

ارزیابی رتروترنسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم

بابک عبدالحی‌مندولکانی^۱، محمدرضا بی‌همتا^۲، آلان شولمن^۳، عباسعلی زالی^۴، محمدرضا نقوی^۵

۱- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲ و ۴- به ترتیب استاد، استاد، دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- استاد موسسه بیوتکنولوژی دانشگاه هلسینکی

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۶/۱۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

گندم،
براکیپودیوم،
رتروترنسپوزون،
نشانگر ملکولی

رتروترنسپوزون‌ها فراوان‌ترین و گسترده‌ترین عناصر جابجا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها هستند. با توجه به توزیع، بی‌نظیری و شیوع آنها در ژنوم‌های گیاهی، استفاده از آنها به عنوان نشانگرهای ملکولی ایده‌آل خواهد بود. به منظور ارزیابی رتروترنسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم، فعالیت ۳۰ خانواده مختلف رتروترنسپوزونی متعلق به گندم و گونه‌های به لحاظ تکاملی نزدیک به آن مانند جو، یولاف، برنج، ذرت و براکیپودیوم در گندم بررسی شد. تقریباً تمامی آغازگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌های جو، یولاف و براکیپودیوم و درصد بالایی از آغازگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌های برنج و ذرت الگوی واضح و قابل امتیازدهی را نشان دادند. رتروترنسپوزون‌های Bare-1/Wis2-1A (گندم)، Frodo TRIM (جو)، LTR یولاف، Sukkula (جو)، Bagy2/Wilma (گندم)، Daniela (گندم)، Fatima (گندم) و Cerebera (جو) فعال بودند. بیشتر آغازگرهایی که براساس نواحی محفوظ توالی رتروترنسپوزون‌ها بویژه نواحی انتهایی LTR طراحی شده بودند الگوی نواری واضحی تولید کردند. الگوی مطلوب تکثیر با تک آغازگرها و ترکیبات آغازگری خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد استفاده، نشان داد که این خانواده‌ها به حالت معمولی و آشیانه‌ای در ژنوم گندم قرار می‌گیرند. همچنین الگوی مطلوب تکثیر حاصل از تک آغازگرهای مبتنی بر نواحی ۵' یا ۳' LTR و ترکیب آغازگرهای مربوط به نواحی ۵' و ۳' LTR های خانواده‌های مختلف در واکنش‌های IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) حاکی از قرارگیری رتروترنسپوزون‌ها به صورت سر به سر، دم به دم و سر به دم در ژنوم گندم می‌باشد. با توجه به این مطالعه پیشنهاد می‌شود از این نشانگرها برای مطالعه تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها و صفات در گندم و دیگر محصولات زراعی استفاده شود.

مقدمه

رتروترنسپوزون‌ها فراوانترین و گسترده‌ترین عناصر جابجا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها هستند که برخلاف ترنسپوزون‌ها از طریق رونویسی پی‌درپی^۱، رونویسی معکوس^۲ و نهایتاً تولید cDNA جدید، کپی‌های خود را در نواحی جدید ژنومی درج می‌کنند و کپی‌های قبلی در جای خود پایدار باقی می‌مانند. رتروترنسپوزون‌ها دارای یک ناحیه محفوظ داخلی هستند که فراورده‌های لازم برای انتقال آنها را فراهم می‌سازد. ناحیه داخلی بوسیله توالی‌های طولانی تکراری یعنی LTR^۳ احاطه می‌شوند. بر اساس وجود یا عدم وجود LTR، رتروترنسپوزون‌ها به دو گروه مشخص تقسیم می‌شوند: آنهایی که دارای LTR بوده و گروهی که فاقد LTR می‌باشد. گروه دوم شامل LINE^۴ ها و SINE^۵ ها می‌باشد (گرندهاستین، ۱۹۹۲؛ ویکر و همکاران، ۲۰۰۷). ژنوم‌های گیاهی در مقایسه با سایر ژنوم‌های یوکاریوتی شامل دامنه‌ی متفاوت و وسیعی از رتروترنسپوزون‌های مختلف هستند. در گیاهانی با ژنوم‌های بزرگ مانند گندم، رتروترنسپوزون‌ها ۶۰-۴۰ درصد از کل ژنوم را شامل می‌شوند. رتروترنسپوزون‌ها شامل نواحی محفوظ، مشخص و طولانی بوده که می‌توانند برای همسانه‌سازی نشانگرهای ویژه و توالی‌های مجاور آنها و طراحی آغازگر استفاده شوند. اعضای فعال خانواده‌های رتروترنسپوزون‌ها، الحاق‌های جدید و پایداری را در ژنوم ایجاد می‌کنند که منجر به چندشکلی در بین و داخل گونه‌های گیاهی می‌شوند. درج رتروترنسپوزون‌ها در داخل همدیگر نیز صورت می‌گیرد (حالت آشیانه‌ای^۶). این حالت در رتروترنسپوزون‌های فعال بیشتر دیده می‌شود (ویسینت و همکاران، ۱۹۹۹؛ سابت و شولمن، ۲۰۰۷).

