

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن های مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبله در گندم

عبداله نجفی^{۱*}، سید ابوالقاسم محمدی^۲، محمود تورچی^۲، کن چالمرز^۲، محمد مقدم^۲، محمد ترابی^۲ و سعید اهری زاد^۲

تاریخ دریافت: 87/3/25 تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۳۰

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشگاه آدلاید استرالیا

۴- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

* مسئول مکاتبه E-mail: nadjaphy@yahoo.com

چکیده

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله که عامل آن قارچ *Fusarium graminearum* است، یکی از بیماری های مهم گندم به شمار می رود. اصلاح برای مقاومت به این بیماری از طریق روش های کلاسیک، مشکل و مستلزم صرف هزینه های زیادی است. نشانگرهای DNA پیوسته با ژن های مقاومت به این بیماری می توانند در تسریع برنامه های اصلاح ارقام مقاوم مفید باشند. این مطالعه به منظور شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن های مقاومت به این بیماری در گندم اجرا شد. جمعیتی شامل 167 خانواده $F_{2:3}$ ، حاصل از تلاقی رقم ونگشویبای به عنوان والد مقاوم و رقم فلات به عنوان والد حساس به بیماری تولید شد. گیاهان F_2 و خانواده های F_3 به همراه والدین برای مقاومت نوع 2 (مقاومت به گسترش بیماری درون سنبله) طی دو سال در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. والدین و دو توده (بالک) حساس و مقاوم از گیاهان F_2 (شامل 15 گیاه در هر توده) توسط 341 نشانگر ریزماهواره غربال شدند. 125 نشانگر بین والدین چند شکل بود که از بین آنها 16 نشانگر علاوه بر والدین، بین دو توده نیز چند شکلی نشان دادند. این 16 نشانگر برای تعیین ژنوتیپ افراد دو توده (30 فرد) استفاده شدند اما تنها 8 نشانگر که چند شکلی معنی داری نشان دادند برای غربال جمعیت و تجزیه QTL مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر آن، 7 نشانگر دیگر نیز که بر طبق نقشه های موجود با نشانگرهای فوق پیوستگی داشتند برای غربال جمعیت و شناسایی QTL ها مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه داده های نسل F_2 ژنوتیپی سه QTL برای مقاومت به بلایت فوزاریومی سنبله روی کروموزوم های 2AL، 3BS و 3AS شناسایی شد. با ارزیابی خانواده های F_3 ، نشانگرهای پیوسته با دو QTL کنترل کننده مقاومت به این بیماری روی کروموزوم های 3BS و 2AL تایید شدند. نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با این QTL ها می توانند درگزینش به کمک نشانگر برای مقاومت به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله در گندم مفید باشند.

واژه های کلیدی: بلایت فوزاریومی سنبله (FHB)، گندم، مکان های ژنی صفت کمی (QTL)، نشانگرهای ریزماهواره

Identification of SSR Markers Linked to Fusarium Head Blight

Resistance Genes in Wheat

A Najafi¹, SA Mohammadi², M Toorchi², KJ Chalmers³, M Moghaddam², M Torabi⁴
and S Aharizad⁵

¹Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

²Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Associate Professor, University of Adelaide, Australia

⁴Researcher, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

⁵Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E-Mail: nadjaphy@yahoo.com

Abstract

Fusarium head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* is one of the important diseases of wheat. Traditional breeding for the disease resistance is difficult and expensive. DNA markers linked to FHB resistance genes can be useful in accelerating disease breeding programs. The objective of the study was to identify the SSR markers linked to FHB resistance QTLs in wheat. A population of 167 F_{2:3} families from the cross Wangshuibai (resistant)/Falat (susceptible) was developed. F₂ individuals, F₃ families and the parents were evaluated for Type II resistance (resistance to the disease spread within the spike) in greenhouse. The parents and two resistant and susceptible bulks from F₂ plants (including 15 plants in every bulk) were screened with 341 SSR Markers. 125 markers showed polymorphism between the two parents and 16 markers showed polymorphism between both parents and two bulks. The 16 markers were used to genotype 30 individuals in two bulks. Eight markers showed significant polymorphism and were used for screening the population and QTL analysis. Furthermore, seven markers linked to the polymorph markers were used for screening and identifying QTL. Using F₂ phenotypic and genotypic data, three QTLs for FHB resistance were identified on chromosomes 2AL, 3BS and 3AS. By evaluating F₃ families, two QTLs controlling FHB resistance were confirmed on chromosomes 3BS and 2AL. SSR markers linked to the QTLs can be useful in marker assisted selection for FHB resistance in wheat.

Keywords: Fusarium head blight (FHB), Quantitative trait loci (QTL), SSR markers, Wheat

مقدمه

بیماری بلایت فوزاریومی سنبله (FHB)¹ یا اسکب² که عامل آن عمدتاً قارچ *Fusarium graminearum* است از بیماری های مهم گندم در نواحی نیمه مرطوب به شمار می رود (اعتباریان و ترابی 1374 و مک مولن و همکاران 1997). این بیماری موجب کاهش شدید عملکرد و کیفیت دانه می شود. علاوه بر این، دانه های آلوده حاوی میکوتوکسین هایی مانند دی اکسی نیوالنول بوده که برای انسان و دام سمی هستند (بای و شانر 1994). در سال های اخیر خسارت ناشی از این بیماری در مازندران، گرگان، گنبد و مغان، به علت وجود مایه تلقیح آن، کشت ارقام حساس و مهیا بودن شرایط جوی، بسیار چشمگیر بوده است (اعتباریان و ترابی 1375 و ملیحی پور و همکاران 1379). علائم بیماری با نقاط آبدار مایل به قهوه ای روی پوشینه ها و محور سنبله آغاز و در نهایت منجر به سفید شدن قسمتهایی از سنبله می شود. در مزرعه سنبله های بیمار، کشیده، بدون خمیدگی و بارنگی روشن تر از خوشه های سالم نمایان می شوند. دانه های آلوده، چروکیده و کم وزن بوده و کیفیت مناسبی ندارند (صارمی 1379 و راد و همکاران 2001). بهترین روش مبارزه با این بیماری عبارت از کشت ارقام مقاوم است (پری و همکاران 1995 و میدانر 1997).

