"مجله علوم زراعی ایران"
جلد نهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸٦

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[٤]، محمدرضا بی همتا[٥]، علی اکبر بوشهری[٦] و کری ویلزمور[۷]

چکیده

اعلمی، ع.، ک. اولدچ، هـ. علیزاده، م. امیدی، م.، بی همتا، ع. ا. بوشهری و ک. ویلزمور. ۱۳۸٦. 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): ۱٦۸-۱۵۷**

خانواده بزرگ پروتئین های ABC-Transporter **به عنوان یک پل ارتباطی در غشاهای سلولی همه موجودات زنده یافت می‌شوند. 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** *Nla*III **در والدین** Chebec **و** Harrington **مشاهده و برای تبدیل به نشانگر** CAPS **و مکان‌یابی استفاده شد. نتایج مکان‌یابی 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: جو، مکان یابی ژن، ABC-Transporter، SNP، CAPS، NlaIII، Synteny، **اسکالد.**

تاریخ دریافت: ۱۳۸٦/٤/۲۵

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
٤ و ٦- 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

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]
[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

مقدمه

سلول‌ها بوسیله غشاهایی که آنها را از محیط پیرامون خود جدا می کنند احاطه شده‌اند. از آنجایکه 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 غشائ سلولی همه موجودات زنده یافت می‌شوند و قادرند طیف وسیعی از مواد و متابولیت ها را در بین غشاها مبادله نمایند. این پروتئین ها دارای دو عنصر ساختاری شامل یک ناحیه آبگریز بین غشایی TMD (Trans-Membrance Domain) با ٦ مارپیچ آلفا (α-helix) و یک ناحیه آبدوست اتصال نوکلئوتیدی NBD (Nucleotide Binding Domain) با ۳ موتیف حفاظت شده Walker A و Warlker B و ABC Signature می باشند. همه پروتئین های 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 ٥٤ پروتئین در برنج شناسایی شده اند که این تعداد زیاد نشاندهنده تنوع زیاد ترکیبات و متابولیت هایی است که بایستی در بین غشاهای سلولی رد و بدل شوند (Fernandez *et al.*, 2001).

مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین های ABC-T گیاهی در تبادل متابولیت های ثانویه همچون آلکالوئیدها، ترپانوئیدها، فنل ها و موم ها دخیل می باشند که عمدتاً این متابولیت ها 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 می باشد، را رمز می کند. گسترش موم در سطح کوتیکول می تواند همچون سدی در برابر حمله پاتوژنها مؤثر باشد (Pighin *et al.*, 2004). ژن NpABC1 یک پروتئین ABC-T در گیاه توتون را رمز می کند که نوعی ترپانوئید (یک نوع متابولیت ثانویه که بعنوان ترکیبات سمی در برابر عوامل بیماریزای مختلف عمل می‌کنند) ضد قارچی را به فضای بین سلولی ترشح می کند (Jasinski *et al.*, 2001).

تاکنون گزارش‌های متعددی نیز در رابطه با نقش پروتئین‌های ABC-T تیپ PDR در مسیرهای انتقال پیام مکانیسم های دفاعی ارائه شده است. به عنوان مثال، بیان ژن NpPDR1 در گیاه توتون بوسیله الیسیتورهای (قطعات و یا ترکیباتی از پاتوژن که باعث درک والقای مسیر پیام‌رسانی بیماری مربوطه در میزبان می‌شود) میکروبی القاء شده و از طریق ترشح مواد ضد قارچی در مکانیسم دفاعی گیاه تأثیر می گذارد (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 مکانیسم های دفاعی گیاهان) به سرعت بیان می شود (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 مکانیسم های دفاعی مرتبط با تنش های مختلف، تا کنون تعداد اندکی از این ژنها مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته اند و عملکرد بسیاری از آنها هنوز ناشناخته است، بر همین اساس اخیراً مطالعات در جهت شناخت و درک بیشتر این پروتئین ها در گیاهان رو به فزونی می باشند

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

(Jasinski *et al*., 2003).

