مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه بیوانفورماتیکی ژن Wdhn13 در گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید گندم با استفاده از روش Insilco AFLP Analysis

مهران فلک ناز[۱]، علی اشرف مهرابی[۲]، دانیال کهریزی*[۳]، علی اصغر نصراله نژاد[۴]،خیرا.. یاری

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه ایلام
[۲] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه ایلام
[۳] دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه رازی کرمانشاه
[۴] استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

سابقه و هدف: ژن Wdhn13 کد کننده پروتئین های گروه ۲ LEA می باشد. پروتئین های LEA اولین بار در گندم و پنبه به عنوان پروتئین های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند. ساختار اولیه پروتئین های LEA شامل دمین های اولیه باردار و بدون بار از آمینواسید های قطبی باقی مانده اما غیرآبدوست می باشد که دلالت برآبدوست بودن پروتئین‌های LEA دارد.

مواد و روش ها: در این تحقیق روابط فیلوژنتیکی و بیوانفورماتیکی ژن Wdhn۱۳ در ۸ گونه گندم مطالعه شد و جهت آنالیزهای مولکولی،۳ آنزیم برشی *HindIII* با سایت برشی aagctt، *AluBI* با سایت برشی agct و *TaqI* با سایت برشی tcga استفاده شد و توسط نرم افزار بیولوژیکی CLC به صورت Insilco و در شرایط خارج آزمایشگاهی به توالی ها اعمال شد.

یافته ها: نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی بر اساس الگوریتم UPGMA نشان دهنده این موضوع بود که گندم های مورد بررسی از لحاظ این ژن در۳ گروه قرار دارند که گروه اول شامل ۴ رقم گندم نان (توالی موجود در NCBI)، گندم سرداری، گندم دوروم شوش و گندم دوروم بروجرد، گروه دوم شامل ۱رقم وحشی اورارتو و گروه سوم شامل ۲ رقم نان گنبد و دیکوکوئیدز بودند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نمایانگر ارتباط ویژه و نزدیکی بعضی گونه های مورد مطالعه بود.

کلمات کلیدی: پروتئین های LEA، مقاومت به خشکی، گندم، Insilco AFLP Analysis

مقدمه

به لحاظ اینکه بخش قابل توجهی از اراضی زیر کشت گندم در ایران در مناطق خشک و نیمه خشک قرار گرفته و همچنین این مناطق دارای دامن های از تنش های زیستی (از جمله آفات، بیماری ها) و تنش های غیرزیستی (از جمله خشکی، شوری و ...) می باشد (۲)، لذا با توجه به این موضوع شناسایی ژن و آلل های ژن مقاومت به خشکی و تنوع آن ها از طریق روش های بیوانفورماتیکی و سرانجام انتقال آن به گونه های حساس می تواند باعث افزایش مقاومت به خشکی گردد. در اغلب برنامه های اصلاحی، اصلاح ژنتیکی مقاومت به خشکی از طریق انتخاب برای عملکرد صورت می‌گیرد ولی به علت وراثت پذیری پایین عملکرد تحت شرایط تنش و تغییرات زمانی و مکانی در محیط مزرعه، روش‌های سنتی اصلاح نباتات از سرعت کندی برخوردار بوده است. نشانگرهای مولکولی مانند چند شکلی در طول قطعات حاصل از برش آنزیمی DNA (RFLP[۱])، DNA چند شکل حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD[۲]) و آیزوزایم ها موجب افزایش کارایی در تهیه ژنوتیپ های مقاوم به خشکی می‌گردد زیرا بیان آن‌ها مستقل از اثرات محیطی است (۵). پروتئین های LEA[۳] به عنوان

آدرس نویسنده مسئول : گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه رازی کرمانشاه
Email : dkahrizi@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۴

1 - Restriction fragment length polymorphism
2 - Random amplified polymorphic DNA
3 - Late Embryogenesis Abundant

