و عکس العمل گیاهان به بُر در جمعیت F_2 و فامیلهای F_3 مطالعه گردید.

۱ - آنالیز RAPD

جداسازی DNA از والدین و گیاهان جمعیت F_2 به روش جداسازی DNA در مقیاس کوچک (Weining and Langridge, 1991) صورت گرفت و برای آنالیز RAPD از الیگونوکلئوتیدهای تصادفی (آغازگر) استفاده شد. واکنش زنجیره پلیمر از در حجم ۲۵ میکرولیتر که حاوی ۰/۵ واحد آنزیم *Taq* دی ان آی پلیمراز، ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی قالب، ۱۵ نانوگرم آغازگر، ۱/۲۵ میلی مول از هر کدام dTTP, dGTP, dCTP, dATP، ۲۵ میلی مول MgCl2 و ۳ میکرولیتر بافر (*Taq* x 10) که قبلاً نتایج خوبی داده بود (Bagheri *et al.*, 1995) صورت گرفت.

قبل از انتقال نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر (PTC - 100, MJ Research, Inc, USA) هر کدام با یک قطره از روغن پارافین پوشش داده شد و سپس واکنش برای ۴۵ دور، ۱ دقیقه در $94^{\circ}C$، ۱ دقیقه در $36^{\circ}C$ و ۲ دقیقه در $72^{\circ}C$ و بعد از اینکه نمونه‌ها برای ۵ دقیقه تا دمای $25^{\circ}C$ سرد شد به مدّت ۵ دقیقه در $72^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از این عمل الکتروفورز فرآورده‌های PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و محلول تریس بوریت، Tris Boric Acid EDTA (1xTBE) انجام شد و نمونه‌ها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور ماوراءبنفش ملاحظه و تصویر برداری شد.

همسانه سازی (کلونینگ)Cloning مولکولی فرآورده‌های RAPD پیوسته با ژن (های) متحمّل به بُر

نتایج اولیه RAPD نشان داد که نواحی تکثیر یافته توسط دو آغازگر OpGo2 و OpGo7 با ژن متحمّل به بُر پیوستگی دارند. لذا به منظور کنترل این نتایج از طریق RFLP و همچنین مارکر RFLP که مارکر مطمئن‌تر و تکرار پذیرتری است کلون فرآورده‌های RAPD حاصل از دو آغازگر فوق جهت تهیه کاوشگر بشرح زیر صورت گرفت:

نوارهای تولید شده توسط دو آغازگر فوق که علائم پیوستگی را نشان می‌دادند را از ژل جدا کرده و سپس DNA آن با استفاده از کیت تمیز کنندهٔ ژن Geneclean RII kit (BiO 151, La Jolla,Ca) بازیافت شد. سپس DNA بازیافت شده در DNA وکتور (ناقل) pBluescript SK (+/-) انجام شد. انتقال (ترانسفورماسیون) DNA بازیافت شده از طریق شارژ الکتریکی با استفاده از دستگاه Bio Rad Gene Pulser صورت گرفت. پلاسمیدهای انتقال یافته روی محیط کشت LB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آمپی سیلین که به آن X-Gal و IPTG نیز اضافه شده بود کشت و پلاسمیدهای نوترکیب انتخاب و سپس برای اطمینان از انتقال قطعهٔ مورد نظر، DNA انتقال یافته برش و توسط الکتروفورز کنترل شد.

۲ - آنالیز RFLP

الف - آنالیز RFLP با کاوشگر حاصل از فرآوردهٔ RAPD پیوسته با ژن متحمّل به بُر

از فرآوردهٔ RAPD همسانه یافته پس از انجام مجدد واکنش PCR بر روی DNA پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای M13 (M13 forward and reverse primers)، تمیز کردن و کنترل مجدد اندازه به عنوان کاوشگر برای انجام RFLP استفاده شد.

برای انجام RFLP ابتدا DNA ژنومی والدین و F_2 توسط آنزیم‌های برشی *Hin*d III *Eco*R$_V$ *Eco*R$_I$ و *Dra*I هضم و سپس روش ساترن بلات (Southern blot) انجام شد.