دو نوع مهم مقاومت (نوع 1 و 2) به FHB در گندم توسط شرودر و کریستنسن (1963) توصیف شده است. مقاومت نوع 1، به مقاومت در برابر آلودگی اولیه و مقاومت نوع 2، به مقاومت به گسترش بیماری درون سنبله اطلاق می شود. ارزیابی دقیق مقاومت نوع 1 مشکل است، زیرا این نوع مقاومت تا حد زیادی تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می گیرد و تعیین مقدار واقعی مایه تلقیح به کار برده شده دشوار است (بای و شانر

1994). درگندم معمول ترین مقاومت مورد ارزیابی، مقاومت نوع 2 است. این نوع مقاومت با مشاهده علایم ظاهری ناشی از گسترش بیماری پس از انجام تلقیح نقطه ای اندازه گیری می شود (بای و همکاران 1999). این مقاومت عموماً در گلخانه تحت شرایط کنترل شده ارزیابی می شود و بدین ترتیب تنوع محیطی کاهش می یابد (بای و همکاران 1999 و والدرون و همکاران 1999). ارزیابی مقاومت به FHB مشکل، پرهزینه و مستلزم صرف زمان زیادی است. نشانگر های مولکولی به عنوان ابزارهای کارا برای مکان یابی ژن های کنترل کننده مقاومت به بیماری، گزینش برای مقاومت را تسهیل کرده و امکان انتقال ژن های مقاومت از ارقام مقاوم به ارقام حساس را در زمان کوتاه تر و با دقت بیشتر فراهم می کنند. به این ترتیب نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن های مقاومت می توانند در اصلاح برای بیماری FHB موثر باشند (کولب و همکاران 2001).

چن و همکاران (2000) با ارزیابی 156 بوته F₂ حاصل از تلاقی ارقام دبلیو 14 و پایونیر 2684 برای مقاومت به FHB و استفاده از نشانگرهای ریز مایهواره، دو QTL را روی کروموزوم های 3BS و 2BS مکان یابی کردند. در مجموع 21 درصد از تنوع در شدت بیماری توسط این دو QTL توجیه شد.

اتو و همکاران (1999) با ارزیابی بیماری FHB در جمعیتی مرکب از 83 لاین اینبرد کروموزومی نوترکیب حاصل از تلاقی رقم لانگدون با یک لاین جایگزینی دی سومیک برای کروموزوم 3A از *Triticum dicocoides* یک QTL را برای مقاومت به FHB روی کروموزوم 3A شناسایی کردند. نشانگر ریزماهواره Xgwm 2 با این QTL پیوستگی داشت. با ارزیابی 218 لاین خویش آمیخته نوترکیب از تلاقی نینگ 894037 با آلوندر، سه QTL برای مقاومت به FHB روی کروموزوم های

¹Fusarium head blight² Scab

بیماری FHB و فلات گندم بهاره حساس به این بیماری است. حدود دویست و پنجاه بذر F_2 در گلدان‌های پلاستیکی بزرگ به ابعاد 21×23 سانتی متر در گلخانه تحت 16 ساعت روشنایی در سال 1381 کشت شدند. در هر گلدان به منظور دستیابی به تعداد پنجه مناسب فقط دو بذر کاشته شد. به منظور تولید خانواده های F_3 ، 14 تا 18 بذر حاصل از هر گیاه F_2 در سه گلدان بزرگ به ابعاد 21×23 سانتی متر کاشته شد. گلدان‌ها به طور تصادفی توزیع شدند. بافت خاک مورد استفاده لوم شنی بود. آبیاری گلدان‌ها و سایر مراقبت‌های زراعی مطابق معمول و بر حسب نیاز گیاهان انجام شد. کوددهی در دو مرحله 4 تا 5 برگی و مرحله طویل شدن ساقه اعمال گردید. به دلیل این که نمونه‌های DNA تعدادی از گیاهان F_2 تخریب شده بود، 196 گیاه F_2 در ارزیابی‌های ژنوتیپی مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی بیماری

سی بوته از هر یک از والدین ونگشوییای و فلات، 213 گیاه F_2 و 167 خانواده F_3 برای مقاومت نوع 2 (گسترش بیماری درون سنبله) در گلخانه‌ای کاملاً تحت کنترل از نظر دما و رطوبت طی دو سال ارزیابی شدند. دو رقم سومای تری و فلات نیز که در چند تاریخ متوالی کشت شده بودند به ترتیب به عنوان شاهد‌های مقاوم و حساس مورد استفاده قرار گرفتند. مایه تلقیح *F. graminearum* مخلوطی از پنج جدایه جمع‌آوری شده از شمال ایران بود. سوسپانسیون اسپور جدایه‌های فوق از بخش پاتولوژی غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. در اوایل گلدهی 2 تا 3 سنبله از هر گیاه F_2 و 13 تا 17 گیاه F_3 حاصل از هر گیاه F_2 با 10^4 میکرولیتر سوسپانسیون اسپور که غلظت آن 2×10^4 اسپور در میلی لیتر بود تلقیح شدند. تزریق سوسپانسیون اسپور توسط یک میکروپیپت به گلچه میانی در سنبله نزدیک به مرکز سنبله مطابق روش اندرسن و همکاران (2001) انجام شد. به منظور تامین

3B، 6B و 2D شناسایی شدند که در مجموع 51/6 درصد از تنوع فنوتیپی را تبیین کردند.

ژو و همکاران (2003) اثر QTL شناسایی شده برای مقاومت به FHB روی کروموزوم 3BS را در یک جمعیت F_2 (نینگ 7840/ویتون) و یک جمعیت $F_{3:4}$ (نینگ 7840/ای ال 897978) تأیید کردند. آنها دریافتند که اثر جایگزینی آلل مقاوم در نسل F_2 مشابه نسل F_4 و نسل های بالاتر است و اظهار داشتند که در صورت استفاده از نشانگرهای همباز مانند ریزماهواره، تأثیر گزینش به کمک نشانگر در نسل F_2 می تواند همانند تأثیر این عمل در نسل های بالاتر باشد.