Archive of SID
www.SID.ir

پروتئین های تجمعی در اواخر دوره جنینی جهت مقابله با تنش های محیطی اولین بار در گندم و پنبه به عنوان پروتئین های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند (۸ و۱۰). ساختار اولیه پروتئین های LEA شامل دمین های اولیه (پروتئین های هم خانواده) باردار وبدون بار از آمینواسید های قطبی باقی مانده اما غیرآبدوست می باشد که دلالت برآبدوست بودن پروتئین‌های LEA دارد. بنابراین پروتئین های LEA برای مقاومت به تنش های شوری و خشکی پیشنهاد شده اند (۱۰،۴،۹). وظیفه پروتئین های LEA به صورت تدریجی و بعد از گذشت دو دهه آشکار شد، ولی بیشتر اطلاعات نیز هنوز به خوبی مشخص نشده است (۱۷، ۱۴). آنالیزهای اولیه نشان داد که پروتئین های LEA در دو دسته جدا گانه LEA و زیر گروه‌های LEA-A قرار دارند. ژن های LEA-A در زمان تنش شوری و در ابتدای جوانه زنی بذر قبل از ژن های LEA بیان می شوند. بیشتر دسته بندی های عمومی ژن های LEA براساس ساختار دمین های پروتئینی یا ویژگی های شیمیایی آن ها انجام می شود (۱۰،۱۴). ژن Wdhn۱۳ از ژن های کد کننده پروتئین های گروه دوم LEA با وزن ملکولی ۱۲/۸ کیلودالتون به عنوان کوچک ترین عضو گروه دی هیدرین ها در گیاهان با سه قطعه غنی از لایسین می باشد(۶). پیشرفت های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی، امیدهای تازه ای در به نژادگران به وجود آورده است که از جمله این پیشرفت ها می توان به ابداع انواع نشانگرهای مولکولی اشاره کرد. در بین انواع نشانگرهای مولکولی شناخته شده، نشانگرهای AFLP[1]، SSR[2] و SAMPL[3] در اصلاح نژاد و ارزیابی تنوع و فواصل ژنتیکی ژرم پلاسم های گندم استفاده شده‌اند(۱). با توجه به اهمیت بالای ژن های مقاومت به خشکی، در این تحقیق تنوع فیلوژنتیکی ژن Wdhn۱۳ از طریق مطالعات بیوانفورماتیکی و با استفاده از روش Insilco AFLP Analysis مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۰ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه ایلام انجام شد. در این تحقیق از هشت گونه دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید گندم که از مناطق مختلف استان ایلام به دست آمده بود استفاده شد که اسامی و مشخصات ژنومی هر یک در جدول شماره ۱ ارائه شد.

جدول ۱- معرفی گونه های گندم مورد استفاده در این تحقیق

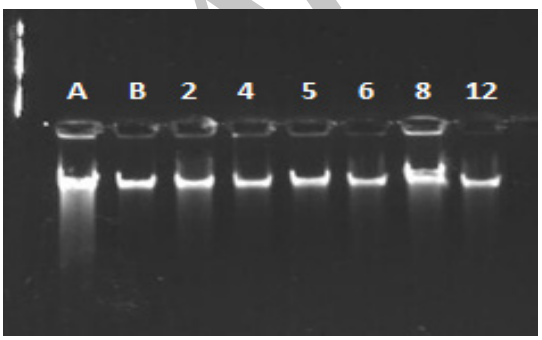
نام	ژنوم	کد نمونه در PCR	نام	ژنوم	کد نمونه در PCR
دروم بروجرد	AABB	A	دیکوکویدز	AABB	5
سرداری	AABBDD	B	اورارتو	AA	6
نان گندم	AABBDD	2	تائوشی	DD	8
دروم شوشی	AABB	4	اسپلتوئیدز	BB	12

۱- کشت بذور و استخراج DNA ژنومی

جهت استخراج DNA ژنومی از نمونه ها، ابتدا بذور ضد عفونی شده و سپس در گلدان کشت شده و پس از ۱۰ روز با استفاده از برگ های تازه و جوان، DNA ژنومی به روش C-TAB استخراج شد (۱۶).

