دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تجزیه ارتباطی تجمع کادمیم در گندم با استفاده از نشانگرهای AFLP و RAPD

بابک صارمی راد[۱]، مجید شکرپور[۲]، امید سفالیان[۳]، سیده الهه هاشمی نژاد[۴]، آرمن آوانس[۵] و عزت‌اله اسفندیاری[۶]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه محقق اردبیلی، (نویسنده مسوول: bsaremirad@yahoo.com)
۲- استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳ و ۴- دانشیار و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه محقق اردبیلی
۵ و ۶- استادیار و دانشیار، دانشگاه مراغه
تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۴

چکیده

کادمیم عنصری سمی و غیر ضروری برای انسان و گیاه است که به راحتی از طریق گیاهان جذب می‌شود. وجود تنوع ژنتیکی در ارتباط با تجمع کادمیم امکان استفاده از روش‌های اصلاحی برای گزینش ژنوتیپ‌هایی با میزان تجمع کم کادمیم را فراهم می‌آورد. با توجه به هزینه زیاد تجزیه بافت‌های گیاهی برای تعیین میزان کادمیم، استفاده از نشانگرها برای کمک به گزینش ژنوتیپ‌هایی با تجمع کم کادمیم روش موثری به شمار می‌آید. از این رو به منظور بررسی کارایی نشانگرهای AFLP و RAPD در شناسایی و تعیین خصوصیات مربوط به تجمع کادمیم در گندم، آزمایشی با دو سطح کادمیم شامل صفر (شاهد) و ۰/۲۵ میلی‌مولار و ۴۳ ژنوتیپ گندم انجام گردید. در تجزیه AFLP با استفاده از شش ترکیب آغازگردر مجموع ۳۲۸ نوار با میانگین ۵۴/۶۶ نوار به ازای هر ترکیب آغازگر تولید شد که از این تعداد، ۲۰۷ نوار دارای چندشکلی بود. در تجزیه RAPD تعداد شش آغازگر از ۵۰ آغازگر ارزیابی شده با الگوی نواری مناسب برای بررسی تمام ژنوتیپ‌ها استفاده شد. این آغازگرها در مجموع ۳۱ نوار چند شکل با ۵/۱۶ نوار به ازای هر آغازگر تولید کردند. رابطه بین داده‌های مولکولی و صفات مورد اندازه‌گیری از طریق تحلیل رگرسیون چندگانه مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۱۱۳ نشانگر آگاهی‌بخش در سطح شاهد و ۷۷ نشانگر آگاهی‌بخش در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم شناسایی شد. تعدادی از نشانگرها با بیش از یک صفت رابطه معنی‌دار داشتند. نتایج این تحقیق درتأمین اطلاعات اولیه برای انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کادمیم، گندم، نشانگر، AFLP، RAPD

مقدمه

کادمیم (Cd) عنصری سمی و غیر ضروری برای انسان و گیاه است که به راحتی از طریق گیاهان جذب می‌شود.

گونه‌های گیاهی و ارقام یک گونه از نظر تحمل و تجمع کادمیم متفاوت هستند (۳). وجود تنوع ژنتیکی در یک گونه از نظر تجمع کادمیم، امکان گزینش ارقامی را فراهم می‌آورد که علاوه بر مقاومت نسبت به سمیت کادمیم، تجمع این فلز سنگین در بیومس آن‌ها نیز کمتر باشد. این امر به منظور کاهش خطرات بالقوه‌ی کادمیم برای سلامتی انسان و تولید گیاهی، راهکاری ضروری و مناسب به شمار می‌آید.

تنوع گسترده‌ای در ارقام گندم نان (۱۹،۵) و گندم دوروم (۶) از نظر جذب کادمیم مشاهده شده است. با این حال، هزینه زیاد و نیز زمان‌بر بودن تجزیه شیمیایی بافت‌های گیاهی برای تعیین میزان کادمیم، مانعی بر سر راه گزینش لاین‌هایی با تجمع کم کادمیم به شمار می‌آید (۱۲).

