

مکان یابی یک ژن ABC-Transporter مرتبط با بیماری اسکالد جو
(*Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis) با استفاده از یک نشانگر CAPS
Mapping of an ABC-Transporter gene associated with barley scald disease
(*Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis) using a CAPS marker

علی اعلمی^۱، کلاس اولدچ^۲، هوشنگ علیزاده^۳، منصور امیدی^۴، محمدرضا بی همتا^۵،
علی اکبر بوشهری^۶ و کری ویلزمور^۷

چکیده

اعلمی، ع.، ک. اولدچ، ه. علیزاده، م. امیدی، م. بی همتا، ع. ا. بوشهری و ک. ویلزمور. ۱۳۸۶. مکان یابی یک ژن ABC-Transporter مرتبط با بیماری اسکالد جو (*Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis) با استفاده از یک نشانگر CAPS. مجله علوم زراعی ایران. ۹ (۲): ۱۶۸-۱۵۷

خانواده بزرگ پروتئین های ABC-Transporter به عنوان یک پل ارتباطی در غشاهای سلولی همه موجودات زنده یافت می شوند. این پروتئین ها مسئول تبادل مواد گوناگون از جمله متابولیت های دخیل در مکانیسم های دفاعی گیاهان می باشند. در این تحقیق، جهت مکان یابی یک ژن ABC-Transporter اختصاصی در برهمکنش سازگار و ناسازگار با قارچ *R. secalis* عامل بیماری اسکالد جو از SNP ها و نشانگر CAPS استفاده شد. یک قطعه ۲/۲kb حاصل از فراورده PCR با آغازگر های اختصاصی برای ژن مذکور در ۱۰ والد جو توالی یابی شد و پس از همردیفی برای کشف SNP ها مورد استفاده قرار گرفت. در میان SNP های مشاهده شده، یک SNP با تفاوت در جایگاه برشی آنزیم *NlaIII* در والدین Chebec و Harrington مشاهده و برای تبدیل به نشانگر CAPS و مکان یابی استفاده شد. نتایج مکان یابی موقعیت این ژن را روی بازوی بزرگ کروموزوم شماره ۳ جو تعیین کرد. همچنین نتیجه بررسی همولوژی در این ناحیه از کروموزوم نیز همچون مطالعات قبلی نشاندهنده وجود Synteny بالا برای کروموزوم شماره ۳ جو با کروموزوم شماره ۱ برنج بود.

واژه های کلیدی: مکان یابی ژن، ABC-Transporter، SNP، CAPS، *NlaIII*، Synteny، اسکالد.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۴/۲۵

- ۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه تهران (مکاتبه کننده)
- ۲- محقق ارشد مؤسسه تحقیقات و توسعه جنوب استرالیا
- ۳- استادیار، دانشکده علوم زراعی و دامی، دانشگاه تهران
- ۴ و ۶- دانشیار، دانشکده علوم زراعی و دامی، دانشگاه تهران
- ۵- استاد، دانشکده علوم زراعی و دامی، دانشگاه تهران
- ۷- کارشناس تحقیقات مؤسسه تحقیقات و توسعه جنوب استرالیا

مقدمه

سلول‌ها بوسیله غشاهایی که آنها را از محیط پیرامون خود جدا می‌کنند احاطه شده‌اند. از آنجاییکه حیات بدون تبادل مواد و اطلاعات ژنتیکی غیرممکن است در طی تکامل موجودات زنده، سیستم‌هایی برای تبادل مواد تعبیه شده‌اند که از جمله این سیستم‌ها می‌توان به خانواده بزرگ پروتئین‌های ABC-T (ATP-Binding Cassette Transporter) اشاره نمود که به عنوان یک پل ارتباطی در غشای سلولی همه موجودات زنده یافت می‌شوند و قادرند طیف وسیعی از مواد و متابولیت‌ها را در بین غشاها مبادله نمایند. این پروتئین‌ها دارای دو عنصر ساختاری شامل یک ناحیه آبگریز بین غشایی TMD (Trans-Membrance Domain) با ۶ مارپیچ آلفا (α -helix) و یک ناحیه آبدوست اتصال نوکلئوتیدی NBD (Nucleotide Binding Domain) با ۳ موتیف حفاظت شده Walker A و Walker B و ABC Signature می‌باشند. همه پروتئین‌های ABC-T براساس ساختار و ترتیب دو عنصر TMD و NBD به سه زیر خانواده به شرح زیر تقسیم بندی می‌شوند (Jasinski et al., 2003; Stukkens et al., 2005):

Pleiotropic Drug Resistance (PDR)

Multi-Drug Resistance (MDR)

Multi-Drug Resistance-associated Proteins (MRP)

تا کنون ۱۳۱ پروتئین ABC-T در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و ۵۴ پروتئین در برنج شناسایی شده‌اند که این تعداد زیاد نشاندهنده تنوع زیاد ترکیبات و متابولیت‌هایی است که بایستی در بین غشاهای سلولی رد و بدل شوند (Fernandez et al., 2001).

مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین‌های ABC-T گیاهی در تبادل متابولیت‌های ثانویه همچون آلکالوئیدها، ترپانوییدها، فنل‌ها و موم‌ها دخیل می‌باشند که عمدتاً این متابولیت‌ها نقش مهمی در

حفاظت گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا دارند (Yazaki, 2006). به عنوان نمونه، ژن CER5 در آرابیدوپسیس یک پروتئین ABC-T که مسئول انتقال موم به سطح کوتیکول می‌باشد، را رمز می‌کند. گسترش موم در سطح کوتیکول می‌تواند همچون سدی در برابر حمله پاتوژنها مؤثر باشد (Pighin et al., 2004). ژن NpABC1 یک پروتئین ABC-T در گیاه توتون را رمز می‌کند که نوعی ترپانویید (یک نوع متابولیت ثانویه که بعنوان ترکیبات سمی در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف عمل می‌کنند) ضد قارچی را به فضای بین سلولی ترشح می‌کند (Jasinski et al., 2001).

