ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸
صفحه ۲۹۰ - ۲۸۱

تهیه نقشه ژنتیکی اشباع جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب گندم نان بهاره با استفاده از روش ارزیابی ژنوتیپی با توالی‌یابی (Genotyping by Sequencing)

Construction of high density linkage map in spring bread wheat recombinant inbred lines using genotyping by sequencing (GBS) method

نیر عبدالهی سیسی[۱]، سید ابوالقاسم محمدی[*۲]، سارا غفاریان[۳]

۱- دانش‌آموخته دکتری دانشگاه تبریز

۲- استاد گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، قطب علمی اصلاح مولکولی غلات، دانشگاه تبریز

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

Abdolahi Sisi N[1], Mohammadi SA[*2], Ghafarian S[4]

1. PhD Graduated of Plant Biotechnology, University of Tabriz
2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Center of Excellence in Cereal Molecular Breeding
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mohammadi@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۴ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

چکیده

نقشه‌های ژنتیکی اشباع لازمه مکان‌یابی دقیق مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی می‌باشند. در این مطالعه، نقشه ژنتیکی اشباع جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب گندم نان بهاره حاصل از تلاقی رقم Yecora Rojo و ژنوتیپ بومی No. 49 با استفاده از روش ارزیابی ژنوتیپی با توالی‌یابی (GBS) تهیه شد. برای شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs)، توالی‌یابی والدین و لاین‌های اینبرد نوترکیب به‌صورت تکرار دار در سه لاین دستگاه ایلومینا Illumina Hiseq 2500 انجام شد. در مجموع، بیش از ۳۶ هزار SNP شناسایی شد که ۸۰۴ SNP به هیچ گروه کروموزومی منتسب نشد. از این تعداد SNP، ۳۰۴۲ به زیرژنوم A، ۳۹۷۷ به زیرژنوم B و ۷۶۹ SNP به زیرژنوم D تعلق داشتند. پس از حذف SNPهایی با داده گمشده بیش از ۲۰ درصد، فراوانی آلل نادر کمتر از ۵ درصد و نیز دارای انحراف تفرق از نسبت مندلی ۱:۱، تعداد ۵۸۳۱ نشانگر SNP شناسایی و به ۲۱ کروموزوم گندم منتسب شد. این نشانگرها، ۳۶۴۲/۱۴ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم را با متوسط فاصله ۰/۶۲ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش دادند.

واژه‌های کلیدی

ارزیابی ژنوتیپی با توالی‌یابی (GBS)
چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی
گندم
نقشه پیوستگی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

مقدمه

گندم به‌عنوان مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین محصول در سراسر دنیا توجه گسترده پژوهشگران و محققان را به خود جلب کرده است. افزایش عملکرد گندم در شرایط تغییر اقلیم کنونی از چالش‌های اصلی برنامه‌های اصلاحی این گیاه می‌باشد و لازمه این کار شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات مرتبط است. تهیه و توسعه نقشه‌های پیوستگی اشباع در گندم به‌عنوان گام اساسی در پروژه‌های اصلاحی محسوب می‌شود که امکان شناسایی، مکان‌یابی ژن‌ها، تعیین عمل هر ژن و سهم آن در تبیین واریانس فنوتیپی صفت را فراهم می‌سازد (Jamann et al. 2015). پیشرفت و توسعه تکنولوژی‌های توالی‌یابی نسل آتی (NGS) کاربرد SNPها برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی اشباع جهت استفاده در انواع تجزیه‌های ژنتیکی را ممکن ساخته است.

چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی، نشانگرهایی با تغییر تک نوکلئوتید در یک توالی DNA، با یک جایگزین معمول از دو نوکلئوتید ممکن در مکان مشخص می‌باشند. (Liao and Lee 2010). پیش از ظهور تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (Next Generation Sequencing: NGS)، محققان برای اجتناب از بخش‌های تکراری ژنوم به استراتژی‌های تجربی مختلف مثل توالی‌یابی‌دوباره قطعات تکثیری و شناسایی SNPها از طریق مطالعات *in silico* و استخراج SNPها از داده پایگاه‌های EST تکیه می‌کردند (Batley et al. 2003). علاوه بر اندازه بزرگ ژنوم، به دلیل ماهیت آلوپلوئیدی و داشتن سه ژنوم همولوگ و درنتیجه وجود توالی‌های بسیار همولوگ مطالعه و تجزیه SNPها در گندم مشکل‌تر است (Kozlova et al. 2009). چون که تنوع اللی توالی می‌تواند با تغییرات همولوگ (تفاوت موجود بین نسخه‌های ژنی در ژنوم‌های A، B و D) و پارالوگ (تفاوت در نسخه‌های تکراری که ممکن است داخل یک ژنوم مد نظر وجود داشته باشد) اشتباه گرفته شود (Ravel et al. 2007). در واقع تجزیه ژنوم در گندم نان دارای چالش‌های اساسی است. علاوه بر ساختار هگزاپلوئید پیچیده، ژنوم گندم بسیار بزرگ (۱۷ گیگا بایت، حدود ۴۰ برابر ژنوم برنج و ۶ برابر ژنوم انسان) است و شامل ۹۰-۸۰ درصد توالی تکراری می‌باشد (Safar et al. 2010; Lai et al. 2015).

چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی مکررترین نوع چندشکلی ژنتیکی را نشان می‌دهد و از این رو توسعه بالاترین تراکم نشانگرهای مولکولی را باعث می‌شوند (Lai et al. 2015). حجم زیاد داده‌های حاصل از تکنیک‌های NGS پتانسیلی برای شناسایی تعداد زیادی از SNPها را هم در توالی‌های بیان شده و هم در نواحی دیگر ژنوم فراهم کرده است (Visendi et al. 2013). ارزیابی ژنوتیپی با توالی‌یابی که یکی از تکنیک‌های NGS است شناسایی هم‌زمان SNP و ارزیابی ژنوتیپی را فراهم کرده است. به‌خصوص در گونه‌هایی با کمبود توالی‌های ژنوم مرجع، یک مزیت مهم به شمار می‌رود (Kim and et al. 2016).

