ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۴۱۶- ۴۰۹

# مکان یابی ژن کنترل کننده فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه سانترومری کروموزوم ۷H 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، سورگوم و براکی پودیوم، مکان ژن فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه سانترومری کروموزوم ۷H جو مورد مطالعه قرار گرفت. ژن مزبور از جمله ژن های تکاملی و مرتبط با مورفولوژی سنبله و کنترل عملکرد در جو می باشد که از جنبه های اقتصادی حائز اهمیت است. تفرق ۳:۱ فنوتیپی فشردگی سنبله در بین نتاج $F_2$ حاصل از تلاقی والدین Bowman و BW265 نشان داد که توارث ژنتیکی این صفت بصورت ساده مندلی و با یک ژن کنترل می گردد. با ابداع نشانگرهای جدید STS، 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 وCAPSK06413 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 ژن ها و ژنوم های گیاهی جهت بهره گیری از آن در اصلاح نباتات مولکولی است که به تفصیل به شرح آن پرداخته خواهد شد.**

**واژه‌های کلیدی**

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

[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

## مقدمه

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، پیش بینی عملکرد و پتانسیل هتروزیس گیاهان دورگ، اصلاح زود هنگام و غیر تخریب‌کننده و غربال ژرم پلاسم گیاهی از نظر صفات مفید استفاده می‌گردد (Slafer et al. 2002). با وجود این عمده‌ترین هدف از کاربرد نشانگرهای مولکولی، گزینش به کمک نشانگر (MAS) بوده است. اصلاح به کمک نشانگر فرصت مناسبی برای بهبود کارایی انتخاب ژنوتیپ‌های 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 توالی‌یابی ژنوم گیاهان کمک بزرگی به درک عمل، تنظیم و بیان وهمسانه سازی ژن‌ها نیز می باشد (Gale and Devos 1998).

تکمیل نقشه ژنی و توالی‌یابی ژنوم آرابیدوپسیس و برنج نشان داد که آرایش ژن‌ها اغلب در میان گونه‌های خویشاوند به‌صورت 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 نحوهٔ 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 نشان‌دهندهٔ 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).

ژنوم جو به جز در نواحی اندکی از برگشتگی‌های کروموزومی، از هم راستایی بالایی با ژنوم‌های A و D گندم برخوردار است. همچنین هم‌راستایی بسیار مطلوبی بین ژنوم جو و برنج خصوصا در برخی از نواحی محافظت شده ژنومی گزارش شده است (Slafer et al. 2002). نتایج مجموعه مطالعات حاکی از وجود هم‌راستایی در ترتیب آرایش ژن‌ها روی این دو ژنوم است. به‌همین علت Devos and Gale (1997) ژنوم برنج را به‌عنوان یک مدل مطلوب و منبعی برای یافتن نشانگر به‌منظور اشباع نقشه ژنوم جو مطرح نمودند. قابل ذکر است که اندازه ژنوم هاپلوئید جو (۲n = ۲x =۱۴) حدود ۴۹۰۰Mb و اندازه ژنوم هاپلوئید برنج (۲n = ۲x =۲۴) حدود ۴۰۰Mb می‌باشد. کامل‌ترین نقشه ژنتیکی برنج متشکل از ۱۲ گروه پیوستگی به‌طول ۱۵۷۵ cM می‌باشد. این در حالی است که نقشه ژنتیکی جو از اندازه‌ای حدود ۱۲۴۵ cM روی ۷ کروموزوم برخوردار است. همچنین ژنوم برنج حاوی میزان اندکی DNA تکراری (۵۰ درصد) در مقایسه با ژنوم جو (۸۰ درصد) می‌باشد. اندازه کوچکتر و میزان کمتر توالی‌های تکراری در ژنوم برنج نشان‌دهنده مزایای استفاده از دستاورد پروژه توالی‌یابی ژنوم برنج در برنامه‌های همسانه‌سازی براساس نقشه خصوصاً همسانه‌سازی ژن‌ها در ژنوم‌های بزرگی نظیر 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 پروژه های توالی یابی سایر ژنوم های خانواده گرامینه نظیر ذرت (*Zea mays* L.)، سورگوم (*Sorghum bicolor* L.) و براکی پودیوم (*Brachypodium distachyon* L.) حتی درجه بالاتری از هم راستایی و ریز تشابهات ژنومی مشاهده شد و طیف وسیع‌تری از کاربرد ژنومیکس مقایسه ای برای تولید مخازن جدید و گسترده تر نشانگری مطرح گردید (Mayer et al. 2011)، که از اهمیت فوق العاده ای در ژنتیک و اصلاح نباتات مولکولی برخوردار است. در هر سنبله جو سه سنبلچه وجود دارد و براساس شکل ظاهری سنبله به گروه‌های دو ردیفه و شش ردیفه و حد واسط یا غیر شش ردیفه طبقه‌بندی می‌شود. ژن *dsp.ar* (موتانت ژن *dsp*1)



