

مکان یابی ژن کنترل کننده فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه ساترورومری کروموزوم 7H جو با استفاده از ریز تشابهات ژنومی و ژنومیکس مقایسه ای

Molecular mapping of the gene dense spike (*dsp.ar*) to the centromeric region of barley chromosome 7H using micro-synteny and comparative genomics

فهیمه شاهین نیا

پژوهشگر موسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی (IPK) آلمان

Shahinnia F

Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr3, 06466 Gatersleben, Germany

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shahinnia@ipk-gatersleben.de

(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

نتایج مطالعات ژنوم گیاهان مختلف تا سال ۱۹۹۸ مشخص کرد که حدود ۵۰ درصد از ژن‌هایی که جدید شناسایی می‌شوند، دارای توالی‌های مشابه و آرایش حفاظت شده ژنومی در مقایسه با ژن‌هایی هستند که در گذشته شناخته شده‌اند. این یافته اساس پیدایش ژنومیکس مقایسه‌ای شد. در این راستا با بهره گیری از ریز تشابهات ژنومی و همراستایی مولکولی بین ژنوم توالی یابی نشده جو در مقایسه با ژنوم های توالی یابی شده خانواده پواسه (گرامینه) نظیر برنج، ذرت، سودگوم و براکی پودبوم، مکان ژن فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه ساترورومری کروموزوم 7H جو مورد مطالعه قرار گرفت. ژن مزبور از جمله ژن‌های تکاملی و مرتبط با مورفوЛОژی سنبله و کنترل عملکرد در جو می باشد که از جنبه‌های اقتصادی حائز اهمیت است. تفرق ۳:۱ فنوتیپی فشردگی سنبله در بین نتاج *F2* حاصل از تلاقی والدین BW265 و Bowman نشان داد که توارث ژنتیکی این صفت بصورت ساده مندلی و با یک ژن کنترل می گردد. با ابداع نشانگرهای جدید SNP و EST و تبدیل آنها به نشانگرهای مبتنی بر PCR به روش CAPS و Pyrosequencing امکان اشباع نقشه پیوستگی مولکولی در این ناحیه و مکان یابی ژن فشردگی سنبله (*dsp.ar*) فراهم شد. در بین ۱۹۹۳ فرد متعلق به این جمعیت ۳۹ لاین شناسایی گردید که برای ۴۰ نشانگر تولید شده نوترکیبی نشان دادند. از نشانگرهای SC57808 و CAPSK06413 پیوسته با ژن مذکور در فاصله ای کمتر از یک سانتی مورگان جهت اصلاح به کمک نشانگر و همسانه سازی این ژن بر اساس نقشه استفاده خواهد شد. روش استفاده شده در این تحقیق قابل تعمیم به سایر ژن‌ها و ژنوم های گیاهی جهت بهره گیری از آن در اصلاح بناهای مولکولی است که به تفصیل به شرح آن پرداخته خواهد شد.

واژه‌های کلیدی

اصلاح به کمک نشانگر،
Hordeum vulgare L.،
ریز تشابهات ژنومی،
نقشه گرافیکی،
همسانه سازی بر اساس نقشه،

مقدمه

ژنوم جو به جز در نواحی اندکی از برگشتگی‌های کروموزومی، از هم راستایی بالایی با ژنوم‌های A و D گندم برخوردار است. همچنین هم راستایی بسیار مطلوبی بین ژنوم جو و برنج خصوصاً در برخی از نواحی محافظت شده ژنومی گزارش شده است (Slafer et al. 2002). نتایج مجموعه مطالعات حاکی از وجود هم راستایی در ترتیب آرایش ژن‌ها روی این دو ژنوم است. به همین علت (Devos and Gale 1997) ژنوم برنج را به عنوان یک مدل مطلوب و منبعی برای یافتن نشانگر به منظور اشباع نقشه ژنوم جو مطرح نمودند. قابل ذکر است که اندازه ژنوم هاپلولئید جو ($2n = 14$) حدود 4900 Mb و اندازه ژنوم هاپلولئید برنج ($2n = 24$) حدود 400 Mb می‌باشد. کامل‌ترین نقشه ژنتیکی برنج متشكل از ۱۲ گروه پیوستگی به طول 1575 cM می‌باشد. این در حالی است که نقشه ژنتیکی جو از اندازه‌ای حدود 1245 cM روی ۷ کروموزوم برخوردار است. همچنین ژنوم برنج حاوی میزان اندکی DNA تکراری (درصد) در مقایسه با ژنوم جو (درصد) می‌باشد. اندازه کوچکتر و میزان کمتر توالی‌های تکراری در ژنوم برنج نشان‌دهنده مزایای استفاده از دستاوردهای توالی یابی ژنوم برنج در برنامه‌های همسانه‌سازی براساس نقشه خصوصاً همسانه‌سازی ژن‌ها در ژنوم‌های بزرگی نظری جو و سایر غلات است (Freeling 2001). همچنین با توجه به این‌که این برنامه‌ها مستلزم وجود نقشه‌های هرچه اشباع‌تر برای نشانگرهای مولکولی می‌باشند، از اطلاعات مذکور می‌توان در تکمیل نقشه‌های ژنتیکی ژنوم توالی یابی نشده جو بهره فراوان برد. این در حالی است که پس از تکمیل پروژه‌های توالی یابی سایر ژنوم‌های خانواده گرامینه نظری ذرت (*Zea mays* L.), سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) و برکی پودیوم (*Brachypodium distachyon* L.) حتی درجه بالاتری از هم راستایی و ریز تشابهات ژنومی مشاهده شد و طیف وسیع تری از کاربرد ژنومیکس مقایسه‌ای برای تولید مخازن جدید و گسترش‌تر نشانگری مطرح گردید (Mayer et al. 2011)، که از اهمیت فوق العاده‌ای در ژنتیک و اصلاح نباتات مولکولی برخوردار است. در هر سنبله جو سه سنبله‌جو وجود دارد و براساس شکل ظاهری سنبله به گروه‌های دو ردیفه و شش ردیفه و حد واسطه یا غیرشش ردیفه طبقه‌بندی می‌شود. ژن *dsp* (موتانت ژن *dsp1*)