روش GBS ابتدا توسط Elshire et al. (2011) با استفاده از یک آنزیم برشی ابداع شد. سپس Poland et al. (2012) پروتکل GBS را با استفاده از دو آنزیم برشی که شامل یک آنزیم با جایگاه تشخیص چهار نوکلئوتیدی و یک آنزیم با جایگاه تشخیص شش نوکلئوتیدی ارتقا و نشان دادند که توسعه روش‌های GBS و نقشه‌های ژنتیکی با تراکم (چگالی) بالا یک پیشرفت مهم در مطالعات ژنتیکی گونه‌های گیاهی با کمبود توالی‌های ژنوم مرجع محسوب می‌شود. هم‌چنین هزینه برای هر نمونه در این روش نصف هزینه در روش‌های توالی‌یابی کل ژنوم می‌باشد. استفاده از دو آنزیم برشی می‌تواند به‌صورت یکنواخت و مناسب پیچیدگی ژنوم را کاهش دهد (Catchen et al. 2013). در GBS به اطلاعات ژنومی اولیه گونه مورد نظر نیازی نیست، و شناسایی SNPها و ارزیابی ژنوتیپی هم‌زمان انجام می‌گیرد. بنابراین، GBS بر کاستی‌های روش‌های قدیمی شناسایی SNP که براساس PCR یا آرایه بودند فائق آمده است و هزینه کمتری برای به‌دست آوردن حجم مناسب داده‌ها نیاز است (Kim et al. 2016). همچنین ماهیت دو اللی SNPها را می‌توان با تعداد زیاد نشانگرهای SNP مورد استفاده جبران کرد که هزینه این کار نیز بستگی به نوع گیاه و منابع توالی‌های در دسترس برای آن ژنوم دارد. SNPهای شناسایی شده توسط GBS می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ساده در مطالعات ژنومیکس از جمله تهیه نقشه پیوستگی استفاده شدند.

روش GBS در گونه‌های گیاهی مختلف مانند یولاف (*Avena sativa* L.) برای اشباع نقشه ژنتیکی (Huang et al. 2014)، گراس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

علفی (*Panicum virgatum* L.) برای تهیه نقشه ژنتیکی (Fiedler et al. 2015)، سورگوم (*Sorghum bicolor* L. Moench) برای مکان‌یابی QTLها (Sukumaran et al. 2016)، جو (*Hordeum vulgare* L.) جهت مطالعات تکاملی (Mascher et al. 2016)، به‌کار رفته است. Lin et al. (2015) برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با مقاومت به جوانه‌زنی قبل از برداشت در گندم از روش GBS استفاده نمودند. نقشه‌ی ژنتیکی شامل ۲۰۲۹ نشانگر SNP حاصل از GBS و ۹۳ نشانگر SSR، ۱۱۹/۱۸سانتی‌مورگان از ژنوم گندم با متوسط فاصله ۱/۲۸ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش داد. Li et al. (2015) در سه جمعیت RIL گندم نان، نقشه پیوستگی نشانگرهای DArT حاصل از روش GBS را به‌منظور شناسایی مناطق ژنومی دخیل در مقاومت به بیماری زنگ، تهیه کردند. Boehm et al. (2017) از ۶۰۷ نشانگر SNP حاصل از GBS و ۸۱ نشانگر SSR برای تهیه نقشه پیوستگی در ۱۳۲ لاین اینبرد نوترکیب گندم استفاده کردند. این نقشه شامل ۳۵ گروه پیوستگی منطبق با همه کروموزوم‌های گندم به جز 4D، و طول پوشش ۱۸۱۳/۴ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم و متوسط چگالی ۲/۹ سانتی‌مورگان به ازای هر نشانگر بود. برخلاف سیستم‌های نشانگری قبلی، نقشه‌های ژنتیکی حاصل از نشانگرهای SNP اشباع یا حتی فوق اشباع می‌باشند، بنابراین مکان‌یابی دقیق ناحیه مورد نظر، شناسایی نشانگرهای پیوسته بیشتر با ژن‌های کنترل کننده صفات، تسریع همسانه‌سازی ژن یا QTL امکان‌پذیر شده‌است (Mammadov et al. 2012).

اهداف این پژوهش شامل ۱) شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) از طریق GBS کل ژنوم و ۲) تهیه نقشه پیوستگی براساس نشانگرهای SNP شناسایی شده بود.

مواد و روش‌ها

جمعیت مورد استفاده شامل ۱۴۹ لاین اینبرد نوترکیب گندم نان بهاره حاصل از تلاقی رقم Yecora Rojo (زودرس و پاکوتاه با منشأ امریکا به‌عنوان والد پدری) و ژنوتیپ شماره ۴۹ (دیررس و پابلند با منشأ سیستان و بلوچستان به‌عنوان والد مادری) بود. جمعیت حاصل از طریق روش بالک تک بذری تولید و تا زمان رسیدن به خلوص گزینشی در لاین‌ها انجام نشده‌است.

