شناسایی نشانگرهای AFLP پیوسته به ژن کنترل کننده تعداد ردیف بذر در جو

بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[۱]

چکیده

صفت دو ردیفه و شش ردیفه بودن بذر در جو توسط ژن vrs1 که روی بازوی بلند کروموزوم ۲H قرار دارد کنترل می‌شود. این صفت در بررسی روند اهلی شدن و میزان محصول جو اهمیت دارد. دو والد کانتو نکیت گولد (دو ردیفه) و آزوماموگی (شش ردیفه) به منظور تهیه لاین‌های تقریباً ایزوژن (NILs) تلاقی داده شدند. لاین‌های تهیه شده به منظور یافتن نشانگرهای پیوسته با ژن مورد نظر با استفاده از نشانگر AFLP مورد استفاده قرار گرفتند.

پس از بررسی ۱۷۹۲ ترکیب جفت آغازگر، تعداد ۵ نشانگر جدید پیوسته به ژن مذکور شناسایی شد. با استفاده از لاین‌های نوترکیب، فاصله تقریبی نشانگرهای انتخاب شده با مکان ژنی vrs1 تعیین گشت. این نشانگرها می‌توانند به منظور همسانه‌سازی و توالی یابی ژن مورد نظر استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: ***جو، ردیف بذر، لاین تقریباً ایزوژن، AFLP، vrs1***

مقدمه

سنبلچه‌های جو زراعی *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* دارای گلچه‌های سه تایی است که در کنار هم قرار دارند. گلچه میانی همواره بارور است و توانایی تبدیل شدن به بذر را دارد ولی دو گلچه جانبی در ارقام دو ردیفه جو بارور نمی‌شود و بذر تولید نمی‌کند در صورتی که این گلچه‌ها در جوهای شش ردیفه بارور می‌باشند. باروری گلچه‌های جانبی به طور عمده توسط ژن *vrs1* که روی کروموزوم ۲H قرار دارد کنترل می‌گردد (۱).

جوهای وحشی *Hordeum vulgare* ssp. *Spontaneum* دو ردیفه هستند و اعتقاد بر این است که جوهای زراعی شش ردیفه از جوهای دو ردیفه اهلی حاصل شده‌اند (۴). مطالعات مولکولی مکان ژنی *vrs1* می‌تواند این فرضیه را تأیید کند یا دلایل جدیدی را در مورد تکامل جوهای زارعی ارائه دهد. علاوه بر آن، مطالعه این مکان ژنی می‌تواند در علم رده بندی و استفاده از منابع ژنتیکی ارزشمند جو مورد استفاده قرار گیرد .

مطالعات نوترکیبی ژنتیکی مکان ژنی *vrs1* با استفاده از

۱. دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-30]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.4.4.6]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

جمعیت‌های در حال تفرق مختلف و نشانگرهای RFLP مشابه، نتایج متفاوتی را نشان داده است (۲). گرانر و همکاران (۳) عدم وجـود نوترکیبی را در این ناحیه ژنی بیان کردند در صورتی که کوماتسـودا و همکـاران (۶ و ۷) نوترکیبـی قابـل توجهـی را گـزارش کردند. پس از تبدیل نشانگرهای RFLP به نشانگرهای STS (۸) نقشـه ژنتیکـی اطـراف مکـان ژنی *vrs*1 نشان داد که MWG801، cMWG699، *vrs*1، ABC311، MWG865 و MWG503 بـه تـرتیب بـا فاصله‌های ژنتیکی بین دو مکان ژنی متوالی ۳/۸ ، ۰/۳ ، ۰/۰، ۱/۰ و ۸/۴ قرار دارند (۱۱).

