شناسایی نشانگر DNAی DAF دارای پیوستگی با ژن Yr۵ مقاومت به زنگ زرد گندم

علی اکبر شاه نجات بوشهری، بهمن یزدی صمدی و سیروس عبدمیشانی

بترتیب دانشجوی دوره دکتری و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۷/۷

خلاصه

زنگ زرد یکی از بیماریهای مهم گندم در ایران است که هرساله خسارات قابل توجهی به گندم وارد می سازد. موثرترین و اصلی ترین روش کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. برای شناسایی یک نشانگر مولکولی حاوی پیوستگی با یکی از ژن های مقاومت به زنگ زرد (Yr۵) از DNAگیاهان $F_۲$ حاصل از تلاقی دو رقم مقاوم و حساس برای ژن Yr۵ استفاده شد. DNA ی دو توده ازگیاهان حساس و مقاوم به طور جداگانه تهیه گردید، و با استفاده از ۲۷۲ آغازگر تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی پلی مورفیسم نوارهای DAF حاصل از تکثیر DNA معلوم شد که یکی از نوارها با مقاومت به زنگ به طور کامل پیوستگی نشان می دهد.

واژه های کلیدی : زنگ زرد، نشانگرهای مولکولی DAF،PCR، BSA ، پلی مورفیسم ، سلکسیون ژنوتیپی، گندم، ژن مقاومت

مقدمه

زنگ زرد یکی از بیماریهای مهم گندم در ایران است که هر ساله خسارات قابل توجهی به گندم وارد می سازد. استفاده از نشانگرهای مولکولی برای انتخاب در هیچیک از برنامه های اصلاحی ایران تاکنون مرسوم نبوده، لذا از این جهت تحقیقی در این زمینه صورت نگرفته و این بررسی اولین در نوع خود در ایران و از نظر مقاومت برای بیماری زنگ زرد گندم در جهان است. تاکنون قسمت اعظم مطالعات با استفاده از نشانگرهای RFLP[1] بوده است اخیرا" فناوری مبتنی بر آغازگرهای اختیاری نظیر DAF[2] و RAPD[3] نیز مرسوم گردیده است. این گونه فنون مولکولی بر خلاف RFLP، مبتنی بر تکثیر آنزیمی قطعات مختلف DNA با یک آغازگر اختیاری است که تولید مجموعه ای از قطعات DNA می کند و انگشت نگاری حاصل به منظور شناسایی به کار می رود.

روش DAF مبتنی بر PCRتک آغازگری است که در آن قطعات تکثیر شده DNAبر اساس اندازه در ژل پلی اکریلامید از هم جدا و توسط رنگ آمیزی نقره قابل رویت می‌شوند. مزایای روش DAFبر فنون RFLPو RAPD عبارتند از : تفکیک بهتر قطعات تکثیر شده، حساسیت بیشتر در آشکارسازی DNAو ثبت شدن دائمی DNAدر ژل های خشک شده به طوری که می توان در آینده برای تکثیر مجدد و کلون کردن از آنها استفاده کرد. DAFاز نظر سه جنبه عمده با RAPD متفاوت است : ۱) در این روش از آغازگرهای ۸ نوکلئوتیدی استفاده می شود با این حال با این حال از نوکلئوتیدهای خیلی کوتاه ۵ واحدی هم می توان استفاده کرد، ۲) قطعات تکثیر شده DNAبر

1 - Restriction Fragment Lenght Polymorphism (RFLP)

2 -DNA Amplification Fingerprinting (DAF)

3 - Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

روی ژل های پلی اکریلامید حاوی اوره ۷ مول از هم جدا می شوند. پشت این ژل ها، فیلم های پلی استری است و نوارها توسط رنگ‌آمیزی با نقره آشکار می شوند و ۳) درDAFبرخلاف RAPDنسبت غلظت مولاری آغازگر / الگو در واکنش بالاست (۱). با توجه به عوامل ذکر شده DAF تولید تعداد زیادی نشانگر ژنتیکی می کند زیرا عملا" تعداد نامحدودی مکان ژنی را آشکار می‌کند (۱۰).DAF قادر به کشف تفاوت دربسیاری از موجودات مانند حیوانات ، گیاهان و باکتری ها می باشد این روش هم چنین موجودات کاملا" نزدیک مانند ایزوله های باکتریایی،ارقام گیاهی، لاین های ایزوژن و افراد انسانی را از هم تمیز می دهد(۲).