۲- تعیین کیفیت وکمیت DNA ژنومی استخراج شده

برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. از هر نمونه مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با دو میکرولیتر بافر نمونه گذاری مخلوط و بارگذاری شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ تا ۱۲۰ تا رسیدن رنگ آبی به انتهای ژل صورت گرفت و سپس ژل پس از شستشوی چند ثانیه ای با آب مقطر به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در داخل محلول اتیدیوم برماید جهت رنگ آمیزی قرار داده شد و در پایان ژل درون دستگاه UV Transluminator قرار گرفت. نمونه های با کیفیت بالای DNA برای انجام واکنش زنجیره پلی مراز انتخاب شدند (شکل ۱).



شکل ۱- کیفیت DNA ژنومی گندم های مورد مطالعه در این تحقیق

1- Amplified fragment length polymorphism
2- simple sequence repeat
3- Selective amplification of microsatellite polymorphic loci

Archive of SID
www.SID.ir

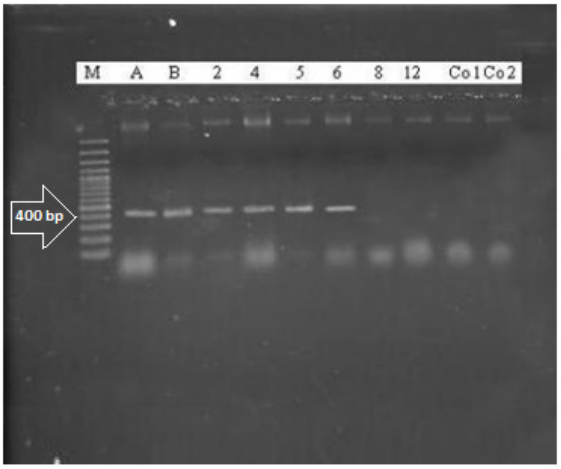
۳- طراحی پرایمر تخصصی و تکثیر

جهت PCR و تکثیر ژن Wdhn۱۳ ابتدا از روی توالی ژن Wdhn۱۳ گرفته شده از سایت NCBI (با طول۳۷۶ نوکلئوتید) در گندم *T.aestivum* (تنها توالی موجود در پایگاه های اطلاعاتی) آغازگرهای اختصاصی توسط نرم افزار۵ OLigo طراحی شدند و جهت سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شدند به منظور افزایش دقت مطالعه ژن، در طراحی پرایمر از قسمت های UTR استفاده شد با توجه به این موضوع در پرایمر رفت کدون ATG وجود ندارد، توالی پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ نشان داده شده است

جدول۲- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

Forward	**5-TAGGGACAAGTTGAGGGCAAG-3**
Reveres	**5-CTGGGCTTAGTGCTGTCCAG-3**

جهت دقت بیشتر فرآیند PCR از آنزیم *Pfu* Polymerase و دو کنترل استفاده شد، درکنترل اول آنزیم *Pfu* Polymerase از واکنش حذف و در کنترل دوم DNA ژنومی از واکنش حذف شد. حجم نهایی واکنش PCR ۲۵ میکرولیترو با شرایط ذیل تنظیم گردید: ۱/ µl۳ DNA ژنومی (۱۰۰ ng/ µl)، ۱/µl۳ MgCl۲، µl۲ dNTPs، µl۱۵ ۲/ PCR buffer ۱۰x µl، ۰/۳ از هر پرایمر و ۱ واحد *Pfu* Polymerase . برنامه بکار رفته جهت تکثیر این قطعه ژن در PCR به صورت زیر بود: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت چهار دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت۳۰ ثانیه، ۵۵درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه (۳۵ سیکل)، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) در پایان محصولات PCR به دست آمده، با الکتروفورز روی ژل آگارز۱/ ۵ درصد بررسی شدند(شکل۲) . جهت تخلیص محصول PCR روش خالص سازی از روی ژل آگارز، توسط شرکت Bioneer انجام گرفت.



