مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۳، شماره ۳، ۱۳۹۱ (۵۰۶-۵۰۱)

شناسایی قطعات کروموزومی 1RS چاودار در جنس *Aegilops* با استفاده از نشانگر مولکولی اختصاصی DNA

سیوان احمدی[1*] و محمدرضا نقوی[2]
۱، ۲، دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۳- تاریخ تصویب: ۹۱/۵/۳)

چکیده

چاودار به عنوان یک منبع ژنتیکی خارجی توسط اصلاح گرها به وفور در افزایش تنوع ژنتیکی گندم استفاده شده است، و کروموزوم 1R و بخصوص بازوی کوتاه آن 1RS به فراوانی به ژنوم گندم انتقال داده شده است. در مطالعات 1RS و انتخاب موثر از تکنیک‌های سیتوژنتیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای DNA استفاده می‌شود. در این مطالعه وجود قطعات کروموزومی چاودار در بعضی از گونه‌های خانواده گندمیان با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی 1RS ($RyeR_3/F_3$) بررسی شده است. برای این منظور، از چاودار، گندم نان و تعدادی از گونه‌های جنس *Aegilops*، DNA ژنومی استخراج و واکنش زنجیره ای پلیمراز با کمک آنزیم TaKaRa Ex Taq™ انجام گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که توالی تکثیری مورد انتظار مربوط به رتروترانسپوزون‌های gypsy-like با طول ۱۴۵۱$_{bp}$ در DNA ژنومی گونه‌های چاودار، گندم نان، *Ae. biuncialis*، *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica*، *Ae. kotschyi*، *Ae. speltoides* و *Ae. taushii* بر روی ژل آگارز مشاهده و صحت باندها با کمک داده‌های حاصل از توالی‌یابی تائید گردید. با رسم درخت فیلوژنتیکی، گندم نان و چاودار در یک کلاستر و همچنین *Ae. crassa*، *Ae. taushii*، *Ae. speltoides*، *Ae. cylindrica* و *Ae. biuncialis* در کلاستر دیگری قرار گرفتند و *Ae. kotschyi* بیشترین فاصله ژنتیکی را از گندم و چاودار از نظر توالی رتروترانسپوزونی مورد بررسی داشت. این نتایج نشان می‌دهد که این توالی خاص رتروترانسپوزونی در ژنوم بسیاری از گونه‌های خانواده گندمیان وجود دارد.

واژه های کلیدی: جفت آغازگر اختصاصی $RyeR_3/F_3$، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز،

مقدمه

اصلاحگران منابع ژنتیکی خارجی را در افزایش تنوع ژنومی به فراوانی استفاده می‌کنند. چاودار (*Secale cereale* L.) به وفور در افزایش تنوع در برنامه‌های اصلاحی گندم (*Triticum aestivum* L.) استفاده می‌شود (Gustafson, 1983; Yediay & Lukaszewski et al., 2010). قطعات کروموزومی چاودار حاوی ژن‌هایی است که به‌طور گسترده‌ای به داخل ژنوم گندم از طریق تولید لاین‌های جایگزین و ترانسلوکاسیون معرفی شده‌است (Yediay et al., 2010). موفقیت‌آمیزترین ترانسلوکاسیون گندم-چاودار مربوط به استفاده از کروموزوم یک چاودار 1R می‌باشد (Weng et al., 2007). کروموزوم 1R و بخصوص بازوی کوتاه آن 1RSبسیار به ژنوم گندم وارد شده است (Katto et al., 2004). ترانسلوکاسیون 1RS شامل معرفی بازوی کوتاه کروموزوم یک چاودار (1RS) به داخل بازوی بلند کروموزوم‌های 1A، 1B و 1D و تشکیل فرم‌های 1AL.1RS، 1BL.1RS و 1DL.1RS است (Landjeva et al., 2006). اثرات مثبت ژن‌های موجود در 1RS روی مقاومت به بیماری‌های زنگ ساقه