در ژنوم گندم نشانگرهای رتروترنسپوزونی توزیع وسیعی داشته و خوشه‌بندی آنها بسیار کم می‌باشد بنابراین برای استفاده در مطالعات مختلف از جمله بررسی و ارزیابی تنوع ژنتیکی و پیوستگی ژنتیکی مناسب می‌باشند (کوبین و همکاران، ۲۰۰۴؛ شولمن، ۲۰۰۷). بسیاری از مطالعات توالی‌یابی ژنومی در ابتدا نشان دادند که رتروترنسپوزون‌ها عمدتاً در نواحی یوکروماتینی دیده می‌شوند ولی توالی‌یابی ژنوم گیاهان نشان داد که

رتروترنسپوزون‌ها تقریباً در تمامی نواحی کروموزومی مشاهده می‌شوند. جستجوی بانک‌های اطلاعاتی نشان می‌دهد که رتروترنسپوزون‌ها در بین یا نزدیک ژن‌ها بوفور دیده می‌شوند (کومار و بنتزن، ۱۹۹۹؛ اشمایکل و همکاران، ۲۰۰۹). احتمالاً بسیاری از رتروترنسپوزون‌ها تمایل دارند که به نواحی بین ژنی انتقال پیدا کنند و باعث جهش ژن‌ها نشوند یا اگر برخی از آنها در داخل ژن‌ها درج پیدا کردند در اثر تکامل و فرایند زمانی، فشار گزینشی باعث گزینش نواحی ژنومی با رتروترنسپوزون‌ها در بین و نزدیک نواحی ژنی شده است. تجزیه و تحلیل توالی‌ها در جو نشان داده که رتروترنسپوزون‌ها با توالی‌های ریزماهوره در ژنوم نیز به وفور دیده می‌شوند. به هر حال بی‌نظیری، تعداد زیاد کپی‌های رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم، توزیع وسیع و تصادفی آنها در کروموزوم‌های گیاهی و چندشکلی درجی^۷ و پایدار آنها در بین و داخل گونه‌های گیاهی، استفاده از آنها را به عنوان نشانگرهای ملکولی بسیار ایده‌آل می‌سازد (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹؛ شولمن و همکاران، ۲۰۰۴؛ آ و ب؛ سابت و شولمن، ۲۰۰۷؛ شولمن، ۲۰۰۷). علاوه بر این، توزیع و وفور وسیع رتروترنسپوزون‌ها در نواحی ژنی کروموزوم‌ها، شناسایی نشانگرهای خیلی نزدیک با ژن‌های مهم زراعی را بسیار متحمل می‌سازد (کومار و بنتزن، ۱۹۹۹؛ مننین و همکاران، ۲۰۰۰؛ ویسینت و همکاران، ۲۰۰۵؛ ثابت و شولمن، ۲۰۰۷). تا به حال بررسی و ارزیابی تعداد زیادی خانواده رتروترنسپوزونی در سطح گسترده برای استفاده به عنوان نشانگر ملکولی در گندم و حتی دیگر گیاهان انجام نگرفته است. همچنین مطالعات زیادی با استفاده از نشانگرهای ملکولی مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها برای بررسی تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها در گیاهان صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این مطالعه ارزیابی و بررسی فعالیت ۳۰ خانواده مختلف رتروترنسپوزونی متعلق به گندم و گونه‌های به لحاظ تکاملی نزدیک به گندم، جهت استفاده به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم می‌باشد.

1. Successive transcription
2. Reverse transcription
3. Long terminal repeat
4. Long interspersed elements
5. Short interspersed elements
6. Nested
7. Insertional polymorphism

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی شامل لاین دهنده‌ی ژن Yr15، G25، *Triticum dicoccoides*، لاین‌های دوروم LDN و DW1 حساس به زنگ زرد و فاقد ژن Yr15 (گرچتر- آمیتای، ۱۹۸۹؛ آ؛ سان و همکاران، ۱۹۹۷) و لاین‌های B9 و B10 لاین‌های (BC3F9) دارای ژن Yr15 در زمینه‌ی ژنتیکی DW1 بودند (این لاین‌ها از طریق تلاقی برگشتی G25 با DW1 تولید شده بودند). برای بررسی فعالیت رتروترنسپوزون‌ها از ۶۰۰ فرد F2 حاصل از تلاقی لاین‌های تقریباً ایزوژنیک B9 و B10 با DW1 استفاده شد. این جمعیت عمدتاً برای قطعه‌ی حامل ژن Yr15 تفرق نشان می‌داد. افراد این جمعیت بر اساس نشانگرهای Xgwm18 و Xgwm91 (این دو نشانگر بر اساس مطالعه‌ی پنگ و همکاران در سال ۲۰۰۰ ژن Yr15 را با حد فاصل ۲۳ سانتی‌مورگان احاطه می‌کردند) غربال شده و افراد نوترکیب در فاصله‌ی این دو نشانگر انتخاب شدند. ده بذر F3 (خانواده F3) از هر کدام از افراد نوترکیب F2- براساس جفت نشانگرهای مذکور غربال شده و یک فرد نوترکیب هموزیگوس از هر کدام از خانواده‌ی F3 انتخاب شدند افراد نوترکیب هموزیگوس F3 از خانواده‌ی F3 انتخاب شدند به عنوان جمعیت برای ارزیابی فعالیت رتروترنسپوزون‌ها استفاده شدند.