از نشانگرهای مولکولی جهت تشخیص و تمایز گونه‌های مختلف، بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم گیاهی، تأیید گردهافشانی و اثبات هویت دورگها، ارزیابی خلوص ژنتیکی لاین‌های اصلاحی، ارزیابی تنوع سوماکلونال، پیش‌بینی عملکرد و پتانسیل هتروزیس گیاهان دورگ، اصلاح زود هنگام و غیر تخریب‌کننده و غربال ژرم پلاسم گیاهی از نظر صفات مغاید استفاده می‌گردد (Slafer et al. 2002). با وجود این عمدت‌ترین هدف از کاربرد نشانگرهای مولکولی، گزینش به کمک نشانگر (MAS) بوده است. اصلاح به کمک نشانگر فرصت مناسبی برای بهبود کارایی انتخاب ژنتیکی‌های مطلوب از حیث صفت مورد نظر فراهم می‌نماید و راهکاری بالقوه برای سرعت بخشیدن و گزینش دقیق در اصلاح نباتات مولکولی و بیوتکنولوژی کشاورزی است. لازمه اصلاح به کمک نشانگر تهیه نقشه‌های پیوستگی نشانگرهای مولکولی برای جمعیت‌های مختلف ژنتیکی است. تهیه نقشه و توالی یابی ژنوم گیاهان کمک بزرگی به درک عمل، تنظیم و بیان و همسانه سازی ژن‌ها نیز می‌باشد (Gale and Devos 1998).

تمکیل نقشه ژنی و توالی یابی ژنوم آرایدوسیس و برنج نشان داد که آرایش ژن‌ها اغلب در میان گونه‌های خویشاوند به صورت محافظت شده (Conserved) می‌باشد (Bennetzen 2000). بنابراین از ژنومیکس مقایسه‌ای می‌توان خصوصاً از جنبه‌های تکاملی در اصلاح نباتات مولکولی بهره برد، زیرا نتایج تحقیقات اخیر حاکی از تأثیر انتخاب طبیعی در طی تکامل بر نحوه تنظیم و بیان ژن‌ها و نقش نواحی ترجمه شده ژنوم در وظیفه ژن و فرایندهای متابولیت است (Kantety et al. 2002). بررسی ژنوم غلات نشان می‌دهد که اگرچه حدود ۵۰ میلیون سال پیش سه گونه گندم، برنج و جو از یکدیگر تمایز حاصل نموده‌اند، ولی ژنوم این گیاهان از توالی‌های حفاظت شده و مشابه زیادی برخوردارند. ژنومیکس مقایسه‌ای برای برنج، گندم، جو، ذرت و سورگوم نشان‌دهنده آرایش نشانگری محافظت شده برای نواحی بزرگ کروموزومی در این گونه‌هاست و این اساس فرضیه تشابهات ژنومی در مطالعات نقشه‌یابی مقایسه‌ای می‌باشد (Gale and Devos 1998 ; Freeling 2001).

RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/converter/run) از MIPS (http://mips.Helmholtz-muenchen.de/plant/brachypodium) استخراج شد. همولوژی توالی های بدست BLAST (Altschul et al. 1990) از گرینه استفاده کرد. مکان ژنی از جمله ژن های دخیل در فرایند تکاملی جو و کنترل کننده میزان عملکرد در این گیاه می باشد که خصوصاً از جنبه های اقتصادی حائز اهمیت است. بنابراین، مکان ژنی این ژن به روش های مولکولی و ژنومیک از جمله ژنومیکس مقایسه ای برای ابداع نشانگر پیوسته و کاربرد آن در برنامه های اصلاح به کمک نشانگر و همسانه سازی بر اساس نقشه در جهت اصلاح مولکولی جو ضروری به نظر می رسید. به منظور نیل به این هدف مطالعه حاضر طراحی و اجرا شد.