* نویسنده مسئول: سیوان احمدی تلفن: ۰۹۳۷۸۰۳۸۶۴۸ E-mail: saywanahmadi@ut.ac.ir

(*Puccinia graminis* Pers)، زنگ نواری (*P. striiformis* Westend)، سفیدک پودری (*Erysiphe graminis* DC)، سن سبز، تنش‌های زنده و غیره زنده، پایداری و افزایش عملکرد محصول گندم است (Sebesta & Wood 1978; Porter Webster 1994; Sebesta et al., 1995; Ehdaie et al., 2003; Quan et al., 2009; Yediay et al., 2010). در مقابل این اثرات مثبت، گیاهان 1BL.1RS ارتفاعی کمتر و تاخیر در گلدهی دارند (McKendry et al., 1996). کیفیت گندم وابسته به خانواده‌های ژنی گلوتنین‌های با وزن مولکولی پایین و گلیادین‌ها می‌باشد که در بازوی کوتاه کروموزوم‌های گروه یک قرار دارند. معرفی 1RS بجای این بازوهای کوتاه منجر به تولید دانه‌های با خصوصیات نانوائی ضعیف‌تر می‌شود (Kumlay et al., 2003). این اثرات منفی بر ژنوم DD شدیدتر از ژنوم BB و AA است (Kumlay et al., 2003). جایگزینی 1R به داخل 1B به صورت خودبخودی در طبیعت صورت گرفته‌است (Katto et al., 2004). اولین بار در دهه ۱۹۳۰ ترانسلوکاسیون خودبخودی 1R به 1B شناسایی و از این نوع ترانسلوکاسیون در تولید رقم 'Aurora' و 'Kavkaz' در روسیه استفاده شد (Sharma et al., 2010; Yediay et al., 2010). در مطالعات 1RS و انتخاب موثر از تکنیک‌های سیتوژنتیکی، بیوشیمیایی و مولکولی استفاده می‌شود (Landjeva et al., 2006). با این حال به کار بردن نشانگرهای DNA روشی سریع، دقیق و آسان در تشخیص قطعات کروموزومی 1RS در پیشینه گندمیان می‌باشد (Landjeva et al., 2006). توسعه روش‌های شناسایی ترانسلوکاسیون‌ها دارای اهمیت ویژه‌ای در کارهای اصلاحی به منظور انتخاب موثر لاین‌های مورد نظر دارد (Weng et al., 2007).

در این مطالعه سعی شده‌است، وجود قطعات کروموزومی چاودار در بعضی از گیاهان تیره گندمیان با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی 1RS بررسی شود و سپس درخت فیلوژنتیکی براساس توالی‌های بدست آمده، رسم گردد. امید بر این است که نتایج این پژوهش بتواند در شناسایی و تائید وجود قطعات کروموزومی 1RS در ژنوم گیاهان خانواده گندمیان موثر باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش، گونه‌های گیاهی مورد بررسی شامل *S. cereale* L.، *T. aestivum L.*، *Aegilops biuncialis*، *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica*، *Ae. columnaris*، *Ae. neglecta*، *Ae. kotschyi*، *Ae. speltoides*، *Ae. taushii* و *Ae. triuncialis* می‌باشد که همگی از بانک ژن، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- گونه‌های گیاهی مورد استفاده در این مطالعه

گونه	تعداد کروموزوم	ژنوم	شماره اکسیشن
***Secale cereale* L.**	**2n=2x=14**	**RR**	-
***Triticum aestivum* L.**	**2n=6x=42**	**AABBDD**	**KC609**
Aegilops biuncialis	**2n=4x=28**	**MMUU**	**TN0632**
Aegilops columnaris	**2n=4x=28**	**MMUU**	**TN1471**
Aegilops crassa	**2n=4x=28**	**DDMM**	**TN0721**
Aegilops cylindrica	**2n=4x=28**	**CCDD**	**50072**
Aegilops kotschyi	**2n=4x=28**	**SSUU**	**TN1009**
Aegilops neglecta	**2n=4x=28**	**MMUU**	**TN0637**
Aegilops speltoides	**2n=2x=14**	**SS**	**TN0770**
Aegilops taushii	**2n=2x=14**	**DD**	**50006**
Aegilops triuncialis	**2n=4x=28**	**CCUU**	**TN2001**

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

نمونه‌های برگی جوان در مرحله گیاهچه‌ای جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی از ۱۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم وزن تازه برگ توسط روش CTAB استخراج و به عنوان DNA الگو در PCR مورد استفاده قرارگرفت (Saghai-Maroof et al., 1984). جفت آغازگر اختصاصی ($RyeR_3/F_3$) برای

شناسایی و تکثیر قطعات کروموزومی چاودار انتخاب شده توسط Katto et al (2004) طراحی گردیده‌است (جدول ۲).