استینر و همکاران (2004) با ارزیابی 210 لاین هاپلوئید مضاعف شده حاصل از تلاقی رقم مقاوم برزیلی فرونتانا با رقم حساس رموس و بهره گیری از نشانگرهای DNA، دو QTL را روی کروموزوم‌های 3A و 5A که به ترتیب بیانگر 16 و 9 درصد تنوع فنوتیپی بودند، مکان یابی کردند. در این تحقیق QTL هایی با اثرهای کوچکتر روی کروموزوم‌های 1B، 2A، 2B و 6B نیز گزارش شد. با ارزیابی نسل های F_3 و F_5 حاصل از تلاقی سری 82 با ونگشوییای در مزرعه برای مقاومت نوع 1 و استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره AFLP، دو QTL روی کروموزوم‌های 3B و 2D توسط مردی و همکاران (2005) شناسایی شده است.

هدف از این تحقیق شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با QTL های کنترل کننده مقاومت نوع 2 به بیماری FHB گندم در جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی ارقام ونگشوییای و فلات بود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه متشکل از 213 گیاه F_2 و 167 خانواده F_3 حاصل از تلاقی رقم ونگشوییای با رقم فلات بود. ونگشوییای گندم بهاره چینی مقاوم به

الکتروفورز نمونه های DNA برش شده به همراه DNA گندم چاینیز اسپرینگ با غلظت مشخص و نشانگر DNA لمد (HindIII λ) انجام شد و برای تعیین کمیت نمونه - های DNA، غلظت آنها با شاهد مورد مقایسه قرار گرفت. بر اساس ارزیابی فنوتیپی بیماری در گلخانه، DNA 15 گیاه از مقاوم ترین افراد F₂ به نسبت یکسان برای تهیه توده (بالک) مقاوم (R) با یکدیگر مخلوط شدند. به همین ترتیب، یک توده حساس (S) با ادغام DNA پانزده گیاه از حساس ترین افراد F₂ تشکیل شد. والدین و دو توده R و S با استفاده از 341 نشانگر ریزماهواره شامل 166 نشانگر Xgwm (رودر و همکاران 1998) و 175 نشانگر Xbarc (کریگن و همکاران 2001) غربال شدند. آغازگرهایی که بین والدین و همچنین بین دو توده چند شکلی نشان دادند، برای غربال افراد دو توده (30 فرد) مورد استفاده قرار گرفتند. در صورتی که تفاوت معنی داری از نظر فراوانی آلی در بین افراد دو توده R و S وجود داشت، کل افراد جمعیت برای آن نشانگر غربال شدند. علاوه بر این، نشانگرهای دیگری نیز که با نشانگرهای فوق طبق نقشه های ژنتیکی گندم (رودر و همکاران 1998 و کریگن و همکاران 2001) پیوستگی داشتند، برای غربال جمعیت استفاده شدند. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) مطابق روش رودر و همکاران (1998) انجام شد، با این تفاوت که حجم واکنش به 12/5 میکرولیتر کاهش یافت. مراحل واکنش، دما و دوره های زمانی واکنش زنجیره ای پلیمرز برای همه آغازگرها یکسان بود و فقط دمای اتصال بر حسب نوع آغازگر، 50، 55 یا 60 درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. قطعات حاصل از PCR روی ژل آکرلامید 8 درصد تفکیک شدند. سپس ژل ها با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه یو وی عکسبرداری از آنها به عمل آمد.

رطوبت درحد اشباع و امکان استقرار قارچ بر روی گیاه میزبان، سنبله های تلقیح شده با آب پاش دستی به طور یکنواخت مرطوب شده و به وسیله کیسه های پلاستیکی مرطوب به مدت سه روز پوشانده شدند. در طی این مدت دمای گلخانه درحدود 25 درجه سانتیگراد نگاه داشته شد. پس از سه روز، کیسه های پلاستیکی برداشته و گلدان ها به بخشی از گلخانه با رطوبت نسبی 70 درصد منتقل شدند. دمای گلخانه به طور متوسط 25 درجه سانتیگراد در طول روز و 19 درجه سانتی گراد در طی شب بود. سه هفته پس از تلقیح، درصد سنبله های آلوده (PSS) در هر سنبله به عنوان شدت بیماری بر اساس مقیاس صفر تا 100 درصد (والدرون و همکاران 1999) و معیاری از مقاومت نوع 2 تعیین شد. PSS متوسط برای هر گیاه F₂ و هر خانواده F₃ با میانگین گیری از PSS سنبله های تلقیح شده در آن گیاه و یا خانواده بدست آمد (اسنایدرز 1990 و ژو و همکاران 2003).

ارزیابی های ژنوتیپی

DNA ژنومی از برگ های افراد F₂ و والدین به روش CTAB (سقای معروف و همکاران 1984) با تغییرات جزئی استخراج شد. ارزیابی کیفی نمونه های DNA با استفاده از ژل آگارز انجام شد. سپس نمونه های DNA با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی، در دمای پایین خشک شدند. ادامه تحقیق با انتقال نمونه های DNA به مرکز ژنومیک گیاهی دانشگاه آدلاید استرالیا صورت گرفت. نمونه های DNA در TE (Tris - EDTA) حل شدند و کیفیت و کمیت آنها با استفاده از ژل آگارز و روش برش آنزیمی DNA با آنزیم BamH1 برده شد. بدین ترتیب که پنج میکرولیتر از هر نمونه DNA برای مدت 3 الی 4 ساعت در آون با دمای 37 درجه سانتی گراد با پنج میکرولیتر مخلوط مادری واکنش آنزیمی (شامل آنزیم BamH1، آب مقطر استریل و بافر SDB) مورد برش قرار گرفت. سپس

تجزیه های آماری

از آنجایی که مقادیر PSS توزیع نرمال نداشتند، از تبدیل آنها به ریشه دوم در تجزیه های آماری استفاده شد. سپس رابطه بین نشانگرها و مقادیر PSS با داده های حاصل از تبدیل به ریشه دوم و داده های تبدیل نشده مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که ماهیت ارتباط تغییر قابل توجهی نکرد، نتایج با داده های تبدیل نشده ارایه شدند.