تاکنون گزارش‌های متعددی نیز در رابطه با نقش پروتئین‌های ABC-T تیپ PDR در مسیرهای انتقال پیام مکانیسم‌های دفاعی ارائه شده است. به عنوان مثال، بیان ژن NpPDR1 در گیاه توتون بوسیله الیستورهای (قطعات و یا ترکیباتی از پاتوژن که باعث درک و القای مسیر پیام‌رسانی بیماری مربوطه در میزبان می‌شود) میکروبی القاء شده و از طریق ترشح مواد ضد قارچی در مکانیسم دفاعی گیاه تأثیر می‌گذارد (Sasabe et al., 2002; Stukkens et al., 2005). ژن Gm PDR12 در سویا به وسیله تیمار با سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونیت (ترکیبات و عناصر کلیدی در مکانیسم‌های دفاعی گیاهان) به سرعت بیان می‌شود (Eichhorn et al., 2006). ژن At PDR8 در آرابیدوپسیس در کنترل میزان مرگ سلولی در پاسخ دفاعی گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا دخالت دارد (Kobae et al., 2006).

علیرغم اهمیت ژنهای ABC-T در مکانیسم‌های دفاعی مرتبط با تنش‌های مختلف، تا کنون تعداد اندکی از این ژنها مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند و عملکرد بسیاری از آنها هنوز ناشناخته است، بر همین اساس اخیراً مطالعات در جهت شناخت و درک بیشتر این پروتئین‌ها در گیاهان رو به فزونی می‌باشند

(Jasinski et al., 2003).

مواد و روش ها

در این تحقیق ۱۰ ژنوتیپ جو که به عنوان والدین در تهیه جمعیت های هاپلوئید مضاعف در برنامه ملی به نژادی مولکولی کشور استرالیا مورد استفاده قرار می گیرند، استفاده شد. این ژنوتیپ ها همراه با شجره و تیپ رشدی آنها در جدول ۱ آورده شده اند. آغازگرها براساس یک توالی ۴kb مربوط به یک ناحیه از BAC (Bacterial Artificial Chromosome) شماره ۷ که حامل ژن ABC-T مورد نظر بود، طراحی شد. این BAC قبلاً بوسیله دورگ گیری با یک کاوشگر بدست آمده از نتایج یک آزمایش SSH در خصوص شناسایی ژنهای کاندید در برهمکنش سازگار و ناسازگار قارچ بیماری زای *R. secalis* در کتابخانه ژنومی BAC های جو غربال شده بود. آغازگرها بوسیله نرم افزار Primer3 به شرح زیر طراحی گردید:

BAC 7-1 5AATTGCTAGGTGAGATGCTTGTGGTCC

BAC 7-2 5GCTCTTGATCTTTCCTTGATGTCACC

BAC 7-3 5AATGGGAGTACCATGCCCTTCCTTCTTG

BAC 7-4 5GCCATGATTGGATACACACTGCTCTTCA

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک برابر بافر PCR، ۱/۵ میلی مولال کلرید منیزیم، ۰/۳۳ میلی مول dNTPs، ۰/۳۳ میکرومول از هر آغازگر،

۴٪ DMSO و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Immolys, UK) همراه با ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی به عنوان الگو انجام شد. برنامه حرارتی و زمانبندی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۷ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۱ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه. واکنش PCR با یک بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت.

فرآورده PCR بوسیله کیت شرکت کیاژن

SNP ها شامل تغییرات در سطح یک باز آلی یا درج ها (Insertion) و حذف ها (Deletion) در سطح ژنوم می باشند (Brookes, 1998). این تغییرات معمولاً از طریق توالی یابی آلل ها و یا قطعات DNA و همردیفی (Alignment) آنها باهم و یا با یک توالی مرجع مشخص می شوند (Rostoks et al., 2005). از آنجاکه SNP ها فراوانترین فرم تنوع DNA در سطح ژنوم می باشند بنابراین به عنوان گنجینه ارزشمندی از نشانگرهای ژنتیکی جهت مطالعات مولکولی از قبیل تهیه نقشه ژنتیکی، مکان یابی ژنها، انتخاب به کمک نشانگر و غیره قابل بهره برداری می باشند. این نشانگرها دو آللی با پایداری و فراوانی بالا، نسبتاً ارزان و نسبت به SSR ها از احتمال جهش کمتری برخوردار می باشند (Giordano et al., 1999; Rafalski, 2002). تا کنون چندین روش ارزیابی برای شناسایی SNP ها ارائه شده است (Gut, 2001; Kwok, 2000; Rafalski, 2002; Shi, 2001). اما در میان آنها تبدیل SNP به نشانگر CAPS به عنوان کاراترین، پایدارترین و کم هزینه ترین روش ارزیابی توصیه شده است (Rostoks et al., 2005; Thiel et al., 2004).

این تحقیق براساس نتایج یک پروژه SSH (Suppression Subtractive Hybridization) در خصوص شناسایی ژنهای کاندید با بیان متفاوت در برهمکنش سازگار و ناسازگار قارچ بیماری زای *Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis عامل بیماری اسکالد جو طراحی شده بود. یکی از ژنهای کاندید با بیان بسیار اختصاصی در پاسخ به قارچ مذکور، رمز کننده یک پروتئین ABC-T در گیاه جو می باشد. در تحقیق حاضر هدف مطالعه SNP ها (Single Nucleotide Polymorphisms) در ژن مذکور و تبدیل آنها به نشانگر (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) CAPS برای مکان یابی این ژن بود.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های جو

Table 1- Barley genotypes.