جدول ۲- توالی جفت آغازگر مورد استفاده در این مطالعه

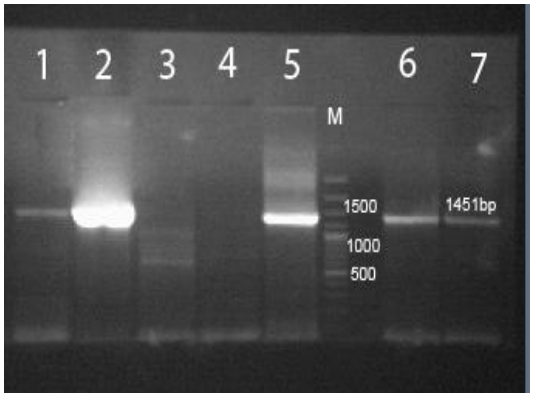
توالی آغازگر	آغازگر $RyeR_3/F_3$
5'-GATCGCCTCTTTTGCCAAGA-3'	آغازگر مستقیم
5'-TCACTGATCACAAGAGCTTG-3'	آغازگر معکوس

تکثیر PCR در واکنش‌های زنجیره‌ای به حجم ۱۵µl که حاوی $MgCl_2$ ۱/۲ mM، dNTP ۰/۱ mM، µl ۱/۵ بافر PCR، pmol ۱۰ از هر آغازگر، ۱U آنزیم TaKaRa Ex Taq™ و ng ۱۵۰ DNA الگو بود، اجرا گردید. PCR تحت شرایط دمایی °C ۹۵ برای واسرشت‌سازی ابتدایی، به دنبال آن ۳۵ چرخه دمای °C ۹۴ برای ۶۰ ثانیه، °C ۵۵/۴ برای ۶۰ ثانیه و °C ۷۲ برای ۳ دقیقه و در نهایت دمای °C ۷۲ برای توسعه پایانی به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر 1X TAE تفکیک و برای مشاهده باندها در ژل از اتیدیوم بروماید و لامپ UV استفاده شد.خالص سازی باندها توسط تکنیک Glass Milk, Patterson, PNAS 76:615 (1979) انجام شد و توالی‌یابی قطعات تکثیری با همکاری شرکت سیک لب (Sequence Laboratories, Göttingen, Germany) اجرا گردید. برای تشخیص توالی تکثیری، از نرم افزار تحت شبکه BLASTN (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) استفاده شد.رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Clustal W version 1.83 و نرم افزار Mega Version 4.0 انجام شد.

نتایج و بحث

بوسیله برنامه دستورالعمل گرادیانت در دستگاه ترموسیکلر، دمای مناسب تکثیر قطعات °C ۵۵/۴ تعیین شد. در دماهای پایین‌تر تعداد زیادی باند غیراختصاصی مشاهده شد. تشابه بالای بعضی از ژن‌ها در گندمیان را می توان دلیل این پدیده دانست. برای مثال ژن‌های *sec*-1 و ω-گلیادین بیشتر از ۸۰٪ همولوژی دارند (Weng et al., 2007). طول قطعه تکثیر شده ۱۴۵۱bp و توالی مربوط به رتروترانسپوزون *gypsy*-like می‌باشد.