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

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 کوتاه کروموزوم 7H گزارش شده بود (Franckowiak and Konishi 1997). این ژن از جمله ژن های دخیل در فرایند تکاملی جو و کنترل کننده میزان عملکرد در این گیاه می باشد که خصوصاً ازجنبه های اقتصادی حائز اهمیت است. بنابراین، مکان یابی این ژن به روش‌های 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 روش‌ها

جمعیت گیاهی مورد استفاده برای مطالعه ژن *dsp.ar* شامل ۱۹۹۳ (۳۹۸۶ گامت) نتاج $F_2$ حاصل از تلاقی والد زراعی(BO) Bowman و ژنوتیپ موتانت (BW) BW265 بود. BO ژنوتیپی دو ردیفه با سنبله معمولی از لحاظ طول و فشردگی می باشد در حالیکه BW موتانت 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 فنوتیپی افراد نسل $F_2$ و $F_3$ در این جمعیت برای صفت فشردگی سنبله در شرایط کنترل شده گلخانه جهت حذف واریانس عوامل محیطی ضمن سال‌های ۱۳۸۷ و۱۳۸۸ 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) بررسی 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 براکی پودیوم برای همردیفی توالی های SSR، SNP و STS گزارش شده توسط Mayer at al. (2011) استفاده شد. توالی های ارتولوگ مورد استفاده از ژنوم های برنج، ذرت، سورگوم و براکی پودیوم جهت اشباع پیوستگی نشانگری مکان ژن *dsp.ar* از بانک های اطلاعاتی RAP-DB (http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/converter/run) و MIPS (http://mips.Helmholtz-muenchen.de/plant/brachypodium searchjsp /blast.jsp) استخراج شد. همولوژی توالی های بدست آمده به روش Altschul et al. 1990 و استفاده از گزینه BLAST بانک اطلاعاتی NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) انجام شد. طراحی آغازگرها برای توالی های الگو با استفاده از نرم افزار Oligo5 صورت گرفت (Shahinnia et al. 2011). تکثیر DNA ژنومی والدین و افراد جمعیت به روش PCR در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش دریافت شده از شرکت Fermentas و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Gene Amp PCR System 9700 (ABI, Tokyo) صورت گرفت. اجزای واکنش عبارت بودند از: 1X بافر PCR شامل ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۶۲۵ واحد از HotStar *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)، ۲۵۰ میکرو مولار dNTPs و ۱۰ میکرو مولار از هر آغازگر. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۱۵ دقیقه‌ای در ۹۵ برای واسرشته سازی اولیه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مناسب برای هر جفت آغازگر (جدول ۱) و ۰/۵ تا دو دقیقه (جدول ۱) بسط در دمای 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، ژل‌های الکتروفورزی بامحلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

در صورت عدم مشاهده چند شکلی طولی و به‌منظور شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNPs) محصولات تکثیری مربوط به والدین توالی‌یابی شدند. خالص سازی فرآورده‌های PCR با استفاده از کیت استخراج QIAGEN (Mary land, USA, QIAGEN) و توالی‌یابی با دستگاه توالی یاب ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer انجام شد. نتایج حاصله از توالی‌یابی DNA ژنومی والدین با استفاده از نرم‌افزار Clastal W (http://www.ebi.ac.uk/clustal w/) مورد مطالعه قرار گرفت. از نتایج حاصل از همردیفی توالی DNA والدین به‌منظور پیدا کردن چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) ناشی از جهش های تک