ژنوتیپ Genotype	تپ رشد Growth habit	تعداد ردیف No. of row
Chebece	Spring بهاره	Two rowed
Harrington	Spring بهاره	Two rowed
Clipper	Spring بهاره	Two rowed
Sahara	Spring بهاره	Two rowed
Galleon	Spring بهاره	Two rowed
Sloop	Spring بهاره	Two rowed
Alexis	Spring بهاره	Two rowed
Harana Nijo	Spring بهاره	Two rowed
Frankiln	Spring بهاره	Two rowed
Halcyon	Spring بهاره	Two rowed

۱- تپ رشدی Haruna Nijo مشخص نیست.

<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/links.shtml>
<http://genbank.vurv.cz/barley/pedigree/pedigree.asp>

هضم آنزیمی بر روی ژل آگاروز دو درصد جداسازی شدند.

تجزیه داده های نشانگر CAPS برای ۹۶ لاین هاپلوئید مضاعف جمعیت Chebec و Harrington با داده های موجود ۳۷۲ نشانگر قبلی (Willms et al., 2006) ادغام و با نرم افزار QTX Map Manager (Manly et al., 2001) براساس تابع کوزامبی و مقدار آستانه $P=0.05-0.001$ انجام گرفت. نقشه کروموزومی با استفاده از نرم افزار Map Chart (Voorrips, 2002) تهیه شد.

نتایج و بحث

ابتدا آغازگرهای طراحی شده برای ژن ABC-T جهت بررسی کارایی صحیح در واکنش PCR به دو صورت مجزا و ترکیبی با استفاده از DNA ژنومی ۱۰ والد مذکور آزمون شدند. در این میان در حالت مجزا آغازگرها BAC7-4 و BAC7-3 و در حالت ترکیبی آغازگرهای BAC7-3 و BAC7-1 تولید تک نوار اختصاصی یکسان برای والدین با اندازه مورد انتظار، به ترتیب ۳۷۰ bp و ۲۲۰۰ bp نمودند. از آنجاکه قطعه تکثیر شده توسط آغازگرها بصورت ترکیبی، قطعه

(Min Elute PCR purification, QIAGEN, USA) خالص سازی و سپس جهت توالی یابی به روش Big Dye Terminator در دو جهت با آغازگرهای BAC7-1 و BAC7-3، از کیت Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Bio Systems, USA) استفاده شد.

همردیفی قطعات توالی یابی شده بوسیله نرم افزار Contig Express نسخه ۲ با بررسی کروماتوگرام های مربوطه انجام و SNP ها شناسایی شدند. ۱۰ جفت باز دو طرف توالی SNP برای برش آنزیمی بصورت *In Silico* با نرم افزار NEBcutter2 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) مورد استفاده قرار گرفت. هضم آنزیمی برای تبدیل SNP به نشانگر CAPS با آنزیم *NlaIII* (Biolabs, NEW England) در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر به شرح زیر انجام شد.

۲ میکرولیتر بافر ۱۰X شماره ۴ (NEBuffer4)، تهیه شده بوسیله کمپانی (Biolabs, NEW England)، ۰/۲۵ میکرولیتر BSA (۱۰ میلی گرم / میلی لیتر) ۲/۵۵ میکرولیتر آب، ۰/۲۵ میکرولیتر فراورده PCR به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفتند. نتایج

۳۷۰bp را نیز شامل می شدند، بنابراین فراورده PCR والدین با آغازگرها در حالت ترکیبی به عنوان الگو برای توالی یابی و تعیین SNP ها مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج توالی یابی و همردیفی قطعات با توجه به کروماتوگرام آنها برای فراورده ۲۲۰۰bp مربوط به جفت آغازگر BAC 7-3 و BAC 7-1 تعداد هشت SNP در والدین را نشان داد. از آنجائیکه ممکن است علیرغم مشاهده یک تک نوار مجزا روی ژل آگاروز، بیش از یک الگو در واکنش توالی یابی وارد شده باشد، بنابراین ممکن است تنها حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد داده های توالی یابی شده براساس کروماتوگرام های مربوطه دارای کیفیت بالا و قابل اطمینان باشند (Van et al., 2004). بر این اساس در مطالعه حاضر فراوانی SNP ها با توجه به در نظر گرفتن نواحی توالی یابی شده با کیفیت بالا و قابل اطمینان، یک SNP به ازای هر ۵۹۰bp بود.

SNP ها جزء فراوانترین نوع تنوعات در سطح ژنوم ها می باشند که این فراوانی در نواحی مختلف ژنوم متفاوت می باشد. بطور کلی SNP ها در نواحی غیر رمز کننده (Non-Coding Regions) حداکثر و در نواحی رمز کننده (Coding Regions) حداقل میزان خود می باشند. به همین دلیل در مطالعه SNP ها، طراحی آغازگرها در نواحی غیر رمز کننده مثل 5-UTR یا 3-UTR مجاور EST ها و ژنهای شناخته شده و یا اینترون ها متمرکز می شوند تا امکان تهیه تعداد بیشتری نشانگر بوجود آید. (Rafalski, 2002). از طرف دیگر مطالعه SNP ها در نواحی رمز کننده نیز می توانند ارزشمند باشند در صورتیکه سبب تغییر در فنوتیپ شده، که در این صورت به عنوان یک نشانگر عملکردی قابل استفاده خواهد بود (Van et al., 2004). به عنوان مثال، آنزیم بتا آمیلاز سبب آزادسازی مالتوز از نشاسته آندوسپرم در فرایند تهیه مالت جو می شود. اسجاکستی و رودر (Sjaskste and Roder, 2004) موفق به یافتن یک SNP از نوع C→T شدند که سبب جابجایی اسید