موضـوع اصـلی ایـن پـژوهش یافـتن نشانگرهای بیشتر در اطـراف مکان ژنی *vrs*1 بود. طبیعتاً نشانگرهای نزدیک‌تر به ژن مـورد نظر از اهمیت بیشتری برخوردار خواهد بود زیرا می‌تواند به منظور جدا کردن و همسانه‌سازی ژن *vrs*1 مورد استفاده قرار گیـرد. بـه ایـن مـنظور بـا اسـتفاده از لایـن‌هـای تقریباً ایزوژن (Near Isogenic Lines, NILs) و به کارگیری تکنیک AFLP به شناسایی نشانگرهای نزدیک به مکان ژنی *vrs*1 پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

ژنوتـیپ‌های گیاهی مورد استفاده در این آزمایش حاصل تلاقی بـین دو رقـم جـو ژاپنـی کانتونکـیت گـولد و آزوماموگی بود. کانتونکـیت گـولد یـک جـو دو ردیفـه (*Vrs*1*Vrs*1) اسـت بـه طـوری‌کـه گلچـه‌هـای کـناری آن دارای بسـاک‌هـای بزرگ و گـرده‌هـای فعـال اسـت ولـی مادگـی آن غیـر فعـال می‌باشد. آزوماموگی یک جو شش ردیفه (*vrs*1*vrs*1) است و باروری در همه گلچه‌های آن یکسان است.

لایـن‌های تقریباً ایزوژن مورد استفاده دارای هم‌ردیف *Vrs*1 از والـد کانتونکـیت گولد بوده که حاصل تلاقی برگشتی با والد آزوماموگـی بـه عـنوان والـد گیـرنده بـوده اسـت. ژنوتیپ‌های مختلفـی در نسـل‌های متعدد توسط نشانگرهای واقع در اطراف مکـان ژنـی *vrs*1 آزمـایش شـدند. یکی از گیاهان نسل BC_7F_1 (M1-7-64) وجـود کراسـینگ اور بـین مکـان‌های ژنی *vrs1* و cMWG699 را نشـان داد. ایـن گـیاه بـه منظور ادامه آزمایش‌ها انتخاب و در نهایت دو گیاه در نسل BC_7F_3 (M1-7-64-11-65 و M1-7-64-12-24) وجـود کراسـینگ اور بـین مکان‌های ژنی *vrs*1 و MWG865 را نشـان دادنـد. بنابراین گیاهان انتخابی در مورد مکان‌های ژنی *vrs*1 و ABC311 به صورت ناخالص ولی در مورد نشانگرهای MWG801 ، cMWG699 ، MWG865 و MWG503 خـالص بـودند. ادامـه آزمایش‌ها نشان داد که محل کراسینگ اور بین مکان‌های ژنی *vrs1* و cMWG699 در گیاه M1-7-64-12-24بـه *vrs*1 نـزدیک‌تـر است. بذرهای حاصل از خـود بـاروری گـیاهان انتخابـی (BC_7F_4) به عنوان جمعیت در حـال تفرق (در مورد مکان ژنی *vrs*1) کشت شدند. حداقل سه هفته پس از گل‌دهی نتاج در حال تفرق، ردیف بذرهای تشکیل شده در تک تک گیاهان مشخص و به منظور اطمینان از صحت انـتخاب، نـتاج آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۶ گیاه دو ردیفـه و ۱۶ گـیاه شـش ردیفـه حاصـل از نـتاج هر یک از گیاهان M1-7-64-11-65 و M1-7-64-12-24 انتخاب شدند.

استخراج DNA ، انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگـرهای STS و تجـزیه داده‌های حاصل بر اساس روش پیشنهادی کوماتسودا و همکاران (۸) انجام گردید.