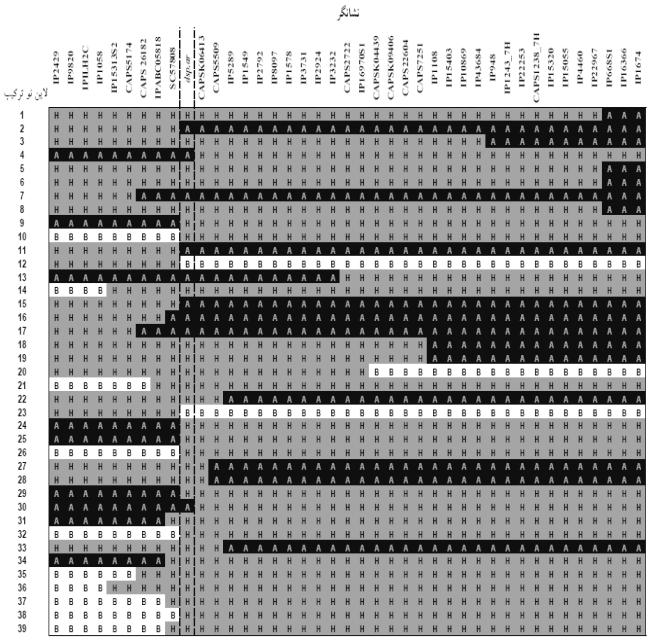
[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

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

## نتایج و بحث

تفرق ۳:۱ فنوتیپی فشردگی سنبله در بین نتاج $F_2$ نشان داد که توارث ژنتیکی این صفت بصورت ساده مندلی و با یک ژن کنترل می گردد. میانگین طول میانگره ها 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 میانگره ها و در نتیجه طول سنبله اتفاق می افتد نیز مشاهده شد.

غربال ژنتیکی و نقشه گرافیکی والدین با استفاده از ۱۵۳۶ نشانگر SNP شناسایی شده در جو نشان داد که والد موتانت BW حامل یک قطعه ژنتیکی 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 نشانگرهای پیوسته به این ژن از ۲۰/۳ به کمتر از یک سانتی مورگان لازم بود تا ۱۹۹۳ فرد متعلق به این جمعیت ژنتیکی برای تعداد بیشتری از نشانگرهای با چندشکلی بالا برای قطعه هدف مورد غربال ژنتیکی قرار گیرند. بدین منظور 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 گرامینه نظیر برنج، ذرت، سورگوم و براکی پودیوم، ۳۸۰ توالی EST که از همولوژی بالایی با توالی ناحیه ژنی مورد نظر برخوردار بودند انتخاب شدند. پس ازطراحی آغازگر و تکثیر فرآورده ها و توالی یابی، تنها برای ۴۰ توالی EST بین والدین چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) مشاهده شد (جدول ۱). از 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 $F_2$ 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 نشانگرهای 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 $F_3$ برای قطعه ژنی هدف تکرار گردید که نتیجه موید ثبات پیوستگی و ترتیب الگوی نشانگرها بر روی نقشه گرافیکی بود. تجزیه پیوستگی نشانگرهای 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 نشانگرSC578808 و CAPSK06413 در ناحیه سانترومری کروموزوم ۷H شد که




شکل ۱- نقشه گرافیکی نشانگرهای پیوسته با ژن فشردگی سنبله (*dsp.ar*) در ناحیه سانترومری کروموزوم۷H جو با استفاده از ۳۹ لاین نوترکیب نسل $F_3$ حاصل از تلاقی والدین Bowman و BW265 . 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 (*SC57808-CAPK06413*) بصورت نقطه چین نمایش داده شده است.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