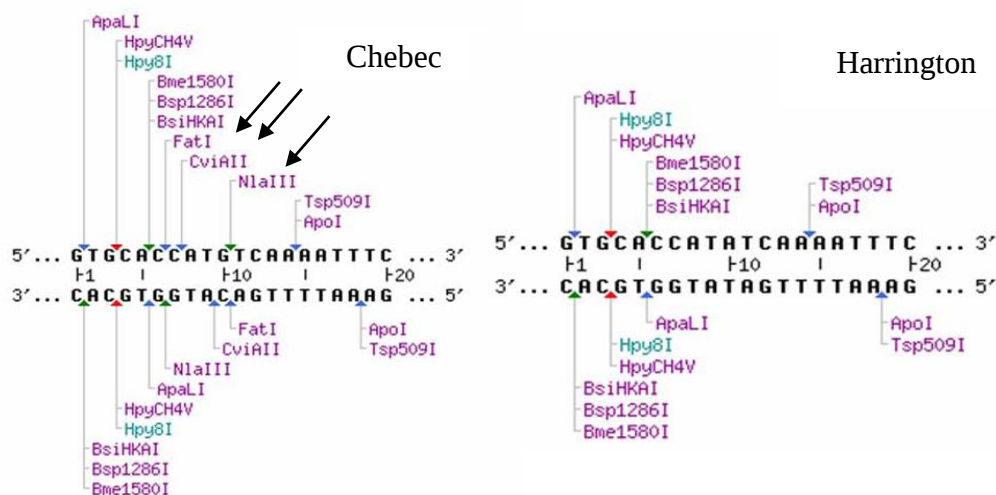
آمینو والین به جای سرین در ساختار پروتئینی و در نتیجه افزایش پایداری این آنزیم در دماهای بالاتر از ۵۵ درجه در فرایند تولید مالت می شود. آنها با تبدیل این SNP به نشانگر CAPS، توزیع و توارث آلل های بتا آمیلاز را در ارقام جو اروپایی مطالعه کردند.

در مطالعه حاضر فراوانی SNP ها نسبت به فراوانی SNP ها در سایر گزارشها کمتر بود. کوتا و همکاران (Kota et al., 2001) فراوانی SNP ها ۱ در هر ۲۴۰ جفت باز در نواحی غیر رمز کننده تعدادی از EST های جو برآورد کردند. روستاکس و همکاران (Rostoks et al., 2005) نیز فراوانی SNP ها را برای ناحیه ۳ تعدادی از ژنهای پاسخگو در تنش های غیر زنده در گیاه جو ۱ به ۲۰۰ جفت باز گزارش نمودند. از آنجائیکه قطعات توالی یابی شده با کیفیت بالا در این تحقیق عمدتاً مربوط به نواحی رمز کننده (اگزون ها) ژن ABC-T بودند، فراوانی بدست آمده برای SNP ها در این ناحیه از ژنوم قابل انتظار بود. ون و همکاران (Van et al., 2004) فراوانی SNP ها را در نواحی رمز کننده، یک SNP به ازای ۳۲۶۰ جفت باز و در نواحی غیر رمز کننده یک SNP به ازای ۲۷۸ جفت باز در گیاه سویا گزارش کردند که نشان می دهد فراوانی SNP ها در نواحی غیر رمز کننده ممکن است تا بیش از ۱۰ برابر نواحی رمز کننده باشد. علاوه بر این ممکن است قطعات مورد بررسی در نواحی NBD پروتئین ABC-T که از حفاظت بالایی برخوردار است، واقع شده باشند که در این صورت احتمال جهش کم خواهد بود (Jasinski et al., 2003).

در میان SNP های مشاهده شده تنها یک SNP با تفاوت در جایگاه برش آنزیمی برای دو ژنوتیپ Chebec و Harrington بدست آمد. در این ناحیه با تعداد ۲۰ نوکلئوتید جایگاه تشخیص تعداد زیادی آنزیم برشی مشاهده شد که در این میان ۳ آنزیم *FatI*، *NlaIII* و *CviAI* بین دو والد متمایز بودند (شکل ۱) و بنابراین می توانند برای تعیین ژنوتیپ SNP موجود و تبدیل آن

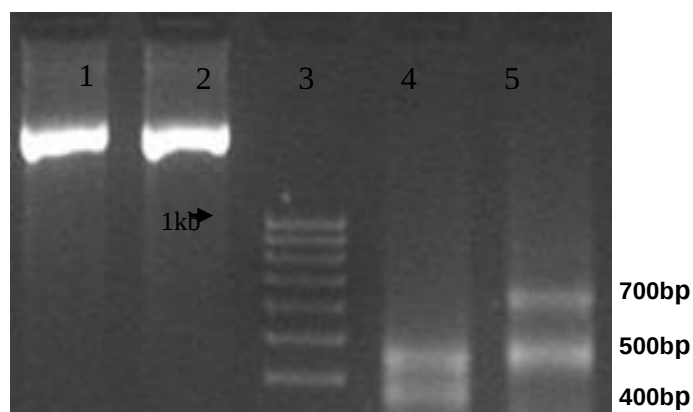
بطوریکه در شکل ۲ مشاهده می شود تفکیک فرآورده ۲۲۰۰ جفت باز حاصل از PCR دو ژنوتیپ جو پس از برش با آنزیم *NlaIII* روی ژل آگاروز تولید دونوار واضح برای هر یک از والدین Chebec و Harrington کرد که نوار ۵۰۰bp بین دو والد مشترک و نوارهای ۷۰۰bp و ۴۰۰bp در آنها متفاوت بودند. از آنجائیکه جایگاه برشی این آنزیم بصورت چهار نوکلئوتیدی می باشد برشهای متعدد دیگری نیز مورد انتظار بود که با وضوح کمتر در قسمت پایین ژل قرار داشتند. وجود تفاوت در نوارهای ۷۰۰bp و ۴۰۰bp در والدین، آنها می توانند به عنوان یک نشانگر CAPS غربال افراد جمعیت حاصل از والدین و مکان یابی ژن ABC-T مورد استفاده قرار گیرد. از آنجائیکه این نشانگر CAPS براساس یک SNP مربوط به ژن ABC-T و برش با آنزیم *NlaIII* توسعه یافته است، *ABC-NlaIII* نام گرفت.