ب - آنالیز RFLP با استفاده از جمعیت اینبرد نوترکیب

یکی دیگر از روش‌هایی که می‌توانست برای تعیین محل کروموزمی ژن کنترل کننده متحمّل به بُر مورد استفاده قرار گیرد استفاده از جمعیت‌های اینبرد نوترکیبی بود که از آن جمعیت‌ها برای تهیه نقشه ژنتیکی RFLP نخودفرنگی در انگلستان استفاده شده بود. لذا ابتدا با در اختیار قرار دادن بذر والدین این جمعیت‌ها با مساعدت انستیتو جان اینس (John Innes Institute, UK.) و ارسال بذر عکس العمل آنها به بُر در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به تنوع حاصله در بین این والدین (JI 399 x JI 15) مجدداً عکس‌العمل به بُر یکی از جمعیت‌های استفاده شده در تهیه نقشه ژنتیکی حاصل از تلاقی لاین‌های نسل F_{11} اینبرد نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصل با مارکرهای مورفولوژیکی و RFLP که نقشهٔ ژنتیکی آنها قبلاً در این جمعیت تعیین شده بود مقایسه شد.

ج - آنالیز RFLP روی فامیلهای F_3 حاصل از تلاقی Alma x SA 310 با استفاده از بعضی کاوشگرهای انتخابی وکروموزوم شماره ۱

در صورت وجود ژن مشابه کنترل کنندهٔ متحمّل به بُر در ژنوتیپ‌های فوق، آنالیز RFLP فامیلهای F_3 حاصل از تلاقی SA 310 x Alma با بعضی از کاوشگرهای انتخابی کروموزوم شماره ۱ این موضوع اثبات خواهد شد. لذا این ارزیابی به کمک ۵ مارکر انتخابی، cDNA 44، cDNA 150، cDNA 206، SHMT و PIT 26-74 که توسط الیس و همکاران (Ellis *et al.*, 1992) از انستیتو جان اینس اهداء گردید، انجام شد.

نتایج و بحث

۱ - آنالیز RAPD

در آنالیز RAPD، ژنوتیپ‌های والد با ۱۲۶ آغازگر تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفتند. اکثریت این آغازگرها فرآورده‌های مناسبی را تولید کردند که در تعداد زیادی از آنها چند شکلی بین والدین براحتی قابل مشاهده بود. در کل، از ۱۰۸ آغازگر موفق، تعداد ۸۶ آغازگر چندشکلی خوبی را بین والدین نشان دادند. نوارهای تولید شده از این آغازگرها عمدتاً ۵ نوار اصلی و تعدادی نوار فرعی را تشکیل می‌داد.

پس از مشاهدهٔ چندشکلی بین والدین، جمعیت در حال تفکیک از طریق آنالیز جمعیت بالک با استفاده از آغازگرهایی که چندشکلی خوبی را نشان داده بودند مورد

بررسی قرار گرفتند. برای تشکیل جمعیت بالک DNA حاصل از ۱۰ گیاه از هر کدام از دو فامیل هموزیگوس متحمّل و هموزیگوس حساس بصورت جداگانه مخلوط و بهمراه والدین با آغازگرهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. فرآورده‌های حاصل از دو آغازگر نوارهایی بود که در مخلوط DNA حساس و متحمّل به ترتیب با نوارهای موجود در والدین حساس و متحمّل مطابقت داشت که این‌مطابقت دلیلی بود بر اینکه احتمالاً بین این مارکر با ژن متحمّل به بُر پیوستگی وجود دارد. این آغازگرها[1] و ترتیب بازی آنها عبارت بودند از :

OpGo2 : 5´ - GGCACTGAGG - 3´

OpKo7 : 5´ - AGCCAGCAAG - 3´

با استفاده از این دو آغازگر جمعیت گیاهی F_2 مورد بررسی قرار گرفت و ارزیابی گیاهان برای عکس‌العمل به بُر در فامیل‌های F_3 صورت گرفت. تفکیک فامیل‌های F_3 برای عکس‌العمل به بُر به نسبت ۱(حساس هموزیگوس) : ۲ (تفکیک) : ۱ (متحمّل هموزیگوس) یعنی حالت مونوژنی را نشان داد. نتایج RAPD برای حضور یا عدم حضور نوار مربوطه درجه بندی شد. تفکیک نسبت ها برای حضور نوار: عدم حضور نوار برای نسبت ۳ : ۱ برای هر دو آغازگر تطابق داشت (جدول ۱).

