

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 کانتونکیت گولد (دو ردیفه) و آزموناموگی (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 توالی‌یابی ژن مورد نظر استفاده شوند.

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

مقدمه

جوه‌ای وحشی *Hordeum vulgare* ssp. *Spontaneum*

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 زراعی 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

سنبلیچه‌های 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).

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

جمعیت‌های در حال تفرق مختلف و نشانگرهای RFLP مشابه، نتایج متفاوتی را نشان داده است (۲). گرائر و همکاران (۳) عدم وجود نوترکیبی را در این ناحیه ژنی بیان کردند در صورتی که کوماتسودا و همکاران (۶ و ۷) نوترکیبی قابل توجهی را گزارش کردند. پس از تبدیل نشانگرهای RFLP به نشانگرهای STS (۸) نقشه ژنتیکی اطراف مکان ژنی *vrs1* نشان داد که MWG801، cMWG699، *vrs1*، ABC311، MWG865 و MWG503 به ترتیب با فاصله‌های ژنتیکی بین دو مکان ژنی متوالی ۳/۸، ۰/۳، ۰/۰، ۱/۰ و ۸/۴ قرار دارند (۱۱).

موضوع اصلی این پژوهش یافتن نشانگرهای بیشتر در اطراف مکان ژنی *vrs1* بود. طبیعتاً نشانگرهای نزدیک‌تر به ژن مورد نظر از اهمیت بیشتری برخوردار خواهد بود زیرا می‌تواند به منظور جدا کردن و همسانه‌سازی ژن *vrs1* مورد استفاده قرار گیرد. به این منظور با استفاده از لاین‌های تقریباً ایزوژن (Near Isogenic Lines, NILs) و به کارگیری تکنیک AFLP به شناسایی نشانگرهای نزدیک به مکان ژنی *vrs1* پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های گیاهی مورد استفاده در این آزمایش حاصل تلاقی بین دو رقم جو ژاپنی کانتونکیت گولد و آزوماموگی بود. کانتونکیت گولد یک جو دو ردیفه (*Vrs1Vrs1*) است به طوری که گلچه‌های کناری آن دارای بساک‌های بزرگ و گرده‌های فعال است ولی مادگی آن غیر فعال می‌باشد. آزوماموگی یک جو شش ردیفه (*vrs1vrs1*) است و باروری در همه گلچه‌های آن یکسان است.

لاین‌های تقریباً ایزوژن مورد استفاده دارای هم‌ردیف *Vrs1* از والد کانتونکیت گولد بوده که حاصل تلاقی برگشتی با والد آزوماموگی به عنوان والد گیرنده بوده است. ژنوتیپ‌های مختلفی در نسل‌های متعدد توسط نشانگرهای واقع در اطراف مکان ژنی *vrs1* آزمایش شدند. یکی از گیاهان نسل BC₇F₁ (M1-7-64) وجود کراسینگ اور بین مکان‌های ژنی *vrs1* و cMWG699 را نشان داد. این گیاه به منظور ادامه آزمایش‌ها

انتخاب و در نهایت دو گیاه در نسل BC₇F₃ (M1-7-64-11-65) و M1-7-64-12-24 وجود کراسینگ اور بین مکان‌های ژنی *vrs1* و MWG865 را نشان دادند. بنابراین گیاهان انتخابی در مورد مکان‌های ژنی *vrs1* و ABC311 به صورت ناخالص ولی در مورد نشانگرهای MWG801، cMWG699، MWG865 و MWG503 خالص بودند. ادامه آزمایش‌ها نشان داد که محل کراسینگ اور بین مکان‌های ژنی *vrs1* و cMWG699 در گیاه M1-7-64-12-24 به *vrs1* نزدیک‌تر است. بذره‌ای حاصل از خود باروری گیاهان انتخابی (BC₇F₄) به عنوان جمعیت در حال تفرق (در مورد مکان ژنی *vrs1*) 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 انتخاب، نتاج آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۶ گیاه دو ردیفه و ۱۶ گیاه شش ردیفه حاصل از نتاج هر یک از گیاهان M1-7-64-11-65 و M1-7-64-12-24 انتخاب شدند.

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

به منظور بررسی نشانگرهای AFLP، برش DNA توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *MseI*، اتصال آدپتورها (آدپتور e مربوط به ناحیه برشی *EcoRI* و آدپتور m مربوط به ناحیه برشی *MseI*)، تکثیر اولیه (توسط آغازگرهای e000 مربوط به ناحیه آدپتور e و m000 مربوط به ناحیه آدپتور m)، تکثیر انتخابی (توسط آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر اولیه که دارای سه باز انتخابی اضافی در ناحیه 3' بود) و رنگ آمیزی نقره بر اساس روش ارائه شده توسط مانو و همکاران (۱۲) انجام شد. نام‌گذاری آغازگرهای مورد استفاده نیز مطابق با نام گذاری توسط مانو و همکاران (۱۲) بود. به این صورت که e000+AAA به نام e01، e000+AAC به نام e02، e000+AAG به نام e03، e000+AAT به نام e04 و به همین ترتیب e000+TTT به نام e64 مورد استفاده قرار گرفت. همین روش در مورد نام گذاری آغازگرهای m نیز به کار رفت.