برای شناسایی نشانگرهای نزدیک به ژن مورد نظر، روش تجزیه تفرق یافته های توده ای (BSA)[1] از کارایی لازم برخوردار است (۱۲). این روش شامل مقایسه دو نمونه از DNAمخلوط یک جامعه در حال تفکیک حاصل از یک تلاقی است. هر نمونه شامل افرادی است که از حیث یک صفت خاص یا یک ناحیه ژنومی یکسان هستند بنابراین دو نمونه مخلوط از لحاظ ژنتیکی در ناحیه مورد نظر مشابه نیستند و معمولا" برای سایر نواحی نیز ناخالص اند. در مرحله بعد دو نمونه برای تفاوت های موجود خود توسط آغازگرها بررسی می شوند. استفاده از روش BSAجهت سلکسیون مقاومت به بیماری با استفاده از نشانگرهای مولکولی باعث کاهش زمان لازم جهت تهیه جمعیت های مقاوم و حساس به بیماری شده و در نتیجه کاربرد این تکنیک را تسهیل کرده است. با استفاده از روش PCRو با کاربرد روش BSA نشانگرهای DNAدارای پیوستگی با ژن های مقاومت به پوسیدگی اسکلروتینیا در شبدر قرمز (۱۴)، مقاومت به زنگ طوقه در یولاف ، (۱۵)، مقاومت به زنگ در لوبیا (۱۳)، مقاومت به آنتراکنوز در لوبیا (۲۰) شناسایی شده اند.

هدف از این تحقیق ، شناسایی نشانگر DAF حاوی پیوستگی با ژن Yr۵ برای مقاومت به زنگ زرد است .

مواد و روشها

مواد گیاهی : از گیاهان F_2 حاصل از تلاقی واریته قدس (حساس) و گندم T. spelta album (مقاوم) برای ژن Yr۵ استفاده شد . گیاهان F_2 با نژاد ۲۵۰AT ۲۳۴E زنگ آلوده و گیاهان حساس ومقاوم مشخص شدند.

تشکیل توده هابرای روش BSA: DNAژنومی توسط روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) از برگها استخراج گردید و کیفیت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل SHIMADZU UV-VIS RECORDING SPECTROPHOTOMETER UV-160 A تعیین گردید. هریک از توده های مقاوم و حساس از مخلوط مساوی DNA ده ژنوتیپ مربوط به خود تهیه شد.

تکثیر DNA : مجموعا" ۱۵۲ آغازگر UBC[2] و ۱۲۰ آغازگر از نوع ریز - سنجاقی (۵) برای شناسایی نشانگر نزدیک به ژن Yr۵ به کار رفت. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده عبارت بود از : ۱۲/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل ، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر و حاوی کلرورمنیزیم ۱۵ میلی مول (تریس ۱۰۰ میلی مول، کلرور پتاسیم ۵۰۰ میلی مول با pHبرابر ۸/۳)، ۴ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱/۲۵ میلی مول ، ۱ میکرولیتر آغازگر UBC(۱۰ میکرومول)/ ۱ میکرولیتر آغازگر ریز - سنجاقی[3] (۳۰ میکرومول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلی مراز (۵ واحد در میکرولیتر Boehringer Mannheim) و ۵ میکرولیتر DNAالگو (۱ نانوگرم). غلظت های نهایی مواد بکار رفته عبارتند از بافر: × ۱، منیزیم: ۱/۵ میلی مول، مخلوط نوکلئوتیدی: ۰/۲ میلی مول ، آغازگرUBC : ۰/۴ میکرومول، آغازگر ریز - سنجاقی : ۱/۲ میکرومول و غلظت تک پلی مراز : ۰/۲ نانوگرم. قطعات DNA در ترموسیکلرفارماسیا (Gene ATAQ Controller) با سه چرخه مختلف: یک چرخه (۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه) ۴۵ چرخه (۹۲ درجه یک دقیقه، ۳۵ درجه یک دقیقه، ۷۲ درجه ۲ دقیقه) و یک چرخه (۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه) تکثیر گردید. قطعات تکثیر شده DNAدر ژل های عمودی (۱۰ × ۸ سانتیمتر) پلی اکریلامید ۱۰٪ با ضخامت ۰/۴۵ میلی متر که پشت آنها فیلم های پلی استری، (Gel Bond PAG film FMC Bioproducts) بود تکثیر گردید. به هر تیوب حاوی قطعات تکثیر شده ۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و حباب تشکیل شده DNA به یک تیوب جدید وارد شد. ۳ میکرولیتر DNA از این تیوب با ۳ میکرولیتر بافر نمونه گذاری (اوره ۵ مول و