امروزه استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژن‌های کنترل کننده صفات کمّی، فرایند گزینش را در اصلاح نباتات تسریع کرده است. به طوری که به جای ارزیابی صفات، گزینش غیرمستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته صورت می‌گیرد (۱۸). روی و همکاران (۱۴) در تجزیه ارتباط ژنوتیپ و فنوتیپ برای ۵۵ ژنوتیپ گندم با استفاده از ۲۰ جفت آغازگر ریزماهواره، دو جفت آغازگر SAMPL و هشت جفت آغازگر AFLP و در مجموع ۵۱۹ نشانگر چندشکل، موفق به شناسایی ۱۳۱ آلل ریزماهواره، ۴۳ نشانگر SAMPL و ۱۶۶ نشانگر AFLP با ارتباط معنی‌دار برای ۱۴ صفت زراعی گردیدند. حمزا و همکاران (۷) از ۱۷ نشانگر ریزماهواره برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم جو و تعیین ارتباط این نشانگرها با برخی صفات مورفولوژیک استفاده کردند. رشیدی و همکاران (۱۳) نیز با استفاده از شش صفت زراعی و ۷۴ نشانگر مولکولی حاصل از ده جفت آغازگر SSAP، ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی را روی ۱۰۸ ژنوتیپ بومی و ۲۱ رقم زراعی گندم دوروم بررسی کردند. ۳۲ نشانگر چند شکل SSAP رابطه معنی‌داری با حداقل یکی صفات زراعی داشت. شایق (۱۷) در بررسی ارتباط نشانگرهای ریزماهواره و RAPD و هشت صفت مورفولوژیک در ۳۲ ژنوتیپ کلزا، رابطه معنی‌داری بین ۱۳ آلل ریزماهواره و عملکرد دانه در هکتار شناسایی کرد. در مطالعه ۶۷ لاین اینبرد ذرت با استفاده از ۴۹ جفت نشانگر ریزماهواره که در مجموع ۴۱۰ الل چندشکل تولید کرده بودند، تعداد ۳۲ آلل از ۱۵ نشانگر با رابطه معنی‌دار برای ۱۵ صفت زراعی شناسایی شد (۱).

مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که از میان آن‌ها می‌توان به امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی و شناسایی آلل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم اشاره کرد (۹).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]

استفاده از نشانگرها برای کمک به گزینش ژنوتیپ‌هایی با تجمع کم کادمیم روش موثری به‌شمار می‌آید. در واقع، توانایی تشخیص و گزینش تفاوت‌های ژنتیکی از نظر میزان کادمیم در مراحل اولیه رشد، زمان و هزینه برنامه‌های اصلاحی را کاهش خواهد داد. پژوهش حاضر با هدف بررسی کارایی نشانگرهایAFLP و RAPD در شناسایی و تعیین خصوصیات مربوط به تجمع کادمیم در گندم طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

۴۳ ژنوتیپ گندم (جدول ۱) در دو سطح کادمیم (صفر و ۰/۲۵ میلی‌مولار) به روش هیدروپونیک کشت و در مرحله گیاهچه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی انجام گردید. سطوح کادمیم کرت اصلی و ژنوتیپ‌های گندم کرت فرعی در نظر گرفته شد.در این پژوهش گیاهان در یک بستر مخلوط غیرآلی (پرلیت و ورمیکولیت)–که یکی از روش‌های کشت هیدروپونیک است–، کشت گردید. گلدان‌های محتوی گیاهچه‌های گندم (۲۷×۳۷ سانتی‌متر) هفته اول با آب معمولی یک روز در میان آبیاری شد. با اتمام اندوخته بذور از محلول غذایی با pH حدود ۵/۵ استفاده شد (۴). بعد از رسیدن گیاهچه‌های گندم به مرحله ۴–۳ برگی به محلول غذایی مقدار ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم کلرید اضافه شد. اعمال تیمارهای مذکور به مدت ۲۴ روز ادامه یافت. از محلول غذایی نیز برای شاهد استفاده گردید (۲).

پس از گذشت ۲۴ روز از اعمال تیمار، پنج گیاه در هر تکرار انتخاب و پارامترهای هدایت روزنه‌ای، فلورسانس و میزان کلروفیلبا استفاده از برگ سوم هر بوته سنجش شد (۱۶). میزان کلروفیل بر اساس قرائت دستگاه کلروفیل‌سنج SPAD-502 Plus ساخت شرکت KonicaMinolta اندازه‌گیری شد. این دستگاه به طور خودکار با اندازه‌گیری طیف جذبی در محدوده‌ی نور آبی (۴۰۰–۵۰۰ nm) و در محدوده‌ی نور قرمز (۵۰۰–۶۰۰ nm) میزان کلروفیل را به صورت غیرتخریبی تعیین می‌کند. برای اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل از دستگاه پرتابل فلورومتر (تنش‌سنج) OS-30p ساخت شرکت OPTI-SCIENCES استفاده شد. قسمت میانی برگ به مدت ۱۵ دقیقه داخل گیره در تاریکی قرار گرفت، سطح نوری دستگاه روی دو تنظیم شد و پس از آن اندازه‌گیری انجام گرفت. هدایت روزنه‌ای با استفاده از دستگاه پورومتر برگ ساخت شرکتDECAGON DEVICES مورد سنجش قرار گرفت. به این منظور برگ طوری داخل گیره دستگاه قرار داده شد که سطح زیرین آن مقابل سنسور قرار گیرد.به منظور کاهش خطا برای هر تکرار سه بار قرائت انجام شد و از میانگین آنها به‌عنوان اندازه‌گیری مربوط به هر تکرار استفاده شد. طول ریشه و اندام هوایی با استفاده از خط‌کش برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. پس از قرار دادن نمونه‌های گیاهی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک اندام هوایی و ریشه از طریق ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ محاسبه شد. بیومس (عملکرد بیولوژیک) از مجموع وزن خشک ریشه و اندام هوایی به دست آمد.