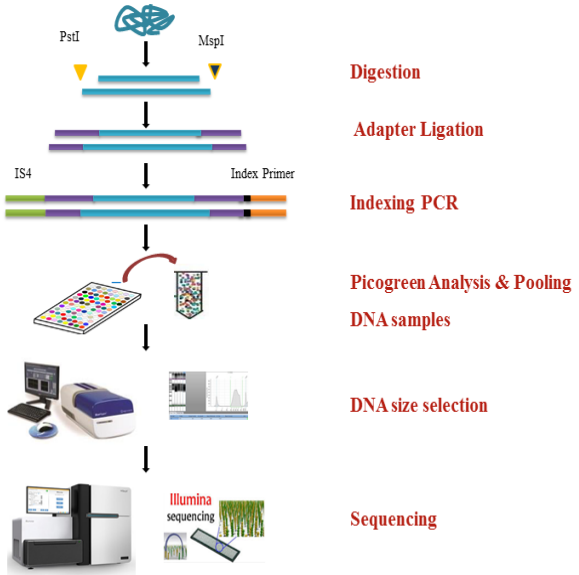
ارزیابی ژنوتیپی

ارزیابی ژنوتیپی با استفاده از تکنیک GBS در گروه ژنومیک منابع ژنتیکی (GGR) مؤسسه‌ی IPK آلمان، انجام شد. جهت تشکیل کتابخانه GBS از پروتکل Poland et al. (2012) استفاده شد. DNA ژنومی استخراج شده لاین‌های اینبرد به همراه والدین پس از تعیین کمیت (۲۰ ng/µl) و کیفیت با استفاده از دو آنزیم برشی *PstI* (با جایگاه برشی CTGCAG) و *MspI* (با جایگاه برشی CCGG) جهت کاهش پیچیدگی ژنوم مورد برش واقع شدند. در این روش، DNA ژنومی هر فرد پس از برش و کاهش پیچیدگی ژنومی، نشانمند و سپس تکثیر شد تا پس از مخلوط شدن نمونه DNA افراد مختلف یا حتی گونه‌های مختلف و تهیه کتاخانه ژنومی و توالی‌یابی آن‌ها، توالی هر فرد یا هر گونه با توجه به کد (Index) مربوطه قابل شناسایی باشد. برای بررسی کیفیت قطعات بعد از PCR دوباره از ژل الکتروفورز آگاروز ۲ درصد استفاده شد. جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب به‌همراه دو تکرار از هر کدام از والدین که دارای کدهای متفاوت بودند ادغام شدند. در مرحله نهایی، انتخاب قطعات مورد نظر با اندازه ۶۰۰-۱۵۰ جفت‌باز توسط دستگاه BluePipen انجام شد. کتابخانه GBS برای توالی‌یابی در سه لاین دستگاه Illumina Hiseq 2500 بارگذاری شد. شکل ۱ نمای کلی از مراحل مختلف تهیه کتابخانه GBS را نشان می‌دهد.

تجزیه داده‌های GBS براساس روش‌های مبتنی بر ژنوم مرجع و با استفاده از نرم‌افزارهای SAMtools (Mascher et al. 2013) انجام گردید. ابتدا فایل Fastq یا توالی‌های خام حاصل از GBS از نظر کیفیت خوانش‌ها بررسی و با نرم‌افزار Cutadapt عمل حذف توالی‌های آداپتوری از خوانش‌ها انجام گرفت. سپس انتصاب خوانش‌ها به ژنوم مرجع با استفاده از نرم‌افزار BWA (Li et al. 2009; Li 2013) انجام شد.

ژنوم گندم Chinese spring که توسط گروه بیوانفوماتیکی IPK و کنسرسیوم بین‌المللی توالی‌یابی ژنوم گندم IWGSC تهیه شده بود به‌عنوان ژنوم مرجع در نظر گرفته شد. هم‌ردیف کردن خوانش‌ها به هر کروموزوم ژنوم مرجع و شناسایی چندشکلی‌ها توسط نرم‌افزارهای SAMtools و BCFtools انجام گرفت.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]



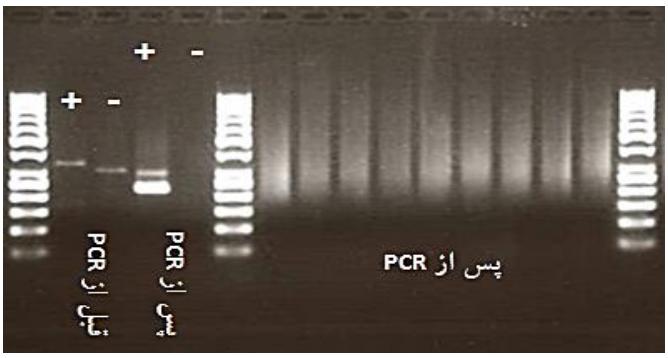
شکل ۱- مراحل مختلف تهیه کتابخانه GBS

پارامترهای مورد استفاده جهت شناسایی SNPها یا چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی و اعمال فیلتر مناسب شامل فراوانی الل نادر مساوی و کمتر از ۰/۰۵، حداکثر داده گمشده ۲۰ درصد، کمترین عمق خوانش ۴ برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت و حداکثر مقدار هتروزیگوتی برابر با ۱۰ درصد (باتوجه به اینکه بیشترین هتروزیگوتی مورد انتظار در جمعیت RIL معمولاً ۱۰ درصد است) بود. پس از حذف SNPهای دارای داده گمشده و هتروزیگوت برای یکی یا هر دو والد و یا ژنوتیپ مشابه برای دو والد، ماتریس SNPها به‌صورت ۴X (عمق خوانش برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت برابر ۴ بود) تشکیل شد. الگوی هر جایگاه SNP بصورت کدهای صفر (ژنوتیپ در آن مکان مشابه ژنوتیپ ژنوم مرجع بود)، ۲ (ژنوتیپ در آن مکان متفاوت از ژنوتیپ ژنوم مرجع بود) و NA (ژنوتیپ گمشده) امتیازدهی شد. برای تجزیه‌های بعدی دوباره امتیازدهی بصورت دستی انجام شد، به این صورت که اگر SNP لاین‌های اینبرد نوترکیب در یک مکان مشابه ژنوتیپ والد مادری (No.49) بود کد صفر و اگر مشابه والد پدری (Yecora Rojo) بود کد ۲ را گرفت.

SNPهای که از نظر کیفیت ژنوتیپ و نیز از نظر تعداد ژنوتیپ گمشده، دارای کیفیت بالایی بودند، به‌عنوان نشانگر جهت تشکیل نقشه پیوستگی استفاده شدند. تجزیه پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار JoinMap 4.1 (Van Ooijen 2006) براساس تابع مکان‌یابی رگرسیونی و مقدار LOD≥۳ انجام شد. برای تبدیل فاصله ژنتیکی براساس نسبت نوترکیبی به سانتی‌مورگان از تابع مکان‌یابی کوسامبی (Kosambi 1943) استفاده شد. SNPهایی که به هیچ گروه پیوستگی منتصب نشدند و نشانگرهای یکسان (identical) توسط نرم‌افزار JoinMap حذف شد. همچنین نشانگرهایی که از نسبت‌های مندلی (۱:۱) انحراف داشتند و آزمون کای‌اسکور برای آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود نیز به‌صورت دستی از ادامه تجزیه‌ها حذف شدند.