دستگاه PCR ۹۷۰۰ (Amp PCR System ABI, Tokyo) و بافت ۱X بافر PCR شامل ۱/۵ میلی مولار dNTPs، ۰/۶۲۵ میکرو مولار MgCl₂، ۰/۰۶۲۵ میکرو مولار (Qiagen, Hilden, Germany) و ۰/۰۵۰ میکرو مولار ۲۵۰، (Qiagen, Hilden, Germany) میکرو مولار از هر آغازگر. چرخه های حرارتی شامل یک چرخه ۳۵ دقیقه ای در ۹۵ برای واسرشته سازی اولیه، ۳۰ چرخه شامل ۱۵ دقیقه ای در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مناسب برای هر ۷ دقیقه (جدول ۱) و ۰/۵ تا ۰/۰ تا دو دقیقه (جدول ۱) بسط در ۷۲°C، و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه ای در ۷۲°C بود. محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل یک تا ۳ درصد آگارز (بسته به طول قطعه) از یکدیگر تفکیک و به منظور آشکارسازی نوارهای تکثیر شده، ژل های الکتروفورزی با محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

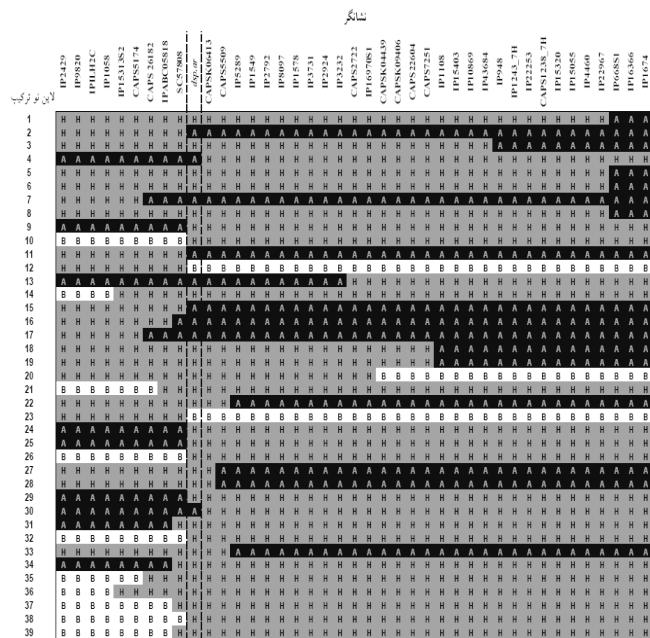
در صورت عدم مشاهده چند شکلی طولی و به منظور شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNPs) محصولات تکثیری مربوط به والدین توالی یابی شدند. خالص سازی فرآورده های Mary land, USA (QIAGEN PCR با استفاده از کیت استخراج Avant Genetic Analyzer (QIAGEN, و توالی یابی با دستگاه توالی یاب-ABI Prism 3100، Clastal W DNA ژنومی والدین با استفاده از نرم افزار (http://www.ebi.ac.uk/clustal w/) مورد مطالعه قرار گرفت. از نتایج حاصل از هم ریفی توالي DNA والدین به منظور پیدا کردن چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNPs) ناشی از جهش های تک

عامل فشردگی سنبله از طریق کوتاه سازی میان گره ها و به طبع آن کاهش طول سنبله و افزایش تراکم آرایش دانه در سنبله می باشد. مکان ژنی آن در گذشته در ناحیه نامعلومی روی بازوی Franckowiak and Konishi 1997 (VH گارش شده بود). این ژن از جمله ژن های دخیل در فرایند تکاملی جو و کنترل کننده میزان عملکرد در این گیاه می باشد که خصوصاً از جنبه های اقتصادی حائز اهمیت است. بنابراین، مکان یابی این ژن به روش های مولکولی و ژنومیک از جمله ژنومیکس مقایسه ای برای ابداع نشانگر پیوسته و کاربرد آن در برنامه های اصلاح به کمک نشانگر و همسانه سازی بر اساس نقشه در جهت اصلاح مولکولی جو ضروری به نظر می رسید. به منظور نیل به این هدف مطالعه حاضر طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها

جمعیت گیاهی مورد استفاده برای مطالعه ژن dsp.ar شامل ۱۹۹۳ (۳۹۸۶ گامت) نتاج F₂ حاصل از تلاقی والد زراعی (BO) و ژنتیپ موتابت (BW) بود. BO ژنتیپی BW265 در دو ردیفه با سنبله معمولی از لحاظ طول و فشردگی می باشد در حالیکه BW موتابت القاء شده به روش اشعه X برای فشردگی و کوتاهی سنبله است. کشت گیاهان در گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی (IPK) آلمان انجام شد و ارزیابی فتوتیپی افراد نسل F₂ و F₃ در این جمعیت برای صفت فشردگی سنبله در شرایط کنترل شده گلخانه جهت حذف واریانس عوامل محیطی ضمن سال های ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ صورت گرفت. استخراج DNA به روش CTAB و تغییر یافته (Stein et al. 2001) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتو متری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در مقایسه با غلظت نشانگر وزن مولکولی III (Roche co, Germany) برسی شد. جهت گزینش نشانگرهای اولیه از بانک نشانگرهای ETS موجود در جو به نام HarvEST و اطلاعات حاصل از ژنومیکس مقایسه ای بین برنج، ذرت، سورگوم و برآکی پودیوم برای هم ریفی توالي های SSR و STS گزارش شده توسط Mayer et al. (2011) استفاده شد. توالي های ارتو لوگ مورد استفاده از ژنوم های برنج، ذرت، سورگوم و برآکی پودیوم جهت اشباع پیوستگی نشانگری مکان