جدول ۱ - جدول توافق دو طرفه بین ژنوتیپ‌ها از نظر تحمّل به بُر با دو مارکر RAPD

Table 1. Two-way contingency tables between genotypes with respect to boron tolerance and two RAPD markers, OpGo2 and OpKo7

مارکرهای RAPD	بُر boron				
	BoBo	*Bobo*	*bobo*	*Total*	e^2
CpGo2					
تیپ SA 310 یا هتروزیگوس	17	23	8	48	
تیپ Alma	0	1	9	10	
جمع Sum.	17	24	17	58	1.903
OpKo7					
تیپ SA 310 یا هتروزیگوس	14	17	6	37	
تیپ Alma	2	5	9	16	
جمع Sum.	16	22	15	53	1.565

χ^2 %5 = 5.99

این نسبت با تفکیک مونوژنی که در آن حضور نوار بیانگر صفت مغلوب است هماهنگی دارد. برای هر دو آغازگر نوارهای تعیین کننده از والد حساس Alma بود. بنابراین جمعیت F_2 برای تیپ هموزیگوس SA 310 یا هتروزیگوس (عدم حضور نوار) و یا تیپ هموزیگوس Alma (حضور نوار) درجه بندی شد. از برنامه تهیهٔ نقشه ژنتیکی برای محاسبهٔ درصد نوترکیبی بین این مارکر و ژن متحمّل به بُر استفاده شد. OpGo2 با ژن کنترل‌کنندهٔ تحمّل به بُر ۲۵/۹ درصد نوترکیبی با LOD = ۲/۱۲ نشان داد.

۱ - Op نشان دهنده منبع تولیدکننده آغازگر (Operon Technologies) Ko7, Go2 به ترتیب بیانگر آغازگرهای شمارهٔ ۲و ۷ درکیت‌های G و K هستند.

امّا چند شکلی تولید شده توسط OpKo7 با علائم مربوط به واکنش به بُر پیوستگی نشان نداد.

۲ - آنالیز RFLP

الف - آنالیز RFLP با کلون (کاوشگر) حاصل از فرآورده‌های RAPD پیوسته با ژن متحمل به بُر

پس از کشت باکتری‌ها روی محیط کشت LB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی سیلین حاوی X - Gal و IPTG سلول‌های نوترکیب، بر اساس رنگ انتخاب شد به گونه‌ای که کلنی‌های نوترکیب سفید و کلنی‌های غیر نوترکیب به رنگ آبی بر روی محیط کشت ظاهر شدند. جهت اطمینان از کلون DNA مورد نظر، پس از رشد سلول‌های منتقل شده، پلاسمیدهای آنها ایزوله و اندازهٔ آنها با الکتروفورز کنترل شد. اندازهٔ DNA انتقال یافته به پلاسمیدهای حاصل از ۴ کلنی با اندازه فرآوردهٔ RAPD کلون شده مطابقت داشت. دو کلون[1] از چهار کلون به ترتیب pOpGo2-800 و pOpKo7-400 پس از تکثیر ناحیهٔ منتقل شده به عنوان کاوشگر برای RFLP استفاده شد. در فرآیند هیبریداسیون، بین دو کلون با DNA والدین هیبریداسیون صورت گرفت. کاوشگر pOpKo7-400 بین والدین تولید چندشکلی نمود امّا قطعات نوار تولید شده توسط کاوشگر دیگر به علّت سیگنال شدید زمینه روی فیلم رادیوگرافی قابل خواندن نبود. به همین دلیل ارزیابی که RFLP جمعیت F_2 حاصل از تلاقی SA 310 × Alma فقط با دو آنزیم *Eco*RV و *Dra*I برای والدین حالت چند شکلی نشان داده بود با کاوشگر اول انجام شد (جدول ۲). لکن این دو آنزیم تولید نوارهایی از RFLP کردند که تفکیک مستقلی نسبت به عکس‌العمل گیاه به بُر نشان دادند و لذا پیوستگی با ژن تحمّل به بُر نشان ندادند.