قبل از تجزیه پیوستگی، بررسی انحراف تفرق (انحراف از نسبت های 1:2:1 مندلی برای ژنوتیپ های نشانگر همباز ریزماهواره) توسط آزمون کای اسکوار انجام گردید. نقشه پیوستگی نشانگرها با استفاده از نرم افزار Map Manager QTX (مانلی و اولسون 1999) و تابع مکان یابی کوسامبی (کوسامبی 1944) با در نظر گرفتن حداقل LOD برابر 3 و حداکثر فاصله 30 سانتی مورگان تهیه شد. تجزیه تک نشانگری به روش رگرسیونی، به عنوان یک روش اولیه برای شناسایی نشانگرهایی که ارتباط معنی داری با مقاومت به FHB در جمعیت داشتند انجام شد. برای شناسایی QTL ها از روش های مکان یابی فاصله ای و مکان یابی فاصله ای مرکب و نرم افزار QTL Cartographer (باستن و همکاران 2001) با در نظر گرفتن حد آستانه معنی دار 3 برای LOD استفاده گردید.

نتایج و بحث

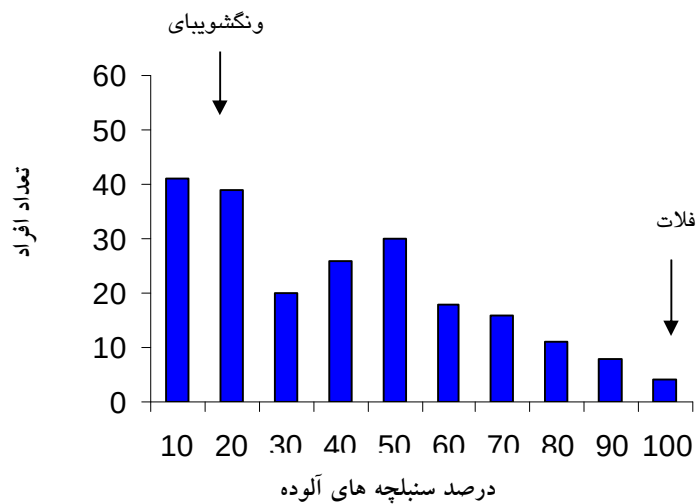
ارزیابی بیماری

شدت بیماری FHB در جمعیت F₂ دارای توزیع پیوسته و دامنه ای بین 4/5 تا 100 درصد بود که نشانگر تنوع فنوتیپی وسیع در این جمعیت بود. والدین از نظر شدت بیماری تفاوت معنی داری نشان دادند ($t=7/66$ و $P < 0/001$). میانگین شدت بیماری والدین جمعیت به ترتیب 14/2 درصد برای والد مقاوم (ونگشوی بای) و 88/2 درصد برای والد حساس (فلات) بود (شکل 1). خانواده های F₃ نیز از توزیع پیوسته ای برخوردار بودند و تنوع وسیعی برای مقاومت به FHB نشان دادند.

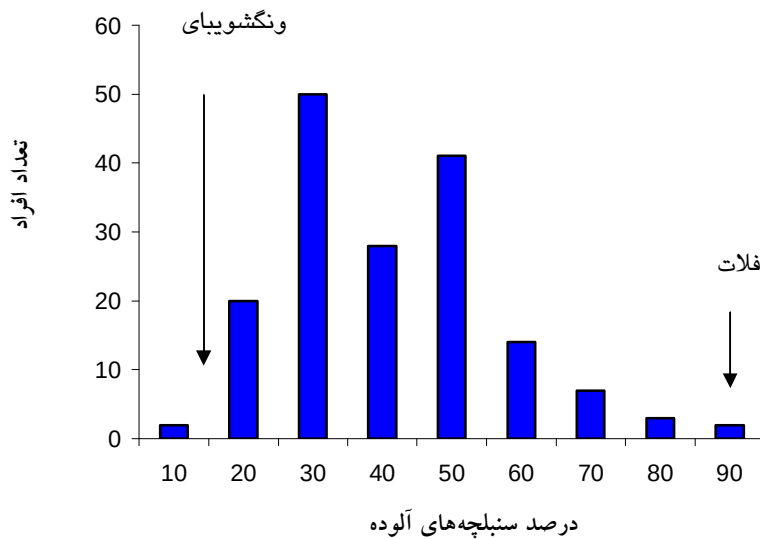
میانگین شدت بیماری این خانواده ها بین 9/5 تا 85/7 درصد متغیر بود. میانگین شدت بیماری والد مقاوم و حساس در سال ارزیابی خانواده های F₃ (سال 1384) به ترتیب 12/4 و 78/6 درصد بود (شکل 2) که این تفاوت از لحاظ آماری نیز معنی دار شد ($t=13/17$ و $P < 0/0001$). توزیع پیوسته برای شدت بیماری در جوامع مورد استفاده برای مکان یابی QTL ها توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (اندرسن و همکاران 2001 و ژو و همکاران 2003). دو عامل محیطی دما و رطوبت عوامل مهم و تعیین کننده در شروع و گسترش بیماری هستند (بای و شانر 1994). در این تحقیق، شرایط مطلوب از نظر دما و رطوبت در یک گلخانه قابل کنترل برای به حداقل رساندن تنوع محیطی فراهم شد.

تجزیه نشانگرهای ریز ماهواره

از 341 نشانگر ریز ماهواره مورد استفاده، 125 نشانگر در بین والدین و 16 نشانگر هم در بین والدین و هم در بین دو توده حساس و مقاوم چند شکلی نشان دادند. این 16 نشانگر برای تعیین ژنوتیپ افراد دو توده (30 فرد) استفاده شدند تا تجزیه توده در حال تفرق اولیه مورد تایید قرارگیرد. در نهایت 8 نشانگر ریز ماهواره چند شکلی معنی داری نشان دادند که برای غربال کل افراد جمعیت استفاده شدند (جدول 1). علاوه بر این، نشانگرهایی نیز که با نشانگرهای فوق بر اساس نقشه رودر و همکاران (1998) و کریگن و همکاران (2001) پیوستگی داشتند برای غربال کل جمعیت استفاده شدند. شکل 3، الگوی چند شکلی نشانگر ریز ماهواره Xbarc 220 در افراد جمعیت F₂ و والدین حساس و مقاوم را نشان می دهد. در مورد تمام نشانگرهای مورد استفاده در تعیین ژنوتیپ جمعیت، نسبت های مشاهده شده با نسبت های مورد انتظار 1:2:1 مطابقت داشت. نقشه پیوستگی جزئی شامل بخش هایی از سه کروموزوم 3B، 2A و 3A توسط نرم افزار Map Manager ایجاد شد (شکل 4).



