مکان یابی DNA ریبوزومی 5S و 45S روی کروموزوم های مارچوبه های بومی ایران

سید جواد موسوی زاده[1*]، محمدرضا حسندخت[1]، عبدالکریم کاشی[1]، خوان خیل[2]، آدوراسیون کابررا[2]

۱- گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.۲-گروه ژنتیک، دانشگاه کوردوبا، کوردوبا، اسپانیا.

*نویسنده مسئول: mousavizadeh@ut.ac.ir

چکیده

چهار گونه خودرو مارچوبه شامل *Asparagus officinalis* L. ،*A. persicus* Baker ،*A. verticillatus* L. و *A. breslerianus* Schult. & Schult. f. از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شدند. مکان یابی 5S و 45S (18S-5.8S-25S) rDNA روی کروموزوم های متافازی جمعیت‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و اکتاپلوئید با استفاده از تکنیک هیبریدسازی فلورسانس در محل (FISH) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس تکنیک FISH سه جفت DNA ریبوزومی 45S و یک جفت 5S برای *A. officinalis* تأیید گردید. برای جمعیت های دیپلوئید *A. persicus* و *A. verticillatus* دو جفت 45S و یک جفت 5S با الگوی خاصی مشخص شدند. کروموزوم های متافازی جمعیت اکتاپلوئید *A. breslerianus* ۱۲ جفت DNA ریبوزومی 45S و چهار جفت 5S را نشان دادند.

کلمات کلیدی: مارچوبه، کروموزوم، هیبریدسازی فلورسانس در محل، FISH.

مقدمه

تکنیک هیبریداسیون در محل یا (FISH[1]) در ابتدا توسط گال و پاردو (۱۹۶۹) و همچنین جان و همکاران (۱۹۶۹) ابداع گردید. این روش مکان یابی ژن ها یا توالی های RNA یا DNA را به مستقیم روی کروموزوم امکان پذیر ساخته است. به طور خلاصه، در تکنیک FISH ، توالی های DNA که مکان یابی شده اند ابتدا به منظور ایجاد کاوشگرها با مواد فلورسنت نشاندار می شوند. سپس کاوشگر با کروموزوم های تعیین شده در بافر هیبریداسیون ترکیب می شوند. پس از این تیمار و دناتوره شدن DNA به رشته های مجزا، کاوشگر و محل تعیین شده برای اتصال مجدد[2] آماده می شوند. کاوشگر به طور اختصاصی با مکان مکمل خود بر روی کروموزوم، باند می شود. پس از شستشو و شناسایی با گزارشگر فلورسنت، سیگنال فلورسنت در محل هیبرید کاوشگر به طور جداگانه قابل مشاهده و تشخیص با میکروسکوپ اپی فلورسنت است (ناث، ۲۰۰۰).

هدف از این تحقیق مکان یابی 5S و rDNA 45S روی کروموزوم های متافازی جمعیت‌های مارچوبه های بومی ایران با استفاده از تکنیک هیبریدسازی فلورسانس در محل (FISH) می باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام FISH روی مارچوبه های بومی ایران، شش جمعیت شامل سه جمعیت دیپلوئید، تتراپلوئید، اکتاپلوئید از گونه *Asparagus. officinalis*، یک جمعیت دیپلوئید از گونه *A. persicus*، یک جمعیت دیپلوئید از گونه *A. verticillatus* و یک جمعیت اکتاپلوئید از گونه *A. breslerianus* مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور کروموزوم ها در حالت متافازی تثبیت شدند. دو کاوشگر[3] rDNA قرار گرفته در محل های 5S و 45S مورد استفاده قرار گرفتند. کلونینک و سیکوئنسینگ 5S و 45S از سلول های سوماتیکی *A. officinalis* L. انجام گرفت. DNA ریبوزومی 45S به وسیه دیگوزیخنین[4] و DNA ریبوزومی 5S نیز

[1] - Fluorescence *in situ* hybridization
[2] - Re-annealing
[3] - Probe
[4] - Digoxigenin-11-dUTP