جدول ۲ - جدول توافق دو طرفه بین ژنوتیپ‌ها از نظر عکس العمل به بُر و مارکرهای RFLP حاصل از کاوشگر pOpKo7-400

Table 2. Two-way contingency tables between genotypes with respect to boron tolerance and RFLP markers detected by the probe pOpK07-400

کاوشگر و آنزیم	بُر Boron			
Probe	*BoBo*	*Bobo*	*bobo*	*Total*
pOpKo7-400/*Eco*RV				
تیپ SA310	7	15	6	28
هتروزیگوس	7	15	7	29
تیپ Alma	3	11	8	22
جمع Sum.	17	41	21	79
pOpKo7-400 /*Dra*I				
تیپ SA 310	2	9	5	16
هتروزیگوس	9	15	8	32
تیپ Alma	5	9	1	15
جمع Sum.	16	33	14	63

۱ - pOpG02-800 و pOpko7-400 به ترتیب بیانگر پلاسمیدهای (کلون) حاوی قطعات DNA انتقال یافته هستند که توسط آغازگرهای G و K تولید شده و اندازهٔ آنها ۸۰۰ و ۴۰۰ جفت باز است.

شاید این موضوع خیلی دور از انتظار نباشد زیرا علیرغم اینکه pOpKo7-400 علائم اولیه پیوستگی نشان داد و تنهاکلونی بود که در هنگام استفاده از روش ساترن بلات تولید الگوی هیبریداسیون واضحی نمود امّا نباید فراموش کرد که این نوار در هنگام بررسی RAPD جمعیت F_2 با علائم واکنش گیاه به بُر پیوستگی نشان نداد و لذا به نظر می رسد که استفاده از مارکر مولکولی RAPD برای مطالعهٔ پیوستگی ژن‌ها هنوز نیاز به بررسی‌های تکنیکی بیشتری دارد.

ب - آنالیز RFLP با استفاده از جمعیت اینبرد نوترکیب

تلفیق نتایج بررسی عکس العمل گیاهان به بُر با داده‌های حاصل از نقشه اشباع نخودفرنگی نشان داد که وراثت به بُر در جمیعت اینبرد نوترکیب (JI 15 x JI 399) توسط یک ژن کنترل می‌شود که این ژن حدود ۱۰ سانتی مورگان از مارکر *dr7-* (LOD = ۲/۳) فاصله دارد. این نوار از JI 399 می‌باشد که در تلاقی (JI 399 x JI 281) نیز که برای تهیهٔ نقشهٔ اشباع استفاده شده است تفکیک می‌گردد. امّا در این تلاقی به عنوان DR9 نامگذاری شده است. از ترکیب نقشه پیوستگی ژنی این دو تلاقی می‌توان نتیجه گرفت که ژن متحمّل به بُر و *dr7-* بین دو مارکر *i-af* و *d-sym2* واقع شده‌اند (شکل ۱).

ج - آنالیز RFLP روی فامیل F_3 حاصل از تلاقی Alma x SA 310 با استفاده از بعضی کاوشگرهای انتخابی از کروموزوم شماره ۱

ارزیابی RFLP جمعیت F_2 حاصل از تلاقی Alma x SA 310 با استفاده از ۵ کاوشگر از کروموزوم شماره ۱ صورت گرفت. در صورت وجود پیوستگی بین این مارکرها با ژن کنترل کننده تحمّل به بُر می‌توان گفت که ژن متحمّل به بُر در این جمعیت با ژن مربوطه در جمعیت قبلی یکسان است. از ۵ کاوشگر مورد ارزیابی ۴ کاوشگر RFLP را نشان داد، اما کاوشگر SHMT با DNA هضم شده هیبرید نشد. تفکیک کاوشگرهای چند شکلی مستقل از علائم بُر در جمعیت F_2 بود (جدول ۳) و لذا می‌توان گفت که ژن دیگری کنترل تحمّل به بُر را در جمعیت Alma x SA 310 بعهده دارد که آن ژن با ژن موجود در جمعیت JI 399 x JI 15 متفاوت است.