شکل ۲- تکثیر ژن Wdhn۱۳ با آغازگر های تخصصی در گندم های مورد مطالعه
از چپ به راست M: سایز مارکر A: دوروم بروجرد، B: سرداری، ۲: نان گنبد، ۴: دوروم شوش، ۵: دیکوکوئیدز، ۶: اورارتو، ۸: تائوشی، ۱۲: اسپلتوئیدز،Co۱: کنترل ۱ (واکنشPCR بدون DNA) ، Co۲ : کنترل ۲ (واکنشPCR بدون پرایمر)

۵- اعمال آنزیم های برشی و آنالیز نتایج

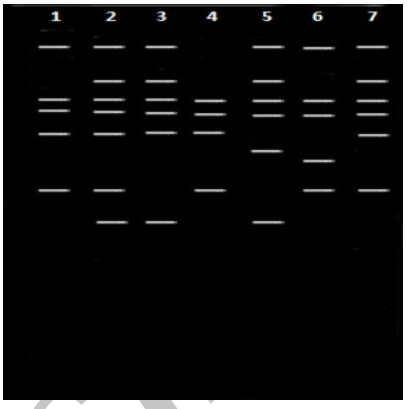
جهت آنالیز و بررسی تنوع درون ژن از ۳ آنزیم برشی: *HindIII* با سایت برشی AAGCTT، *AluBI* با سایت برشی AGCT و *TaqI* با سایت برشی TCGA استفاده شد. این آنزیم ها از طریق نرم افزار بیولوژیکی CLC Main workbench ۶ در شرایط خارج آزمایشگاهی به توالی ژن Wdhn۱۳ مربوط به هر نمونه گندم اعمال شد. دلیل استفاده از این آنزیم ها، دارا بودن سایت های برشی زیاد در طول توالی این ژن بوده است. در مرحله بعد توسط نرم افزار بیولوژیکی CLC، به توالی ها اعمال شد. جهت مطالعات فیلوژنتیکی نیز از نرم افزارهای MEGA ۵ و DARWIN استفاده شد.

یافته ها

نتایج حاصل از داده های ۳ آنزیم برشی توسط نرم افزار(CLC Main workbench ۶) نشان داد که با توجه به طول ۳۷۶ نوکلئوتیدی طول ژن مجموعاً ۳۹ قطعه تولید شده که از بین آن ها۲۱ قطعه (۵۳درصد) در بین تمامی گونه ها وجود داشت که نشان دهنده درصد بالای چند شکلی (پلی مورفیسم) در بین نمونه ها بود. در بین گونه های مورد مطالعه، گندم سرداری با ۷ قطعه بیشترین تعداد و گندم دوروم شوش با ۴ قطعه کمترین تعداد قطعه را تولید کردند (شکل ۳). همچنین درصد نمونه ها

Archive of SID
www.SID.ir

در کلاستر اول با ۵۷ درصد ، کلاستر دوم ۱۴ درصد و کلاستر سوم ۲۸ درصد بود. یک نتیجه مهم که از این آزمایش می توان گرفت این موضوع است که توالی ژن Wdhn۱۳ در گندم سرداری شباهت بسیار زیادی با توالی این ژن در نمونه موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI را دارد.

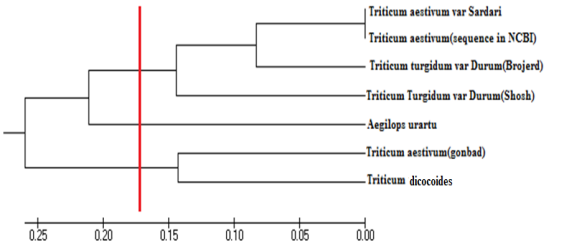


شکل ۳- نمایش ژل فرضی اعمال آنزیم های برشی بر توالی ژن Wdhn۱۳درگونه های دارای ژن مورد نظر توسط نرم افزار CLC Main workbench ۶.