به منظور تهیه مخلوط DNA در آزمایش تجزیه توده‌ای نسل‌های در حال تفرق (balk segregant analysis)، هشت گیاه دو ردیفه 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 نو ترکیب در اطراف *vrs1* مکان‌یابی شد.

نتایج و بحث

گیاهان ناخالص نسل BC₇F₄ برای مکان ژنی *vrs1* دارای گلچه‌های جانبی با باروری ناقص (۳۰ تا ۶۰ درصد) بوده و کاملاً قابل تشخیص از گیاهان خالص در این مکان ژنی بودند. با این وجود به منظور اطمینان بیشتر از خلوص گیاهان انتخابی، نتایج آنها بررسی و خلوص گیاهان تأیید شد.

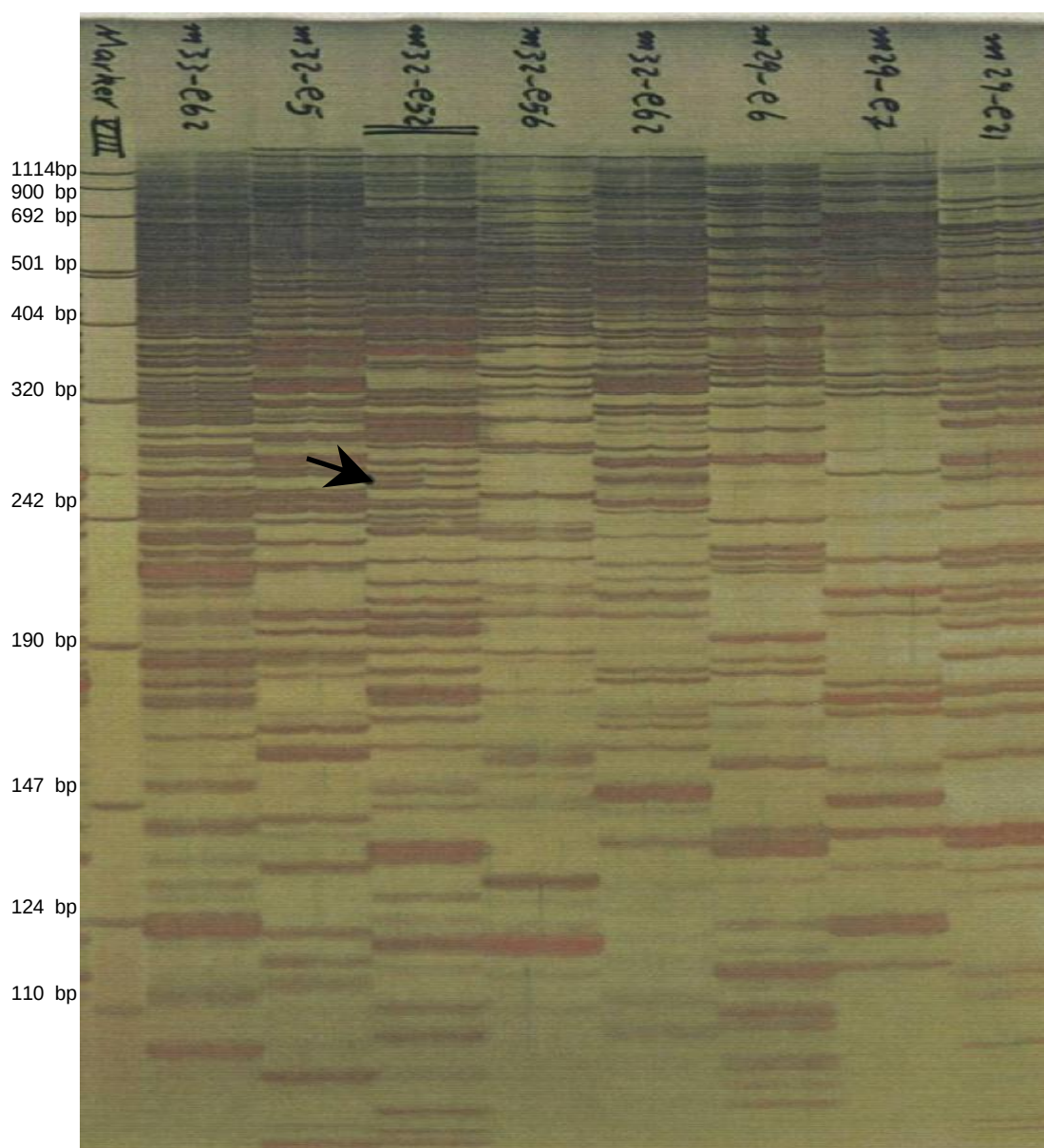
در مرحله اول هشت گیاه خالص *Vrs1Vrs1* (دو ردیفه) و هشت گیاه خالص *vrs1vrs1* (شش ردیفه) حاصل از گیاه ناخالص M1-7-64-11-64 (BC₇F₃) به منظور تهیه مخلوط DNA (یکی برای دو ردیفه‌ها و دیگری برای گیاهان شش ردیفه) مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۱۷۹۲ ترکیب جفت آغازگر حاصل از ۶۴ آغازگر e و ۲۸ آغازگر m به منظور یافتن باندهای چند شکل بین دو توده DNA استفاده شد. بررسی باندهای تکثیر شده تعداد ۲۰۹ جفت آغازگر را مشخص کرد که حاوی باندهای چند شکل بودند. به منظور اطمینان از پیوستگی باندهای انتخاب شده با مکان ژنی *vrs1*، آغازگرهای مورد نظر روی DNA افراد تشکیل دهنده مخلوط DNA آزمایش شد. ولی با آزمایش ۴۰ جفت آغازگر انتخابی، تنها ۳ باند حاصل از جفت آغازگرهای e31m13، e31m26 و e34m13 مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین ادامه این گونه آزمایش زمان‌بر و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نبود.