به نشانگر CAPS جهت مکان یابی ژن مورد نظر در جمعیت حاصل از تلاقی والدین مذکور مورد استفاده قرار گیرند. از آنجائیکه آنزیم *NlaIII* نسبت به ۲ آنزیم دیگر عمومی تر و ارزاتر می باشد، بنابراین از این آنزیم برای برش فرآورده PCR استفاده شد. تیل و همکاران (Thiel *et al.*, 2004) نرم افزاری به نام SNP2CAPS را معرفی کردند که با همردیفی توالی ها، جایگاه های چندشکل برشی آنزیم هایی را که می توانند برای آنالیز CAPS مورد استفاده قرار گیرند، شناسایی کند. آنها با استفاده از نرم افزار فوق نشان دادند که بیش از ۹۰٪ نشانگرهای SNP قابلیت تبدیل به نشانگر CAPS را دارا می باشند. اما از آنجائیکه ممکن است بعضی از آنزیم های پیش بینی شده در این نرم افزار نادر و یا گران باشند، تنها با استفاده از ۱۰ آنزیم برشی عمومی و ارزان قیمت همچنان ۳۱٪ از جایگاه های چندشکل قابلیت تبدیل به نشانگر CAPS را دارند.



شکل ۱- جایگاه های برشی آنزیم ها در مجاورت SNP (موقعیت ۱۰) برای Chebec و Harrington

Fig.1 Restriction enzyme sites in flank of SNP (Position 10) for Chebec and Harrington



شکل ۲- هضم فراورده PCR با آنزیم NlaIII، (۱ و ۲ فراورده PCR والدین)، (۳- نشانگر اندازه 1kb)، (۴- Chebec پس از هضم)، (۵- Harrington پس از هضم)

Fig2. Digestion of PCR product by NlaIII, (1 and 2 Parents PCR products), (3- Ladder 1kb), (4- Chebec after digestion), (5- Harrington after digestion)

حفاظت دیواره اولیه و ثانویه سلولی نقش دارد و مطالعات نیز نشان داده که این ژن در مکانیسم های دفاعی گیاه در برابر پاتوژنها دخیل می باشد (Schenk *et al.*, 2000; Zwiegelaar and Dubery 2006). مجاورت این ژن و همچنین کشف چندین QTL مربوط به ژن های مقاومت به بیماری اسکالد و Net blotch روی بازوی بزرگ کروموزوم شماره ۳ (Willsmore *et al.*, 2006) نشان می دهد که ژن های مقاومت و یا دخیل در مکانیسم های دفاعی در برابر پاتوژن ها بصورت خوشه ای در این ناحیه کروموزومی قرار دارد. تاسونی و همکاران (Tacconi *et al.*, 2001) نیز به خوشه ای بودن si ژن مقاومت به بیماری های زنگ ساقه، سفیدک پودری و اسکالد بر روی ناحیه ای از کروموزوم شماره هفت جو اشاره کردند.

مطالعات مکان یابی مقایسه ای (Comparative Mapping)، همولوژی و Synteny وسیعی از نشانگرها و ژنها را برای نواحی بزرگی از کروموزوم های جو، برنج و سایر ژنوم های خانواده گندمیان نشان دادند. بخصوص در رابطه با کروموزوم شماره سه جو با کروموزوم شماره یک برنج و کروموزوم شماره شش جو با شماره دو برنج یک Synteny بالای