استخراج DNA و نشانگرهای IRAP و REMAP

استخراج DNA طبق روش CTAB با تیمار RNaseA بر اساس روش اوزویل و همکاران (۱۹۹۵) با تغییرات جزئی انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA ی استخراجی با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و همه DNA ها به غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. از این DNA در واکنش‌های PCR استفاده شد. ۲۰۰ آغازگر IRAP و ۴۲۰ ترکیب آغازگری REMAP (حاصل از ترکیب ۴۲ آغازگر ISSR با ۱۰۰ آغازگر IRAP) روی والدین جهت شناسایی نوارهای چندشکل بطور بالقوه پیوسته با ژن Yr15 ارزیابی شدند. آغازگرهای ISSR معمولاً دارای یک یا دو باز آویز اضافه در انتها یا برای جلوگیری از لغزش در داخل توالی تکراری و افزایش وضوح الگوی نواری بودند. آغازگرهای رتروترنسپوزونی بر اساس نواحی مختلف توالی ۳۰ خانواده رتروترنسپوزونی با استفاده از نرم افزار FastPCR (کلندر، ۱۹۹۶-)

۲۰۰۷) طراحی شدند (جدول ۱). بیشتر آغازگرها بر اساس نواحی مختلف و محفوظ توالی‌های LTR و شمار بسیار کمی بر اساس نواحی محفوظ داخلی رتروترنسپوزون‌ها طراحی شدند. رتروترنسپوزون‌های مورد استفاده عمدتاً از گندم و سایر گیاهان به لحاظ تکاملی نزدیک به گندم مانند جو، یولاف، برنج، ذرت و براکیپودیوم^۴ (گیاهی از خانواده‌ی گراس‌ها می‌باشد که اندازه ژنوم آن کوچک، در حد فاصل برنج و آرابیدوپسیس است و شباهت زیادی به گندم دارد) بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، الکتروفورز و رنگ آمیزی بر اساس روش کلندر و شولمن (۲۰۰۶) با تغییرات جزئی انجام گرفت. ژل‌ها با اسکنر FLA 5100 اسکن شدند.

نتایج و بحث

رتروترنسپوزون‌ها به عنوان نشانگرهای ملکولی در گندم:

در این تحقیق خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزونی متعلق به گندم و گونه‌های مختلف نزدیک به آن به عنوان نشانگر ملکولی در گندم کارآیی بسیار بالایی نشان دادند. بیش از ۹۰ درصد آغازگرهای رتروترنسپوزونی، الگوی واضح و قابل امتیازدهی را در گندم تولید کردند. تقریباً تمامی آغازگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌های جو، یولاف و براکیپودیوم و درصد بالایی از آغازگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌های برنج و ذرت الگوی واضح و قابل امتیازدهی را نشان دادند. اکثر آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر اساس نواحی محفوظ LTR طراحی شده بودند. این نواحی برای یک خانواده رتروترنسپوزونی در گونه‌های نزدیک به هم محفوظ می‌باشد. نواحی مختلف (بویژه نواحی LTR) رتروترنسپوزون Bare-1 و توالی‌های مشابه آن بوفور در تریسیسه توزیع می‌شوند (ویسنت و همکاران، ۱۹۹۹؛ ثابت و شولمن، ۲۰۰۷). توالی‌های مشابه Bare-1 در گندم، چادار، یولاف (گریبون و همکاران، ۱۹۹۹)، برنج (نوما و همکاران، ۱۹۹۷)، ذرت (هیروچیکا و هیروچیکا، ۱۹۹۳) و *Agropyron cristatum* (وانگ و وین، ۱۹۹۵) شناسایی شده است.

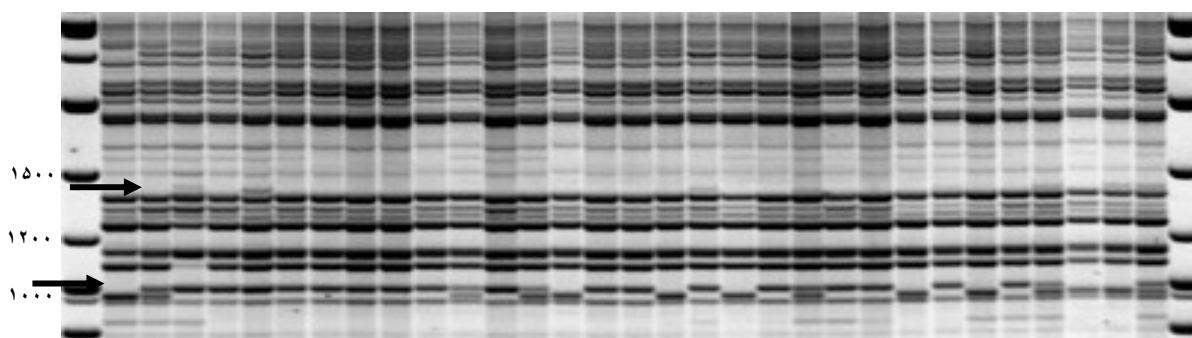
1. Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism
2. Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
3. Inter Simple Sequence Repeat
4. Brachypodium