این میان ۱۰ نشانگر SNP شناسایی شده به روش برش آنزیمی فرآورده برای تولید نشانگر CAPS و بقیه به روش Pyrosequencing به نشاگرهای مبتنی بر PCR تبدیل شدند. ژنوتیپ ۱۹۹۳ نتاج نسل F₂ با استفاده از ۴۰ نشانگر تولید شده تعیین شد. در میان نتاج تعداد ۳۹ لاین نوترکیب برای فشردگی سنبله شناسایی شدند که بر اساس اطلاعات ژنوتیپی هر گیاه برای هر نشانگر، نقشه گرافیکی نشانگرها پیوسته با ژن *dsp.ar* ترسیم شد (شکل ۱). همچنین به منظور تایید ثبات پیوستگی، این مراحل برای تعداد ۱۶ گیاه از هر لاین نوترکیب (مجموعاً ۶۲۴ گیاه) نتاج نسل F₃ برای قطعه ژنی هدف تکرار گردید که نتیجه موید ثبات پیوستگی و ترتیب الگوی نشانگرها بر روی نقشه گرافیکی بود. تجزیه پیوستگی نشانگرها تولید شده و ژن مورد نظر در این تحقیق منجر به مکان یابی ژن *dsp.ar* در فاصله ای حدود ۰/۵۷ سانتی مورگان (معادل ۱۵ نوترکیبی) بین دو نشانگر SC578808 و CAPSK06413 در ناحیه سانترومری کروموزوم ۷H شد که



شکل ۱- نقشه گرافیکی نشانگرها پیوسته با ژن فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه سانترومری کروموزوم ۷H جو با استفاده از ۳۹ لاین نوترکیب نسل F₃ حاصل از تلاقی والدین *BW265* و (A) در ناحیه سیاه رنگ نقشه بیانگر ژنوتیپ هموزیگوت نوع *Bowman* با سنبله طبیعی، (B) در ناحیه سفید رنگ نقشه بیانگر ژنوتیپ هموزیگوت نوع *BW265* با سنبله فشرده و H در ناحیه خاکستری رنگ نقشه بیانگر ژنوتیپ هتروزیگوت با سنبله طبیعی می باشد. ناحیه نزدیکترین نشانگرهای پیوسته با ژن CAPSK06413 (SC578808-CAPSK06413) بصورت نقشه چین نمایش داده شده است.

نقطه ای و جایگزین شدگی نوکلئوتیدی استفاده شد. برای تبدیل SNP شناسایی شده در والدین به چند شکلی طولی با استفاده از Nishanگرهای مبتنی بر PCR از روش (Shahinnia and CAPS Sayed-Tabatabaei 2009; Shahinnia et al. 2009) و (Ahmadian et al. 2006) Pyrosequencing تعیین فواصل نشانگرها و تجزیه پیوستگی ازتابع (Kosambi 1994) بر حسب فراوانی نوترکیبی و نرم افزار JoinMap (v4.0, Kyazma BV, Wageningen, Netherlands) استفاده شد.

نتایج و بحث

تفرق ۳:۱ فنوتیپی فشردگی سنبله در بین نتاج F₂ نشان داد که توارث ژنوتیکی این صفت بصورت ساده متالی و با یک ژن کترل می گردد. میانگین طول میانگرهای در مرحله رسیدگی به ترتیب ۲/۴ میلی متر برای والد BW در برابر ۳/۷ میلی متر برای والد BO بود که از تفاوت معنی دار آماری برخوردار شده است. این تفاوت معنی دار برای طول ۸/۵ در برابر ۹/۸ و عرض دانه ۳/۸ در برابر ۴/۲) که در اثر کاهش طول میانگرهای و در نتیجه طول سنبله اتفاق می افتد نیز مشاهده شد.