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

| نشانگر* | شناسه در بانک اطلاعاتی HarvEST | ژن خویشاوند براکی پودیوم | ژن خویشاوند برنج | دمای اتصال (ºC) | زمان گسترش(ثانیه) |
|---|---|---|---|---|---|
| IP7810 | 7810 | Bradi1g45710.1 | Os06g0218600 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP2429 | 2429 | Bradi1g43770.1 | Os06g0270900 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP9820 | 9820 | Bradi1g44530.1 | – | ۵۸ | ۳۰ |
| IP1286_7H | 1674 | Bradi3g37680.1 | Os08g0460000 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP1058 | 1058 | Bradi3g39850.1 | Os08g0504700 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP15313_S2 | 15313 | – | – | ۵۸ | ۳۰ |
| CAPS5174 | 5174 | Bradi1g43580.1 | Os06g0283300 | ۵۵ | ۶۰ |
| CAPS26182 | 26182 | Bradi1g42760.1 | – | ۵۵ | ۶۰ |
| IPABC05818 | 4202 | Bradi1g42707.1 | Os06g0318600 | ۵۸ | ۳۰ |
| SC57808 | – | Bradi3g40030.1 | Os08g0509600 | ۵۷ | ۹۰ |
| CAPSKO6413 | 1814 | Bradi1g36840.1 | Os06g0598900 | ۵۵ | ۶۰ |
| CAPS5509 | 5509 | Bradi3g18190.1 | Os08g0556000 | ۵۵ | ۶۰ |
| IP1549 | 1549 | Bradi3g22330.1 | Os08g0345800 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP2792 | 2792 | Bradi3g16187.1 | – | ۵۸ | ۳۰ |
| IP8097 | 8097 | Bradi1g45620.1 | Os08g0180300 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP5289 | 5289 | Bradi3g12830.2 | Os12g0641500 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP1578 | 1578 | Bradi3g10620.1 | Os02g0290500 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP2924 | 2924 | Bradi3g42030.1 | Os08g0545200 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP3232 | 3232 | Bradi1g36700.1 | Os06g0602600 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP16970S1 | 16970 | Bradi1g37250.1 | Os06g0588900 | ۵۸ | ۳۰ |
| CAPS2722 | 2722 | Bradi3g14000.1 | Os08g0120500 | ۵۷ | ۶۰ |
| CAPSK04439 | 7916 | – | – | ۵۵ | ۶۰ |
| CAPSK09406 | 19528 | Bradi3g12960.1 | – | ۵۵ | ۶۰ |
| CAPS22604 | 22604 | Bradi1g37977.1 | Os06g0556200 | ۵۵ | ۶۰ |
| CAPS7251 | 7251 | Bradi1g41947.1 | – | ۵۵ | ۶۰ |
| IP43684 | 43684 | Bradi3g41920.1 | Os08g0543600 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP10869 | 10869 | Bradi3g41830.1 | Os08g0541500 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP15403 | 15403 | Bradi3g41600.5 | Os08g0538600 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP1108 | 1108 | Bradi3g41480.3 | Os08g0536000 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP15320 | 15320 | Bradi3g18820.1 | Os12g0152700 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP22253 | 22253 | Bradi3g17040.1 | Os08g0152800 | ۵۸ | ۳۰ |
| CAPS1238_7H | 1238 | Bradi3g16240.1 | Os08g0162200 | ۵۵ | ۶۰ |
| IP4460 | 4460 | Bradi3g14090.1 | Os08g0122000 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP15055 | 15055 | Bradi3g13800.1 | Os08g0117300 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP22967 | 22967 | Bradi3g13330.1 | Os08g0109100 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP1243_7H | – | – | Os08g0161800 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP948 | 948 | Bradi1g36830.1 | Os06g0600100 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP1674 | 1674 | Bradi1g37582.1 | Os06g0568200 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP4589 | 4589 | Bradi1g37630.1 | Os06g0567000 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP3731 | 3731 | Bradi1g35780.1 | Os06g0354700 | ۵۸ | ۳۰ |
| IP4850 | 4850 | Bradi3g43020.1 | Os08g0560500 | ۵۸ | ۳۰ |

*نشانگرهایی که به ترتیب با CAPS وIP معرفی شده اند با استفاده از روش‌های CAPS و Pyrosequencing به نشانگرهای مبتنی برPCR تبدیل شده اند.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