جدول ۱– اسامی ژنوتیپ‌های گندم مورد استفاده درآزمایش

Table 1. Names wheat genotypes used in trial

ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ
۱	آرتا	۱۵	داراب۲	۲۹	مهدوی
۲	مارون	۱۶	هیرمند	۳۰	اکبری
۳	پیشتاز	۱۷	روشن	۳۱	فلات
۴	آتیلا۴	۱۸	بک‌کراس روشن	۳۲	پیشتاز۱
۵	بهار	۱۹	نیک‌نژاد	۳۳	شیرودی
۶	دریا	۲۰	یاواروس	۳۴	چمران
۷	زاگرس	۲۱	آریا	۳۵	لاینA
۸	سپاهان	۲۲	شعله	۳۶	کرج۲
۹	سرخ‌تخم	۲۳	آزادی	۳۷	مغان۱
۱۰	کوهدشت	۲۴	کویر	۳۸	کرخه
۱۱	اروند	۲۵	قدس	۳۹	مرودشت
۱۲	البرز	۲۶	کرج۳	۴۰	طبسی
۱۳	آتیلا۵۰	۲۷	چناب	۴۱	۶۰۵
۱۴	سیستان	۲۸	گلستان	۴۲	PG-1252
				۴۳	PGS

برای تعیین میزان کادمیم، بافت‌های نمونه‌های گیاهی خشک شده ابتدا پودر شد و بعد از آن با استفاده از ترکیب HNO_3-$HClO_4$ هضم گردید. محلول حاصل گرم شد، تا بخارات اسیدی از آن خارج شود. سپس حجم محلول به ۲۵ میلی‌لیتر رسید و از کاغذ صافی عبور داده شد. غلظت کادمیم محلول با استفاده از دستگاه جذب اتمی AA-6300 ساخت شرکت SHIMADZU مورد سنجش قرار گرفت (۱۶).

به منظور استخراج DNA برای انجام تجزیه‌های مولکولی، نمونه برگی از تکبوته‌ها به‌طور جداگانه برداشت شد.استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت (۱۵).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]

برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

تجزیه AFLP براساس روش ووس و همکاران (۲۲) با تغییرات جزئی انجام گرفت. در این تکنیک از آنزیم‌های برشیPstI و Tru1I–که به‌ترتیب دارای جایگاه برشیشش و چهار بازی هستند–، استفاده شد. الکترفورز قطعات حاصل از تکثیر انتخابی از طریق دستگاه الکتروفورز عمودی توالی‌یاب ساخت شرکت Bio-Rad مدلSequi-Gen GT با ابعاد شیشه ژل ۵۰×۳۸ سانتی‌متر مربع صورت گرفت.آغازگرهای این واکنش دارای توالی یکسان با آغازگرهای مرحله تکثیر مقدماتی می‌باشند، با این تفاوت که سه باز انتخابی اضافی داشتند. الکتروفورز با استفاده از ژل پلی آکریلامید ۴/۵ درصد و با توان ثابت ۱۰۰ وات به مدت دو ساعت انجام گردید. در نهایت برای مرئی کردن قطعات تکثیر شده از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

در تجزیه RAPD به منظور بهینه‌سازی شرایط، غلظت واکنش‌گرها برای حجم ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد. اجزای تشکیل‌دهنده هر واکنش عبارت بود از: بافر ۱۰x با غلظت ۱x، کلرید منیزیم با غلظت دو میلی‌مولار، dNTP به غلظت ۰/۲ میلی‌مولار از هر کدام، آغازگر ده نوکلئوتیدی به غلظت ۰/۱۳۲ میکرومولار، ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۳/۳۳ نانوگرم در میکرولیتر، یک واحد آنزیم Taq و آب دو بار استریل. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و نوارها با استفاده از اتیدیوم بروماید در معرض نور UV آشکار گردید.

هر یک از مکان‌های تکثیر شده به‌وسیله آغازگر یک صفت در نظر گرفته شد و حضور داشتن و یا نداشتن آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شد.

رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات مورد اندازه‌گیری در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (هدایت روزنه‌ای، فلورسانس و میزان کلروفیل، طول اندام هوایی و ریشه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، عملکرد بیولوژیک و میزان کادمیم اندام هوایی و ریشه) با استفاده از رگرسیون گام به گام بررسی شد. به این ترتیب که هر صفت کمّی متغیر وابسته و نشانگرهای مولکولی متغیرهای مستقل در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تمام صفات تفاوت قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه داشتند. اثر کادمیم در کلیه صفات مورد بررسی به جز فلورسانس کلروفیل و طول ریشه معنی‌دار بود. برای صفات کلروفیل، وزن خشک اندام هوایی، عملکرد بیولوژیک (بیومس)، کادمیم اندام هوایی و کادمیم ریشه اثر متقابل ژنوتیپ در کادمیم معنی‌دار بود. میانگین سطوح مختلف کادمیم برای صفات مذکور نشان داد که کادمیم به کاهش معنی‌دار میانگین صفات در کلیه ارقام نسبت به شاهد منجر گردید. در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم، ژنوتیپ‌های PG-1252 و گلستان بیشترین و ژنوتیپ‌های داراب۲، مغان۱ و آتیلا۵۰ کمترین تجمع کادمیم را در اندام هوایی داشتند. بیشترین تجمع کادمیم در ریشه مربوط به ژنوتیپ‌های آریا و گلستان بود و پیشتاز۱، چمران و شیرودی کمترین میزان کادمیم را در ریشه دارا بودند. بیشترین آسیب ناشی از کادمیم مربوط به وزن خشک اندام هوایی و بیومس و کمترین آسیب مربوط به طول ریشه و فلورسانس کلروفیل بود (داده‌های مربوطه آورده نشده است).