نسبت‌های تفکیکی ۲۲ (هموزیگوس حساس): ۳۶ (در حال تفکیک): ۲۳ (هموزیگوس متحمّل) در فامیل‌های F_3 حاصل از تلاقی Alma x SA 310 برای عکس‌العمل به بُر با نسبت ۱ : ۲ : ۱ توافق دارد. تفکیک نسبت‌های ژنتیکی حاصل از تلاقی Alma با دیگر ژنوتیپ‌ها نیز نشان می‌دهد که حداقل دو ژن با اثر افزایشی، کنترل واکنش به بُر را در این ژنوتیپ بعهده دارند. بطوری که ژنوتیپ نسبتاً متحمّل Alma دارای یک ژن غالب و ژنوتیپ آن *Bo1 Bo1 bo2 bo2* و لاین متحمّل SA 310 دارای دو ژن غالب و ژنوتیپ *Bo1 Bo1 Bo2 Bo2* و ژنوتیپ کاملاً حساس Pennant برای هر دو ژن مغلوب است (*bo1 bo1 bo2 bo2*) (Bagheri *et al.*, 1996) .

عکس‌العمل ژنوتیپ‌های JI 15 و JI 399 به بُر بسیار شبیه به عکس العمل گیاهان Alma و Pennant است و نسبت تفکیک در این جمعیت نیز نشان دهنده کنترل مونوژنیک برای واکنش به بُر می‌باشد. بر اساس ژنوتیپ‌های قراردادی فوق احتمال دارد که ژن‌های متفاوتی کنترل تحمّل به بُر در این دو جمعیت رابعهده داشته باشند. بنابر این احتمال دارد که بتوان ژن تحمّل به بُر در جمعیت JI399 x JI 15 را به *Bo1* نسبت داد. اما برای اثبات این موضوع نیاز به ارزیابی F_2 حاصل از جمعیت Pennant x JI 15 و Alma x JI 399 می‌باشد. در حال حاضر آلل *Bo1* ارزش زیادی در سازگاری ژنوتیپ Alma به مقادیر زیاد بُر در خاک دارد و طراحی برنامه‌های اصلاحی به منظور انتقال آلل دوم یا *Bo2* می‌تواند بسیار ارزشمند باشد. علیرغم با ارزش بودن نتایج این تحقیق از نظر تعیین محل ژنی، از نقطه نظر به نژادی نیاز به تحقیقات بیشتری برای یافتن مارکرهای کاملاً پیوسته با ژن کنترل کننده تحمّل به بُر می‌باشد تا بتوان از این مارکرها در

نسل‌های در حال تفکیک برنامه‌های به نژادی استفاده نمود.