بـه مـنظور بررسی نشانگرهای AFLP ، برش DNA توسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Mse*I، اتصال آداپتورها (آداپتور e مربوط به ناحـیه برشـی *Eco*RI و آداپـتور m مـربوط به ناحیه برشی *Mse*I)، تکثیـر اولیه (توسط آغازگرهای e000 مربوط به ناحیه آداپتور e و m000 مـربوط بـه ناحـیه آداپـتور m)، تکثیر انتخابی (توسط آغازگـرهای مـورد اسـتفاده در تکثیـر اولـیه کـه دارای سـه باز انتخابـی اضـافی در ناحیه '3 بود) و رنگ آمیزی نقره بر اساس روش ارائـه شـده توسـط مانـو و همکـاران (۱۲) انجـام شـد. نـام‌گـذاری آغازگـرهای مـورد اسـتفاده نیز مطابق با نام گذاری توسـط مانـو و همکـاران (۱۲) بـود. بـه ایـن صـورت کـه e000+AAA بـــه نـــام e01، e000+AAC بـــه نـــام e02، e000+AAG بـه نـام e03، e000+AAT بـه نام e04 و به همین تـرتیب e000+TTT به نام e64 مورد استفاده قرار گرفت. همین روش در مورد نام گذاری آغازگرهای m نیز به کار رفت.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.4.4.6]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

بـه مـنظور تهـیه مخلـوط DNA در آزمـایش تجـزیه تـوده‌ای نسل‌های در حال تفرق (balk segregant analysis)، هشت گیاه دو ردیفـه و هشت گیاه شش ردیفه حاصل از هر یک از گیاهان انتخابی مد نظر گرفته شد. هشت گیاه باقیمانده برای تأیید نتایج به دست آمده استفاده شدند. محل نشانگرهای انتخابی با استفاده از لاین‌های نوترکیب در اطراف *vrs*1 مکان‌یابی شد.

نتایج و بحث

گـیاهان ناخـالص نسـل BC_7F_4 بـرای مکـان ژنـی *vrs*1 دارای گلچـه‌هـای جانبـی با باروری ناقص (۳۰ تا ۶۰ درصد) بوده و کـاملاً قابل تشخیص از گیاهان خالص در این مکان ژنی بودند. بـا ایـن وجـود به منظور اطمینان بیشتر از خلوص گیاهان انتخابی، نتاج آنها بررسی و خلوص گیاهان تأیید شد.

در مـرحله اول هشت گیاه خالص *Vrs*1*Vrs*1 (دو ردیفه) و هشـت گـیاه خـالص *vrs*1*vrs*1 (شـش ردیفـه) حاصل از گیاه ناخـالص M1-7-64-11-64 (BC_7F_3) بـه مـنظور تهـیه مخلوط DNA (یکـی بـرای دو ردیفـه‌هـا و دیگـری برای گیاهان شش ردیفـه) مـورد اسـتفاده قـرار گرفت. تعداد ۱۷۹۲ ترکیب جفت آغازگر حاصل از ۶۴ آغازگر e و ۲۸ آغازگر m به منظور یافتن بانـدهای چـند شـکل بـین دو توده DNA استفاده شد. بررسی باندهای تکثیر شده تعداد ۲۰۹ جفت آغازگر را مشخص کرد که حـاوی باندهای چند شکل بودند. به‌منظور اطمینان از پیوستگی باندهای انتخاب شده با مکان ژنی *vrs*1 ، آغازگرهای مورد نظر روی DNA افـراد تشـکیل دهـنده مخلـوط DNA آزمایش شد. ولـی با آزمایش ۴۰ جفت آغازگر انتخابی، تنها ۳ باند حاصل از جفـت آغازگرهای e31m13 ، e31m26 و e34m13 مورد تأیید قـرار گـرفت. بنابراین ادامه این‌گونه آزمایش زمان‌بر و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبود.

بـر ایـن اسـاس، گـیاهـان حاصـل از گـیـاه انتخـابـی M1-7-64-12-24 بـه مـنظور تأیـید پیوسـتگی باندهای انتخاب شـده بـا مکـان ژنی *vrs*1 استفاده شد. به این منظور هشت گیاه خـالص *Vrs*1*Vrs*1 و هشـت گـیاه خالص *vrs*1*vrs*1 حاصل از گـیاه ناخـالص M1-7-64-12-24 (BC_7F_3) جهـت تهیه مخلوط DNA (یکـی بـرای دو ردیفـه‌هـا و دیگـری برای گیاهان شش ردیفـه) بـه کـار رفت. سپس ۲۰۹ جفت آغازگر انتخابی حاوی بانـدهای چـند شـکل توسـط دو مخلوط DNA ذکر شده مورد آزمـون قرار گرفت که در نتیجه ۲۴ جفت آغازگر مورد تأیید و پـس از آزمـایش آغازگـرهای انتخابـی روی DNA هـر یک از ژنوتـیپ‌هـای تشـکیل دهنده مخلوط DNA ، تعداد سه آغازگر مـورد تأیـید قـرار گـرفت. بـه ایـن معنی که سه باند حاصل از آغازگرهای e40m36، e34m13 و e52m32 در مکان ژنی *vrs*1 قـرار دارنـد. اندازه تقریبی این سه باند به ترتیب ۱۱۱۰، ۲۶۰ و ۲۷۰ باز تخمین زده شد (شکل ۱).