غربال ژنوتیکی و نقشه گرافیکی والدین با استفاده از ۱۵۳۶ نشانگر SNP شناسایی شده در جو نشان داد که والد موتانت BW حامل یک قطعه ژنوتیکی القاء شده به طول ۲۰/۳ سانتی مورگان مرتبط با ژن *dsp.ar* در ناحیه سانترومری کروموزوم ۷H جو می باشد (Druka et al. 2011). به منظور مکان یابی دقیق تر و کاهش هر چه بیشتر فاصله نشانگرها پیوسته به این ژن از ۲۰/۳ به کمتر از یک سانتی مورگان لازم بود تا ۱۹۹۳ فرد متعلق به این جمعیت ژنوتیکی برای تعداد بیشتری از نشانگرها با چندشکلی بالا برای قطعه هدف مورد غربال ژنوتیکی قرار گیرند. بدین منظور با بهره گیری از ریز تشابهات ژنومی و همسایه مولکولی بین ژنوم توالی یابی نشده جو در مقایسه با ژنوم های توالی یابی شده خانواده گرامینه نظیر برنج، ذرت، سورگوم و برکی پودیوم، ۳۸۰ توالی EST که از همولوژی بالایی با توالی ناحیه ژنی مورد نظر توالی EST باز استفاده کردند انتخاب شدند. پس از طراحی آغازگر و تکثیر برخوردار بودند انتخاب شدند. نهایتاً ۴۰ توالی EST بین والدین فرآورده ها و توالی یابی، تنها برای ۴۰ توالی EST مشاهده شد (SNP) (جدول ۱). از چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- نشانگرهای پیوسته با ژن فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه سانترومی کروموزوم ۷H، شناسه نشانگرها در بانک اطلاعاتی HarvEST برای دریافت توالی هر نشانگر، ژن های خویشاوند بر گرفته شده از ناحیه حفاظت شده ژنومی برآکی پودیوم و برنج، دمای اتصال و زمان گسترش برای هر نشانگر.

نشانگر*	شناسه در بانک اطلاعاتی HarvEST	ژن خویشاوند برآکی پودیوم	ژن خویشاوند برنج	دمای اتصال (°C)	زمان گسترش (ثانیه)
IP7810	7810	Bradi1g45710.1	Os06g0218600	58	۲۰
IP2429	2429	Bradi1g43770.1	Os06g0270900	58	۲۰
IP9820	9820	Bradi1g44530.1	-	58	۲۰
IP1286_7H	1674	Bradi3g37680.1	Os08g0460000	58	۲۰
IP1058	1058	Bradi3g39850.1	Os08g0504700	58	۲۰
IP15313_S2	15313	-	-	58	۲۰
CAPS5174	5174	Bradi1g43580.1	Os06g0283300	55	۶۰
CAPS26182	26182	Bradi1g42760.1	-	55	۶۰
IPABC05818	4202	Bradi1g42707.1	Os06g0318600	58	۲۰
SC57808	-	Bradi3g40030.1	Os08g0509600	57	۴۰
CAPSKO6413	1814	Bradi1g36840.1	Os06g0598900	55	۶۰
CAPS5509	5509	Bradi3g18190.1	Os08g0556000	55	۶۰
IP1549	1549	Bradi3g22330.1	Os08g0345800	58	۲۰
IP2792	2792	Bradi3g16187.1	-	58	۲۰
IP8097	8097	Bradi1g45620.1	Os08g0180300	58	۲۰
IP5289	5289	Bradi3g12830.2	Os12g0641500	58	۲۰
IP1578	1578	Bradi3g10620.1	Os02g0290500	58	۲۰
IP2924	2924	Bradi3g42030.1	Os08g0545200	58	۲۰
IP3232	3232	Bradi1g36700.1	Os06g0602600	58	۲۰
IP16970S1	16970	Bradi1g37250.1	Os06g0588900	58	۲۰
CAPS2722	2722	Bradi3g14000.1	Os08g0120500	57	۶۰
CAPSK04439	7916	-	-	55	۶۰
CAPSK09406	19528	Bradi3g12960.1	-	55	۶۰
CAPS22604	22604	Bradi1g37977.1	Os06g0556200	55	۶۰
CAPS7251	7251	Bradi1g41947.1	-	55	۶۰
IP43684	43684	Bradi3g41920.1	Os08g0543600	58	۲۰
IP10869	10869	Bradi3g41830.1	Os08g0541500	58	۲۰
IP15403	15403	Bradi3g41600.5	Os08g0538600	58	۲۰
IP1108	1108	Bradi3g41480.3	Os08g0536000	58	۲۰
IP15320	15320	Bradi3g18820.1	Os12g0152700	58	۲۰
IP22253	22253	Bradi3g17040.1	Os08g0152800	58	۲۰
CAPS1238_7H	1238	Bradi3g16240.1	Os08g0162200	55	۶۰
IP4460	4460	Bradi3g14090.1	Os08g0122000	58	۲۰
IP15055	15055	Bradi3g13800.1	Os08g0117300	58	۲۰
IP22967	22967	Bradi3g13330.1	Os08g0109100	58	۲۰
IP1243_7H	-	-	Os08g0161800	58	۲۰
IP948	948	Bradi1g36830.1	Os06g0600100	58	۲۰
IP1674	1674	Bradi1g37582.1	Os06g0568200	58	۲۰
IP4589	4589	Bradi1g37630.1	Os06g0567000	58	۲۰
IP3731	3731	Bradi1g35780.1	Os06g0354700	58	۲۰
IP4850	4850	Bradi3g43020.1	Os08g0560500	58	۲۰

*نشانگرها بی که به ترتیب با CAPS و IP معرفی شده اند با استفاده از روش های Pyrosequencing و CAPS به نشانگرهای مبتنی بر PCR تبدیل شده اند.