شکل ۱- توزیع فنوتیپی درصد سنبلچه های آلوده به عنوان شدت بیماری در افراد جمعیت F_2 . شدت بیماری والدین در شکل مشخص شده است

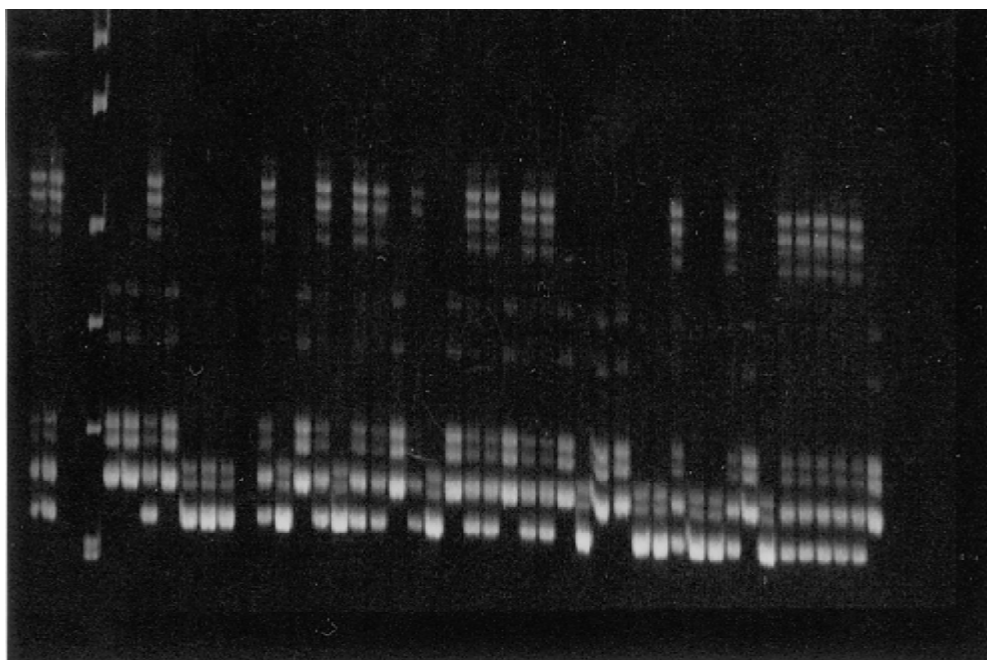


شکل ۲- توزیع فنوتیپی درصد سنبلچه های آلوده به عنوان شدت بیماری در خانواده های F_3 . شدت بیماری والدین در شکل مشخص شده است

جدول ۱- فهرست و مشخصات نشانگرهایی که برای غربال جمعیت F_2 حاصل از تلاقی فلات با ونگشویبای استفاده شدند

نشانگر	کروموزوم	توالی	دمای اتصال ($^{\circ}\text{C}$)
Xgwm 2	3A	(GA)۱۸	۵۰
Xgwm 369	3A	(CT)۱۱ (T)۲(CT)۲۱	۵۰
Xgwm 372	2A	(GA)۵۱	۵۰
Xgwm 389	3B	(CT)۱۴(GT)۱۶	۵۰
Xgwm 493	3A	(CA)۴۳ imp	۶۰
Xgwm 533	3B	(GA)۱۸ (GA)۲۰	۵۰
Xgwm 666.1	3A	(CA)۱۳	۶۰
Xgwm 666.2	3A	(CA)۱۳	۶۰
Xbarc 15	2A	(CAA)۹	۵۵
Xbarc 54	3A	(TAGA)۱۰	۵۵
Xbarc 133	3B	(CT)۲۴	۵۵
Xbarc 220	2A	(CT)۱۸	۵۵
Xbarc 310	3A	(CT)۱۵	۵۵
Xbarc 353.1	2A	تکرار نامنظم نوکلئوتیدها	۵۵
Xbarc 353.2	2A	تکرار نامنظم نوکلئوتیدها	۵۵

p^{UC} 19 B B H B A A A-H A B...



شکل ۳- الگوی چند شکلی نشانگر ریز ماهواره *Xbarc 220* در افراد جمعیت F_2 والدین حساس و مقاوم. ژنوتیپ والد مقاوم ونگشویبای، حساس فلات و افراد هتروزیگوت به ترتیب با A، B و H نشان داده شده است.

تجزیه QTL

با استفاده از روش مکان یابی فاصله ای و داده های فنوتیپی مقاومت به بیماری در نسل F_2 ، سه QTL روی کروموزوم های 2AL، 3BS و 3AS برای مقاومت به FHB شناسایی شدند که در مجموع 49/2 درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند (شکل 4، جدول 2). محتمل ترین مکان QTL کروموزوم 2AL در حد فاصل نشانگرهای Xbarc 353.2 و Xbarc 15 با $7/85 = LOD$ بود. این QTL، 20/9 درصد از تنوع مقاومت به بیماری را تبیین کرد. یک QTL برای مقاومت به FHB با مکان مشابه روی کروموزوم 2AL توسط والدرون و همکاران (1999)، اندرسن و همکاران (2001) و همکاران (2003) گزارش شده است. QTL دوم نزدیک انتهای بازوی کوتاه کروموزوم 3B در حد فاصل Xgwm 389 - Xgwm 533 ($LOD = 5/22$) شناسایی شد که 13/9 درصد از تنوع فنوتیپی توسط این QTL توجیه شد. QTL مستقر روی کروموزوم 3BS برای اولین بار توسط والدرون و همکاران (1999) در جمعیت RIL حاصل از تلاقی سومای تری با استوا گزارش شد. مطالعات دیگری نیز یک QTL را برای مقاومت به FHB در روی بازوی کوتاه کروموزوم 3B گزارش کرده اند (بای و همکاران 1999، اندرسن و همکاران 2001 و بورستمیر و همکاران 2002). سومین QTL در روی کروموزوم 3AS و در حد فاصل نشانگرهای Xgwm 369 و Xgwm 2 شناسایی شد که 14/4 درصد از تنوع فنوتیپی را تبیین کرد. اتو و همکاران (1999) نیز یک QTL را برای مقاومت به FHB در روی کروموزوم 3A گزارش کردند که با مکان ژنی نشانگر Xgwm 2 پیوستگی نزدیکی داشت. بررسی ها نشان داده است که ارقام مقاوم فرونتانا و اف 201 آرن نیز