SNPها شامل تغییرات در سطح یک باز آلی یا درج ها (Insertion) و حذف ها (Delition) در سطح ژنوم ها 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 آنجایکه SNPها فراوانترین فرم تنوع DNA در سطح ژنوم می باشند بنابراین به عنوان گنجینه ارزشمندی از نشانگر های ژنتیکی جهت مطالعات مولکولی از قبیل تهیه نقشه ژنتیکی، مکان یابی ژنها، انتخاب به کمک نشانگر و غیره قابل بهره برداری می باشند. این نشانگر ها دو آللی با پایداری و فراوانی بالا، نسبتاً ارزان و نسبت به SSRها از احتمال جهش کمتری برخوردار می باشند (Giordano *et al*., 1999; Rafalski, 2002). تا کنون چندین روش ارزیابی برای شناسایی SNPها ارائه شده است (Gut, 2001; Kwok, 2000; Rafalski, 2002; Shi, 2001). امّا 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 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) برای مکان یابی این ژن بود.

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 ژنوتیپ‌ها همراه با شجره و تیپ رشدی آنها در جدول ۱ آورد شده اند. آغازگرها براساس یک توالی ٤kb 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 BACهای جو غربال شده بود. آغازگرها بوسیله نرم افزار Primer3 به شرح زیر طراحی گردید:

BAC 7-1 5'AATTGCTAGGTGAGATGCTTGTTGGTCC

BAC 7-2 5'GCTCTTGATCTTTCCTTGATGTCACC

BAC 7-3 5'AATGGGAGTACCATGCCCTTCCTTCTTG

BAC 7-4 5'GCCATGATTGGATACACACTGCTCTTCA

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، ٤٪ 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 ٦۱ 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.

فراورده PCR بوسیله کیت شرکت کیاژن

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

جدول۱- ژنوتیپ‌های جو

Table 1- Barley genotypes.

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

۱- تیپ رشدی Haruna Nijo مشخص نیست.

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

(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 SNPها 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 *Nla*III (Biolabs, NEW England) در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر به شرح زیر انجام شد.

۲ میکرولیتر بافر ۱۰X شماره ٤ (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 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 (Willsmore *et al.*, 2006) ادغام و با نرم افزار Map Manager QTX (Manly *et al.*, 2001) براساس توابع کوزامبی و مقدار آستانه P=0.05-0.001 انجام گرفت. نقشه کروموزمی با استفاده از نرم افزار Map Chart (Voorrips, 2002) تهیه شد.

نتایج و بحث

ابتدا آغازگر های طراحی شده برای ژن ABC-T جهت بررسی کارائی 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 ۳۷۰bp و ۲۲۰۰bp نمودند. از آنجایکه قطعه تکثیر شده توسط آغازگر ها بصورت ترکیبی، قطعه

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

۳۷۰bpرا نیز شامل می شدند، بنابراین فراورده PCR والدین با آغازگرها در حالت ترکیبی به عنوان الگو برای توالی یابی و تعیین SNPها 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 ٦٠ تا ٧٠ 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 SNPها با توجه به در نظر گرفتن نواحی توالی یابی شده با کیفیت بالا و قابل اطمینان، یک SNP به ازای هر ۵۹۰bp بود.

SNPها جزء فراوانترین نوع تنوعات در سطح ژنوم ها می باشند که این فراوانی در نواحی مختلف ژنوم متفاوت می باشد. بطورکلی SNPها 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 SNPها، طراحی آغازگرها در نواحی غیر رمز کننده مثل 5 –UTR یا 3 –UTR مجاور ESTها 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 SNPها در نواحی رمز کننده نیز می توانند ارزشمند باشند در صورتیکه سبب تغییر در فنوتیپ شده، که در این صورت به عنوان یک نشانگرعملکردی 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 آمینه 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 SNPها ۱ در هر ۲٤۰ جفت‌باز درنواحی غیر رمز کننده تعدادی از ESTهای جو برآورد کردند. روستاکس و همکاران (Rostoks *et al.*, 2005) نیز فراوانی SNPها را برای ناحیه ۳ تعدادی از ژنهای پاسخگو در تنش‌های غیر زنده در گیاه جو ۱ به ۲۰۰ جفت‌بازگزارش نمودند. از آنجایکه 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 SNPها در این ناحیه از ژنوم قابل انتظار بود. ون و همکاران (Van *et al.*, 2004) فراوانی SNPها را در نواحی رمز کننده، یک SNP به ازای ۳۲٦۰ جفت باز و در نواحی غیر رمز کننده یکSNP به ازای ۲۷۸ جفت باز در گیاه سویا گزارش کردند که نشان می دهد فراوانی SNPها 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 برخورداراست، واقع شده باشند که در این صورت احتمال جهش کم خواهد بود (Jasinski *et al*., 2003).