گام نخست وضروری 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 می‌باشد. 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 اشباع نقشه های پیوستگی نشانگری، همسانه سازی بر اساس نقشه و برنامه های اصلاح به کمک نشانگر بوده است. با این وجود دستاورد 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 گزارش‌های اندکی در رابطه با وجود هم‌راستایی و تشابهات ژنومی برای نواحی بزرگ کروموزومی بین برنج و جو منتشر شده است، ولی برخی از محققین از جمله Caldwell et al. (2004) و Brunner et al. (2003) به وجود هم‌راستایی بزرگ (Macro-colinearity) بین نشانگرها و ژن‌ها در گونه‌های مختلف برای فواصل بزرگ کروموزومی نیز اشاره نموده‌اند. در این گزارش‌ها وجود هم‌راستایی بین ۵ نشانگر در فاصله بزرگ ۵۰ سانتی‌مورگان روی نقشه های کروموزوم از یک گونه با گونه دیگر به "هم‌راستایی بزرگ" تعبیر شده است. هم‌راستایی بزرگی بین نشانگرهای نقشه‌یابی شده واقع بر کل کروموزوم‌های یک برنج و کروموزوم ۳H جو گزارش شده است (Smilde et al. 2001). وجود توالی‌های DNA تکراری در ژنوم جو به دلیل کراسینگ اورهای نابرابر و جفت شدگی‌های اشتباهی به هنگام همانند سازی DNA است (Saghai Maroof et al. 1996). بنابراین اگرچه وجود توالی‌های DNA تکراری منجر به افزایش ۱۴ برابری ژنوم جو در مقایسه با برنج شده است، ولی به‌دلیل اینکه در طی مراحل تکامل این توالی‌ها بیشتر در نواحی تلومری و سانترومری کروموزوم‌های جو مستقر شده‌اند امکان از بین رفتن هم‌راستایی بین ژن‌ها و نشانگرها در فواصل بزرگ کروموزومی کاهش یافته است. وجود درجه بالایی از ریزتشابهات ژنومی و همراستایی در ناحیه ای حدود یک Mb از بازوی بلند کروموزوم ۳ برنج و ۸/۲ سانتی‌مورگان بین نشانگرهای AV933435 و BJ460446 واقع در ناحیه تلومری بازوی کوتاه کروموزوم ۴H جو در ناحیه ژن سنبله حد واسط (*int-c*) توسط (Shahinnia et al. 2009) گزارش شده است. همچنین گزینش ۵۴ نشانگر EST از همسانه های cDNA بازوی کوتاه کروموزوم ۲H جو در فاصله حدود سه Mb از نقشه فیزیکی بازوی بلند کروموزوم ۷ برنج منجر به نقشه‌یابی ۳۰ نشانگر در ناحیه ژن مقاومت به زنگ برگ (*Rph16*) در جو گردید (Perovic et al. 2004). Mammadov et al. (2005) با استفاده از ریزتشابهات ژنومی موجود بین بازوهای کوتاه کروموزوم‌های 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 اشباع نمایند. درجه بالایی از ریز تشابهات ژنومی و همراستایی در فاصله‌ای کمتر از یک سانتی مورگان و لنگرگاه ژن مقاومت به زنگ ساقه (*Rpg1*) در ناحیه تلومری بازوی کوتاه کروموزوم‌های ۷H و ۶ برنج نیز توسط Kilian et al. (1995) اشاره شده است. از جمله عوامل موفقیت در استفاده از تئوری تشابهات ژنومی برای اشباع نقشه پیوستگی مولکولی، طراحی آغازگر مناسب برای توالی نشانگرهاست. علت اصلی تشابهات ژنومی و هم‌راستایی ژن‌ها و نشانگرهای مولکولی بین گونه‌های 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 جفت باز برای آغازگر، دمای ذوب (Tm) بین ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد، محتوای G/C بیش از ۵۰ درصد در توالی، عدم وجود ساختمان ثانویه 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 می‌شوند. در صورتی‌که امکان طراحی آغازگر و رعایت این معیارها در مناطق کد شده وجود نداشته نباشد و آغازگر طراحی شده با مناطق



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

غیرکد شده ژنوم جفت شدگی داشته باشد احتمال تکثیر توالی به روش PCR اندک و گاها میسر نخواهد شد. به همین علت به منظور افزایش کارایی آغازگرهای طراحی شده در مطالعات نقشه‌یابی مقایسه‌ای بهتر است در صورت امکان این آغازگرها در نواحی حفاظت شده نظیر مناطق مرتبط با توالی‌های EST-SSR طراحی گردند.