دارای یک QTL برای مقاومت به FHB روی کروموزوم 3A در نزدیک سانترومر هستند (شن و همکاران 2003 و استینر و همکاران 2004).

به منظور تایید QTL های شناسایی شده برای مقاومت به FHB، ارزیابی مقاومت به بیماری با تکرار بیشتر و با استفاده از خانواده های F_3 نیز انجام شد. با استفاده از داده های فنوتیپی این خانواده ها و روش مکان یابی فاصله ای مرکب، دو QTL برای مقاومت به FHB در روی کروموزوم های 3BS و 2AL مکان یابی شدند (جدول 2). هر چهار نشانگر ریزماهواره روی کروموزوم 3BS با LOD بیشتر از 3/9 ارتباط معنی داری با مقاومت به FHB نشان دادند، اما محتمل ترین مکان QTL در روی بازوی کوتاه کروموزوم 3B و در حد فاصل Xbarc 133-Xgwm 493 قرار داشت (شکل 5). این QTL با LOD برابر 5/7، 16 درصد از تنوع فنوتیپی را تبیین کرد. شن و همکاران (2003 b) نیز یک QTL را برای مقاومت نوع 2 در همین فاصله روی کروموزوم 3BS در رقم نینگ 894037 گزارش کردند. محتمل ترین محل QTL دوم روی کروموزوم 2AL در فاصله بین نشانگر های Xbarc 353.1 و Xgwm 372 با LOD برابر 3/6 تعیین شد (شکل 5) که 9/1 درصد از تنوع را توجیه کرد.

در مجموع، QTL های شناسایی شده در نسل های F_2 و F_3 به ترتیب 49/2 و 25/1 درصد از تنوع فنوتیپی را تبیین کردند. تنوع تبیین نشده احتمالاً مربوط به QTL هایی است که یا به علت کوچک اثر بودن و یا به دلیل این که نشانگرهای آن نواحی در مطالعه حاضر ارزیابی نشدند، مورد شناسایی قرار نگرفتند. اپیستازی بین QTL ها و تنوع محیطی نیز می تواند در عدم تبیین تنوع سهم باشد. عدم شناسایی

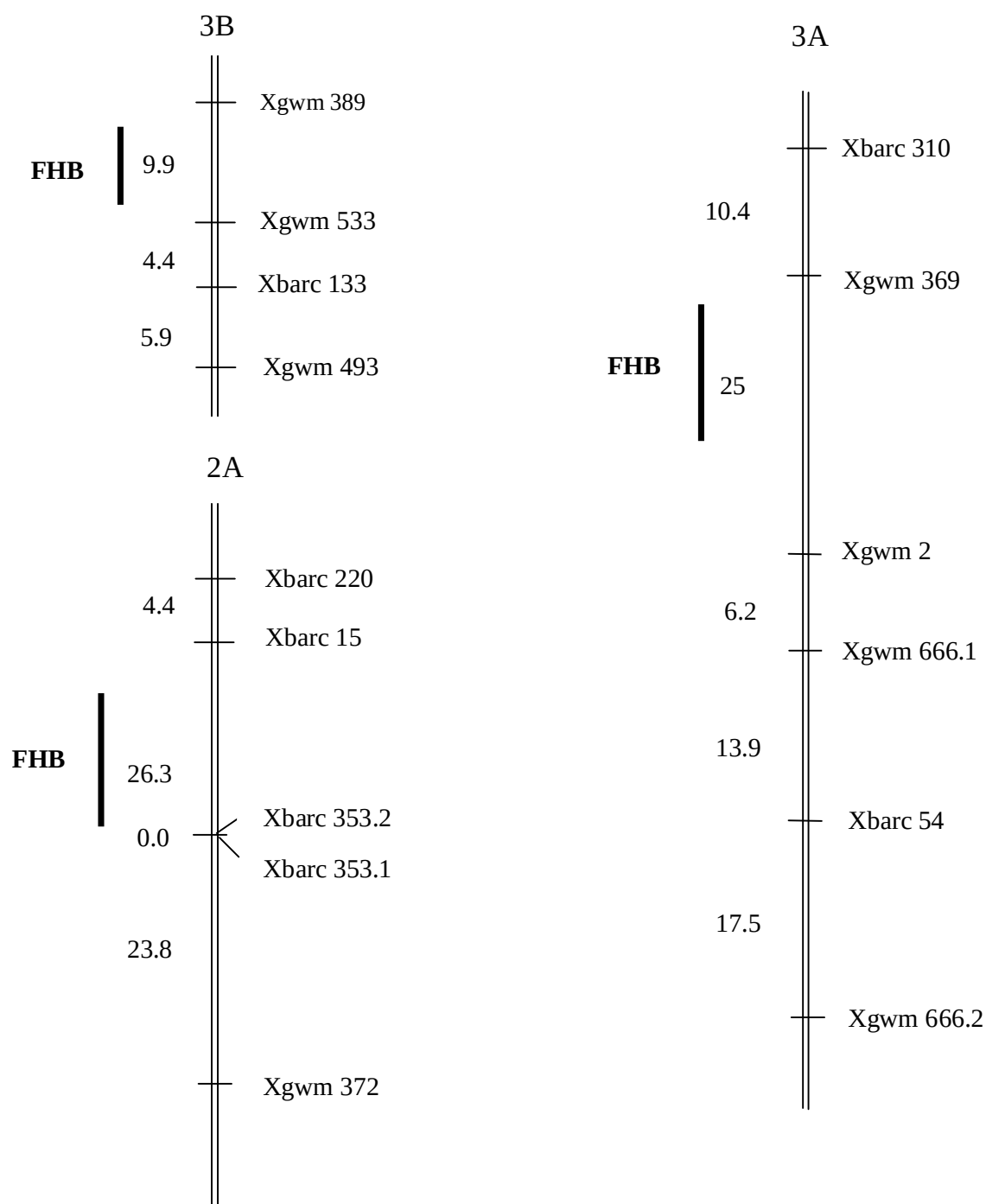
QTL روی کروموزوم 3AS در نسل F_3 ممکن است به دلیل نوترکیبی بین نشانگر و QTL در این ناحیه باشد.