Bare-1 در جو، گندم، چاودار و یولاف و بیشتر گونه‌های تریتیسه چندشکلی زیادی نشان داده است که دلیل بر فعالیت ادغامی آن در همه‌ی گونه‌های تریتیسه می‌باشد (چانگ و شولمن، ۲۰۰۸). سیتی^۱ بین ژنوم‌های تریتیسه نیز ثابت شده است (مور و همکاران، ۱۹۹۵). ۹۴ درصد نشانگرها در گندم و یولاف ترتیب یکسان دارند (وان‌دینز و همکاران، ۱۹۹۵ ب). برآورد مشابه یا حتی بیشتر برای گندم و جو مشاهده شده است (کونزل و همکاران، ۲۰۰۰). علیرغم اینکه گندم و ذرت در حدود ۶۰ میلیون سال پیش از هم جدا شده‌اند ولی هنوز درصد بالایی از قطعات کروموزومی محفوظ (بویژه رتروترنسپوزون‌ها) بین آنها مشاهده می‌شود (دووس و همکاران، ۱۹۹۴). همه‌ی این موارد بیانگر محفوظ بودن بخش‌های مختلف رتروترنسپوزون‌ها در تریتیسه و گونه‌های نزدیک به لحاظ تکاملی می‌باشد که می‌تواند دلیلی بر کارایی آغازگرهای رتروترنسپوزونی مورد استفاده از گونه‌های نزدیک به گندم در این گیاه باشد.

بررسی فعالیت خانواده‌های رتروترنسپوزونی:

مطالعات قبلی نشان می‌دهد که برخی از رتروترنسپوزون‌های مورد استفاده در این تحقیق فعال می‌باشند (مینن و شولمن، ۱۹۹۳؛ کلندر و همکاران، ۱۹۹۹؛ لی و همکاران، ۲۰۰۴؛ ثابت و شولمن، ۲۰۰۷) در این مطالعه بررسی فعالیت رتروترنسپوزون‌ها با استفاده از ترکیبات آغازگری که بین والدین چندشکلی پیوسته با ژن Yr15 نشان دادند و نهایتاً روی جمعیت ارزیابی شدند، انجام گرفت. برای این منظور فاکتورهایی در نظر گرفته شد. به این ترتیب که اگر آغازگرهای IRAP یا REMAP، نوارهای چندشکل غیر پیوسته با ژن نشان دادند و یا نوار جدیدی را در جمعیت تولید کردند که در والدین تلاقی یعنی B9، B10 و DW1 وجود نداشت، به عنوان درج جدید در نظر گرفته شد و بیانگر فعالیت این رتروترنسپوزون بود. بدین معنی که این رتروترنسپوزون در نسل‌های بعدی در جمعیت، رونویسی و درج جدید داشته است. در مورد چند شکلی غیر پیوسته با ژن، اگر رتروترنسپوزونی نوار چندشکلی نشان دهد که بین افراد جمعیت و والدین متفاوت باشد، با توجه به اینکه والدین تلاقی و افراد از گونه‌ی دوروم هستند، بدین معنی است که این رتروترنسپوزون در

سطح داخل گونه‌ای و داخل جمعیت چند شکلی نشان می‌دهد، پس در اواخر مراحل تکاملی فعال بوده و قادر است افراد درون جمعیت را تمیز دهد و برای مطالعه‌ی درون جمعیتی مفید است. بر همین مبنا رتروترنسپوزون‌های Bare-1/Wis2-1A (گندم)، Frodo TRIM (جو)، LTR یولاف، Sukkula (جو)، Bagy2/Wilma (گندم)، Daniela (گندم)، Fatima (گندم) و Cerebera (جو) فعال بودند یعنی یا دارای درج جدید در جمعیت و یا دارای چندشکلی غیر پیوسته با ژن بودند. بسیاری هر دو مورد مذکور را نشان دادند. البته جمعیت مورد مطالعه عمدتاً برای قطعه حاوی ژن Yr15 تفرق نشان می‌داد (چون والدین جمعیت لاین‌های تقریباً ایزوژنیک بوده و عمدتاً در قطعه‌ی حاوی ژن تفاوت داشتند) و بنابراین طبیعی است که چندشکلی کمی در دیگر نواحی غیر از قطعه‌ی حاوی ژن دارا باشد و ادغام‌های جدید کمتری نشان دهد. بنابراین وجود ادغام جدید و چند شکلی غیر پیوسته با ژن برای یک خانواده‌ی رتروترنسپوزونی در این جمعیت خاص می‌تواند دال بر فعالیت بسیار بالای خانواده مذکور و حداقل تاییدی بر قدرت آشکارسازی چندشکلی آن باشد. به هر حال آشکارسازی چندشکلی غیر پیوسته با ژن و در واقع مرتبط با سایر نواحی ژنوم در چنین جمعیتی توسط نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها، چندشکلی بالای این نشانگرها و توزیع آنها در همه‌ی نقاط ژنوم را نشان می‌دهد. خصوصیتی که ممکن است استفاده از رتروترنسپوزون‌ها را نسبت به سایر نشانگرها برتری بخشد زیرا نشانگرهای دیگر مانند RAPD و AFLP معمولاً بصورت خوشه‌ای در نواحی خاصی دیده می‌شوند در حالی که خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزون‌ها در همه جای ژنوم توزیع شده، بطوری که می‌توان با استفاده از خانواده‌های مختلف، هر کدام با توزیع مخصوص به خود در ژنوم، پوشش مناسبی از ژنوم در مطالعات تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی و مکان‌یابی ژن‌ها و صفات مختلف ایجاد کرد (واق و همکاران، ۱۹۹۷؛ یو و وایز، ۲۰۰۰؛ کوپین و همکاران، ۲۰۰۴؛ شولمن، ۲۰۰۷). شکل ۱ برخی آغازگرهای رتروترنسپوزونی که ادغام جدید و یا چندشکلی غیر پیوسته با ژن آشکار ساختند را نشان می‌دهد.