جفت آغازگر $RyeR_3/F_3$ در گونه‌های چاودار، گندم نان، *Ae. biuncialis*، *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica*، *Ae. kotschyi*، *Ae. speltoides* و *Ae. taushii* تکثیر و باند مورد انتظار دیده‌شد ولی باند bp ۱۴۵۱ در گونه‌های *Ae. columnaris*، *Ae. neglecta* و *Ae. triuncialis* مشاهده نگردید (شکل ۱). صحت باندهای تکثیر شده این توالی bp ۱۴۵۱ در ژنوم گندم و گونه‌های ذکر شده *Aegilops* با استفاده از توالی‌یابی و نرم افزار تحت شبکه‌ای BLASTN تائید شد (جدول ۳) E-value توالی‌های همه گونه‌ها دارای ارقام اعشاری بسیار پایینی هستند و این نتایج پیشنهاد می‌دهد که توالی مربوط به رتروترانسپوزون *gypsy*-like، در بسیاری از گندمیان به فراوانی یافت می‌شود.



شکل ۱- ژل آگارز ۱٪ با استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، حاوی باندهای حاصل از به‌کارگیری جفت آغازگر $RyeR_3/F_3$ در تکثیر PCR با استفاده از DNA تعدادی از گونه‌های گیاهی جنس *Aegilops* مورد ارزیابی به ترتیب: ۱ (*Ae. speltoides*)، ۲ (*Secale cereale*)، ۳ (*Ae. neglecta*)، ۴ (*Ae. columnaris*)، ۵ (*Ae. biuncialis*)، ۶ (*Ae. triuncialis*)، M (نشانگر اندازه)، ۷ (*Triticum aestivum*) و ۸ (*Ae. kotschyi*). اندازه باندهای نشانگر اندازه M از بالا به پایین بر حسب bp بترتیب به قرار زیر می‌باشد (۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۲۰۰، باند روشن ۱۰۰۰، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، باند روشن ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰).

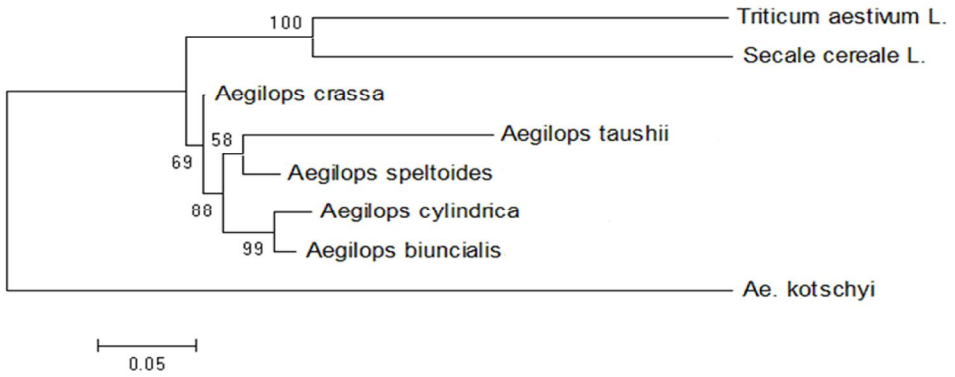
جدول ۳- توالی‌های رتروترانسپوزونی ثبت شده در پایگاه‌های اطلاعاتی با بیشترین تشابه همولوژی برای توالی‌های تکثیری گونه‌های مورد بررسی

گونه توالی یابی شده	اکسیشن	امتیاز کلی (Total score)	پوشش‌دهی (Query coverage)	E-value	حداکثر تطابق (Max ident)
Secale cereale L.	GU318209.1	۴۶۰	٪۲۳	۹e-۱۲۶	٪۹۲
Triticum aestivum L.	GU318209.1	۶۶۲	٪۵۲	۰/۰	٪۸۴
Aegilops biuncialis	GU318139.1	۱۳۸۲	٪۹۸	۰/۰	٪۸۵
Aegilops crassa	GU318213.1	۱۴۸۵	٪۹۹	۰/۰	٪۸۷
Aegilops cylindrica	GU318196.1	۱۱۴۰	٪۹۸	۰/۰	٪۸۲
Aegilops kotschyi	GU318158.1	۲۳۸	٪۲۰	۲e-۱۹	٪۹۱
Aegilops speltoides	GU318209.1	۱۷۰۹	٪۹۹	۰/۰	٪۹۰
Aegilops taushii	GU318191.1	۱۶۳۹	٪۹۸	۰/۰	٪۸۹