از بین یازده ترکیب آغازگر در تجزیه AFLP، شش ترکیب با الگوی نواری مناسب مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). سایر ترکیب‌ها یا هیچ‌گونه نواری تولید نکردند و یا این‌که محصولات تکثیر شده آنها وضوح و قابلیت تکرارپذیری کافی نداشت. شش ترکیب آغازگر مورد استفاده در مجموع ۳۲۸ نوار با میانگین ۵۴/۶۶ نوار به ازای هر ترکیب آغازگر تولید کردند که از این تعداد ۲۰۷ نوار دارای چندشکلی بود.بیشترین تعداد نوار چند شکل در ترکیب آغازگر p2 (۴۴ نوار) و کمترین آن مربوط به ترکیب آغازگر p5 (۲۹ نوار) بود. در این پژوهش به دست آمدن تعداد بالای نوارهای پلی‌مورف در مقابل تعداد کم نوارهای مونومورف در ترکیبات آغازگری نشان داد که تجزیه و تحلیل AFLP پتانسیل بالایی برای یافتن تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارد. بنابراین به کارگیری این آغازگرها در برنامه‌های اصلاحی ممکن است در شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش– که همبستگی بالایی با صفات مهم زراعی دارند–، مفید باشد.

در تجزیه RAPD تعداد شش آغازگر از ۵۰ آغازگر ارزیابی شده با الگوی نواری مناسب برای بررسی تمام ژنوتیپ‌ها استفاده شد. این آغازگرها در مجموع ۳۱ نوار چند شکل با ۵/۱۶ نوار به ازای هر آغازگر تولید کردند. بیشترین درصد چند شکلی (۶۰٪) مربوط به آغازگر rp5 بود (جدول ۴). نمونه‌ای از الگوی نواربندی آغازگرهای AFLP و RAPD در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است.

میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه AFLP بین ۰/۳۹ در آغازگر P-AGT/M-CAG تا ۰/۴۴ در آغازگر P-ATG/M-CTG متغیر بود. مقدار PIC نشان‌دهنده کارایی آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق بود که می‌توان آنها را برای مطالعات مشابه پیشنهاد نمود. معیار PIC توان تمایز هر آغازگر را از طریق تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی و فراوانی نسبی آلل‌ها تعیین می‌کند. برای نشانگر RAPD، آغازگر Oligo-57 بیشترین PIC (۰/۴۶) را دارا بود.

بر اساس تجزیه رگرسیون داده‌هایAFLP و RAPD و صفات مورد اندازه‌گیری در مجموع ۱۱۳ نشانگر آگاهی‌بخش در سطح شاهد (۹۸ نشانگر AFLP و ۱۵ نشانگر RAPD) و ۷۷ نشانگر آگاهی‌بخش در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم (۷۲ نشانگر AFLP و ۵ نشانگر RAPD) شناسایی شد (جدول ۳). توالی‌یابی نوارهای آگاهی‌بخش و مقایسه آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی به اطمینان انتخاب به کمک نشانگر و همسانه‌سازی آن‌ها می‌افزاید.

پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمّی (QTLها) محتمل‌ترین توجیه برای رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات کمّی می‌باشد. وجود

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]

نشانگرهای مولکولی برای صفات مذکور ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند. به این ترتیب این امکان برای اصلاحگران فراهم می‌آید که بدون آن‌که مجبور به در نظر گرفتن تأثیرات محیطی باشند، دست به گزینش ژن‌های مرتبط با تجمع کم کادمیم بزنند. البته برای اطمینان از وجود ارتباط پیوسته بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های تفرق می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل‌کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها مشخص شود (۱۱).

کمترین تعداد نشانگر در سطح شاهد مربوط به کادمیم اندام هوایی با چهار نشانگر و بیشترین مربوط به طول ریشه با پانزده نشانگر مولکولی بود. در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم، فلورسانس کلروفیل با پانزده نشانگر بیشترین و هدایت روزنه‌ای و طول ریشه با سه نشانگر کمترین تعداد نشانگر آگاهی‌بخش را داشتند. بیشترین میزان تغییرات تبیین شده به وسیله نشانگرهای آگاهی‌بخش مربوط به صفت طول اندام هوایی (۱۹/۷٪) در سطح شاهد و وزن خشک اندام هوایی (۱۵/۹٪) در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم بود. وزن خشک ریشه در هر دو سطح کمترین میزان تغییرات تبیین شده را داشت.