در این پژوهش استفاده از نشانگرهای EST و تبدیل آنها به نشانگر CAPS امکان اشباع نقشه پیوستگی مولکولی در ناحیه مورد مطالعه را به خوبی فراهم نمود. در اشباع نقشه‌های پیوستگی مولکولی خصوصاً در نواحی کوچکتر از یک سانتی مورگان تنها یک روش دیگر یعنی استفاده از نشانگر AFLP به همراه تکنیک BSA از کارایی بالایی برخوردار است (Perovic et al. 2004)، ولی عدم اطلاع از جایگاه ژنی این نشانگرهای غیراختصاصی و نامعلوم بودن جایگاه کروموزومی آنها، بارز بودن نشانگرهای AFLP و عدم امکان تشخیص افراد هتروزیگوت از هموزیگوت، پیچیدگی مراحل انجام آزمایش و نیاز به مواد رادیواکتیو و غیره از جمله معایب عمده این روش می‌باشد. در حالی‌که نشانگرهای CAPS به‌دلیل عدم نیاز به کاوشگر و مواد رادیواکتیو، نیاز به مقدار کم DNA ، اختصاصی بودن با قدرت تکرار پذیری و قابلیت اعتماد فوق‌العاده برای رتبه دهی آسان و هم‌بارز بودن آنها جهت تفکیک دقیق نوارهای هتروزیگوت از هموزیگوت و شبیه والدین در مقایسه با نشانگرهای AFLP از اهمیت خاصی در تحقیقات اخیر برخوردارند. در صورتیکه امکان استفاده از روش CAPS بدلیل عدم وجود مکان برش آنزیمی مناسب وجود نداشته باشد می توان از هر یک از روشهای موجود در توالی یابی نظیر Pyrosequencing جهت تعیین ژنوتیپ افراد جمعیت بهره برد. نتایج نشان دادند که موفقیت گزینش نشانگرهای EST و استفاده از آنها در نقشه‌یابی مقایسه‌ای منوط به کیفیت، کمیت و صحت منابع اطلاعاتی مرتبط با پروژه‌های توالی‌یابی در بانک‌های اطلاعاتی است. در صورتی‌که توالی یابی در ناحیه هدف برای گونه‌ای با تشابهات ژنومی تکمیل نشده باشد و همچنین این نواحی ضمن تکامل از گونه ارتولوگ حذف شده و به هر علتی بیان ژنتیکی نداشته باشند، تظاهری در یک EST نشان نمی‌دهند و نمی توان از این روش در نقشه‌یابی مقایسه‌ای استفاده نمود. دو معیار مهم مقدار $e\text{-value} \leq e^{-5}$ برای میزان همولوژی یا شباهت یک توالی مشابه بین جو و برنج و وجود بالاترین میزان انطباق ناحیه هدف با ناحیه متشابه در گونه ارتولوگ به‌عنوان معیارهای افزاینده کارایی EST های گزینش شده در مطالعات نقشه‌یابی مقایسه‌ای عنوان شده است (Perovic et al. 2004). استفاده از اطلاعات مرتبط با پروژه توالی‌یابی ژنوم برنج در بانک dna و ترنسکریپتوم جو (Stein et al. 2007) در بانک‌های TIGR و NCBI کمکی مؤثر در گزینش نشاگرهای EST خواهد بود (Galperin et al. 2002).

از ژنومیکس مقایسه‌ای می توان به عنوان ابزاری مناسب برای مطالعه نحوه تکامل ژن‌های خویشاوند، اساس سازگاری مولکولی و میزان جهش های مخرب نیز بهره برد. این روش امکان شناسایی توالیهای ترجمه نشده ژنوم و اطلاعات مهمی در مورد عوامل تنظیم کننده ژنی را فراهم می‌سازد. علاوه بر این از مقایسه نواحی حفاظت شده بین گونه‌ای و بررسی میزان اثر انتخاب طبیعی بر DNA غیرکد شونده می‌توان حتی نواحی پروموتوری و نواحی حفاظت شده نسخه‌برداری نشده در ژنوم را مورد شناسایی قرار داد. در نهایت لازم است نقش فرایندهای عمده که منجر به تغییرات ژنومی می‌گردند از قبیل برگشتگی، مضاعف شدگی، کمبود، جابه‌جایی‌های متقابل، ادغام ژنی، کراسینگ آورهای نابرابر، نوترکیبی، تبدیل ژنی و تنوع تکاملی را در ژنومیکس مقایسه‌ای از نظر دور نداشت (Mitchelloldz and Clauss 2002).

تشکر و قدردانی

کلیه هزینه انجام این آزمایش بعنوان بخشی از پروژه فوق دکتری نویسنده 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.



[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]

## 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 microcollinearity 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 Physioogy 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 282: 656-659.

Galperin MY (2005) The molecular biology database collection: 2005 update. Nucleic Asids 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 Asids 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, Fronckowiak J, Waugh R, Morgante M, Stein N (2012). High resolution mapping of the gene dense spike (dsp1) to the genetic centromer 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 Biolology 32: 564-567.

Shahinnia F, Sayed-Tabatabaei BE, Pourkheirandish M, Sato K, Komatsuda T (2009) Mapping of QTL for intermedium 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.




[ Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-01-08 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.11.2 ]