از چپ به راست ۱: دوروم بروجرد ، ۲: سرداری ، ۳: نان گنبد، ۴: دوروم شوش، ۵: دیکوکوئیدز ، ۶: اورارتو، ۷: توالی ژن Wdhn۱۳ بدست آمده از سایتNCBI .

بحث

نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی بر اساس الگوریتم UPGMA و بر اساس دو ماتریس دایس ($dij = \frac{b+c}{2a(b+c)}$) و جاکارد ($dij = \frac{b+c}{a+(b+c)} \frac{b+c}{a+(b+c)}$) برای نمونه های دارای ژن Wdhn۱۳ (۶ نمونه ای که در PCR ژن را تکثیر کردند) و توالی ژن موجود در NCBI نشان دهنده این موضوع بود که گندم های مورد بررسی از لحاظ این ژن در ۳ کلاستر قرار دارند (شکل۴). کلاستر اول شامل ۴ رقم گندم نان (توالی موجود در NCBI)، گندم سرداری، گندم دوروم شوش و گندم دوروم بروجرد، کلاستر دوم شامل رقم وحشی اورارتو و کلاستر سوم شامل ۲ رقم نان گنبد و دیکوکوئیدز بودند. چون تشابه ژنتیکی با فاصله ژنتیکی رابطه معکوس دارد، لذا ۲ رقم گندم نان (توالی موجود در NCBI) و گندم سرداری که دارای کمترین فاصله ژنتیکی هستند دارای بیشترین تشابه ژنتیکی و گندم اورارتو دارای کمترین تشابه ژنتیکی با سایر نمونه ها بر اساس ژن Wdhn۱۳ بود. این تحقیق نشان داد که تجزیه و تحلیل AFLP پتانسیل بالایی برای یافتن تنوع ژنتیکی در گندم دارد (۱). آلمانزا و همکاران در سال ۲۰۰۳، میانگین باند پلی‌مورف در نژادهای گندم نان بهاره را ۵۹ درصد گزارش کردند (۴). هم چنین در این مطالعه مشخص شد که AFLP روشی قدرتمند است، زیرا تنها نیاز به حداقل کار اولیه دارد ولی تنوع ژنتیکی مناسبی را در جمعیت نمایان می نماید که دستیابی به آنها با روش های دیگر در همان زمان و با هم آن مقدار هزینه، مشکل و یا غیر ممکن است. این تکنیک به دلیل تکرارپذیری بالا و لوکوس های زیادی که در یک AFLP زمان کوتاه و در یک آزمون مورد سنجش قرار می گیرد، یک تکنیک مفید و قابل اعتماد است چرا که تکرارپذیری یکی از معیارهای مهم برای یک مارکر خوب می باشد که می توان خوشه بندی صحیحی بر اساس داده های حاصل از آن برای ارقام متفاوت انجام داد (۱،۱۵،۱۳). توزیع و فراوانی نشانگرها یکنواخت نیست و همانند سایر غلات انتخاب ترکیب AFLP آغازگرها به طور مستقیم روی توزیع مکانی نشانگرها تأثیر می گذارد. دلیل توزیع غیر یکنواخت این نشانگر به مکانیسم های ایجاد چند شکلی در این نشانگر نسبت داده حذف می شود، وقایعی مانند موتاسیون قطعات در ایجاد چند شکلی و اضافه شدن در این نشانگر دخیل هستند (۱۲). عموماً نشانگرهای که با ترکیب های مختلف آنزیم های برشی حاصل شده اند توزیع مناسب تری در طول ژنوم داشته اند. اگرچه تجمع نشانگرها در نواحی سانترومری اغلب گزارش شده AFLP به خصوص در RFLP و AFLP است (۱،۱۱،۱۵) تجمع نشانگرهای نواحی سانترومری شاید به دلیل کاهش یا ممانعت از نوترکیبی در این مناطق باشد(۱و۱۵و۱۳)و این عقیده در مورد سایر نقشه های ژنتیکی منتشر شده در سایر غلات نیز صادق است(۱ و۱۵).