بر این اساس، گیاهان حاصل از گیاه انتخابی M1-7-64-12-24 به منظور تأیید پیوستگی باندهای انتخاب شده با مکان ژنی *vrs1* استفاده شد. به این منظور هشت گیاه خالص *Vrs1Vrs1* و هشت گیاه خالص *vrs1vrs1* حاصل از

گیاه ناخالص M1-7-64-12-24 (BC₇F₃) جهت تهیه مخلوط DNA (یکی برای دو ردیفه‌ها و دیگری برای گیاهان شش ردیفه) به کار رفت. سپس ۲۰۹ جفت آغازگر انتخابی حاوی باندهای چند شکل توسط دو مخلوط DNA ذکر شده مورد آزمون قرار گرفت که در نتیجه ۲۴ جفت آغازگر مورد تأیید و پس از آزمایش آغازگرهای انتخابی روی DNA هر یک از ژنوتیپ‌های تشکیل دهنده مخلوط DNA، تعداد سه آغازگر مورد تأیید قرار گرفت. به این معنی که سه باند حاصل از آغازگرهای e40m36، e34m13 و e52m32 در مکان ژنی *vrs1* قرار دارند. اندازه تقریبی این سه باند به ترتیب ۱۱۱۰، ۲۶۰ و ۲۷۰ باز تخمین زده شد (شکل ۱).

باندهای چند شکل حاصل از جفت آغازگرهای e31m13 (باند ۱۶۰ بازی) و e31m26 (باند ۵۲۰ بازی) که براساس مخلوط DNA حاصل از نتایج گیاه M1-7-64-11-65 مشخص شده بودند روی مخلوط DNA حاصل از نتایج گیاه M1-7-64-12-24 باندهای هم شکل را نشان دادند. این نتیجه مؤید آن است که محل کراسینگ اور بین مکان‌های ژنی *vrs1* و cMWG699 در گیاه M1-7-64-12-24 به *vrs1* نزدیک‌تر است. بنابراین باندهای چند شکل حاصل از سه آغازگر e40m36، e34m13 و e52m32 در مقایسه با باندهای چند شکل حاصل از آغازگرهای e31m13 و e31m26 به مکان ژنی *vrs1* نزدیک‌تر خواهند بود.

به منظور مکان‌یابی نشانگرهای مشخص شده و تهیه نقشه فشرده ژنتیکی، تعداد ۲۱ ژنوتیپ (انتخاب شده از بین ۱۷۵۱ لاین تقریباً ایزوژن) که دارای نو ترکیبی در فاصله نشانگرهای cMWG699 و MWG865 بودند، مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج آزمون مکان‌های ژنی cMWG699، *vrs1*، ABC311، MWG865 و نشانگرهای AFLP تعیین شده نشان داد که نشانگرهای AFLP بین MWG865 و *vrs1* قرار دارند. ترتیب نشانگرها به صورت cMWG699، *vrs1*، e40m36، e34m13، e52m32، ABC311، e31m26 و e31m13 و MWG865 به ترتیب با فواصل ژنتیکی تقریبی بین دو مکان ژنی متوالی



شکل ۱. الگوی باندهای توده‌های DNA مربوط به *Vrs1* و *vrs1* ستون سمت چپ در هر جفت آغازگر مربوط به توده *Vrs1* می‌باشد. باند انتخاب شده مربوط به آغازگر e52m32 در شکل نشان داده شده است.

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 F₁ 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

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 *vrs1* 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

قرار دارد که حدود ۵ درصد کل ژنوم را در برمی گیرد. با توجه به این که مکان ژنی *vrs1* متعلق به این نواحی کروموزومی است، بنابراین می تواند به منظور همسانه سازی 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 راهنمایی های ارزشمند و فراهم آوردن امکانات این پژوهش قدردانی می شود.

همسانه سازی 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 کروموزوم ها به شدت کاهش می یابد (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 *vrs1* در ناحیه میانی بازوی بلند کروموزوم ۲H قرار دارد (۹). بررسی های کونزل و همکاران (۹) همچنین نشان داد که حدود ۵۰ درصد مکان های ژنی نقشه لینکاژی RFLP در نواحی با فراوانی زیاد نوترکیبی

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. Klienhofts, 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, *Hordeum 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.