ژنومی و همراستایی در ناحیه ای حدود یک Mb از بازوی بلند کروموزوم ۳ برنج و ۸/۲ سانتی مورگان بین نشانگرهای AV933435 و BJ460446 واقع در ناحیه تلومری بازوی کوتاه کروموزوم ۴H جو در ناحیه ژن سنبله حد واسط (*int-c*) توسط ۵۴ نشانگر EST از همسانه های cDNA بازوی کوتاه کروموزوم ۲H نشانگر مقاومت به زنگ برگ (*Rph16*) در جو گردید (Perovic et al. 2004). Mammadov et al. (2005) با استفاده از ریزتشابهات ژنومی موجود بین بازوها کوتاه کروموزوم های یک برنج و ۳ جو، توانستند فضای کوچکتری از یک سانتی مورگان در اطراف ژن مقاومت به زنگ برگ (*Rph5*) را با ۱۱ نشانگر EST اشیاع نمایند. درجه بالایی از ریز تشابهات ژنومی و همراستایی در فاصله ای کمتر از یک سانتی مورگان و لنگرگاه ژن مقاومت به زنگ ساقه (*Rpg1*) در ناحیه تلومری بازوی کوتاه کروموزوم های ۷H و ۶ برنج نیز توسط Kilian et al. (1995) اشاره شده است. از جمله عوامل موافقیت در استفاده از تئوری تشابهات ژنومی برای اشیاع نقشه پیوستگی مولکولی، طراحی آغازگر مناسب برای توالی نشانگرهاست. علت اصلی تشابهات ژنومی و همراستایی ژن ها و نشانگرهای مولکولی بین گونه های مختلف منوط به نواحی حفاظت شده و مرتبط با نواحی کد شده یا بیان شده ژنوم در تکامل می باشد (Bennetzen 2000; Caldwell et al. 2004). در طراحی آغازگرها برای نشانگرهای EST برگرفته شده از نواحی بیان شده معمولاً چند ویژگی مانند طول بین ۱۸ تا ۲۰ حفت باز برای آغازگر، دمای ذوب (Tm) بین ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد، محتوای G/C بیش از ۵۰ درصد در توالی، عدم وجود ساختمندانه ای درونی یا معکوس، مکمل نبودن آغازگرهای مستقیم و معکوس در نواحی ۳' انتهایی با یکدیگر، وجود بازهای C و G در انتهای ۳' آغازگرها و وجود فاصله ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز بین آغازگرهای مستقیم و معکوس در نظر گرفته می شوند. در صورتی که امکان طراحی آغازگر و رعایت این معیارها در مناطق کد شده وجود نداشته نباشد و آغازگر طراحی شده با مناطق

گام نخست و ضروری جهت همسانه سازی این ژن بر اساس نقشه را فراهم نمود. نتایج حاصل از این پژوهش، نخستین گزارش در مورد وجود درجه بالایی از ریزتشابهات ژنومی و همراستایی در ناحیه ای به بزرگی ۲۰/۳ سانتی مورگان از محدوده سانترومری کروموزوم ۷H جو می باشد. نواحی سانترومری ژنوم گونه های مختلف گیاهی بدلیل اینکه ضمن تکامل بسیار محافظت شده باقی مانده اند از فراوانی نوترکیبی بسیار پایینی برخوردار می باشند. این مسئله از مشکلات اساسی برای مشاهده چندشکلی و اشیاع نقشه های پیوستگی نشانگری، همسانه سازی بر اساس نقشه و برنامه های اصلاح به کمک نشانگر بوده است. با این وجود دستاوردهای ژنومیکس مقایسه ای و استفاده از هم راستایی و ریز تشابهات ژنومی در جهت تولید و غنی سازی نشانگرهای جدید مولکولی تا حد زیادی این مشکل را مرتفع نموده است. اگرچه تاکنون گزارش های اندکی در رابطه با وجود هم راستایی و تشابهات ژنومی برای نواحی بزرگ کروموزومی بین برنج و جو منتشر شده است، ولی برخی از محققین از جمله Brunner et al. (2003) و Caldwell et al. (2004) هم راستایی بزرگ (Macro-colinearity) بین نشانگرها و ژن ها در گونه های مختلف برای فواصل بزرگ کروموزومی نیز اشاره نموده اند. در این گزارش ها وجود هم راستایی بین ۵ نشانگر در فاصله بزرگ ۵۰ سانتی مورگان روی نقشه های کروموزوم از یک گونه با گونه دیگر به "هم راستایی بزرگ" تعییر شده است. هم راستایی بزرگی بین نشانگرهای نقشه یابی شده واقع بر کل کروموزوم های یک برنج و کروموزوم ۳H جو گزارش شده است (Smilde et al. 2001) جو به دلیل کراسینگ اورهای نابرابر و جفت شدگی های اشتباہی به هنگام همانند سازی DNA است (Saghai Maroof et al. 1996). بنابراین اگرچه وجود توالی های DNA تکراری منجر به افزایش ۱۴ برابری ژنوم جو در مقایسه با برنج شده است، ولی به دلیل اینکه در طی مراحل تکامل این توالی ها بیشتر در نواحی تلومری و سانترومری کروموزوم های جو مستقر شده اند امکان از بین رفتن هم راستایی بین ژن ها و نشانگرها در فواصل بزرگ کروموزومی کاهش یافته است. وجود درجه بالایی از ریزتشابهات