نتایج و بحث

بررسی کمیت و کیفیت قطعات DNA برای تشکیل کتابخانه ژنومی در دو مرحله قبل و بعد از انجام Indexing PCR انجام گرفت. بدین ترتیب که کمیت نه نمونه قطعات DNA به‌صورت تصادفی قبل و بعد از Indexing PCR با استفاده از دستگاه Qubit اندازه‌گیری و کیفیت آن‌ها پس از Indexing PCR به همراه کنترل مثبت (آداپتور با T4 لیگاز) و کنترل منفی (آداپتور بدون T4 لیگاز) با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد در حضور نشانگر اندازه مولکولی ۵۰ bp بررسی شد. جدول ۱ و شکل ۲ کمیت و کیفیت قطعات DNA را نشان می‌دهد. کمیت قطعات DNA قبل و بعد از انجام Indexing PCR نباید به‌ترتیب از ۰/۳ و ۵ ng/µl کمتر باشد. به‌طوری‌که در شکل ۲ نشان داده شده‌است در کنترل منفی به دلیل عدم تکثیر نواری مشاهده نمی‌شود.



شکل ۲- کیفیت قطعات DNA پس از انجام واکنش Indexing PCR به‌همراه کنترل مثبت و منفی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

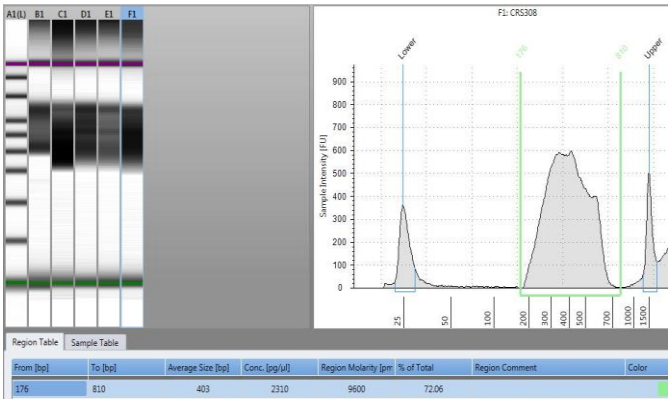
جدول ۱- کمیت تعدادی از نمونه‌های قطعات DNA قبل و بعد از انجام Indexing PCR

شماره نمونه	قبل از Indexing PCR (ng/µl)	بعد از Indexing PCR (ng/µl)
A1-1	۴/۷	۲۸/۲
B1-3	۱۰/۷	۱۶/۸
C1-5	۹/۸	۱۴/۹
D1-7	۷/۲	۲۳/۲
F1-8	۶/۵	۲۲/۶
A2-1	۶/۰	۲۰/۸
B2-3	۶/۵	۲۷/۲
C2-5	۴/۶	۲۵/۴
D2-7	۳/۳	۲۱/۰

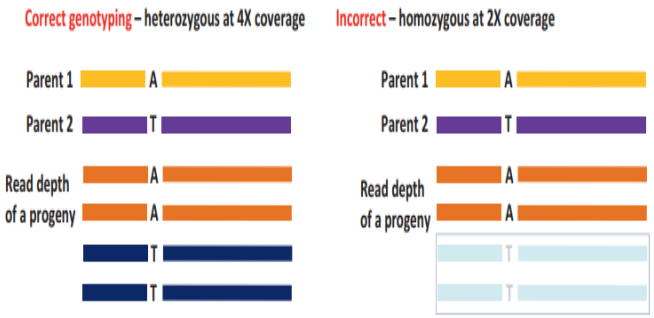
در روش‌های قدیمی برای انتخاب قطعات مورد نظر از ژل آگارز استفاده می‌شد. در این پژوهش، از دستگاه Blue Pippen برای استخراج قطعاتی با طول ۶۰۰-۱۵۰ جفت باز استفاده شد که روشی بدون نیاز به الکتروفورز و بسیار سریع، دقیق و با کارآیی بالاتر نسبت به روش استخراج از ژل آگارز می‌باشد. شکل ۳ نمودار و شکل ژل حاصل (F1، چاهک آخر) برای قطعات DNA کتابخانه GBS را نشان می‌دهد. طول قطعات DNA کتابخانه GBS تهیه شده بین ۱۷۶ تا ۸۱۰ با میانگین ۴۰۳ جفت‌باز بود.

هر کدام از افراد جمعیت سه مرتبه و والدین شش مرتبه توالی‌یابی شدند. در مجموع، ۴۶۵/۵ میلیون با میانگین ۳ میلیون خوانش به‌دست آمد که ۹۸ درصد خوانش‌های پیرایش شده به ژنوم مرجع منتسب شدند. علاوه بر افزایش تعداد لاین‌های توالی‌یابی، در هنگام تجزیه‌های بیوانفورماتیکی نیز اقداماتی برای افزایش دقت توالی‌یابی و تعداد SNPها در نظر گرفته شد. یکی از این اقدامات استفاده از پروتکل تجزیه GBS براساس ژنوم مرجع و دیگری تشکیل ماتریس ۴x برای SNPهای شناسایی شده بود. بدین معنی که کمترین عمق خوانش برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت برابر ۴ در نظر گرفته شد. با افزایش عمق خوانش (از ۲ به ۴) برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت با وجود کاهش تعداد SNPها، دقت تجزیه و تحلیل بالا می‌رود. به‌دلیل ماهیت آلوهگزاپلوئیدی ژنوم گندم، هم‌ردیفی تعداد ۲ خوانش با ژنوم مرجع توصیه نمی‌شود. چرا که خطای ارزیابی ژنوتیپی ناشی از پوشش پایین نواحی می‌تواند عاملی برای عدم تشخیص هموزیگوت‌ها از هتروزیگوت‌ها باشد (Kim et al. 2016). شکل ۴ تأثیر پوشش پایین در خطای ارزیابی ژنوتیپی SNPها را نشان می‌دهد (Kim et al. 2016).

به‌دلیل تعداد SNPهای کمتر ماتریس ۶x، از ماتریس ۴x برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی استفاده شد. چون که ماتریس ۴x هم دارای پوشش کافی برای شناسایی ژنوتیپ‌ها و هم تعداد SNP بیشتری برای تهیه نقشه ژنتیکی اشباع بود. از ۳۶۲۰۹ SNP به‌دست آمده، ۸۰۴ SNP (۲/۲٪) به هیچ گروه کروموزومی منتسب نشدند.