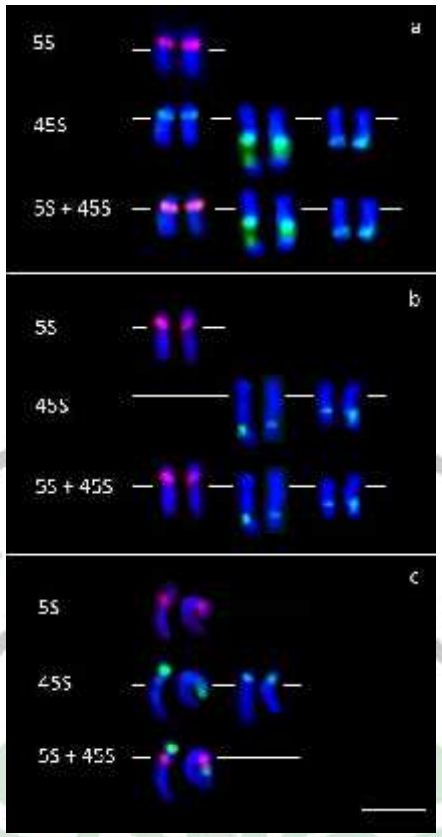
توسط بیوتین[1] نشاندار گردید. هر دو عمل توسط به کارگیری واکنش های نیک ترانس لیشن[2] انجام گرفت. برای هیبریداسیون کاوشگرها به وسیله آنتی بادی های استپتاویدین[3] و آنتی دیگوزیخنین[4] در یک درصد بلوکینگ بافر شناسایی شدند. برای ادامه اسلایدهای حاوی کروموزوم توسط DAPI و وکتاشیلد همراه با DAPI[5] تثبیت شدند. مشاهده اسلایدها با میکروسکوپ اپی فلورسنس لایکا[6] انجام گرفت و عکس ها با دوربین اسپات سی سی دی[7] دارای نرم افزار SPOT 2.1 گرفته شدند (کابررا و همکاران، ۲۰۰۲).

نتایج و بحث

بر اساس نتایج به دست آمده کروموزوم های متافازی گونه دیپلوئید *A. officinalis* (شکل ۱ a) دارای سه جفت DNA ریبوزومی 45S و یک جفت 5S می باشند. دو جفت 45S روی بازوی بلند و یک جفت آن روی بازوی کوتاه در کروموزوم های مختلف قرار گرفته اند. یک جفت 5S همراه با یک جفت 45S به صورت مشترک روی یک کروموزوم دیده می شوند. سیگنال مشترک 5S و 45S روی کروموزوم متوسط (به لحاظ طولی) و روی بازوی کوتاه کروموزوم نزدیک سانترومر شناسایی شد. کروموزوم های متافازی گونه دیپلوئید *A. persicus* (شکل ۱ b) دارای دو جفت DNA ریبوزومی 45S روی انتهای بازوی بلند و یک جفت 5S روی بازوی کوتاه نزدیک سانترومر روی کروموزوم های مختلف می باشند. یک جفت 45S و یک جفت 5S روی کروموزوم متوسط و جفت دیگر 45S روی بلندترین کروموزوم ظاهر شدند. کروموزوم های متافازی گونه دیپلوئید *A. verticillatus* (شکل ۱ c) دارای دو جفت DNA ریبوزومی 45S و یک جفت 5S می باشند. هر سه جفت 45S و 5S روی بازوی کوتاه و روی کروموزوم های بلند شناسایی شدند. یک جفت 45S و یک جفت 5S به صورت مشترک روی بازوی کوتاه یک کروموزوم ولی با کمی فاصله از یکدیگر ظاهر شدند. سیگنال 5S در نزدیک سانترومر و سیگنال 45S انتهای بازوی کوتاه مشاهده گردیدند.

همچنین نتایج نشان داد که کروموزوم های متافازی گونه تتراپلوئید *A. officinalis* دارای شش جفت DNA ریبوزومی 45S و دو جفت 5S می باشند. هیچ کدام از سیگنال های 5S و 45S روی کروموزوم مشترک مختلف قرار نداشتند. روی کروموزوم های متافازی گونه اکتاپلوئید *A. officinalis* ۱۲ جفت DNA ریبوزومی 45S و چهار جفت 5S شناسایی شدند. کروموزوم های متافازی گونه اکتاپلوئید *A. breslerianus* ۱۲ جفت DNA ریبوزومی برای 45S و چهار جفت برای 5S سیگنال نشان دادند. دو جفت 45S همراه با دو جفت 5S سیگنال به صورت مشترک روی یک کروموزوم ظاهر شدند.