در این تحقیق از نشانگرهای ریزماهواره و روش تجزیه توده در حال تفرق برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با مقاومت به FHB و غربال آنها در جمعیت استفاده شد. این روش در کنار ارزیابی چند شکلی والدین یک راهبرد کارا برای تسهیل شناسایی ژن‌ها به شمار می‌رود، زیرا در مقایسه با تعیین ژنوتیپ جمعیت با تعداد زیادی از نشانگرها، موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌شود. در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره از جمله نشانگرهای همباز می‌باشند که از نظر تکنیکی، ساده بوده و امکان تعیین ژنوتیپ با آنها نسبتاً آسان می‌باشد. این نشانگرها تنوع بالایی دارند و برای گزینش به کمک نشانگر، نشانگرها مناسبی به شمار می‌روند. در این پژوهش برای مکان یابی QTL ها از جمعیت‌های F_2 و F_3 استفاده شد. ژو و همکاران (2003) اظهار داشتند که با استفاده از نشانگرهای همباز، گزینش به کمک نشانگر در نسل F_2

برای مقاومت به FHB می‌تواند تأثیری مشابه با این عمل در نسل‌های پیشرفته‌تر داشته باشد. بنابراین، از طریق گزینش به کمک نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت در نسل‌های اولیه و گزینش افراد هموزیگوت دارای الل نشانگر والد مقاوم می‌توان عملیات اصلاحی را تسریع کرده و کارایی گزینش را افزایش داد. نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با QTL های شناسایی شده در این تحقیق می‌توانند استفاده از ژن‌های مقاوم رقم ونگشویبی را در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به FHB تسهیل کنند.

سپاسگزاری

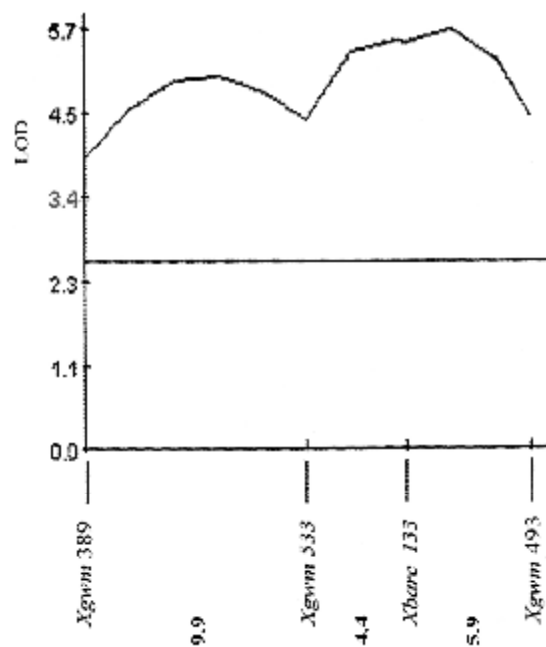
از همکاری دانشگاه آدلاید استرالیا که امکان اجرای بخش مولکولی این تحقیق را برای نویسنده اول فراهم کرد سپاسگزاری می‌شود. از خانم دکتر ناهید نیاری به خاطر کمک در مراحل ارزیابی فنوتیپی و استخراج DNA تشکر و قدردانی می‌شود.



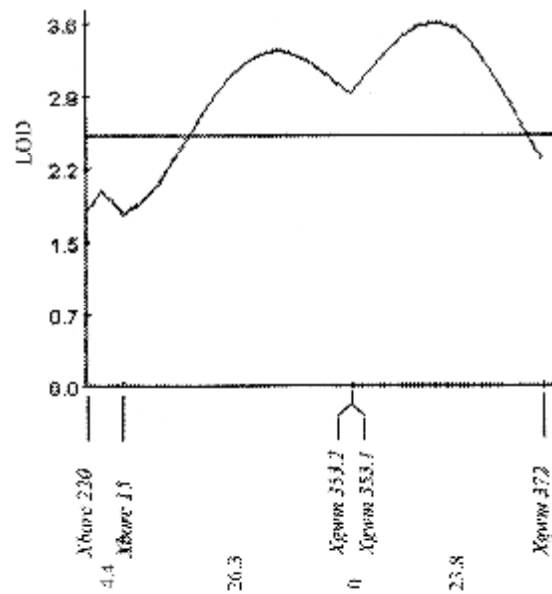
شکل ۴ - نقشه پیوستگی نشانگرهای ریز ماهواره و مکان سه QTL شناسایی شده در نسل F_2 حاصل از تلاقی فلات با ونگشویبی برای مقاومت به FHB به روش مکان یابی فاصله ای. نشانگرها در سمت راست کروموزوم ها نوشته شده اند. اعداد سمت چپ کروموزوم ها نیز بیانگر فاصله بین نشانگرها بر حسب سانتی مورگان (cM) است.