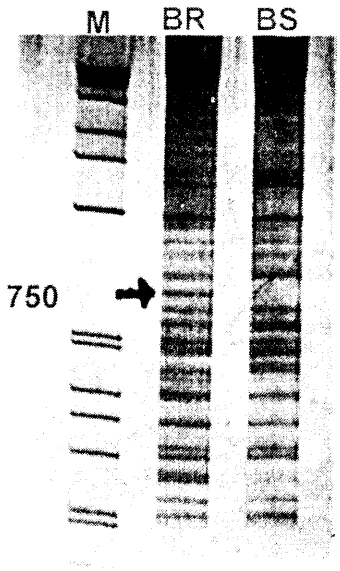
1 - Bulked Segregant Analysis (BSA) 2 - University of British Columbia 3 - mimi-hairpin

۰/۰۲ درصد زیلن سیانول) مخلوط و نمونه گذاری در چاهک ها صورت گرفت. ولتاژ الکتروفورز برابر ۳۰۰ و تا رسیدن رنگ بالایی بافر نمونه گذاری در زیر الکترود، کارالکتروفورز ادامه یافت (۲). پس از اینکه الکتروفورز انجام شد ژل هایی که پشت آنها فیلم پلی استری بود طبق روش بسام و همکاران (۱۹۹۳) رنگ آمیزی و در دمای اتاق خشک و دائمی گردید. با این روش ژل‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در اسید استیک ۷/۵ درصد ثابت شدند و با آب مقطر سه بار و هر بار به مدت دو دقیقه شسته شدند. در مرحله بعد ژل ها مدت ۲۰ دقیقه در نیترات نقره قرار گرفتند سپس سریعا" با آب مقطر شسته شدند. برای ظهور، فیلم ها در محلول ظاهر کننده وارد و به این کار در اسید استیک ۷/۵ درصد سرد خاتمه داده شد. سپس ژها با آب شسته شده و در مرحله نهایی به مدت ۵ دقیقه در محلول ضد ترک قرار گرفتند.

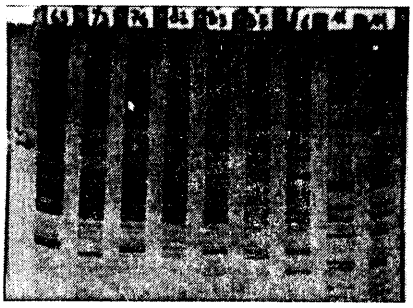
نتایج و بحث

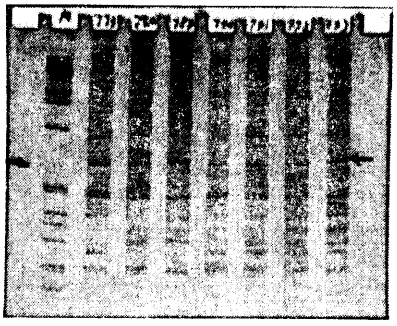
چهارنوع تکثیر توسط دستگاه PCRبه شرح زیر انجام شد: ۱) والد مقاوم، ۲) والد حساس، ۳) DNAمخلوط شده گیاهان مقاوم از نسل F_2، ۴) DNAمخلوط شده گیاهان حساس از نسل F_2 ، ژل های رنگ آمیزی شده به صورت ظاهری از نظر حضور نوارهای چند شکل بین DNA های مقاوم و حساس مورد مطالعه قرار گرفت.

از مجموع ۲۷۲ آغازگر به کار رفته برای شناسایی چند شکلی بین دو والد مقاوم و حساس تعداد ۲۹ آغازگر هیچ نواری تولید نکرد. بقیه به طور متوسط ۱۷ نوار نشان دادند که از ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز متغیر بودند نشانگر ملکولی استاندارد مورد استفاده 1Kb ladder (۷۵-۱۲۲۱۶bp) بود که از آن برای تعیین اندازه قطعات تکثیر شده DNA استفاده گردید. از بین آغازگرهای که مورد استفاده واقع شدند آغازگر موسوم به UBC - ۱۰۰ با توالی "5ATCGGGTCCG3" تولید یک نوار اضافی در والدهای مقاوم کرد، در حالیکه سایر آغازگر ها در هر دو گروه مقاوم و حساس نوارهای کاملا" مشابهی ایجاد کردند (شکل ۱). برای تایید کارایی نشانگر مولکولی Yr5 در سایر ژنوتیپ ها ، ۱۴ واریته مقاوم مورد مطالعه قرار گرفتند که همگی نوار مذکور را نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۱ - شناسایی چند شکلی با استفاده از روش BSA، در این شکل نوار چند شکل تکثیر شده توسط آغازگر UBC-۱۰۰ در توده مقاوم نشان داده شده است. طول قطعه چند شکل در سمت چپ نشان داده شده است . نشانگر مورد استفاده 1Kb DNA LAdder است. BR: توده مقاوم ،BS: توده حساس و M نشانگر مولکولی .