شکل ۳- نمودار و ژل آگارز برای بررسی طول قطعات DNA برای تشکیل کتابخانه GBS. ستون اول حاوی نشانگر اندازه مولکولی و ستون آخر (F1) کتابخانه GBS. نمودار مربوط به طول قطعات DNA با خطوط سبز متمایز شده است.



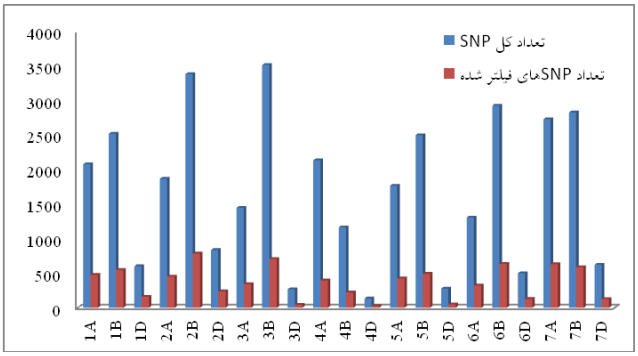
شکل ۴- خطای ارزیابی ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت در پوشش پایین (Kim et al. 2016)

SNPهایی که برای هر دو و یا یکی از والدین دارای ژنوتیپ گمشده و هتروزیگوت بودند حذف شدند. در نهایت ماتریس ۴x با حذف SNPهایی که دارای ژنوتیپ مشابه برای هر دو والد بودند با ۳۵۴۰۵ SNP تشکیل شد. پس از اعمال فیلتر ۲۰٪ و حذف SNPهایی با ژنوتیپ گمشده بیشتر از ۲۰٪، تعداد ۷۷۸۸

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

SNP در ادامه برای تجزیه و تحلیل‌ها استفاده شد. تعداد SNPهای خام و فیلتر شده در شکل ۵ به تفکیک گروه کروموزومی نشان شده‌است. بیشترین تعداد SNP در زیرژنوم B (۵۳٪) شناسایی شد. ژنوم‌های B، A و D به‌ترتیب دارای ۳۹۷۷، ۳۰۴۲ و ۷۶۹ SNP فیلتر شده بودند. کروموزوم‌های ۳B (۳۵۱۶) و ۲B (۳۳۸۴) بیشترین و ۴D کمترین (۱۳۴) تعداد SNP را داشتند. به‌دلیل سطح پایین چندشکلی زیرژنوم D، مطابق انتظار تعداد SNP کمتری به این زیر ژنوم منتسب شد. Gao et al. (2015)، Zhai et al. (2016)، Alipour et al. (2017) و Hussain et al. (2017) نیز تعداد SNP کمتری را در زیرژنوم D نسبت به A و B شناسایی کردند. Lai et al. (2015) برای مطالعه و درک بهتر تنوع ژنوم گندم، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی را بین ۱۶ رقم گندم نان استرالیا بررسی و اطلاعات جفت خوانش‌های حاصل از توالی‌های خرد شده کل ژنوم را در گروه‌های کروموزوم ۷A، ۷B و ۷D مکان‌یابی کردند که منجر به شناسایی بیش از چهار میلیون SNPهای بین ارقام شد. چگالی SNPها بین سه ژنوم متفاوت بود، و تراکم بیشتری روی ژنوم‌های A و B در مقایسه با ژنوم D مشاهده شد. آن‌ها گزارش کردند که این تنوع ممکن است در نتیجه جریان ژنی قابل توجه از گندم تتراپلوئید *Triticum turgidum* باشد. در پژوهشی دیگر توالی‌یابی ۲۷۴ RIL گندم به همراه والدین در سه لاین Illumina HiSeq 2000 براساس پروتکل UNEAK بدون ژنوم مرجع، ۲۱۶۳۱۸ SNP خام حاصل شد که ۲۹/۴۸٪ به ژنوم B، ۲۱/۱۹٪ به ژنوم A و ۱۵/۲۱٪ به ژنوم D منتسب شدند. درصد بالایی از SNPهای خام (۳۴/۱۲٪) به‌دلیل عدم استفاده از ژنوم مرجع در پروتکل، به هیچ گروه کروموزومی منتسب نشدند و ناشناخته ماندند. در این مطالعه پس از اعمال فیلتر ۲۰٪ برای داده‌های گمشده و ۵٪ برای هتروزیگوتی، ۱۷۰۰ SNP برای تجزیه پیوستگی استفاده شد (Xiao et al. 2016).

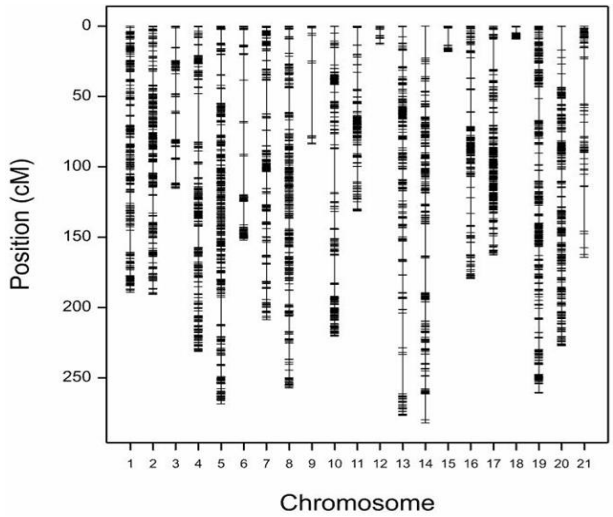
برای تهیه نقشه پیوستگی از ۷۷۸۸ نشانگر SNP براساس تابع مکان‌یابی رگرسیونی و نرم‌افزار Joinmap 4.1 (Van Ooijen 2006) استفاده شد. تابع کوسامبی برای تبدیل نسبت نوترکیبی به فاصله ژنتیکی براساس سانتی‌مورگان استفاده شد. از ۷۷۸۸ SNP مورد استفاده، ۲۶۵ مکان دارای انحراف از نسبت مندلی ۱:۱ بودند و ۱۷۶۴ مکان به هیچ گروه پیوستگی منتسب نشدند.