[1] - Biotin-Cy3-dUTP
[2] - Nick translation reactions
[3] - Streptavidin-Cy3 conjugates (Sigma, St. Louis, MO, USA)
[4] - Anti-digoxigenin-FITC (Roche Corporate)
[5] - Vectashield with DAPI (vector Laboratories, Inc)
[6] - Leica DMR epifluorescence microscope
[7] - SPOT CCD camera



شکل ۱- قرارگیری 5S rDNA (سیگنال قرمز) و 45S (سیگنال سبز) روی کروموزوم های گونه های دیپلوئید مارچوبه.
(a): کروموزوم های متافازی *A. officinalis* .(d): کروموزوم های متافازی *A. persicus* .(g): کروموزوم های متافازی *A. verticillatus* .اندازه مقیاس= 10 µm

در اکثر یوکاریوت ها DNA ریبوزومی 5S و 45S به صورت جداگانه روی یک کروموزوم یا روی کروموزوم های مختلف قرار گرفته اند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر گونه دیپلوئید *A. officinalis* یک جفت جایگاه 5S روی بازوی کوتاه و سه جفت جایگاه 45S (دو جفت روی بازوی بلند و یک جفت روی بازوی کوتاه) شناسایی شدند که با نتایج دنگ و همکاران (۲۰۱۲) در مورد موقعیت 45S در کروموزوم *A. officinalis* همخوانی دارد اما درباره مکان 5S مطابقت ندارد. طبق نتایج این تحقیق، *A. persicus* و *A. verticillatus* دو جفت سیگنال 45S برای جایگاه نشان دادند در حالی که *A. officinalis* سه جفت سیگنال 45S بروز دادند. لی و آروموگاناتان (۲۰۰۱) بیان کردند که بسته به منشا و تکامل ژنوم، گسترش و تعداد rDNA در ژنوم در بین گیاهان متفاوت است. جایگاه های DNA ریبوزومی 45S و 5S توانایی حفاظت از سیکوئنس های DNA را دارند (هوانگ و همکاران، ۲۰۱۵).

امروزه تکنیک FISH به عنوان روشی مناسب برای شناسایی قطعات مخصوص DNA در کروموزوم های متافازی به کار گرفته شده است. با افزایش دسترسی به کاوشگرهای DNA و رشد روش های جدید تهیه پروب ها، اکنون امکان ردیابی توالی خاصی از یک قطعه DNA بر گستره کروموزمی فراهم گردیده است. در تحقیق حاضر انجام FISH و شناسایی نواحی 5S و 45S روی کروموزوم های گونه های *A. persicus*, *A. verticillatus* و *A. breslerianus* برای اولین بار گزارش شده است. شناسایی DNA ریبوزومی به طور مستقیم روی کروموزوم ابزار مناسبی را برای تحقیق در مورد کروموزوم و تکامل ژنوم فراهم می کند. مشاهده سیگنال های هیبرید شده روی کروموزوم ها، امکان نقشه یابی فیزیکی ژن های مارچوبه را فراهم می کند.

منابع

1. Cabrera, A., Martin, A., & Barro, F. 2002. *In-situ* comparative mapping (ISCM) of Glu-1 loci in Triticum and Hordeum. Chromosome Res, 10:49–54.
2. Gall, J., & Pardue, M. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 63: 378-383.
3. Hwang, Y.J., Song, Ch. M., Younis, A., Kim, Ch.K., Kang, Y.I., & Lim., K.B. 2015. Morphological characterization under different ecological habitats and physical mapping of 5S and 45S rDNA in *Lilium distichum* with fluorescence *in situ* hybridization. Revista Chilena de Historia Natural, 88:8. DOI 10.1186/s40693-015-0037-3.
4. John, H., Birnstiel, M., & Jones, K. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature, 223: 582-587.
5. Li, L., & Arumuganathan, K. 2001. Physical mapping of 45S and 5S rDNA on maize metaphase and sorted chromosomes by FISH. Heredims, 134: 141-145.
6. Nath, J. 2000. A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. Biotech Histochem, 75: 54-78.

Physical chromosome mapping of 5S and 45S rDNA of Iranian Asparagus

S. J. Mousavizadeh*[1], M. R. Hassandokht[1], A. Kashi[1], J. Gil[2], A. Cabrera[2]

1- Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. 2- Department of Genetics, University of Cordoba, Cordoba, Spain.

*Corresponding author: mousavizadeh@ut.ac.ir

Abstract

Four wild *Asparagus* species were collected from different natural site of Iran. The physical localization of 45S (18S-5.8S-25S) and 5S rDNA sites by fluorescent *in situ* hybridization on metaphase spreads of diploid, tetraploid and octoploid accessions was studied. FISH technique obviously revealed that there are three pairs for 45S rDNA sites and one pair for 5S site in the diploid *A. officinalis*. Also it has confirmed that in diploid populations of *A. persicus* and *A. verticillatus* each chromosome pair are characterized by a distinct pattern of one pair for 5S and two pairs for 45S rDNA locations. Furthermore, mitotic metaphase of *A. breslerianus* (2n=8x=80) are showing 12 pairs loci for 45S rDNA and four pairs loci for 5S rDNA.

Key words: Asparagus, Chromosome, Fluorescent *in situ* hybridization, FISH.