شکل ۱- نشانگر IRAP2116 (رتروترنسپوزون Fatima) روی والدین و افراد جمعیت F3، دارای ادغام جدید و چندشکلی غیر پیوسته با ژن. افراد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ از سمت چپ به ترتیب B9، B10، G25، DW1، LDN و بقیه افراد جمعیت F3 می‌باشند. نشانگر اندازه GeneRules است که دامنه‌ی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز را در بر می‌گیرد.

خانواده‌ی رتروترنسپوزونی	گیاه	خانواده‌ی رتروترنسپوزونی	گیاه
Bare1/Wis2-1A	گندم	Cereba	جو
Angela	گندم	Tare-1	جو
Erika	تریتیکوم	Kurkuri	جو
Laura	تریتیکوم	Tima-2	جو
Wilma	تریتیکوم	LTR رتروترنسپوزونهای	یولاف
Daniela	گندم	Grande-1	ذرت
Fatima	گندم	PREM-2	ذرت
Wham	گندم	Opie	ذرت
Tagermina	گندم	Cinful	ذرت
Sukkula	جو، گندم دوروم، براکیپودیوم	Bs1	ذرت
Frodo	جو و براکیپودیوم	B5	ذرت
Nikita	جو	Magellan	ذرت
Bagy1	جو	Tos17	برنج
Bagy2	جو	Retrofit	برنج
Sabrina	جو	RIRE3	برنج

جدول ۱- مشخصات رتروترنسپوزون‌های مورد استفاده

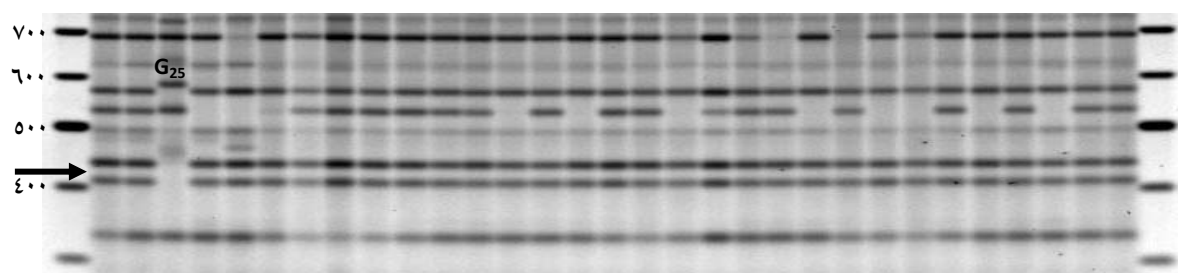
رتروترنسپوزون‌های مذکور و بسیاری از دیگر رتروترنسپوزون‌های مورد استفاده نوارهایی نشان دادند که فقط ویژه G25 بود و در دیگر والدین و افراد جمعیت وجود نداشت. همچنین دیگر افراد جمعیت و والدین که همگی از گونه دوروم بودند نوارهایی را دارا بودند که G25 فاقد آنها بود (شکل ۳). چون G25 از گونه دیکوکویدس (گونه وحشی خویشاوند گندم)

است، بنابراین نوارهای مذکور بیانگر الگوی متفاوت توزیع این رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم دو گونه می‌باشد که قابل انتظار است. نشانگرهای رتروترنسپوزونی می‌توانند بیانگر الگوی توزیع این نشانگرها در ژنوم و بین گونه‌های مختلف باشند. همچنین فعالیت رتروترنسپوزون‌ها در طی دوره تکاملی گونه‌های مختلف، متفاوت بوده بطوری که خانواده‌های مختلف ممکن است در گونه‌های

مختلف فعالیت متفاوتی داشته باشند که می‌تواند منجر به الگوی متفاوت توزیع رتروترنسپوزون‌ها در گونه‌های مختلف شود (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹؛ کوین و همکاران، ۲۰۰۴). بطور مثال بررسی رتروترنسپوزون‌ها در ناحیه‌ی مجاور ژن *adh1* در ذرت و گندم (سان میگوئل و همکاران، ۱۹۹۶) نشان داد که رتروترنسپوزون‌های MITE و LTR در اطراف این ناحیه در ژنوم ذرت بوفور یافت می‌شوند در صورتی که این حالت در همان ناحیه در ژنوم سورگوم مشاهده نشد که بیانگر شروع فعالیت این رتروترنسپوزون‌ها در ذرت بعد از واگرایی ذرت و سورگوم می‌باشد.