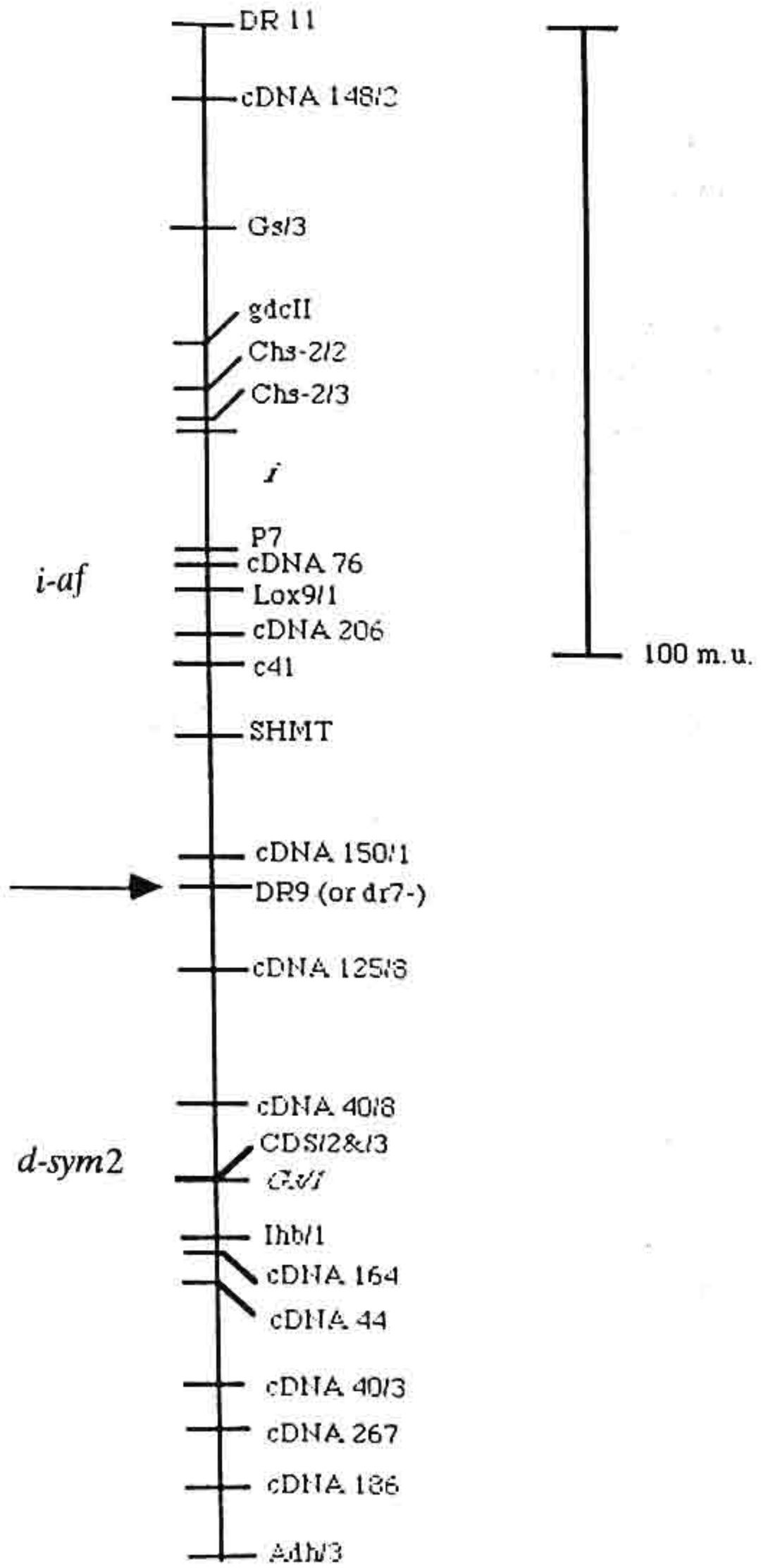
جدول ۳- جدول توافق دوطرفه بین ژنوتیپ‌ها از نظر تحمّل به بُر و مارکرهای RFLP تولید شده از ۴ کاوشگر موجود بر روی گروه پیوسته ژنی شماره ۱

Table 3. Two-way contingency tables between genotypes with respect to boron tolerance and RFLP markers generated by four selected probes form linkage group 1 digested with different restriction enzymes

کاوشگر و آنزیم	بُر Boron			
Probe	*BoBo*	*Bobo*	*bobo*	*Total*
cDNA 150/*Dra*I				
تیپ SA 310	10	5	1	16
هتروزیگوت	1	21	8	30
تیپ Alma	5	6	7	18
جمع Sum.	16	32	16	64
cDNA 150/*Eco*RV				
تیپ SA 310	2	2	1	5
هتروزیگوت	5	3	2	10
تیپ Alma	5	3	4	12
جمع Sum.	12	8	7	27
cDNA 150/*Bam*HI				
تیپ SA 310	1	2	5	8
هتروزیگوت	4	5	5	14
تیپ Alma	2	0	2	4
جمع Sum.	7	7	12	26
cDNA 150/*Hand*III				
تیپ SA 310	1	0	3	4
هتروزیگوت	0	6	3	9
تیپ Alma	0	2	1	3
جمع Sum.	1	8	7	16
cDNA 206/*Dra*I				
تیپ SA 310	3	0	2	5
هتروزیگوت	6	0	4	10
تیپ Alma	2	0	1	3
جمع Sum.	11	0	7	18
cDNA 206/*Eco*RV				
تیپ SA 310	4	4	3	11
هتروزیگوت	9	14	7	30
تیپ Alma	1	2	5	8
جمع Sum.	14	20	15	49