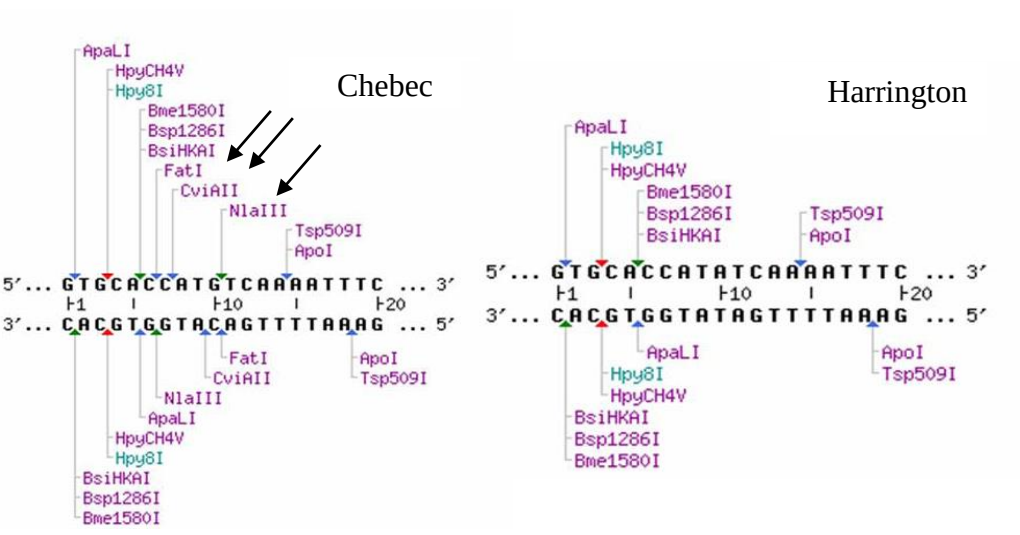
در میان SNPهای مشاهده شده تنها یک SNP با تفاوت در جایگاه برش آنزیمی برای دو ژنوتیپ Chebec و Harrington بدست آمد. در این ناحیه با تعداد ۲۰ نوکلئوتید جایگاه تشخیص تعداد زیادی آنزیم برشی مشاهده شد که در این میان ۳ آنزیم *Fat*I, *Nla*III و *Cvi*AII بین دو والد متمایز بودند (شکل۱) و بنابراین می توانند برای تعیین ژنوتیپ SNP موجود و تبدیل آن

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

به نشانگر CAPS جهت مکان یابی ژن مورد نظر در جمعیت حاصل از تلاقی والدین مذکور مورد استفاده قرار گیرند. از آنجائیکه آنزیم *Nla*III نسبت به ۲ آنزیم دیگر عمومی‌تر و ارزانتر می باشد، بنابراین از این آنزیم برای برش فراورده 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٪ نشانگر های SNP قابلیت تبدیل به نشانگر CAPS را دارا می باشند. امّا از آنجایکه 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.

بطوریکه در شکل ۲ مشاهده می شود تفکیک فراورده ۲۲۰۰ جفت باز حاصل از PCR دو ژنوتیپ جو پس از برش با آنزیم *Nla*III روی ژل آگاروز تولید دونوار واضح برای هر یک از والدین Chebec و Harrington کرد که نوار ۵۰۰bp بین دو والد مشترک و نوار های ۷۰۰bp و ۴۰۰ در آنها متفاوت بودند. از آنجایکه 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 در غربال افراد جمعیت حاصل از والدین و مکان یابی ژن ABC-T مورد استفاده قرار گیرد. از آنجایکه این نشانگر CAPS براساس یک SNP مربوط به ژن ABC-T و برش با آنزیم *Nla*III توسعه یافته است، ABC-*Nla*III نام گرفت.

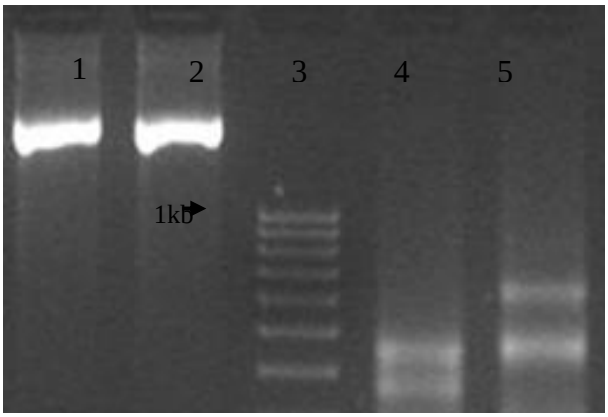


شکل ۱- جایگاه های برشی آنزیم ها در مجاورت SNP (موقعیت ۱۰) برای Chebec و Harrington