همان طور که بیان شد اکثر آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق براساس توالی‌های LTR طراحی شده بود. در مجموع بیشتر آغازگرهایی که براساس نواحی محفوظ چه LTR و چه نواحی دیگر تهیه شده بود الگوی نواری واضحی در این تحقیق تولید کردند. ولی آغازگرهای مبتنی بر نواحی انتهایی LTR در نشانگرهای IRAP تکثیر واضح و بهتری را نشان دادند. نشانگرهای IRAP قطعاتی بین ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز تولید کردند. به نظر می‌رسد که الگوی نواری نشانگرهای رتروترنسپوزونی مخصوصاً نشانگرهای IRAP بستگی به فعال یا عدم فعال بودن خانواده‌ی رتروترنسپوزونی مورد استفاده و همچنین الگوی قرار گرفتن آنها در ژنوم دارد. الگوی قرار گرفتن رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم می‌تواند به حالت آشیانه‌ای یا عادی باشد. معمولاً رتروترنسپوزون‌های فعال در داخل

رتروترنسپوزون‌های دیگر بیشتر درج می‌شوند. به عبارت دیگر به حالت آشیانه‌ای دیده می‌شوند ولی خودشان توسط رتروترنسپوزون‌های دیگر قطع نمی‌شوند (لیق و همکاران، ۲۰۰۳). اگر خانواده‌های مختلف رتروترنسپوزونی حالت آشیانه‌ای داشته باشند در این صورت می‌توان در نشانگر IRAP از ترکیبات آغازگری استفاده کرد. یعنی هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس براساس ناحیه LTR یک رتروترنسپوزون طراحی می‌شود. در این تحقیق از تک آغازگرهای IRAP استفاده شد که نتیجه مطلوب حاصل شد. البته چندین ترکیب آغازگری IRAP نیز مورد استفاده قرارگرفت که الگوی مطلوبی تولید کردند. با توجه به اینکه اکثر خانواده‌های رتروترنسپوزونی مورد استفاده، هم حالت معمولی و هم حالت آشیانه‌ای در ژنوم گندم داشتند می‌تواند توجیهی بر تکثیر مطلوب با تک آغازگرها و ترکیبات آغازگری باشد. نکته جالب دیگر این بود که آغازگرهای طراحی شده بر اساس نواحی انتهایی LTR ها الگوی نواری مناسب و محصولات کوچکتر تکثیر می‌کردند در مقایسه با حالتی که آغازگرها براساس نواحی داخلی تر LTR طراحی شده بود که این حالت می‌تواند بیانگر فاصله رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم باشد. اگر رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم نزدیک بهم باشند می‌توان آغازگرها را براساس نواحی داخلی تر LTR طراحی کرد ولی در غیر این صورت بهتر است آغازگرها بر اساس نواحی انتهایی LTR ها طراحی شوند تا تکثیر مطلوبی حاصل شود (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹؛ لیق و همکاران، ۲۰۰۳).



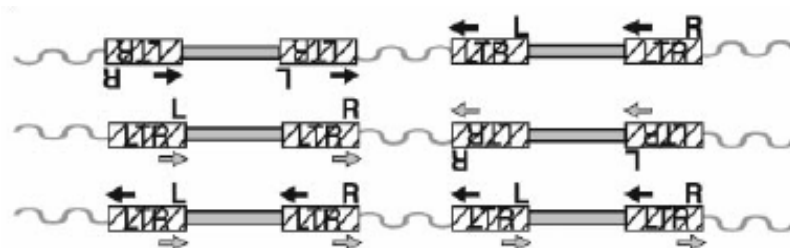
شکل ۲- نشانگر REMAP440-2106 (رتروترنسپوزون Wis-LTR) در والدین و افراد جمعیت F3، دارای نوارهای متفاوت بین گونه دیکوکویدس و دورم. افراد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ از سمت چپ به ترتیب B9، B10، G25، LDN، DW1 و بقیه افراد جمعیت می‌باشند. بقیه افراد به غیر از G25، از گونه‌ی دوروم می‌باشند. نوارهای متفاوت بین دو گونه به وضوح مشاهده می‌شود.

رتروترنسپوزون‌ها ممکن است به سه حالت سر به سر، دم به دم و سر به دم در ژنوم ادغام شوند (شکل ۳). برای دو حالت اول تکثیر بوسیله آغازگرهای مبتنی بر ناحیه ۵' یا ۳' LTR ها امکان‌پذیر است ولی در حالت سوم لازم است که دو آغازگر براساس ناحیه ۵' و ۳' LTR استفاده شود (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹). آغازگرهای IRAP مورد استفاده در این مطالعه، تک آغازگرهای مبتنی بر نواحی ۵' یا ۳' LTR و ترکیب آغازگرهای مربوط به نواحی ۵' و ۳' LTR خانواده‌های مختلف بود که تکثیر مطلوبی را نشان دادند. این بیانگر حالت‌های مختلف قرارگیری رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم گندم می‌باشد.