بيان ژنتيکي نداشته باشند، تظاهرى در يك EST نشان نمي دهند و نمي توان از اين روش در نقشه یابي مقاييسه اى استفاده نمود. دو معيار مهم مقدار $e^{-value} \leq e^{-5}$ برای ميزان همولوژي يا شباht يك توالى مشابه بين جو و برج و وجود بالاترین ميزان انطباق ناحيه هدف با ناحيه مشابه در گونه ارتو لوگ به عنوان معيارهای افزاینده کارايی EST های گريش شده در مطالعات نقشه یابي مقاييسه اى عنوان شده است (Perovic et al. 2004). استفاده از اطلاعات مرتبط با پروژه توالى یابي ژنوم برج در بانک dna و ترسنکرپتوم جو (Stein et al. 2007) در بانک های TIGR و NCBI كمكی مؤثر در گريش نشاگرها EST خواهد بود (Galperin et al. 2002)

از ژنوميكس مقاييسه اى مى توان به عنوان ابزارى مناسب برای مطالعه نحوه تکامل ژنهای خويشاوند، اساس سازگاري مولکولي و ميزان جهش های مخرب نيز بهره برد. اين روش امكان شناسايي تواليهای ترجمه نشده ژنوم و اطلاعات مهمی در مورد عوامل تنظيم کننده ژنی را فراهم می سازد. علاوه بر اين از مقاييسه نواحي حفاظت شده بين گونه اى و برسی ميزان اثر انتخاب طبعی بر DNA غير كد شونده می توان حتى نواحي پرومоторی و نواحي حفاظت شده نسخه برداری نشده در ژنوم را مورد شناسايي قرار داد. در نهايیت لازم است نقش فرایندهای عمدۀ که منجر به تغييرات ژنومی می گردد از قبيل برگشتگی، مضاعف شدگی، کمبود، جابه جايی های متقابل، ادغام ژنی، کراسينگ آورهای نابرابر، نوترکيبي، تبديل ژنی و تنوع تکاملی را در ژنوميكس مقاييسه اى از نظر دور نداشت (Mitchelloldz and Clauss 2002).

تشکر و قدردانی

كلیه هزینه انجام این آزمایش بعنوان بخشی از پروژه فوق دکتری نويسنده توسط مؤسسه تحقیقات ژنتیک گیاهی (IPK) آلمان پرداخت شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد. از راهنمایی های علمی ارزنده آقای دکتر نیلز اشتاین در طول انجام پژوهش سپاسگزاری می گردد.

غیركاد شده ژنوم جفت شدگی داشته باشد احتمال تکثير توالى به روش PCR اندک و گاهما ميسر نخواهد شد. به همين علت به منظور افزایش کارايی آغازگرها طراحی شده در مطالعات نقشه یابي مقاييسه اى بهتر است در صورت امکان اين آغازگرها در نواحي حفاظت شده نظير مناطق مرتبط با توالى های EST-SSR طراحى گرددن.

در اين پژوهش استفاده از نشاگرها EST و تبديل آنها به نشاگر CAPS امکان اشاع نقشه پيوستگي مولکولي در ناحيه مورد مطالعه را به خوبی فراهم نمود. در اشاع نقشه های پيوستگي مولکولي خصوصاً در نواحي كوچکتر از يك سانتي مورگان تنها يك روش ديگر يعني استفاده از نشاگر AFLP به همراه تكنيك BSA از کارايی بالايی برخوردار است (Perovic et al. 2004)، ولی عدم اطلاع از جايگاه ژنی اين نشاگرهاي غيراختصاصي و نامعلوم بودن جايگاه كروموزومي آنها، بارز بودن نشاگرها AFLP و عدم امكان تشخيص افراد هتروزويگوت از هموزيگوت، پيچيدگي مراحل انجام آزمایش و نياز به مواد راديواكتيو و غيره از جمله معایب عمدۀ اين روش می باشد. در حالی که نشاگرها CAPS به دليل عدم نياز به کاوشگر و مواد راديواكتيو، نياز به مقدار کم DNA ، اختصاصي بودن با قدرت تكرار پذيری و قابلیت اعتماد فوق العاده برای رتبه دهی آسان و هم باز بودن آنها جهت تفکيک دقیق نوارهای هتروزويگوت از هموزيگوت و شبيه والدين در مقاييسه با نشاگرها AFLP از اهمیت خاصی در تحقيقات اخير برخوردارند. در صورتیکه امکان استفاده از روش CAPS بدلیل عدم وجود مكان برش آنزیمی مناسب وجود نداشته باشد می توان از هر يك از روشهای موجود در توالى یابي نظير Pyrosequencing جهت تعیین ژنوتیپ افراد جمعیت بهره برد. نتایج نشان دادند که موفقیت گريش نشاگرها EST و استفاده از آنها در نقشه یابي مقاييسه اى منوط به کيفيت، كمیت و صحت منابع اطلاعاتی مرتبط با پروژه های توالى یابي در بانک های اطلاعاتی است. در صورتی که توالى یابي در ناحيه هدف برای گونه اى با تشابهات ژنومی تكميل نشده باشد و همچنین اين نواحي ضمن تکامل از گونه ارتو لوگ حذف شده و به هر علتي