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

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]



شکل ۲- هضم فراورده PCR با آنزیم NlaIII، (۱ و۲ فراورده PCR والدین)، (۳- نشانگر اندازه 1kb)، (٤- Chebec پس از هضم)، (٥- 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)

غربال ۹٦ 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 درسمت سانترمر، نشانگر bcd809 RFLP با فاصله ۰/۹ و نشانگر SSR GBM1163 با فاصله ۳/٤ بودند. نشانگرهای نزدیک درسمت تلومر نیز شامل نشانگر Wg178 RFLP با تفرق همزمان و نشانگر Hvm33 SSR 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 نقشه‌های اجمالی (Vershney *et al.*, 2007) جایگاه دقیق این ژن روی بازوی بزرگ کروموزوم شماره ۳ جو تعیین شد.

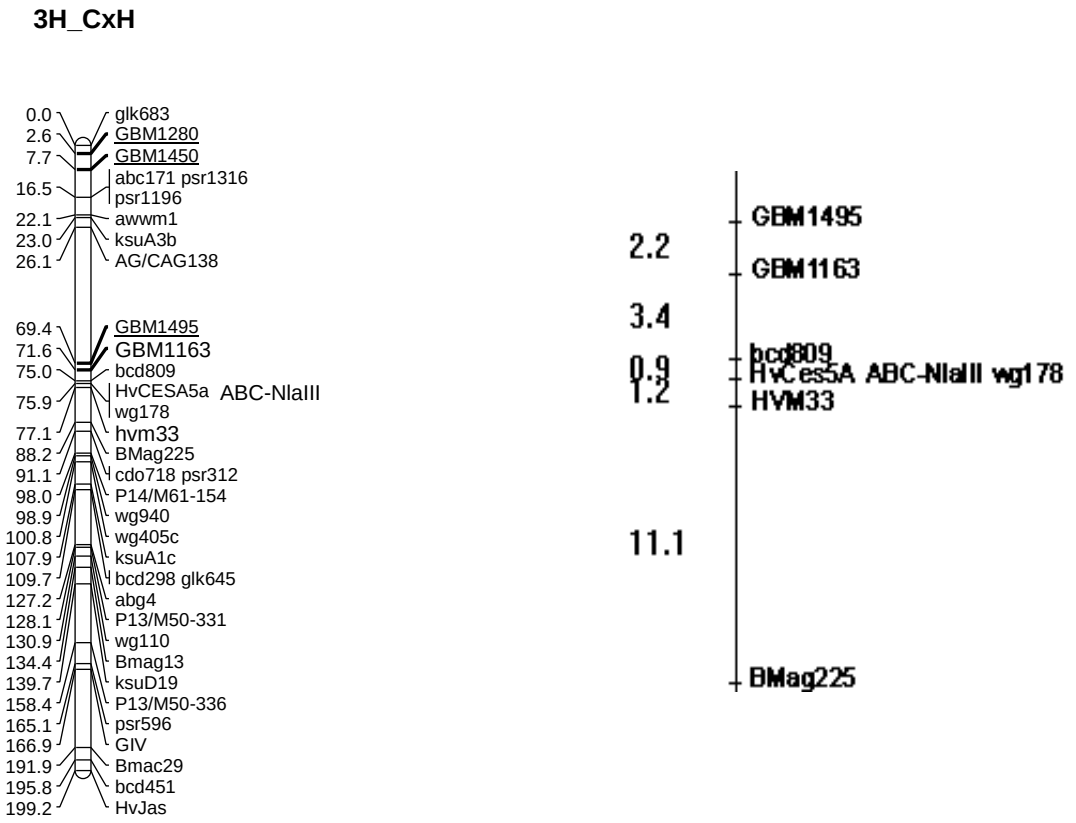
جایگاه Hv.CesA5 متعلق به خانواده بزرگ سلولز سنتاز (Cellulose Synthase) پیوسته به ژن ABC-T بود و تفرق همزمان با آن داشت. آنزیم سلولز سنتاز در حفاظت دیواره اولیه و ثانویه سلولی نقش دارد و مطالعات نیز نشان داده که این ژن در مکانیسم های دفاعی گیاه در برابر پاتوژنها دخیل می باشد (Schenk *et al.*, 2000; Zwiegelaar 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 می‌دهد که ژن های مقاومت و یا دخیل در مکانیسم های دفاعی در برابر پاتوژن ها بصورت خوشه‌ای در این ناحیه کروموزومی قرار دارد. تاسونی و همکاران (Tacconi *et al.*, 2001) نیز به خوشه‌ای بودن si ژن مقاومت به بیماری های زنگ ساقه، سفیدک پودری و اسکالد بر روی ناحیه ای از کروموزم 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 کروموزم های جو، برنج و سایر ژنوم های خانواده گندمیان نشان دادند. بخصوص در رابطه با کروموزم شماره سه جو با کروموزم شماره یک برنج و کروموزم شماره شش جو با شماره دو برنج یک Synteny بالای