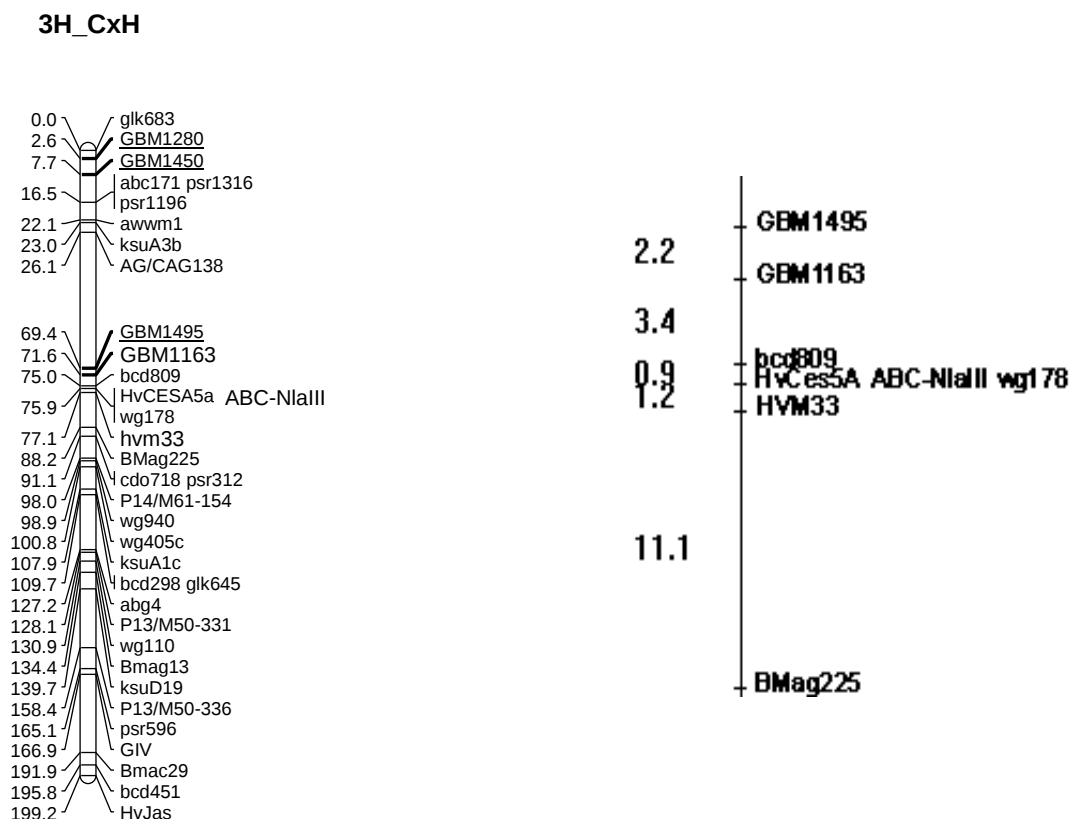
غربال ۹۶ فرد هاپلوئید مضاعف براساس الگوی چندشکلی والدین انجام و داده های حاصله با داده های موجود مربوط به ۳۷۲ نشانگر SSR و RFLP موجود برای این جمعیت ادغام و تجزیه پیوستگی انجام گرفت که بر این اساس ژن ABC-T روی کروموزوم شماره سه جو مکان یابی شد. بطوریکه در شکل ۳ مشاهده می شود، نشانگرهای نزدیک به این ژن در سمت سانترمر، نشانگر RFLP bcd809 با فاصله ۰/۹ و نشانگر SSR GBM1163 با فاصله ۳/۴ بودند. نشانگرهای نزدیک در سمت تلومر نیز شامل نشانگر RFLP Wg178 با تفرق همزمان و نشانگر SSR Hvm33 با فاصله ۱/۲ سانتی مورگان بودند.

با مراجعه به مشخصات مکانی چهار نشانگر مذکور در سایت Graingenes2 (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) و

آخرین نقشه های اجمالی (Vershney *et al.*, 2007) جایگاه دقیق این ژن روی بازوی بزرگ کروموزوم شماره ۳ جو تعیین شد.

جایگاه Hv.CesA5 متعلق به خانواده بزرگ سلولز سنتاز (Cellulose Synthase) پیوسته به ژن ABC-T بود و تفرق همزمان با آن داشت. آنزیم سلولز سنتاز در

تقریباً در طول کامل کروموزوم مشاهده می شود. البته بصورت قطعات غیر پیوسته در طول کروموزومها دیده می شود (Stein et al., 2007).



شکل ۳- نقشه ژنتیکی ژن ABC-T بر روی کروموزوم شماره ۳ جو، فواصل بر حسب سانتی مورگان می باشند

Fig. 3. Genetic map of ABC-T gene on barley chromosome 3, Genetic distances are in CentiMorgan

برای EST ژن HvCesA5 یک ژن سلولز Value=0 و سنتاز با E-value=0 بدست آمد که هر دو روی کروموزوم شماره یک برنج قرار داشتند. همدیفی توالی های مربوط به کاوشگرهای Wg178 و bcd809 نیز دقیقاً دارای بهترین همولوژی روی کروموزوم شماره یک برنج بودند، که این نتیجه مؤید مطالعات قبلی در خصوص Synteny بالای کروموزوم شماره سه جو با کروموزوم شماره یک ا برنج است. وجود چنین وضعیتی از Synteny بالا، بین ژنوم جو و برنج و همچنین سایر گونه های خانواده گندمیان، نمایانگر یک سیر تکاملی از انشعاب گونه ها از ژنوم برنج در این خانواده می باشد

بر این اساس به منظور بررسی وجود چنین سازمانیابی در این ناحیه از ژنوم، EST های بدست آمده در آزمایش SSH مربوط به ژن ABC-T و EST ژن HvCesA5 و کاوشگرهای نشانگرهای RFLP، Wg178 و bcd809 برای شناسایی بهترین جورها در ژنوم برنج بوسیله BlastN با E-value ≤ 1E-10 همدریف شدند

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> and

[http://tigrblast.tigr.org/euk-](http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1)

[blast/index.cgi?project=osa1](http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1))

بهترین ارتولوگ های فرضی برای EST های مربوط به ABC-T یک ژن ABC-T از تیپ PDR4 با E-

تجهیزات عمومی می باشد، هزینه این نشانگرها نیز بخصوص اگر از آنزیم های عمومی استفاده شود معمولاً پایین است (Thiel *et al.*, 2005, Rostoks *et al.*, 2004).

این مزایا سبب شده که تبدیل سایر نشانگرها به نشانگرهای CAPS نیز مورد توجه قرار گیرد. به عنوان مثال، نشانگر RAPD با مشکل عدم تکرارپذیری مناسب و RFLP به عنوان یک نشانگر پیچیده، پر هزینه و زمانبر در آزمایشگاه ها شناخته شده اند که برای رفع این نقیصه می توان از طریق توالی یابی نوارهای مربوطه و کشف SNP، آنها را به نشانگر ساده، کارا و کم هزینه CAPS تبدیل کرد. ویلند و یو (Weiland and Yu, 2003) با توالی یابی یک نوار RAPD که با ژن مقاومت به نماتود ریشه چغندر ارتباط قوی نشان می داد، موفق به تهیه یک نشانگر CAPS مرتبط با این بیماری کردند. گرینر و همکاران (Graner *et al.*, 1999) با تبدیل یک RFLP مجاور با ژن مقاومت به ویروس زرد موزائیکی جو موفق به تهیه یک نشانگر CAPS در این ناحیه از ژنوم شدند.