ادامه جدول ۳. Table 3. continue

کاوشگر و آنزیم *Probe*	بُر Boron *BoBo*	*Bobo*	*bobo*	*Total*
PIT 26-74/*Eco*RI(a)				
تیپ SA 310	3	4	2	9
هتروزیگوت	9	9	4	22
تیپ Alma	5	6	8	19
جمع Sum.	17	19	14	50
PIT 26-74/*Eco*RI(b)				
تیپ SA 310باتیپ هتروزیگوت	7	6	5	18
تیپ Alma	10	12	10	32
جمع Sum.	17	18	15	50
PIT 26-74/*Eco*RI(c)				
تیپ SA 310باتیپ هتروزیگوت	6	5	3	14
تیپ Alma	11	13	12	36
جمع Sum.	17	18	15	50
PIT 26-74/*Eco*RI(d)				
تیپ SA 310باتیپ هتروزیگوت	5	6	2	13
تیپ Alma	12	13	12	37
جمع Sum.	17	19	14	50
PIT 26-74/*Eco*RI(e)				
تیپ SA 310باتیپ هتروزیگوت	4	4	2	10
تیپ Alma	13	14	12	39
جمع Sum.	17	18	14	49
cDNA 44/*Eco*RI(a)				
تیپ SA 310	2	3	1	6
هتروزیگوت	3	4	2	9
تیپ Alma	1	5	2	8
جمع Sum.	6	12	5	23
cDNA 44/*Eco*RI(b)				
تیپ SA 310هتروزیگوت	21	28	17	66
تیپ Alma	6	5	5	16
جمع Sum.	27	33	22	82



شکل ۱- نقشه RFLP کروموزوم شماره ۱ نخود فرنگی که پیکان ناحیهٔ احتمالی ژن *Bo* رادر جمعیت اینبرد نوترکیب JI 399 x JI 15 نشان می‌دهد.

Fig.1. An RFLP map of chromosome 1 of *P. sativum*, showing markers linked to a gene conferring tolerance to boron (Bo) in the recombinant inbred population (JI 15 x JI 399). The arrow shows the possible region of the Bo gene.

References:

BAGHERI, A., J. PAULL, A. J. RATHJEN, S. M. ALI and D. B. MOODY. 1992. Genetic variation in the response of pea (*Pisum sativum* L.) to high concentrations of boron. Plant and Soil 146: 261 - 269.

BAGHERI, A., J. PAULL, and A. J., RATHJEN. 1994. The response of *Pisum sativum* L. germplasm to high concetrations of soil boron. Euphytica 75: 9 - 17.

BAGHERI, A., J. PAULL, P. LANGRIDGE, and A. J., RATHJEN. 1995. Genetic distance detected with RAPD markers among selected Australian commercial varieties and boron tolerant exotic germplasm of pea (*Pisum sativum* L.). Mol. Breeding 1:1931- 197.

BAGHERI, A., J. PAULL, and A. J., RATHJEN. 1996. Genetics of tolerance to high concentrations of soil boron in peas (*Pisum sativum* L.). Euphytica 87: 65 - 75.

CARTWRIGHT, B., B. A., ZARCINAS, and A. H., MAYFIELD. 1984. Toxic concentrations of boron in a red-brown earth at Gladstone, South Australia. Aust. J. Soil Res. 22: 261 - 272.

ELLIS, T. H. N., L., TURNER, R. P., HELLENS, D., LEER, C. L., HARKER, C., ENARD, C., DOMONEY, and D. R., DAVIES. 1992. Linkage maps in pea. Genetics 130: 649 - 663.

GUPTA, U. C., Y. W., JAME, C. A., CAMPBELL, A. J., LEYSHON, and W. NICHOLAICHUK. 1985. Boron toxicity and deficiency: a review. Can. J. Soil Sci. 65: 381 - 409.

HALEY, S. D., P. N., MIKLAS, J. K., STAVELY, J., BYRUM, and J. D., KELLY. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. Theor. Appl. Genet. 86: 505 - 512.

LANDRY, B. S., R. V., KESSELI, B., FARRARA, and R. W., MICHELMORE. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. Genetics: 116 : 331 - 337.

MARTINI, G., B., J. G. K., WILLIAMS, and S. D., TANKSLEY. 1991. Rapid identification of markers linked to a *pseudomanas* resistance in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88: 2336 - 2340.

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.

RAFLASKI, J. A., S. V., TINGEY, and J. G. K., WILLIAMS. 1991. RAPD markers, a new technology for genetic mapping and plant breeding. AgBiotech. News Info: 3: 645 - 648.

SARFATTI, M., J., KATAN, R., FLUHR, and D., ZAMIR. 1989. An RFLP marker in tomato linked to the *Fusarium oxysporum* resistance gene *I2*. Theor. Appl. Genet. 78: 755 - 759.