برای نشانگرهای REMAP ابتدا تمامی آغازگرهای ISSR روی تک نمونه‌ی DNA ارزیابی شده و آنهایی که دارای الگوی نواری مشخص و واضح بودند در ترکیب با آغازگرهای رتروترنسپوزونی استفاده شدند. در حدود ۴۲۰ ترکیب آغازگری REMAP استفاده شد که بیشتر آنها الگوی نواری مناسب و واضحی تولید کردند. در واقع ۴۲ آغازگر ISSR مورد ارزیابی، و در ترکیب با ۱۰۰ آغازگر رتروترنسپوزونی از خانواده‌های مختلف، طراحی شده براساس نواحی مختلف LTR (به ندرت نواحی دیگر) استفاده شدند. برای انتخاب آغازگرهای رتروترنسپوزونی معمولاً شروع با رتروترنسپوزون‌هایی بود که قبلاً مشخص شده بود در داخل نواحی تکراری ژنوم نیز درج می‌شوند (مانند Sukkula, Bare-1 و Bagy1). برای مثال توالی‌یابی نواحی مجاور Bare-1 در جو نشان داده که ۶۹ درصد از توالی‌های مجاور آن را رتروترنسپوزون‌ها تشکیل می‌دهند که از این مقدار، ۶۲ درصد Bare-1 است. این حالت بیانگر حالت آشیانه‌ای این رتروترنسپوزون نیز می‌باشد (ویسنت و همکاران، ۱۹۹۹). در نشانگر REMAP ممکن است

برخی نوارهای مربوط به ISSR هم دیده شود که در این مطالعه خیلی نادر بود. دلیل آن می‌تواند محفوظ بودن زیاد توالی‌های رتروترنسپوزونی در مقایسه با توالی‌های ریزماهوره و همچنین بالا بودن مقدار GC در انتهای ۳' آغازگرهای رتروترنسپوزونی باشد. همچنین در مواردی که آغازگرهای رتروترنسپوزونی با نواحی مکمل در الگو مطابقت بالایی داشته باشند تعداد نوارهای حاصل از ISSR به شدت کاهش می‌یابد (کلندر و شولمن، ۲۰۰۶). آغازگرهای ریزماهوره استفاده شده در این مطالعه حداقل دارای ۷ تکرار بوده که تغییر و تنوع در چنین تکرارهایی نیز کم می‌باشد. همچنین آغازگرهای مبتنی بر توالی‌های ریزماهوره دارای باز آویز اضافه در انتهای ۳' بوده که این از لغزش در داخل توالی و ایجاد چندشکلی ناشی از تکرارهای ریزماهوره جلوگیری می‌کند.

با توجه به توزیع و پوشش ژنومی مناسب نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها، سادگی، چند شکلی و تکرارپذیری بالای آنها، پیشنهاد می‌شود از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی مانند مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی، تهیه‌ی نقشه‌های ژنتیکی و اشباع آنها و مکان‌یابی ژن‌ها و صفات کمی بویژه مکان‌یابی دقیق آنها (با توجه به وفور آنها در نواحی یوکروماتینی و نزدیک ژن‌ها) استفاده شود. در استفاده از رتروترنسپوزون‌ها بهتر است بیشتر از آغازگرهای مبتنی بر نواحی انتهایی LTR استفاده شود. با توجه با اینکه توزیع و فعالیت ادغامی برخی رتروترنسپوزون‌ها قبلاً مطالعه شده و همچنین توزیع و فعالیت ۳۰ خانواده نیز در این مطالعه مشخص شد، بهتر است آگاهانه نسبت به انتخاب رتروترنسپوزون‌های مورد استفاده به عنوان نشانگر بسته به هدف مطالعه اقدام کرد.



شکل ۳- حالت‌های مختلف قرارگیری رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم، به ترتیب از بالا به پایین: سر به سر، دم به دم و سر به دم (کلندر و همکاران، ۱۹۹۹)