بنابراین با توجه به محاسن فوق الذکر به نظر می رسد کاربرد و توسعه نشانگر CAPS در آزمایشگاه های تحقیقاتی کشور با توجه به امکانات موجود توصیه مناسبی جهت مطالعات ژنتیکی مولکولی باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات و توسعه جنوب استرالیا (SARDI) بخاطر حمایت های بیدریغ و در اختیار قرار دادن امکانات و تجهیزات لازم کمال تشکر و قدردانی می شود.

(Stein *et al.*, 2007). علاوه بر این به دلیل وجود چنین حفاظت بالایی از توالی ها در درون ژن ها در بین گونه های خانواده گندمیان، امکان توسعه نقشه های ژنتیکی براساس نشانگرهای مبتنی بر EST برای مقایسه گونه های مرتبط با جو و برنج همچون گیاه ارزشمند گندم فراهم می شود. بر این اساس امروزه توسعه نشانگرهای SSR و SNP مبتنی بر EST ها از طریق جستجو در بانک های اطلاعاتی EST بسیار مورد توجه قرار گرفته است، ضمن اینکه می توان با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی EST ی مربوطه برای شناسایی ژن های خاص در ژنوم استفاده کرد.

بنداک و همکاران (Bundock *et al.*, 2003) با استفاده از نشانگرهای SSR و SNP مبتنی بر EST های مربوط به ژن سیتوکروم P450 در جو موفق به مکان یابی این ژن با استفاده از یک نشانگر CAPS بدست آمده از SNP شدند. روستاکس و همکاران (Rostoks *et al.*, 2005) با ادغام داده های نشانگرهای SNP طراحی شده براساس ژن های دخیل در تنش های غیر زنده با داده های نشانگرهای قبلی، امکان مکان یابی دقیق تر این ژن ها را با افزایش اشباع نقشه های ژنتیکی فراهم کردند. از آنجائیکه SNP ها از تنوع و چند شکلی بالاتر و همچنین احتمال جهش کمتر نسبت به SSR ها برخوردار می باشند، توسعه این نشانگرها در حال فزونی است. همچنین در میان روشهای ارزیابی نیز تبدیل SNP ها به نشانگر CAPS کاراترین، مطمئن ترین و کم هزینه ترین روش ارزیابی ژنوتیپی به نظر می رسد. بدلیل اینکه نتیجه گیری و تفسیر این نشانگرها ساده است، نیاز به امکانات و تجهیزات بسیار پیشرفته و مواد شیمیایی گرانقیمت ندارد و قابل انجام در آزمایشگاه های با

References

- Brookes, A. J. 1998. The essence of SNPs. *Genet.* 234: 177-186.
- Bundock, C., T. Christopher, P. Egger, G. Ablett, J. Henry and A. Holton. 2003. Single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 genes from barley. *Theor Appl Genet.* 106: 676-682.

منابع مورد استفاده

- Eichhorn, H., M. Klinghammer, P. Becht and R. Tenhaken. 2006.** Isolation of a novel ABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid. *Expt. Bot.* 57: 2193–2201.
- Fernandez, R. S., T. G. E. Davies, J. O. D. Coleman and P. A. Rea. 2001.** The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* 276: 30231-30244.
- Giordano, M., P. J. Oefner, P. A. Underhill, L. L. Cavellisforza, , R. Tosi and P. M. Richiardi. 1999.** Identification by denaturing high-performance liquid chromatography of numerous polymorphisms in a candidate region for multiple sclerosis susceptibility. *Genomics.* 56: 247-253.
- Graner, A., S. Streng, A. Kellermann, A. Schiemann, E. Bauer, R. Waugh, B. Pellio and F. Ordon. 1999.** Molecular mapping and genetic fine-structure of the rym5 locus encoding resistance to different strains of the barley yellow mosaic virus complex. *Theor. Appl. Genet.* 98: 285-290.
- Gut, I. G. 2001.** Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* 17: 475-492.
- Jasinski, M., Y. Stukkens, H. Degand, B. Purnelle, J. M. Brynaert and M. Boutry. 2001.** A plant plasma membrane ATP Binding Cassette–Type Transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *The Plant Cell.* 13: 1095–1107.
- Jasinski, M., E. Ducos, E. Martinoia and M. Boutry. 2003.** The ATP-Binding Cassette Transporters: structure, function and gene family comparison between rice and arabidopsis. *Plant Physiol.* 131: 1169–1177.
- Kobae, Y., T. Sekino., H. Yoshioka., T. Nakagawa., E. Martinoia and M. Maeshima. 2006.** Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC Transporter of arabidopsis thaliana, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol.* 47: 309–318.
- Kota, R., R. K. Varshney, T. Thiel, K. J. Dehmer and A. Graner. 2001.** Generation and comparison of EST-derived SSRs and SNPs in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Hereditas.* 135: 145-151.
- Kwok, P. Y. 2000.** High-throughput genotyping assays approaches. *Pharmacogenomics.* 1: 95-100.
- Manly K. F., R.H. Cudmore and J.M. Meer. 2001.** Map Manager QTX, crossplatform software for genetic mapping. *Mammalian Genome.* 12: 930–932.
- Pighin, J. A., H. Zheng, L.J. Balakshin, I.P. Goodman, T.L. Western, R. Jetter, L. Kunst and A.L. Samuels. 2004.** Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science.* 306: 702–704.
- Rafalski, A. 2002.** Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biol.* 5:94–100.
- Rostoks, N., S. Mudie, L. Cardle, J. Russell, L. Ramsay, A. Booth, J. T. Svensson, S. I. Wanamaker, H. Walia, E. M. Rodriguez, P. E. Hedley, H. Liu, J. Morris, T. J. Close, D. F. Marshall and R. Waugh. 2005.** Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol Gen Genomics.* 274: 515-527.
- Sasabe, M., K. Toyoda, T. Shiraishi, Y. Inagaki and Y. Ichinose. 2002.** cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Letters.* 518: 164-168.
- Schenk, P. M., K. Kazan, I. Wilson, J. P. Anderson, T. Richmond, S. C. Somerville and J. M. Manners.**