با توجه به ضریب تبیین صفت کادمیم در ریشه و اندام هوایی و نیز تعداد نوارهای مرتبط با اطمینان بالایی نمی‌توان در مورد کارایی نشانگرهای مذکور در گزینش برای میزان کادمیم اظهار نظر کرد (جدول ۳). به این منظور نیاز به ارزیابی‌های بیشتر دیگری است. اول اینکه نشانگرهای اختصاصی برای این صفت باید شناسایی یا ایجاد شوند و سپس سهم اللی نشانگر اختصاصی در یک جمعیت بزرگ مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به‌دست آمده که مبنایی پایه ای است،می تواند برای پژوهش‌های آتی مورد استفاده قرار گیرد. از نشانگرهای مولکولی می‌توان برای نقشه‌یابی پیوستگی از طریق تجزیه تفرق توده[1] استفاده کرد. تجزیه تفرق توده به‌طور موفقیت آمیزی در شناسایی دو نشانگر RAPD پیوسته به ژن غالب کنترل‌کننده‌ی میزان کادمیم دانه در گندم دوروم به کار گرفته شد و ژن اصلی Cdu1 در بازوی بلند کروموزوم 5B گندم نقشه‌یابی گردید (۱۲).

نشانگرهای مرتبط با ژن اصلی موثر در تجمع کادمیم در یولاف (۱۹) و QTLهای کنترل کننده میزان کادمیم در برنج قهوه‌ای شناسایی شده است. QTLهای موثر در میزان کادمیم ریشه و اندام هوایی در Thlapsi caerulescens نیز نقشه‌یابی شده است (۲).

تعدادی از نشانگرها دارای رابطه معنی‌دار با بیش از یک صفت بودند که بیانگر این موضوع است که صفات مذکور پیوستگی بسیار نزدیکی با هم داشته و یا احتمالاً تحت تأثیر ژن‌های چند اثره قرار دارند؛ به عنوان مثال در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم نشانگرهای p1m13 و p2m22 برای فلورسانس کلروفیل و کادمیم ریشه، p3m9 برای وزن خشک اندام هوایی و کادمیم اندام هوایی، p5m24 برای وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، بیومس و کادمیم ریشه، rp4m2 برای طول اندام هوایی و وزن خشک ریشه و rp6m1 برای کلروفیل و وزن خشک ریشه به‌طور مشترک رابطه معنی‌دار نشان دادند. تهیه جمعیت‌های تفرق و نقشه‌یابی پیوستگی برای درک بهتر این موضوع می‌تواند مفید باشد. نشانگرهای p5m28 و rp2m3 در سطح شاهد و نشانگرهای p2m7 و p2m26 در سطح ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم دارای ضریب رگرسیون منفی برای صفت کادمیم اندام هوایی بودند. به این ترتیب ژنوتیپ‌های دارای این نشانگر به علت داشتن مقادیر کم کادمیم در اندام هوایی مطلوب خواهند بود. تفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر تجمع کادمیم در اندام هوایی می‌تواند در تعیین میزان تجمع کادمیم در دانه مفید باشد. یا دست کم حاکی از انتقال کادمیم به دانه در طول پر شدن می‌باشد. تنوع ژنتیکی در تجمع کادمیم در اندام هوایی ممکن است ناشی از تفاوت در جذب کادمیم یا تفاوت در حرکت کادمیم درون گیاه باشد (۸). نتایج تحقیقات مانه و همکاران (۱۰) نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین تجمع کادمیم در دانه و تجمع آن در اندام هوایی در شرایط مزرعه وجود دارد.

جدول۲- تعداد نشانگرهای چند شکل تولید شده از طریق شش ترکیب آغازگر AFLP در ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی
Table 2. Number of polymorphic markers generated by six AFLP primer combinations in wheat genotypes studied

ترکیب آغازگر	تعداد کل نوارها	تعداد نوارهای چند شکل	درصد چند شکلی
(p1) P-CGA/M-CTA	۵۸	۴۲	۷۲/۴۱
P-ATG/M-CTG(p2)	۵۱	۴۴	۸۶/۲۷
(p3) P-ATG/M-CAT)	۷۱	۳۱	۴۱/۸۹
(p4) P-AGT/M-CTA	۴۸	۳۰	۶۲/۵۰
(p5) P-AGT/M-CAG	۴۹	۲۹	۵۹/۱۸
(p6) P-ATG/M-CAG	۵۱	۳۱	۶۰/۷۸

1- Bulked Segregant Analysis

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]

جدول ۳- نشانگرهایAFLP و RAPD مرتبط با صفات مورد بررسی در سطح شاهد و ۰/۲۵ میلی‌مولار کادمیم
Table 3. AFLP and RAPD markers associated with traits in control and 25/0 mM cadmium