سپاسگزاری

از موسسه بیوتکنولوژی دانشگاه هلسینکی بخاطر کمک‌های مالی برای انجام تحقیق قدردانی می‌شود. از دکتر روسلان کلندر و فرانسوا سابت، محققین آزمایشگاه ژنومیکس گیاهی موسسه بیوتکنولوژی دانشگاه هلسینکی به خاطر بحث‌های ارزنده در تهیه آغازگرهای رتروترنسپوزونی، از آنه ماری ناروانتو و اورسولا لانگویست، تکنسین‌های آزمایشگاه مذکور به خاطر کمک‌های فنی و عملی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki A. 1995. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
2. Chang W, Schulman AH. 2008. BARE-1 retrotransposons produce multiple groups of rarely polyadenylated transcripts from two differentially regulated promoters. *The Plant Journal*, 56(1): 40 - 50 .
3. Devos KM, Chao S, Li QY, Simonetti MC, Gale MD. 1994. Relationship between chromosome 9 of maize and wheat homeologous group 7 chromosomes. *Genetics* 138: 1287-1292.
4. Gerechter-Amitai ZK, Van Silfhout CH, Grama A, Kleitman F. 1989a. Yr15: a new gene for resistance to *Puccinia striiformis* in *Triticum dicoccoides* sel. G25. *Euphytica* 43: 187-190.
5. Grandbastien MA. 1992. Retroelements in higher plants. *Trends Genet* 8: 103-108.
6. Gribbon BM, Pearce SR, Kalendar R, Schulman AH, Paulin L, Jack P, Kumar A, Flavell AJ. 1999. Phylogeny and transpositional activity of Ty-copia group retrotransposons in cereal genomes. *Mol Gen Genet* 261: 883-891.
7. Hirochika H, Hirochika R. 1993. Ty1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. *Jpn J Genet* 68: 35-46.
8. Kalendar R. FastPCR ©. 1998-2007. <http://www.Biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr>.
9. Kalendar R, Schulman AH. 2006. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1, 5: 2478 – 2484.
10. Kumar A, Bennetzen JL. 1999. Plant retrotransposons. *Annual Review Genetic*. 33:479-532.
11. Kunzel G, Korzum L, Meister A. 2000. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation breakpoints. *Genetics* 154: 397-412
12. Leigh F, Kalendar R, Lea W, Lee D, Donini P, Schulman AH. 2003. Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques. *Mol Gen Genomics* 269: 464-474.
13. Li W, Zhang P, Fellers JP, Friebe B, Gill BS. 2004. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome. *The Plant Journal* 40: 500-511.
14. Manninen I, Schulman AH. 1993. BARE-1, a copia-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* 22: 829-846.
15. Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman AH. 2000. Application of Bare-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular Genetics and Genomics* 264: 325-334.
16. Moore G, Devos KM, Wang Z, Gale MD. 1995. Cereal genome evolution: grasses line up and form a circle. *Curr Biol* 5: 737-739.
17. Noma K, Nakajima R, Ohtsubo H, Ohtsubo E. 1997. RIRE1, a retrotransposon from wild rice *Oryza australiensis*. *Genes Genet Syst* 72: 131-140 .
18. Peng JH, Fahima T, Röder MS, Huang QY, Dahan A, Li YC, Grama A, Nevo E. 2000. High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes YrH52 and Yr15 derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Genetica* 109: 199-210.
19. Queen RA, Gribbon BM, James C, Jack P, Falvell AJ. 2004. Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Mol Gen Genomics* 271:91-97.
20. Sabot F, Schulman AH. 2007. Template switching can create complex LTR retrotransposon insertions in Triticeae genomes. *BMC Genomics* 8:247 .
21. SanMiguel P, Tikhonov A, Jin Y K, Motchoulskaia N, Zakharov D, Melake-Berhan A, Springer PS, Edwards KJ, Lee M, Avramova Z, Bennetzen JL. 1996. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274: 765-768.
22. Schulman AH. 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321 .
23. Schulman AH, Flavell AJ, Ellis THN. 2004a. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants. *Methods Mol Biol* 260: 145-173.

24. Schulman AH, Gupta PK, Varshney RK. 2004b. Organisation of retrotransposons and microsatellites in cereal genomes. in *Cereal Genomics* (eds. P.K. Gupta & R.K. Varshney) 83–118 (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands).
25. Smýkal P, Kalendar R, Ford R, Macas J, Griga M. 2009. Evolutionary conserved subfamily of Copia-Angela retrotransposons as a genome-wide microsatellite repeat dispersal agent. *Heredity*, 2009:1-11
26. Sun GL, Fahima T, Korol AB, Turpeinen T, Grama A, Ronin YL, Nevo E. 1997. Identification of molecular markers linked to the Yr15 stripe rust resistance gene of wheat originated in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Theor Appl Genet* 95:622-628.
27. Van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, McCouch SR, Sorrells ME. 1995b. Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol Gen Genet* 248: 744–754.
28. Vicent CM, Kalendar R, Schulman AH. 2005. Variability, recombination and mosaic evolution of the barley BARE-1 retrotransposon. *Journal of Molecular Evolution* 61(3): 275-91 .
29. Vicent CM., Kalendar R, Ananthawat-Jonsson K, Suoniemi A, Schulman A. 1999. Structure, functionality, and evolution of the BARE-1 retrotransposon of barley. *Genetica* 107: 53–63, 1999.
30. Wang RR, Wein JZ. 1995. Variations of two repetitive DNA sequences in several Triticeae genomes revealed by polymerase chain reaction and sequencing. *Genome* 38: 1221–1229.
31. Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W. 1997. Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular and General Genomics* 253: 687-694.
32. Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell AJ, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P and Schulman, A.H. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8: 973-982.
33. Yu G-X, Wise RP. 2000. An anchored AFLP- and retrotransposon-based map of diploid Avena. *Genome* 43,736-749 .