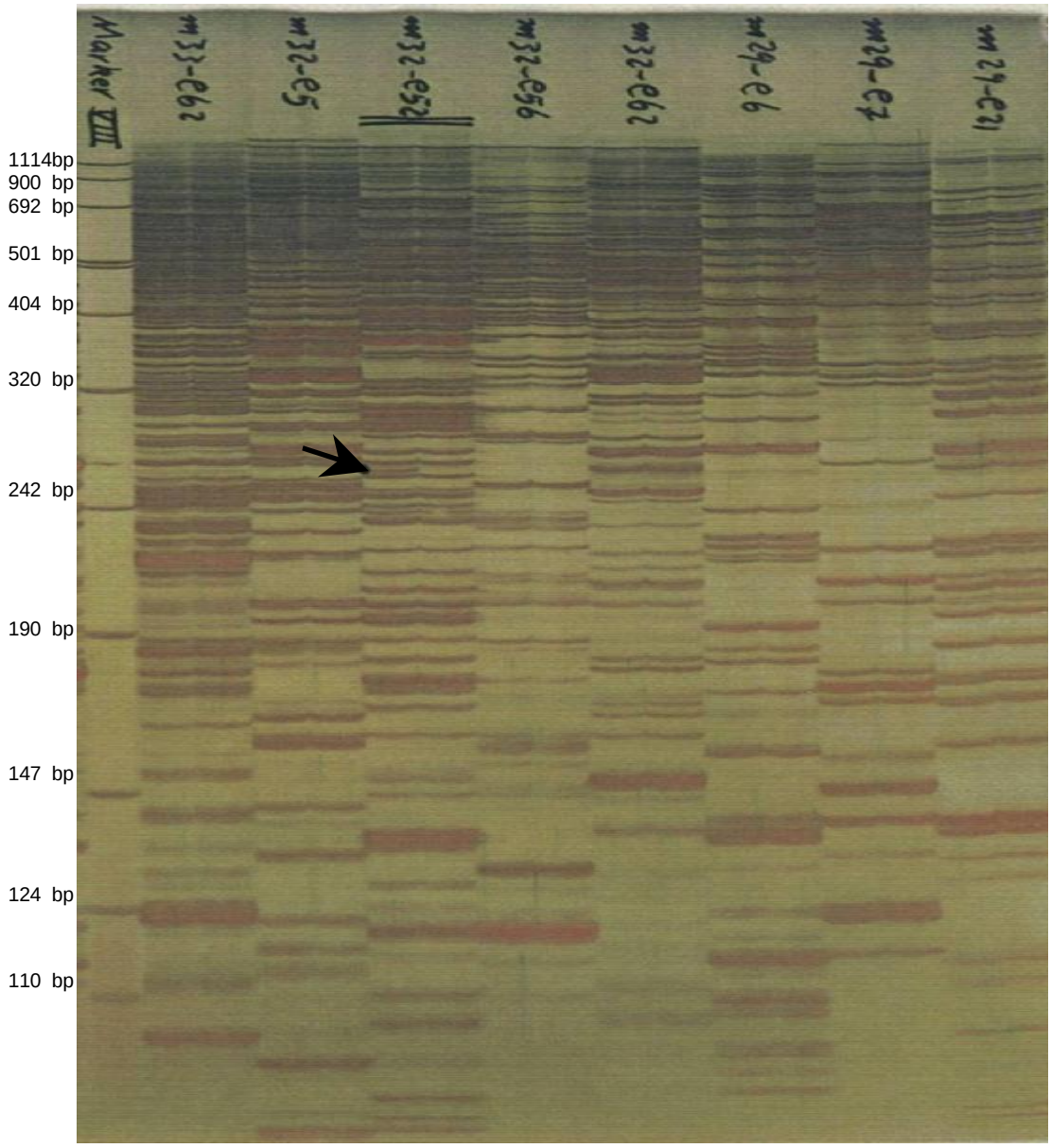
بانـدهای چـند شکل حاصل از جفت آغازگرهای e31m13 (بانـد ۱۶۰ بـازی) و e31m26 (بانـد ۵۲۰ بـازی) کـه براساس مخلـوط DNA حاصـل از نتاج گیاه M1-7-64-11-65 مشخص شـده بودند روی مخلوط DNA حاصل از نتاج گیاه M1-7-64-12-24 بانـدهای هـم شـکل را نشـان دادند. این نتیجه مؤید آن اسـت کـه محـل کراسـینگ اور بـین مکـان‌هـای ژنـی *vrs*1 و cMWG699 در گیاه M1-7-64-12-24 به *vrs*1 نزدیک‌تر است. بنابـراین باندهای چند شکل حاصل از سه آغازگر e40m36، e34m13 و e52m32 در مقایسـه بـا بانـدهای چـند شـکل حاصـل از آغازگـرهای e31m13 و e31m26 بـه مکـان ژنـی *vrs*1 نـزدیک‌تـر خواهند بود.