صفت	سطح کادمیم	نشانگر*	R^2(٪)
فلوئورسانس کلروفیل	شاهد	p1m3، p1m41، p1m42، p1m32، p2m32، p3m24، p4m3، p6m15، p6m19، p6m23، rp1m5	۱۱/۸
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m6، p1m13، p1m20، p1m30، p1m35، p1m39، p2m22، p3m8، p3m13، p3m18، p3m24، p4m1، p4m18، p5m15، p5m12	۱۴/۳
کلروفیل	شاهد	p1m2، p2m7، p2m27، p3m19، p4m15، p5m25، p5m29، p6m4، p6m15، p6m19، p6m25، p6m31، rp1m5، rp6m4	۱۰/۴
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m7، p4m24، p6m4، p6m19، rp6m1	۱۵/۶
هدایت روزنه‌ای	شاهد	p1m5، p1m18، p2m11، p2m2، p4m2، p5m13، p6m13، p6m23، p6m29	۱۱/۲
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m8، p6m3، p6m29	۱۰/۲
طول اندام هوایی	شاهد	p1m19، p1m34، p1m41، p2m2، p2m30، p4m4، p5m1، p5m2، p5m17، p5m21، p6m29، rp2m1، rp6m4	۱۹/۷
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m7، p1m18، p1m30، p2m3، p5m2، p5m5، rp4m2	۱۴/۷
طول ریشه	شاهد	p1m28، p1m29، p2m23، p2m30، p2m36، p4m5، p4m9، p5m3، p5m21، p5m23، p6m3، p6m29، p6m30، rp6m5، rp1m3	۱۳/۲
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p4m15، p5m3، p5m10	۱۱/۷
وزن خشک اندام هوایی	شاهد	p1m14، p1m25، p1m39، p3m12، p4m6، p5m6، p5m24، p5m28، rp5m2، rp6m1	۱۷/۴
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m25، p3m3، p3m4، p3m6، P3m9، p3m12، p5m6، p5m17، p5m24، p5m28	۱۵/۹
وزن خشک ریشه	شاهد	p1m6، p1m22، p2m29، p2m30، p2m35، p3m16، p4m4، p5m17، p5m22، p5m23، p5m28، p5m29، p6m19	۰/۰۸
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m5، p1m39، p2m34، p5m6، p5m17، p5m24، p5m28، p5m29، rp4m2، rp6m1	۰/۰۷
عملکرد بیولوژیک	شاهد	p1m4، p1m14، p1m25، p1m39، p3m12، p4m6، p5m6، p5m24، p5m28، p6m7، rp5m2، rp6m1	۱۷/۷
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m25، p3m3، p3m4، p3m6، p3m12، p5m6، p5m17، p5m24، p5m28	۱۵/۱
کادمیم اندام هوایی	شاهد	p3m27، p4m6، p5m28، rp2m3	۱۲/۷
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p2m7، p2m22، p2m26، p2m44، P3m9، p6m7، p6m14، p6m18	۱۰/۱
کادمیم ریشه	شاهد	p1m3، p1m24، p1m28، p2m8، p2m25، p3m16، p3m23، p4m14، p5m7، p5m18، rp2m4، rp4m3، rp6m2	۱۲/۱
	۰/۲۵ میلی‌مولار	p1m13، p1m14، p1m42، p2m19، p2m41، p5m24، rp6m6	۱۳/۱

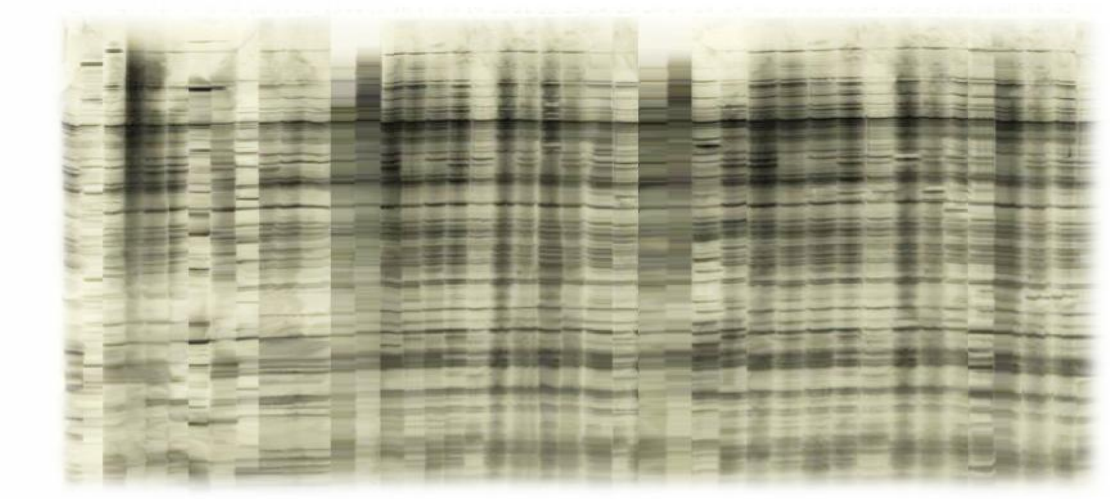
*: نشانگرهای AFLP با حرف p و نشانگرهای RAPD با حرف rp نمایش داده شده است. اولین و دومین اندیس به‌ترتیب نشان‌دهنده شماره آغازگر و شماره نشانگر است.