- 2000.** Coordinated plant defense responses in arabidopsis revealed by microarray analysis. *PNAS*. 97: 11655–11660.
- Shi, M. M. 2001.** Enabling large-scale pharmacogenetic studies by highthroughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 47: 164-172.
- Sjakste, T and M. Roder. 2004.** Distribution and inheritance of b-amylase alleles in north european barley varieties. *Hereditas*. 141: 39- 45.
- Stein, N., M. Prasad, U. Scholz, T. Thiel, H. Zhang, M. Wolf, R. Kota, R. K. Varshney, D. Perovic, I. Grosse and A. Graner. 2007.** A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor Appl Genet*. 114:823–839.
- Stukkens, Y., A. Bultreys, S. Grec, T. Trombik, D. Vanham and M. Boutry. 2005.** NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol*. 139: 341–352.
- Tacconi, G., L. Cattivelli, N. Faccini, N. Pecchioni, A. M. Stanca and G. Vale. 2001.** Identification and mapping of a new leaf stripe resistance gene in barley (*Hordeum vulgare L.*). *Theor Appl. Genet*. 102:1286–1291.
- Thiel, T., R. Kota, I. Grosse, N. Stein and A. Graner. 2004.** SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Research*. 32 e5.
- Van, K., E. Y. Hwang, M. Y. Kim, Y. H. Kim, Y. Cho, P.B. Cregan and S. H. Lee. 2004.** Discovery of single nucleotide polymorphisms in soybean using primers designed from ESTs. *Euphytica*. 139: 147–157.
- Varshney, R. K., T. C. Marcel, L. Ramsay, J. Russell, M. S. Roder, N. Stein, R. Waugh, P. Langridge, R. E. Niks and A. Graner. 2007.** A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor. Appl. Genet*. 114:1091–1103.
- Voorrips, R. E. 2002.** MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. of Hered.* 93:77–78.
- Weiland, J. J. and M. H. Yu. 2003.** A Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet. *Crop Sci*. 43:1814–1818.
- Willmore, K. L., P. Eckermann, R. K. Varshney, A. Graner, P. Langridge, M. Pallotta, J. Cheong and K. J. Williams. 2006.** New eSSR and gSSR markers added to Australian barley maps. *Aust. J. of Agric. Res.* 57: 953-959.
- Yazaki, K. 2006.** ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*. 580:1183–1191.
- Zwiegelaar, M. and I. A. Dubery. 2006.** Early activation of cell wall strengthening-related gene transcription in cotton by a *Verticillium dahliae* elicitor. *South African J. of Bot.* 72: 467–472.

Mapping of an ABC-Transporter gene associated with barley scald disease (*Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis) - using a CAPS marker

Aalami, A¹, C. Oldech², H. Alizadeh³, M. Omid⁴, M. R. Bihamta⁵,
A. A. Boushehri⁶, and K. Willsmore⁷

ABSTRACT

Aalami, A., C. Oldech, H. Alizadeh, M. Omid, Bihamta, M. R., Boushehri, A. A. and K. Willsmore. 2007. Mapping of an ABC-Transporter gene associated with barley scald disease (*Rhynchosporium secalis* (Oud.) Davis)- using a CAPS marker. Iranian Journal of Crop Sciences. 9 (2):157-168

ABC-Transporter proteins superfamily are found in all alive organisms as connection bridge in cellular membranes. These proteins are responsible for transportation of variant substrates such as metabolites that involved in plant defense mechanisms. In this study SNPs and CAPS markers were used for mapping of an ABC-Transporter which is specific for compatible and incompatible interaction against *R. secalis* fungus. A 2.2kb fragment derived from PCR product with specific primers for mentioned gene was sequenced in 10 barley parents. Among observed SNPs, one SNP showed different restriction enzymes sites in Chebec and Harrington parents and converted to CAPS marker. Results mapping revealed position of the gene on long arm of barley chromosome 3. Also, a homology evaluation for this region of chromosome was in accordance with previous studies about high synteny for barley chromosome 3 with rice chromosome 1.

Key words: Barley, Gene Mapping, ABC-Transporter, SNP, CAPS, NlaIII, Synteny, Scald

Received: July, 2007.

1- Ph.D. Student, The University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author).

2- Senior Scientist, South Australian Research and Development Institute, Urrbrae. SA.

3- Assistan Prof., Faculty of Crops and Animal Sciences, The University of Tehran, Karaj, Iran.

4 and 6- Associate Prof., Faculty of Crops and Animal Sciences, The University of Tehran, Karaj, Iran.

5- Prof., Faculty of Crop and Animal Sciences, The University of Tehran, Karaj, Iran.

7- Research Officer, South Australian Research and Development Institute, Urrbrae, SA.