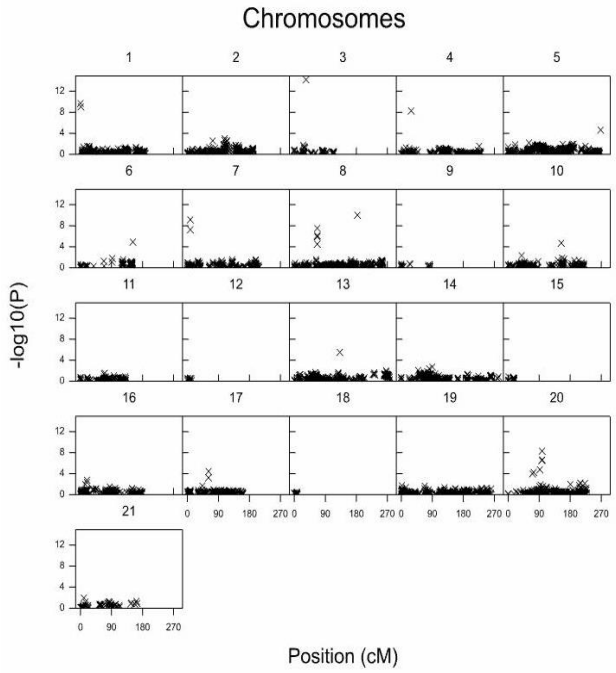
شکل ۵- تعداد SNPهای کل و فیلتر شده تشکیل دهنده ماتریس ۴x برای هر گروه کروموزومی

در مجموع، ۵۸۳۱ نشانگر SNP به ۲۱ گروه پیوستگی منطبق بر کروموزوم‌های گندم نان منتسب شدند. مقدار LOD برای گروه‌های مختلف بین ۸-۳ متغیر بود. تعداد SNPهای خام و فیلتر شده، نشانگرهای منتسب شده به هر گروه پیوستگی، طول هر گروه، فاصله بین دو نشانگر مجاور و تعداد نشانگر در هر سانتی‌مورگان در جدول ۲ برای ۲۱ کروموزوم آورده شده‌است. نقشه ژنتیکی حاصل با ۵۸۳۱ نشانگر، ۳۶۴۲/۱۴ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم را با متوسط فاصله ۰/۶۲ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور پوشش داد. چگالی نقشه پیوستگی به طور متوسط برابر ۱/۶۰ نشانگر در هر سانتی‌مورگان به‌دست آمد. تعداد نشانگرها از ۱۵ برای کروموزوم ۴D تا ۵۷۰ برای کروموزوم ۲B متغیر بود. بیشترین و کمترین طول گروه پیوستگی برابر ۲۸۱/۹۹ و ۹/۱۹ سانتی‌مورگان به‌ترتیب مربوط به کروموزوم‌های ۵B و ۶D بدست آمد. گروه‌های کروموزومی ۶D و ۳D به‌ترتیب کمترین (۰/۳۵) و بیشترین (۵/۳۳) چگالی را داشتند. در مجموع، زیر ژنوم B دارای بیشترین چگالی (۱/۹۳) و کمترین فاصله بین دو نشانگر مجاور (۰/۵۲ سانتی‌مورگان) بود (جدول ۲ و شکل ۶). توزیع نشانگرهای SNP در ۲۱ گروه پیوستگی براساس آزمون کای‌اسکور در شکل ۷ نشان داده شده‌است. نشانگرهایی که انحراف از تفرق آن‌ها براساس آزمون کای اسکور و P<۰/۰۱ معنی‌دار بود از تجزیه حذف شدند. نقشه‌های پیوستگی متعددی در گندم با استفاده از نشانگرهای SNP براساس تکنیک GBS تهیه شده‌است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]



شکل ۶- نقشه ژنتیکی جمعیت RIL گندم حاصل از تلاقی Yecora Rojo و No. 49 براساس نشانگرهای SNP



شکل ۷- توزیع نشانگرهای SNP در ۲۱ گروه کروموزومی براساس آزمون انحراف از تفرق

Hussain et al. (2017) برای مکان‌یابی QTLهای صفات برگ پرچم از نقشه پیوستگی شامل ۳۶۴۱ نشانگر SNP براساس GBS با پوشش ۱۹۵۹/۳۷ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم و متوسط فاصله ۱/۸۶ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور استفاده کردند که بیشترین تعداد نشانگر مربوط به ژنوم B (۵۵/۸۴٪) و کروموزوم 6B (۱۵٪) بود. در پژوهش دیگر نقشه پیوستگی متشکل بر ۲۰۲۹ نشانگر GBS-SNP (داده گمشده<۵۰٪) و ۴۳ نشانگر SSR در ۶۳ گروه پیوستگی با طول ۱۸/۳۷ تا ۱۱۹/۱۸ سانتی‌مورگان در گندم نان تهیه گردید (Lin et al. 2015). این نقشه، ۲۶۴۶/۸۲ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم با فاصله متوسط ۱/۲۸ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور را پوشش داد. نقشه ژنتیکی با چگالی بالا شامل ۲۴۳۱ نشانگر SNP با پوشش ۳۲۱۳/۲ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم با ۱/۲۶ متوسط فاصله سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور برای مکان‌یابی QTLهای مرتبط با صفات دانه گندم نان استفاده شد (Wu et al. 2015). Gao et al. (2015) در ۲۴۶ لاین اینبرد نوترکیب گندم نان با استفاده از آرایه ۹۰K SNP، نقشه‌ی ژنتیکی اشباع مشتمل بر ۵۶۳۶ نشانگر SNP چندشکل با پوشش ۳۶۰۹/۴ سانتی مورگان از ژنوم گندم و متوسط چگالی نقشه ۰/۶۴ تهیه کردند. نقشه پیوستگی مورد استفاده در پژوهش‌های گذشته براساس سایر نشانگرهای مولکولی دارای درجه اشباع کمتری نسبت به نقشه‌های پیوستگی براساس GBS بودند. نقشه‌هایی پیوستگی شامل ۴۷۷ نشانگر SSR، AFLP و DArT با پوشش ۱۶۱۹/۶ سانتی‌مورگان و متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور ۳/۳۹ سانتی‌مورگان (Tahmasebi et al. 2016) و ۳۹۲ نشانگر SSR و DArT با پوشش ۱۵۹۸/۷ سانتی‌مورگان از ژنوم گندم (Gahlaut et al. 2017) گزارش شدند. در جمعیت حاصل از Yecora Rojo × No.49 نقشه پیوستگی براساس نشانگرهای SNP حاصل از GBS نسبت به نقشه پیوستگی پژوهش قبلی که با سیستم نشانگری SSR و رتروترانسپوزون انجام شده بود دارای نشانگر بیشتر و چگالی اشباع‌تر بود. در آن پژوهش ۲۰۱ نشانگر به ۳۴ گروه پیوستگی با طول نقشه ۶۸۷/۲۹ سانتی‌مورگان و میانگین فاصله ۳/۴۲ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور منتسب شد (Abdollahi et al. 2018). می‌توان عنوان کرد که روش GBS به‌عنوان روش بسیار سریع و کارآ، از نظر زمان و هزینه که مهمترین عامل در تحقیقات می‌باشد، علاوه بر انجام هم‌زمان توالی‌یابی با ارزیابی ژنوتیپی میلیون‌ها جایگاه SNP، تهیه نقشه‌های پیوستگی فوق اشباع را امکان‌پذیر می‌سازد. نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر کارآیی بالای روش ارزیابی ژنوتیپی با توالی‌یابی (GBS) در تشکیل نقشه پیوستگی را نشان داد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