شکل ۴- دندوگرام حاصل از تاثیر آنزیم های برشی بر ژن Wdhn۱۳ در گونه های گندم دارای ژن (Wdhn۱۳) مورد بررسی از روش NJ توسط نرم افزار MEGA۵.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت های مالی دانشگاه ایلام و حمایت های
فنی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی
کرمانشاه تشکر می شود.

منابع

(۱) عثمانی ژ. سی و سه مرده ع. بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ های گندم سرداری با استفاده از نشانگر AFLP و صفات زراعی. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۳۸۸; ۳۱۹:۴۸-۳۰۱

(۲) نورمحمدی ق. سیادت ع، زراعت غلات جلد اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۳۷۷

(۳) نوروزی پ. روش کلاسیک و مهندسی ژنتیک برای ایجاد تحمل به تنش خشکی در گیاهان. فصلنامه علمی- ترویجی خشکی و خشکسالی. ۱۳۸۳;۱۱ :۴۶-۴۳.

(4) Almanza-Pinzón M I M. Hairallah P N . Walburton M L. Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. Euphytica, 2003; 130:77-86.

(5) Bartels D. Phillips J. Chandler J. Desiccation tolerance: gene expression, pathways, and regulation of gene expression. In: Jenks MA, Wood AJ (Eds) Plant Desiccation Tolerance. Blackwell, Ames, IA, 2007; 45:115-137.

(6) Bies Etheve N. Gaubier Comella P. Debures A. Lasserre E. Jobet E. Raynal M. Cooke R. Delseny M.Inventory, evolution andexpression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant)protein gene family in Arabidopsis thaliana. Plant Mol,2008; 67,107–124.

(7) Close T J. Fenton R D. Yang A. Asghar R. DeMason D A. Crone D E. Meyer N C. Moonan F. The protein. In ‘‘Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress’’ American Society of Plant Physio,1993; 104–118.

(8) Cuming A C.Lane B G. Protein synthesis in imbibing wheat embryos. EJB journal,1979; 99: 217–224.

(9) Dure L. Structural motifs in Lea proteins. In ‘‘Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress’’ American Society of Plant Physio,1993; 91–103.

(10) Dure L.Crouch M. Harada J. Ho T H D. Mundy J. Quatrano R S.Thomas T.Sung Z R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol,1989;12, 475–486.

(11) Franco J J. Crossa J M. Ribaut J. Bertran M L. Warburton M. Khairallah A. method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. Theor. and App. Genet,2001;103:944-952.

(12) Greg A P. An AFLP based genome map of wheat (Triticum aestivum)., Plant and Animal Genome VI Conference. San Diego., CA; 1998.

(13) Langridge P E S. Lagudah TA. Holton R. Apples P J. Sharp K. Trends in genetic and genome analysis of wheat: a review. Aust. J. Agric. Res,2001; 52:1043-1077.

(14) Ohno R. Takumi S. Nakamura C. Kinetics of transcript and protein accumulation of a low-molecular weight wheat LEA D-11 dehydrin in response to low temperature, Plant Physio, 2003; 169:193-200.

(15) Staub J E. Serquen C. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. Hort. Sci,1996;31:729-740.

Archive of SID

www.SID.ir

(16) Sumer A. Ahmet D. Gulay Y. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf materialof some Hesperis L. Specimens. Plant Mol, 2003; 21, 461- 466.

(17) Yueie C. hsing. Late Embryogenesis Abundant Proteins-Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology, 2008;48:16-23.

Archive of SID

www.SID.ir