با رسم درخت فیلوژنتیکی، گندم نان و چاودار در کلاستر یک قرار گرفته‌اند. همچنین در کلاستر دوم *Ae. crassa*، *Ae. taushii*، *Ae. speltoides*، *Ae. cylindrica* و *Ae. biuncialis* قرار دارند. در کلاستر دوم *Ae. taushii*، *Ae. speltoides* در یک زیرکلاستر و *Ae. cylindrica* و *Ae. biuncialis* زیرکلاستر دیگری را تشکیل می‌دهند. *Ae. kotschyi* بیشترین فاصله ژنتیکی را از گندم یا چاودار از نظر توالی رتروترانسپوزونی مورد بررسی دارد (شکل ۲).

نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی تفاوت بین توالی در دو گونه *T. aestivum* و *Ae. taushii* را نشان می دهد. از طرف دیگر گونه های *Ae. crassa*، *Ae. taushii* و *Ae. cylindrica* با داشتن ژنوم DD در یک گروه قرار گرفتند که می‌تواند نشان دهنده اشتراکات رتروترانسپوزونی بین ژنوم‌های DD این گونه‌ها باشد. این نتایج با نتایج محققین دیگر بر اساس مکان های SSR گونه‌های مختلف آجیلوپس همخوانی ندارد (Naghavi et al., 2009; Dvorak et al., 1998). احتمالا دلیل عدم تطابق به این دلیل است که نتایج بدست آمده از درخت فیلوژنتیکی تنها براساس یک توالی مشخص است لذا نمی توان آن را برای رابطه دوری و نزدیکی کلی گونه‌ها تعمیم داد. پس نتیجه رسم درخت فیلوژنتیکی هر ژن می‌تواند متفاوت از دیگری باشد. به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی کاملتر این گونه‌ها نیاز به توالی کل یا نواحی مهم ژنومی است تا بتوان با اطمینان بیشتری در مورد آن بحث کرد.

شکل ۲- درخت ژنتیکی حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی داده‌های توالی‌یابی تکثیر PCR با استفاده از جفت آغازگر $RyeR_3/F_3$



جابجایی گندم-چاودار دارای 1RS موفق‌ترین استفاده از منابع بیگانه برای اصلاح گندم است. آنالیز DNA برپایه PCR یکی از روش‌های اصلی جهت شناسایی این جابجایی‌ها می‌باشد. در طی سالیان اخیر

چندین نشانگر DNA برای کروموزوم 1RS طراحی و در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده شده است. در این مطالعه به شناسایی قطعات کروموزومی چاودار در تعدادی از گونه‌های جنس *Aegilops* پرداخته شده‌است. Landjeva et al (2006) پراکنش ترانسلوکاسیون گندم-چاودار را در ۳۱ واریته بلغاری بوسیله آغازگرهای RyeR3/F3 نشان دادند. Yediay et al. (2010)وجود قطعات کروموزومی چاودار را در ارقام مختلف گندم نان ترکیه با کمک همین جفت آغازگر تائید نمودند ولی ارقام گندم دوروم (*T. durum* Desf) فاقد هرگونه قطعه کروموزومی 1RS بودند. نتایج حاصل با کارهای Katto et al. (2004)، Landjeva et al. (2006)، Weng et al. (2007) و Yediay et al. (2010) در یک راستا، مطابق و سازگار است.

گندم توانایی تلاقی با چاودار و همچنین تعداد زیادی از گونه‌های جنس *Aegilops* را دارد. گندم می‌تواند به‌عنوان پلی بین این گونه‌ها، نقش ایفا کند. در گونه‌های مورد بررسی تنها چاودار و *Ae. speltoides* دگرگرده‌افشان می‌باشند. گونه‌های جنس *Aegilops* اجداد گندم را تشکیل می‌دهند و گزارش‌های زیادی وجود دارد که این گیاهان توانایی تلاقی با گندم را دارا هستند. تعداد کپی‌های این رتروترانسپوزون در ژنوم‌های بررسی مشخص نیست اما در نواحی تلومری تمرکز بیشتری دارند (Katto et al., 2004). رتروترانسپوزون‌ها در سلسله گیاهان توسعه زیادی یافته‌اند. مهم‌ترین نواحی رتروترانسپوزون‌های *gypsy*-like، توالی‌های رمزکننده برای ژن های رونوشت‌بردار معکوس (Reverse transcriptase)، آنزیم Integrase، آنزیم ریبونوکلئاز H (RNase H)، توالی‌های تکراری انتهایی (Long terminal repeat)، جایگاه اتصال آغازگر (Primer-binding site)، ناحیه غنی از پورین (Poly purine tract) می‌باشد (Kovalchuk et al., 2005). این پژوهش می‌تواند در توسعه سیستم های موثر جهش‌زائی تصادفی *in vivo* مورد استفاده قرار گیرد.