بـه مـنظور مکان‌یابی نشانگرهای مشخص شده و تهیه نقشه فشـرده ژنتیکـی، تعـداد ۲۱ ژنوتیپ (انتخاب شده از بین ۱۷۵۱ لایـن تقـریباً ایزوژن) که دارای نوترکیبی در فاصله نشانگرهای cMWG699 و MWG865 بـودند، مـورد آزمـون قـرار گرفتند. نـتایج آزمـون مکـان‌های ژنی cMWG699 ، *vrs*1 ، ABC311، MWG865 و نشـانگرهای AFLP تعیـین شـده نشـان داد کـه نشـانگرهای AFLP بـین MWG865 و *vrs*1 قـرار دارنـد. تـرتیب نشـانگرها بـه صـورت cMWG699، *vrs*1، e40m36، e34m13، e52m32، ABC311، e31m26، e31m13 و MWG865 و به ترتیب بـا فواصـل ژنتیکـی تقریبـی بـین دو مکـان ژنـی متوالـی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.4.4.6]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com



شکل ۱. الگوی باندی توده‌های DNA مربوط به *vrs*1 و *Vrs*1 ستون سمت چپ در هر جفت آغازگر مربوط به توده *Vrs*1 می‌باشد. باند انتخاب شده مربوط به آغازگر e52m32 در شکل نشان داده شده است.

۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰، ۰/۰۵، ۰/۰، ۰/۳، ۰/۱ و ۰/۴ سانتی مورگان قرار گرفتند.

فراوانی نوترکیبی در بین نشانگرهای MWG801، MWG865، cMWG699 و *vrs*1 در جمعیت مورد استفاده متفاوت با نتایج حاصل از جمعیت به دست آمده از تلاقی ایگری و فرانکا بود (۳). عدم وجود نوترکیبی در آن جمعیت ممکن است به علت تعداد کم افراد جمعیت مورد استفاده (۷۱ ژنوتیپ) باشد. علاوه بر آن جمعیت مورد بررسی لاین‌های هاپلوئید مضاعف حاصل از نسل F_1 بوده است که تنها یک بار امکان رخداد نوترکیبی در هر ناحیه کروموزومی وجود داشته است.