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

تقریباً در طول کامل کروموزم مشاهده می شود. البته برای سایر کروموزم های جو و برنج نیز این وضعیت 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

بر این اساس به منظور بررسی وجود چنین سازمانیابی در این ناحیه از ژنوم، ESTهای 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 همردیف شدند (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ and http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1)

بهترین ارتولوگ های فرضی برای ESTهای مربوط به ABC-T یک ژن ABC-T از تیپ PDR4 با E-Value=0 و برای EST ژن HvCesA5 یک ژن سلولز سنتاز با E-value=0 بدست آمد که هر دو روی کروموزم شماره یک برنج قرار داشتند. همردیفی توالی های مربوط به کاوشگر های Wg178 و bcd809 نیز دقیقاً دارای بهترین همولوژی روی کروموزم شماره یک برنج بودند، که این نتیجه مؤید مطالعات قبلی در خصوص Synteny بالای کروموزم شماره سه جو با کروموزم شماره یک۱ برنج است. وجود چنین وضعیتی از Synteny بالا، بین ژنوم جو و برنج و همچنین سایر گونه‌های خانواده گندمیان، نمایانگر یک سیر تکاملی از انشعاب گونه ها از ژنوم برنج در این خانواده می باشد

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

(Stein *et al.*, 2007). علاوه بر این به دلیل وجود چنین حفاظت بالایی از توالی‌ها در درون ژن ها در بین گونه-های خانواده گندمیان، امکان توسعه نقشه‌های ژنتیکی براساس نشانگرهای مبتنی بر EST برای مقایسه گونه-های مرتبط با جو و برنج همچون گیاه ارزشمند گندم فراهم می‌شود. بر این اساس امروزه توسعه نشانگرهای SSR و SNP مبتنی بر ESTها از طریق جستجو در بانک‌های 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 ESTهای مربوط به ژن سیتوکروم P450 در جو موفق به مکان یابی این ژن با استفاده ازیک نشانگر CAPS بدست آمده از SNP شدند. روستاکس و همکاران (Rostoks *et al.*, 2005) با ادغام داده های نشانگر های SNP طراحی شده براساس ژن های دخیل در تنش های غیر زنده با داده های نشانگرهای قبلی، امکان مکان‌یابی دقیق تر این ژن ها را با افزایش اشباع نقشه های ژنتیکی فراهم کردند. از آنجائیکه SNPها از تنوع و چند شکلی بالاتر و همچنین احتمال جهش کمتر نسبت به SSRها برخوردار می باشند، توسعه این نشانگرها در حال فزونی است. همچنین در میان روشهای ارزیابی نیز تبدیل SNPها 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 تجهیزات عمومی می باشد، هزینه این نشانگرها نیز بخصوص اگر از آنزیم های عمومی استفاده شود معمولاً پایین است (Rostoks *et al.*, 2005 , Thiel *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 نوارRAPD 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 ودر اختیار قرار دادن امکانات و تجهیزات لازم کمال تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

References

Brookes, A. J. 1998. The essence of SNPs. Genet. 234: 177-186.

Bundock, C., T. Christopher, P. Eggler, G. Ablett, J. Henry and A. Holton. 2003. Single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 genes from barley. Theor Appl Genet. 106: 676–682.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

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.

Willsmore, 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.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

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

Aalami, A[1]., C. Oldech[2], H. Alizadeh[3], M. Omidi[4], M. R. Bihamta[5], A. A. Boushehri[6], and K. Willsmore[7]

ABSTRACT

Aalami, A., C. Oldech, H. Alizadeh, M. Omidi, 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

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2025-09-07]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1386.9.2.5.3]

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.