جدول ۴- تعداد نشانگرهای چند شکل تولید شده به وسیله شش ترکیب آغازگر RAPD در ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی
Table 4. Number of polymorphic markers generated by RAPD primer combinations in six wheat genotypes studied

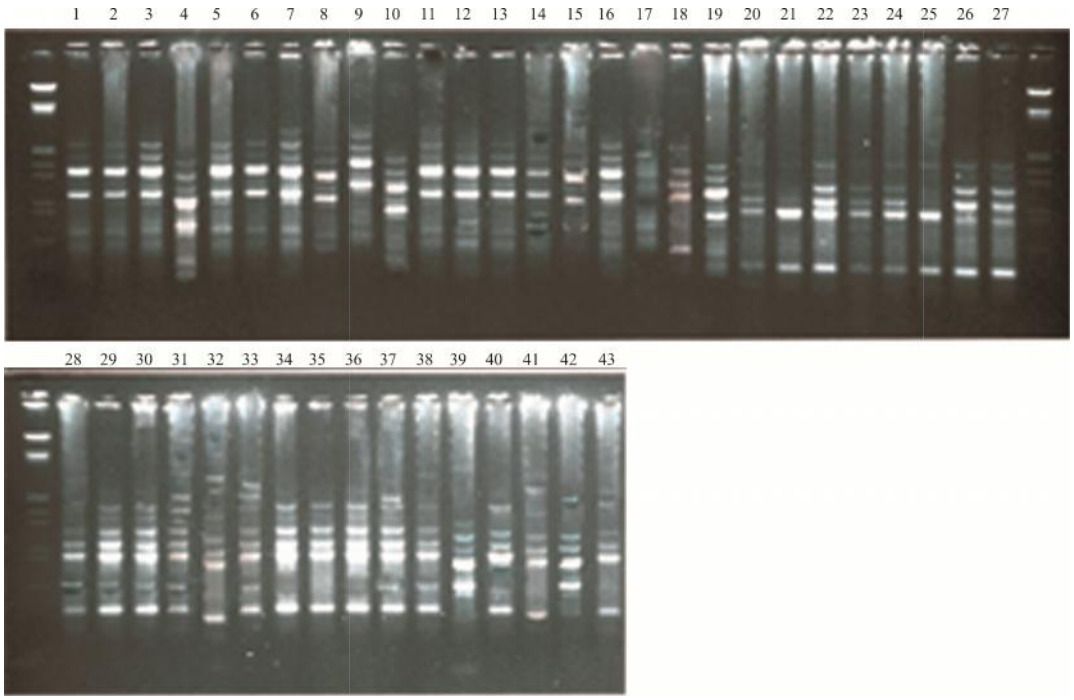
آغازگر	تعداد کل نوارها	تعداد نوارهای چند شکل	درصد چند شکلی
(rp1) Oligo-62	۱۵	۶	۴۰
(rp2) Oligo-63	۱۰	۴	۴۰
(rp3) Oligo-64	۱۱	۶	۵۴/۵۴
(rp4) Oligo-57	۹	۳	۳۳
(rp5) Oliga-34	۱۰	۶	۶۰
(rp6) Oliga-23	۱۱	۶	۵۴/۵۴

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]



شکل۱- الگوی نواربندی AFLP با ترکیب آغازگری P-ATG/M-CAT در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه
Figure 1. AFLP banding patterns with primer combinations P-ATG / M-CAT in wheat genotypes studied



شکل۲- الگوی نواربندی RAPD با آغازگر Oligo-34 در ژنوتیپ‌های گندم مورد مطالعه
Figure 2. primer Oligo-34 RAPD banding patterns in wheat genotypes studied

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]