شناخت از میزان رابطه بین فاصله ژنتیکی و فیزیکی نشانگرها در ناحیه کروموزومی مورد نظر یک نیاز اولیه برای

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-30]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.4.4.6]

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

همسانه‌سازی ژن مورد نظر است. وجود اختلاف بین نقشه فیزیکی و ژنتیکی در جو به اثبات رسیده است به طوری که میزان نوترکیبی در ناحیه سانترومی کروموزوم‌ها به شدت کاهش می‌یابد (۹ ، ۱۰ و ۱۳). گرچه مکان ژنی *vrs1* در ناحیه میانی نقشه لینکاژی RFLP کروموزوم ۲H قرار گرفته است (۲ و ۵) ولی تجزیه و تحلیل PCR نشان داد که مجموعه نشانگرهای پیوسته به مکان ژنی *vrs*1 در ناحیه میانی بازوی بلند کروموزوم ۲H قرار دارد (۹). بررسی‌های کونزل و همکاران (۹) هم‌چنین نشان داد که حدود ۵۰ درصد مکان‌های ژنی نقشه لینکاژی RFLP در نواحی با فراوانی زیاد نوترکیبی قرار دارد که حدود ۵ درصد کل ژنوم را در برمی‌گیرد. با توجه به این که مکان ژنی *vrs*1 متعلق به این نواحی کروموزومی است، بنابراین می‌تواند به منظور همسانه‌سازی و شناسایی توالی بازی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای دکتر تاکائو کوماتسودا از محققین برجسته مؤسسه ملی علوم کشاورزی ژاپن به خاطر راهنمایی‌های ارزشمند و فراهم آوردن امکانات این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Franckowiak, J.D. and U. Lundqvist. 1997. Stock number:BGS 6. Barley Genet. Newsl. 26:49-50.
2. Graner, A., A. Jahoor, J. Schondelmaier, H. Siedler, K. Pillen, G. Fischbeck, G, Wenzel and R.G. Harrmann. 1991. Construction of RFLP map of barley. Theor. Appl. Genet. 83:250-256.
3. Graner, A., E. Bauer, A. Kellermann, S. Kirchner, J.K. Muraya, A. Jahoor and G. Wenzel. 1994. Progress of RFLP-map construction in winter barley. Barley Genet. Newsl. 23:53-59.
4. Harlan, J.R. 1995. Barley. *In*: J. Smartt and N.W. Simmonds. (Eds.), Evaluation of Crop Plants. 2nd ed., Longman, UK, pp. 140-147.
5. Klienhofs, A. 1997. Integrating barley RFLP and classical marker maps. Barley Genet. Newsl. 27:105-112.
6. Komatsuda, T., F. Taguchi-Shibara, S. Oka, F. Takaiwa, T. Annaka and H.J. Jacobsen. 1995. Transfer and mapping of the shoot differentiation locus *Shd1* in barley chromosome 2. Genome 38:1009-1014.
7. Komatsuda, T., S. Kawasaki, I. Nakamura, F. Takaiwa, F. Taguchi-Shibara and S. Oka. 1997. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to the *v* locus in barley, *Hordeum vulgare* L. Theor. Appl. Genet. 95:637-642.
8. Komatsuda, T., I. Nakamura, F. Takaiwa and S. Oka. 1998. Development of STS markers closely linked to *vrs1* locus in barley, *Horseum vulgare*. Genome 41: 680-685.
9. Kunzel, G., L. Korzun and A. Meister. 2000. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. Genet. 254:397-412.
10. Leitch, I.J. and J.S. Heslop-Harrison. 1993. Physical mapping for four sites of 5S rDNA sequences and one site of the α-amylase-2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 36:517-523.
11. Mano, Y., B.E. Sayed-Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka and T. Komatsuda. 1999. Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 98:937-946.
12. Mano, Y. S. Kawasaki, F. Takaiwa and T. Komatsuda. 2001. Construction of genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) cross 'Azumamugi x Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system. Genome 44:284-292.
13. Pederson, C., H. Giese and I. Linde-Laursen. 1995. Towards an integration of the physical and the genetic chromosome maps of barley by *In situ* hybridization. Hereditas 123:77-88.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-30]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.4.4.6]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com