جدول ۲- تعداد SNPهای خام، فیلتر شده و منتسب شده به گروه‌های پیوستگی و اطلاعات نقشه پیوستگی برای جمعیت مورد مطالعه

کروموزوم	تعداد SNP اولیه	تعداد SNP بعد از فیلتر	تعداد SNP منتسب شده به گروه‌های پیوستگی	طول گروه پیوستگی cM	فاصله بین دو نشانگر مجاور	تعداد SNP در هر cM
۱A	۲۰۸۰	۴۷۶	۳۹۹	۱۸۹/۲۲	۰/۴۷	۲/۱۱
۲A	۱۸۶۸	۴۵۱	۳۵۶	۲۳۱/۳۲	۰/۶۵	۱/۵۴
۳A	۱۴۴۷	۳۴۲	۲۶۷	۲۰۸/۶۹	۰/۷۸	۱/۲۸
۴A	۲۱۳۵	۳۹۶	۳۳۵	۲۲۰/۳۹	۰/۶۶	۱/۵۲
۵A	۱۷۶۷	۴۲۴	۳۴۳	۲۷۶/۶۸	۰/۸۱	۱/۲۴
۶A	۱۳۰۵	۳۲۳	۲۵۴	۱۷۹/۴۸	۰/۷۱	۱/۴۲
۷A	۲۷۳۰	۶۳۰	۵۰۰	۲۶۰/۸۰	۰/۵۲	۱/۹۲
ژنوم A	۱۳۳۳۲	۳۰۴۲	۲۴۵۴	۱۵۶۶/۶۴	۰/۶۴	۱/۵۷
۱B	۲۵۲۰	۵۴۸	۴۱۹	۱۹۰/۷۲	۰/۴۶	۲/۲۰
۲B	۳۳۸۴	۷۸۵	۵۷۰	۲۶۸/۴۹	۰/۴۷	۲/۱۲
۳B	۳۵۱۶	۷۰۷	۵۴۰	۲۵۷/۱۹	۰/۴۸	۲/۱۰
۴B	۱۱۶۴	۲۲۲	۱۸۰	۱۳۱/۵۰	۰/۷۳	۱/۳۷
۵B	۲۴۹۹	۴۹۲	۳۸۰	۲۸۱/۹۹	۰/۷۴	۱/۳۵
۶B	۲۹۲۶	۶۳۶	۴۲۲	۱۶۲/۶۳	۰/۳۹	۲/۵۹
۷B	۲۸۲۸	۵۸۷	۴۲۲	۲۲۷/۱۹	۰/۵۴	۱/۸۶
ژنوم B	۱۸۸۳۷	۳۹۷۷	۲۹۳۳	۱۵۱۹/۷۰	۰/۵۲	۱/۹۳
۱D	۶۰۱	۱۵۹	۱۰۱	۱۱۵/۳۸	۱/۱۴	۰/۸۸
۲D	۸۳۷	۲۳۷	۱۲۶	۱۵۲/۱۱	۱/۲۱	۰/۸۳
۳D	۲۶۸	۴۳	۲۹	۸۳/۷۰	۲/۸۹	۰/۳۵
۴D	۱۳۴	۲۷	۱۵	۱۲/۸۹	۰/۸۶	۱/۱۶
۵D	۲۷۶	۴۹	۲۹	۱۸/۱۷	۰/۶۳	۱/۶۰
۶D	۴۹۸	۱۲۸	۴۹	۹/۱۹	۰/۱۹	۵/۳۳
۷D	۶۲۲	۱۲۶	۹۵	۱۶۴/۳۶	۱/۷۳	۰/۵۸
ژنوم D	۳۲۳۶	۷۶۹	۴۴۴	۵۵۵/۸۰	۱/۲۵	۰/۸۰
کل	۳۵۴۰۵	۷۷۸۸	۵۸۳۱	۳۶۴۲/۱۴	۰/۶۲	۱/۶۰

سپاسگزاری

از دولت جمهوری اسلامی ایران و وزارت علوم، تحقیقات و فناوری بدلیل فراهم نمودن امکان استفاده نویسنده اول از فرصت تحقیقاتی و از مؤسسه‌ی IPK آلمان، گروه ژنومیک منابع ژنتیکی (GGR) و قطب علمی اصلاح مولکولی غلات دانشگاه تبریز برای فراهم کردن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

منابع

Abdollahi sisi N, Mohammadi SA, Razeghi J (2018) Mapping QTLs for grain yield components in bread wheat under well-watered and rain-fed conditions Journal of Biodiversity and Environmental Science 2: 306-314.

Alipour H, Bihamta MR, Mohammadi V, Peyghambari SA, Bai G, Zhang G (2017) Genotyping-by-sequencing (GBS) revealed molecular genetic diversity of Iranian wheat landraces and cultivars. Frontiers in Plant Science. 8:1293. doi: 10.3389/fpls.2017.01293

Batley J, Barker G, O'Sullivan H, Edwards KJ, Edwards D (2003) Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data. Plant Physiology 132:84-91.