جدول ۲- نشانگرهای احاطه کننده، مکان کروموزومی، LOD، ضریب تبیین و اثرهای افزایشی QTL های شناسایی شده برای مقاومت به FHB با استفاده از جمعیت های F_2 و $F_{2,3}$ حاصل از تلاقی فلات با ونگشویبای

جمعیت	نشانگرهای احاطه کننده QTL	کروموزوم	LOD	ضریب تبیین (R^2)	اثر افزایشی
F_2	Xbarc 15-Xbarc 353.2	2AL	۷/۸۵	۲۰/۹	۱۴/۷۶
	Xgwm 389-Xgwm 533	3BS	۵/۲۲	۱۳/۹	۹/۸۱
	Xgwm 369-Xgwm 2	3AS	۵/۴۲	۱۴/۴	۱۰/۱۹
F_2	Xbarc 133- Xgwm 493	3BS	۵/۷	۱۶	۱۰/۷۲
	Xbarc 353.1- Xgwm 372	2AL	۳/۶۰	۹/۱	۷/۵۰



ج



الف

شکل ۵- QTL های شناسایی شده برای مقاومت به FHB با روش مکان یابی فاصله ای مرکب در روی کروموزوم های (الف) 2A و 3B (ب) با استفاده از جمعیت $F_{2,3}$ حاصل از تلاقی فلات و ونگشویبای

منابع مورد استفاده

- اعتباریان ح ر و ترابی م، 1374. بیماریزایی جدایه های مختلف *F. graminearum* و حساسیت ارقام گندم نسبت به قارچ عامل بیماری در مرحله گیاهچه . آفات و بیماری های گیاهی، جلد 63، شماره 9، صفحه های 9 الی 112.
- اعتباریان، ح ر و ترابی م، 1375 . بررسی مقاومت ارقام مختلف گندم نسبت به فوزاریوز سنبله گندم. بیماری های گیاهی . جلد 32 ، شماره های 1 و 2، صفحه های 9 الی 15.
- صارمی ح، 1379 . بیماری های گیاهی ناشی از گونه های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. 160 صفحه.
- ملیحی پور ع، اخوت م و علیزاده ع. 1379. تجزیه و تحلیل پیشرفت بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم در شرایط کنترل شده با استفاده از مدل های اپیدمیولوژیکی . بیماری های گیاهی. جلد 36 ، صفحه های 135 الی 153.
- Anderson JA, Stack RW, Liu S, Waldron BL, Fjeld AD, Coyne C, Moreno-Sevilla B, Mitchell J, Fetch AD, Song QJ, Cregan PB and Frohberg RC, 2001. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. Theor Appl Genet 102: 1164-1168.
- Bai GH, Kolb FL, Shaner GE and Domier LL, 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. Phytopathology 89: 343-348.
- Bai GH and Shaner GE, 1994. Scab of wheat. Prospects for control. Plant Dis 78: 760-766.
- Basten CJ, Weir BS and Zeng ZB, 2001. QTL Cartographer: A reference manual and tutorial for QTL mapping, North Carolina State University, USA.
- Buerstmayr H, Lemmens M, Hartl L, Doldi L, Steiner B, Stierschneider M and Ruckebauer P, 2002. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). Theor Appl Genet 104: 84-91.
- Chen J, Griffey CA, Saghai Maroof MA, Zhao W, Xie W, Pridgen T and Biyashev RM, 2000. Genetic analysis of resistance to Fusarium head blight in common wheat. Pp. 19-24. Proceedings of the National Fusarium Head Blight Forum 10-12 December, 1999. Erlanger, KY, USA.
- Cregan PB, Ward R and Gill BS, 2001. Preliminary BARC SSR maps and primer pair details. http://www.scabusa.org/research_bio.html.
- Gervais L, Dedryver F, Morlais JY, Bodusseau V, Negre S, Bilous M, Groos C and Trottet M, 2003. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat. Theor Appl Genet 106: 961-970.
- Kolb FL, Bai GH, Muehlbauer GJ, Anderson JA, Smith KP and Fedak G, 2001. Host Plant resistance genes for Fusarium head blight: Mapping and manipulation with molecular markers. Crop Sci 41:611-619.
- Kosambi. DD, 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann Eugen 12: 172-175
- Manly KF and Olson JM, 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTX. Mammal Genome 10: 327-334.

- Mardi M, Buerstmayr H, Ghareyazie B, Lemmens M, Mohammadi SA, Nolz R and Ruckebauer P, 2005. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a Wangshuibai-derived population. *Plant Breeding* 124: 329-333.
- McMullen MP, Jones R and Gallenberg D, 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis* 81: 1340-1348.
- Miedaner T, 1997. Review: Breeding wheat and rye for resistance to Fusarium diseases. *Plant Breed* 116: 201-220.
- Otto CD, Kianian SF, Elias RM, Stack RW and Joppa LR, 1999. Molecular mapping for FHB resistance in a RICL population of tetraploid wheat. *Agron Abstr* 159-160.
- Parry DW, Jenkinson P and McLeod L, 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals-a review. *Plant Pathol* 44: 207-238.
- Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P and Ganal MW, 1998. A microsatellite map of wheat genetics. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Rudd JC, Horsley RD, McKendry AL and Elias EM, 2001. Host plant resistance genes for Fusarium head blight: Sources, mechanisms and utility in conventional breeding systems. *Crop Sci* 41: 620-627.
- Saghai-Marouf MA, Soliman K, Jorgensen RA and Allard RW. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci*, Pp. 8014-8018. USA.
- Schreoder HW and Christensen JJ, 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838.
- Shen X, Ittu M and Ohm HW, 2003a. Quantitative trait loci conditioning resistance to Fusarium head blight in wheat line F201R. *Crop Science* 43: 850-857.
- Shen X, Zhou M, Lu W and Ohm H, 2003b. Detection of Fusarium head blight resistance QTL in a wheat population using bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet* 106: 1041-1047.
- Snijders CHA, 1990. Diallel analysis of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Euphytica* 50: 1-9.
- Steiner B, Lemmens M, Griesser M, Scholz U, Schondelmaier J and Buerstmayr H, 2004. Molecular mapping of resistance to Fusarium head blight in the spring wheat cultivar Frontana. *Theor Appl Genet* 109: 215-224.
- Waldron BL, Moreno-Sevilla B, Anderson JA, Stack RW and Froberg RC, 1999. RFLP mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. *Crop Sci* 39: 805-811.
- Zhou WC, Kolb FL, Bai GH, Domier LL, Boze LK and Smith NJ, 2003. Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breed* 122: 40-46.