REFERENCES

1. Dvorak, J., Luo, M. C., Yang, Z. L. & Zhang, H. B. (1998). The structure of the *Aegilops taushii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet*, 97, 657-670.
2. Ehdaie, B., Whitkus, R. W. & Waines, J. G. (2003). Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat–rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. *Crop Science*, 43, 710-717.
3. Katto, M. C., Endo, T. R. & Nasuda, S. (2004). A PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background. *Genes & Genetic Systems*, 79, 245-250.
4. Kovalchuk, A., Senam, S., Mauersberger, S. & Barth, G. (2005). Tyl6, a novel Ty3/*gypsy*-like retrotransposon in the genome of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*; 22, 979–991.
5. Kumlay, A. M., Baenziger, P. S., Gill, K. S., Shelton, D. R., Graybosch, R. A., Lukaszewski, A. J. & Wesenberg, D.M. (2003). Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat. *Crop Science*, 43, 1643-1651.
6. Landjeva, S., Korzun, V., Tsanev, V., Vladova, R. & Ganeva, G. (2006). Distribution of the wheat–rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria. *Plant Breeding*; 125, 102-104.
7. Lukaszewski, A. J. & Gustafson, J. P. (1983). Translocations and modifications of chromosomes in triticale 9 wheat hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 64, 239–248.
8. McKendry, A. L., Tague, D. N., Finny, P. L. & Miskin, K. E. (1996). Effect of 1BL.1RS on milling and baking quality of soft red winter wheat. *Crop Science*, 36, 848–851.
9. 9. Naghavi, M. R., Aghaei, M. J., Taleei, A. R., Omidi, M., Mozafari, J. & Hassani, M. E. (2009). Genetic diversity of the D-genome in *T. aestivum* and *Aegilops* species using SSR markers. *Genet Resour Crop Evol*, 56, 499-506.
10. Porter, D. R. & Webster, J. A. (1994). Inheritance of greenbug biotype G resistance in wheat. *Crop Science*; 34, 625–628.
11. Quan, F. T., Lan, S.F., Xiang, Z. T., Long, Z. R. & Qiong, H. Z. (2009). Genetic variation of 1RS arm between sibling wheat lines containing 1BL.1RS translocation. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1(5), 204-209.
12. Saghai-Maroof, M. A., Soilman, K. M., Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Men-delian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Nat Acad Sci USA*, 81, 8014-8.

13. Sebesta, E. E. & Wood, E. A. Jr. (1978). Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays. *Agron Abstr Am Soc Agron*, 61–62.
14. Sebesta, E. E., Wood, E. A. Jr., Porter, D. R., Webster, J. A. & Smith, E. L. (1995). Registration of amigo wheat germplasm resistant to greenbug. *Crop Science*, 34, 293.
15. Sharma, S., DeMason, D. A., Ehdaie, B., Lukaszewski, A. J. & Waines, J. G. (2010). Dosage effect of the short arm of chromosome 1 of rye on root morphology and anatomy in bread wheat. *Journal of Experimental Botany*, 1, 11.
16. Weng, Y., Azhaguvel, P., Devkota, R. N. & Rudd, J. C. (2007). PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat–rye translocations in wheat background. *Plant Breeding*, 126, 482-486.
17. 17. Yediay, F. E., Baloch, F. S., Kilian, B. & Ozkan, H. (2010). Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. *Genetic Resources & Crop Evolution*, 57, 119-129.