Boehm Jr JD, Ibba MI, Kiszonas AM, See DR, Skinner DZ, Morris CF (2017) Identification of genotyping-by-sequencing sequence tags associated with milling performance and end-use quality traits in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Cereal Science 77:73-83.

Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, Amores A, Cresko WA (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. Molecular Ecology 22:3124-40.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PloS One 6:e19379.

Fiedler JD, Lanzatella C, Okada M, Jenkins J, Schmutz J, Tobias CM (2015) High-density single nucleotide polymorphism linkage maps of lowland switchgrass using genotyping-by-sequencing. The Plant Genome 8.

Gahlaut V, Jaiswal V, Tyagi BS, Singh G, Sareen S, Balyan HS Gupta PK (2017) QTL mapping for nine drought-responsive agronomic traits in bread wheat under irrigated and rain-fed environments. PloS One 12: e0182857.

Gao F, Wen W, Liu J, Rasheed A, Yin G, Xia X, Wu X, He Z (2015) Genome-wide linkage mapping of QTL for yield components, plant height and yield-related physiological traits in the Chinese wheat cross Zhou 8425B/Chinese Spring. Frontiers in Plant Science 6:1099.

Huang YF, Poland JA, Wight CP, Jackson EW, Tinker NA (2014) Using genotyping-by-sequencing (GBS) for genomic discovery in cultivated oat. PloS One 9:e102448.

Hussain W, Baenziger PS, Belamkar V, Guttieri MJ, Venegas JP, Easterly A, Sallam A, Poland J (2017) Genotyping-by-sequencing derived high-density linkage map and its application to QTL mapping of flag leaf traits in bread wheat. Scientific Reports 7:16394.

Jamann TM, Balint-Kurti PJ, and Holland JB (2015) QTL mapping using high-throughput sequencing. In Plant Functional Genomics Humana Press, New York, NY, 257-285.

Kim C, Guo H, Kong W, Chandnani R, Shuang LS, Paterson AH (2016) Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. Plant Science 242: 14-22.

Kosambi DD (1943) The estimation of map units from recombination values. Annals of Eugenics 12: 172-175.

Kozlova SA, Khlestkina EK, Salina EA (2009) Specific features in using SNP markers developed for allopolyploid wheat. Russian Journal of Genetics 45:81-4.

Lai K, Lorenc MT, Lee HC, Berkman PJ, Bayer PE, Visendi P, Ruperao P, Fitzgerald TL, Zander M, Chan CK, Manoli S (2015) Identification and characterization of more than 4 million intervarietal SNP s across the group 7 chromosomes of bread wheat. Plant Biotechnology Journal 13: 97-104.

Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv preprint arXiv:1303.3997.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics 25:2078-9.

Li H, Vikram P, Singh RP, Kilian A, Carling J, Song J, Burgueno-Ferreira JA, Bhavani S, Huerta-Espino J, Payne T, Sehgal D (2015) A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits. BMC Genomics 6:216.

Liao PY, Lee KH (2010) From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. Biochemical Engineering Journal 49:149-58.

Lin M, Cai S, Wang S, Liu S, Zhang G, Bai G (2015) Genotyping-by-sequencing (GBS) identified SNP tightly linked to QTL for pre-harvest sprouting resistance. Theoretical and Applied Genetics 128:1385-95.

Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S (2012) SNP markers and their impact on plant breeding. International Journal of Plant Genomics 2012. doi:10.1155/2012/728398.

Mascher M, Schuenemann VJ, Davidovich U, Marom N, Himmelbach A, Hübner S, Korol A, David M, Reiter E, Riehl S, Schreiber M (2016) Genomic analysis of 6,000-year-old cultivated grain illuminates the domestication history of barley. Nature Genetics 48:1089.

Mascher M, Wu S, Amand PS, Stein N, Poland J (2013) Application of genotyping-by-sequencing on semiconductor sequencing platforms: a comparison of genetic and reference-based marker ordering in barley. PloS One 8:e76925.

Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL (2012) Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. PloS One 7:e32253.

Ravel C, Praud S, Canaguier A, Dufour P, Giancola S, Balfourier F, Chalhoub B, Brunel D, Linossier L, Dardevet M, Beckert M (2007) DNA sequence polymorphisms and their application to bread wheat quality. Euphytica 158:331-6.

Šafář J, Šimková H, Kubaláková M, Číhalíková J, Suchánková P, Bartoš J, Doležel AJ (2010) Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. Cytogenetic and Genome Research 129:211-23.

Sukumaran S, Li X, Li X, Zhu C, Bai G, Perumal R, Tuinstra MR, Prasad PV, Mitchell SE, Tesso TT, Yu J

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]

(2016) QTL mapping for grain yield, flowering time, and stay-green traits in sorghum with genotyping-by-sequencing markers. Crop Science 56:1429-42.

Tahmasebi S, Heidari B, Pakniyat H, McIntyre CL (2016) Mapping QTLs associated with agronomic and physiological traits under terminal drought and heat stress conditions in wheat (*Triticum aestivum* L.). Genome 60: 26-45.

Van Ooijen JW (2006) JoinMap 4. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen, Netherlands, 33.

Visendi P, Batley J, Edwards D (2013) Next generation characterization of cereal genomes for marker discovery. Biology 2:1357-77.

Wu QH, Chen YX, Zhou SH, Fu L, Chen JJ, Xiao Y, Zhang D, Ouyang SH, Zhao XJ, Cui Y Zhang DY (2015) High-density genetic linkage map construction and QTL mapping of grain shape and size in the wheat population Yanda1817× Beinong6. PloS One 10: e0118144.

Xiao X, Ohm HW, Hunt GJ, Poland JA, Kong L, Nemacheck JA, Williams CE (2016) Genotyping-by-sequencing to remap QTL for type II Fusarium head blight and leaf rust resistance in a wheat–tall wheatgrass introgression recombinant inbred population. Molecular Breeding 36:51.

Zhai H, Feng Z, Li J, Liu X, Xiao S, Ni Z, Sun Q (2016) QTL analysis of spike morphological traits and plant height in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) using a high-density SNP and SSR-based linkage map. Frontiers in Plant Science 7: p.1617.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-10-22]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1398.14.4.10.0]