منابع

1. Asgari A. 2006. Genetic relationships of Iranian maize inbred germplasm using microsatellite markers and identification of informative markers for important agronomic traits. M.Sc. Thesis in agricultural biotechnology, Faculty of agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. 292 pp (In Persian).
2. Ci, D., D. Jiang, B. Wollenweber, T. Dai, Q. Jing and W. Cao. 2010. Genetic variance in cadmium tolerance and accumulation in wheat materials differing in ploidy and genome at seedling stage. Journal of Agronomy and Crop Science, 196: 302-310.
3. Clemins, S., M.G. Palmgren and U. Krämer. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends in Plant Science, 7: 309-315.
4. Esfandiari, E., M. Shokrpour and S. Alavi-Kia. 2010. Effect of Mg deficiency on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation. Journal of Agricultural Science, 3: 131-136.
5. Gray, C.W., R.G. McLaren and A.H.C. Roberts. 2001. Cadmium concentration insome New Zealand wheat grain. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 29: 125-136.
6. Greger, M. and M. Lofstedt. 2004. Comparison of uptake and distribution of cadmium in different cultivars of bread and durum wheat. Crop Science, 44: 501-507
7. Hamza, S., W.B. Hamida, A. Rebai and M. Harrabi. 2004. SSR-Based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. Euphytica, 135: 107-118.
8. Harris, N.S. and G.J. Taylor. 2004. Cadmium uptake and translocation in seedlings of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. Plant Biology, 4: 1-12.
9. Ibrahimi, A., M. Naghavi, M. Sabokdast and A. Moradi. 2011. Association analysis with microsatellite markers for agronomic traits in Iranian native barlies. Modern Genetics Journal, 6: 35-43 (In Persian).
10. Mane, A.V., R. Sankpal and S. Ambawade. 2010. Cadmium chloride induced alteration in growth and cadmium accumulation in *Triticum aestivum*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 5: 206-215.
11. Naghavi, M.R., M. Mardi, S.M. Pirseyedi, M. Kazemi, P. Potki and M.R. Ghaffari, 2007. Comparison ofgenetic variation among accessions of *Aegilops tauschii*using AFLP and SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 237-240.
12. Penner, G.A., J. Clarke, L.J. Bezte and D. Leisle. 1995. Identification of RAPD markers linked to a gene governing cadmium uptake in durum wheat. Genome, 38: 543-547.
13. Rashidi, S., M. Mardi, A. Hosseinzadeh and M. Naghavi. 2008. Association analysis between main agronomic traits and SSAP retrotransposon markers in durum wheat. Modern Genetics Journal, 3: 29-35 (In Persian).
14. Roy, J.K., R. Bandopadhyay, S. Rustgi, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science, 90: 683-694.
15. Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance chromosomal location, population dynamics. Proceedings of the Nationa Academy of Sciences of the United States of America, 81: 8014-8018.
16. Saremi Rad, B., E. Esfandiari, M. Shokrpour, O. Sofalian, A. Avanes and S.B. Mousavi. Cadmium effects on some morphological and physiological parameters in wheat at seedling stage. Iranian Journal of Biology, 27: 1-11 (In Persian).
17. Shayiq, F. 2005. Evaluation of genetic diversity in winter canola cultivars using DNA markers. M.Sc. thesis in agricultural biotechnology, Faculty of agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. 316 pp (In Persian).
18. Shokrpour, M., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam, S.A. Ziai and A. Javanshir. 2008. Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybium marianum* L.). Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants, 24: 278-292 (In Persian).
19. Stolt, J.P., F.E.C. Sneller, T. Bryngelsson, T. Lundbor and H. Schat. 2003. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. Environmental and Experimental Botany, 49: 21-28.
20. Tanhuanpää, P., R. Kalendar, A.H. Schulman and E. Kiviharju. 2007. A major gene for grain cadmium accumulation in oat (*Avena sativa L.*). Genome, 50: 588-594.
21. Virk, P.S., B.V. Ford-Lioyd, M.T. Jackson, H.S. Pooni, T.P. Clemeno and H.J. Newbury. 1996. Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. IRRI, Rice genetics III, Proceedings of The Third International Rice Genetics Symposium, 307-316.
22. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, D.L. Theovan and M. Hornes. 1995. AFLP: A new technique for DNA frigerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]

Association Analysis of AFLP and RAPD Markers With Cadmium Accumulation in Wheat

Babak Saremi Rad[1], Majid Shokrpour[2], Omid Sofalian[3], Seyyede Elahe Hashemi Nezhad[4], Armen Avanes[5] and Ezatollah Esfandiari[6]

1- M.Sc., University of Mohaghegh Ardabili
(Corresponding author: bsaremirad@yahoo.com)
2- Assistant Professor, University of Tehran, Karaj
3 and 4- Associate Professor, University of Mohaghegh Ardabili
5 and 6- Assistant Professor and Associate Professor, University of Maragheh
Received: July 12, 2014 Accepted: October 26, 2014

Abstract

Cadmium is a toxic unnecessary element for humans and plants which is easily absorbed by plants. Genetic variation in cadmium accumulation provides an opportunity for breeding programs to select genotypes with low cadmium. Due to the high cost of plant tissue analysis to determine the amount of cadmium, use of markers to make efficient selection of low cadmium accumulating genotypes is an effective way. Therefore, to evaluate the effectiveness of AFLP and RAPD markers for identification and determination of cadmium accumulation characteristics in wheat, an experiment was conducted with two cadmium levels including zero (control) and 0.25 mM $CdCl_2$ on 45 wheat genotypes. AFLP analysis using six combinations of primers produced 328 bands with an average of 54.66 bands per primer combination which 207 of these bands were polymorphic. In RAPD analysis, six primers with appropriate banding patterns out of 50 primers were used to evaluate all the genotypes. These primers produced 31 polymorphic bands with 5.16 bands for each primer. Associations between molecular markers and traits were assessed by multiple regression analysis. According to the results of regression analysis, 113 and 77 informative markers were detected at control and 0.25 mM Cd levels, respectively. Some of the markers were significantly associated with more than one trait. The results of this study provide useful preliminary information for indirect selection of traits by associated markers.

Keywords: AFLP, Cadmium, Marker, RAPD, Wheat

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.29252/jcb.8.18.126]