TANKSLEY, S. D. 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 3 - 8.

WEINING, S., and P., LANGRIDGE. 1991. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. Theor. Appl. Genet. 82: 409 - 216.

WILLIAMS, J. G. K., A. R., KUBELIK, K. J., TIVAK, J. A., RAFALSKI, and S. V., TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 18: 6531 -6535.

WILLIAMS, J. G. J., A. R., KUBELIK, J. A., RAFALSKI, and S. V., TINGEY. 1991. Genetic analysis with RAPD markers. In: J. W., Bennett and L. L. Lasure (eds.) pp. 431 - 439. More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, Inc., New york.

Chromosmal localization of genes mediating tolerance to boron in pea (*Pisum sativum* L.) using molecular markers

A. R. Bagheri [1], J. Paull [2] and A. J. Rathjen[3]

ABSTRACT

Boron toxicity is a major problem in dry land areas of southern Australia and is a constraint to production of many crop plants, including grain legumes. Genetic variation in response to boron is under the control of major additive genes and segregation at a single locus was observed between the moderately tolerant Australian variety Alma and several tolerant accessions. The objective of the present study was to identify DNA markers linked to a major boron tolerance gene. Such markers will enable marker assisted selection and facilitate the transfer of the tolerance allele(s) into sensitive varieties.

Segregating DNA markers were used to establish the linkage to boron tolerance in two populations. The bulk segregant analysis strategy was applied to an F_2 population of 82 plants from a cross between Alma (moderately tolerant) and SA 310 (tolerant). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isozyme analyses were conducted upon tissues collected from the F_2 plants and the response to boron was determined for F_3 families. Of 126 random primers screened on the parents, 86 identified polymorphisms. Two primers, OPGO2 and OpKO7, amplified products that showed polymorphism between the tolerant and sensitive pooled DNA and were subsequently shown to be linked to the gene of interest. Amplified RAPD products from the two positive primers were cloned and used as probes for Southern analysis. Polymorphisms between the parents were observed but the polymorphic bands were not linked to the tolerance locus. None of the isozyme loci was linked with tolerance to boron.

Further analysis with restriction fragment length polymophisms (RFLP) in another recombinant inbred population (JI 15 x JI 399) revealed that boron tolerance segregating in this cross was controlled by a single major gene which mapped about 10 units from dr7- (LOD score of 2.3). This placed the gene about mid-way between the two paris of markers i-af and d-sym2 on the classical linkage group 1. The population of Alma x SA 310 was also assayed with several probes which map to chromosome 1 in the region of the boron gene in (JI 15 x JI 399). As these markers segregated independtly of response to boron, it is probable that different genes control boron tolerance in the two populations.

Effects of drying-off time and harvesting date on quantitative and qualitative yield of sugarcane, variety CP - 57 in Khuzetan.

A. Naderi,[4] A. Hashemi - Dezfouli,[5] R. Shokrani,[6] A. Rezaie[7]

ABSTRACT

One of the agronomic management in sugarcane production is drying-off in order to decrease vegetative growth and invert sugars and therefore to increace sucrose accumulation in stem.

In order to investigate drying-off and harvesting time effects on quantitative and qualitative yield of sugarcane variety CP - 57, an experiment was conducted in 1995 - 1996 in a Complete Randonized Block Design with four replications.

Twenty one treatments of drying-off times from 1.4 up to 10.11 with two weeks interavals and harvesting dates from 15.9 up to 24.11 1996 with two weeks intervals were combinated.

Results showed that purity was improved significantly as growth peroid prolonged. Sucrose percentage with little diference had a similar trend as purity. Stem yield difference for all treatments was not significant. Sucrose yield was increased significantly with delay in harvesting date and highest yield with 16.28 tons sucrose per hectare was obtained from the treatment which was combinated of third drying-off time (29 Sep.) and sixth harvesting date (21 Nov.).

1- Associ. Prof., Ferdousi Univ. Mashad, Iran. 2 and 3- Professors Adelyd University, Australia.
4- Scientific memeber, Seed and Plant Improvment Department, Agricultural Center of Khuzestan, Ahvaz, Iran.
5- Assoc. Prof., Shahid Chamran Univ. Ahvaz- Iran. 6& 7- Assistant prof. and prof., Univ. of Technology, Isfahan, Iran, respectively.