منابع

- Ahmadian A, Ehn M, Hober S (2006) Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* 363: 83-94.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Bennetzen JL (2000) Comparative sequence analysis of plant nuclear genomes: Microcolinearity and its many exceptions. *Plant Cell* 12: 1021-1029.
- Brunner S, Keller B, Feuillet C (2003) A large rearrangement involving genes and low-copy DNA interrupts the microcolinearity between rice and barley at the *Rph7* locus. *Genetics* 164: 673-683.
- Caldwell KS, Langridge P, Powell W (2004) Comparative sequence analysis of the region harboring the hardness locus in barley and its colinear region in rice. *Plant Physiology* 136: 3177-3190.
- Devos KM, Gale MD (1997) Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology* 35: 3-15.
- Druka A, Franckowiak J, Lundqvist U, Bonar N, Alexander J, Houston K, Radovic S, Shahinnia F, Vendramin V, Morgante M, Stein S, Waugh R (2011) Genetic dissection of barley morphology and development. *Plant Physiogy* 155:617-627.
- Franckowiak JD, Konishi T (1997) BGS 9, Dense spike 1, *dsp1*, revised. *Barley Genetics Newsletter*. 26:53.
- Freeling M (2001) Grasses as a single genetic system. Reassessment 2001. *Plant Physiology* 125: 1191-1197.
- Gale MD, Devos K (1998) Plant comparative genetics after 10 years. *Genome* 28: 656-659.
- Galperin MY (2005) The molecular biology database collection: 2005 update. *Nucleic Acids Research* 33: D5-D24.
- Kantety RV, Rota ML, Matthews DE, Sorrells ME (2002) Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48: 501-510.
- Kilian A, Kudrna DA, Kleinhofs A, Yano M, Karata N, Steffenson B, Sasaki T (1995) Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley *Rpg1* region. *Nucleic Acids Research* 23: 2729-2733.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- Mammadov JA, Steffenson BJ, Saghai Maroof MA (2005) High-resolution mapping of the barley leaf rust resistance gene *Rph5* using barley expressed sequence tags (ESTs) and synteny with rice. *Theoretical and Applied Genetics* 111:1651-1660.
- Mayer KF, Martis M, Hedley PE, Simková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Dolezel J, Waugh R, Stein N (2011) Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* 23: 1249-1263.
- Mitchellolds T, Clauss MJ (2002) Plant evolutionary genomics. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 74-79.
- Perovic D, Stein N, Zhang H, Drescher , Prasad M, Kota R, Kopahnke D, Graner A (2004) An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. *Functional and Integrative Genomics* 4: 74-83.
- Saghai Maroof MA, Yang GP, Biyashev MR, Maughan PJ, Zhang Q (1996) Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP linkage mapping. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 541-551.
- Shahinnia F, Druka A, Franckowiak J, Waugh R, Morgante M, Stein N (2012). High resolution mapping of the gene dense spike (*dsp1*) to the genetic centromere of barley chromosome 7H. *Theoretical and Applied Genetics* 124:373-384
- Shahinnia F, Sayed-Tabatabaei BE (2009) Conversion barley single-nucleotide polymorphism (SNP) into PCR-based marker using dCAPS method. *Genetics and Molecular Biology* 32: 564-567.
- Shahinnia F, Sayed-Tabatabaei BE, Pourkheirandish M, Sato K, Komatsuda T (2009) Mapping of QTL for intermediate spike on barley chromosome 4H using EST-based markers. *Breeding Science* 59: 383-390
- Slafer GA, Molina Cano JL, Savin R, Araus JL, Romagosa I (2002) Barley science: Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality, Haworth Press, New York, USA.
- Smilde WD, Haluskova J, Sasaki T, Graner A (2001) New evidence for the synteny of rice chromosome 1 and barley chromosome 3H from rice expressed sequence tags. *Genome* 44: 361-367.
- Stein N, Prasad M, Scholz U, Thiel T, Zhang H (2007) A 1, 000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theoretical and Applied Genetics* 114:823-839
- Stein N, Herren G, Keller B (2001) A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant Breeding* 120:354-356.