شکل ۲ - تأیید کارایی نشانگر مولکولی مشخص شده در ۱۴ ژنوتیپ مقاوم، کلیه ژنوتیپ ها، نشانگر مقاومت را نشان می دهند.

هرچند نشانگر های مورفولوژیکی در اصلاح نباتات متداول مورد استفاده بوده اند ولی دارای محدودیت هایی می باشند به طوری که مساعی پژوهشگران را به انواع دیگر نشانگر های ژنتیکی سوق داد. نشانگرهای ظاهری از قاطعیت لازم برخوردار نبوده به طوری که زمینه را برای استفاده از نشانگرهای پروتیین فراهم نمود. نشانگرهای مذکور نیز معایب خاص خود را به همراه داشت. در سالهای اخیر بیولوژی مولکولی ابزارهای مناسبی را برای تجزیه و تحلیل جامع تر فراهم آورده است که بنیادی ترین آنها نشانگر های DNAاست. با اتکا بر پیوستگی نشانگر مولکولی و آلل صفت مورد نظر (مانند مقاومت به بیماری) حضور یا عدم حضور آلل بدون نیاز به تظاهر آن قابل پیش بینی است. بنابراین ژن های مقاومت را می توان بدون به کار گیری پاتوژن زنده انتخاب کرد. کارایی نشانگرهای مولکولی در تشخیص صفات تک ژنی در مطالعات زیادی به اثبات رسیده است. در آغاز میشکل مور و همکاران (۱۹۹۱) از روش BSA استفاده کردند.

BSAروش سریع و ساده ای برای شناسایی نشانگرهای نزدیک به ژن های خاص می باشد. نیاز آن در اختیار داشتن یک جامعه حاصل از یک تلاقی است که در خصوص ژن مورد نظر تفرق پیدا می کند. موفقیت روش بستگی به وجود تفاوت ژنتیکی در بین والدین در ناحیه ژنومی هدف دارد. در BSA افراد طوری دسته بندی می شوند که ناحیه ای خاص از ژنوم بتواند بررسی شود. حداقل تعداد افراد تشکیل دهنده یک توده در BSA براساس مقدار فراوانی ظهور مکان های ژنی ناپیوسته (به صورت پلی مورفیک) در بین نمونه های بالک شده تعیین می شود. این نیز به نوبه خود به ماهیت نشانگر (غالبیت یا همبارزی) و نوع جامعه (F_2 ، تلاقی برگشتی و..) تحت بررسی بستگی دارد. برای نشانگر غالبی که در یک جامعه تفرق F_2 پیدا می کند، در حالت عدم وابستگی نشانگر به ژن هدف ، احتمال اینکه یک توده با n فرد دارای نواری باشد که توده دیگر با همان تعداد فرد فاقد نوار مذکور باشد $(\frac{1}{4})^n(\frac{1}{4}^n]-1)2$است . بنابراین برای تشکیل توده نیاز به افراد زیادی نیست ، احتمال اینکه یک مکان ژنی ناپیوسته در بین دو توده ۱۰ عضوی چند شکلی نشان دهد 2×10^{-6} می باشد. حتی زمانی که بین تعداد زیادی مکان ژنی غربال سازی انجام می شود شانس ظهور یک مکان ژنی ناپیوسته کوچک می شود (۱۲).

مطالعه حاضر آشکار ساخت که روش BAS ابزار مناسبی برای شناسایی ژن مقاومت در گیاهی مانند گندم است که از ژنوم بزرگی برخوردار می باشد (شکل ۱). توسعه پاتوژن ها و آفات به مقدار زیاد به شرایط محیطی بستگی دارد. تظاهر مقاومت در گیاهان نیز تابع شرایط محیطی است. بنابراین گزینش برای مقاومت در شرایط مزرعه به خاطر بستگی آن به عوامل محیطی معایب خاص خود را به همراه دارد. شناسایی نشانگر نزدیک به ژن Yr۵ قدم مهمی در تهیه ارقام گندم مقاوم به بیماری زنگ است. به کمک این نشانگر مولکولی به نژادگران گندم قادر خواهند بود که گیاهان مقاوم به زنگ را بر مبنای ژنوتیپ انتخاب کنند به طوری که مزیت بارزآن نسبت به روشهای متداول اصلاحی گندم بر کسی پوشیده نیست . با این روش تهیه واریته های مقاوم به زنگ باکارایی بیشتر صورت خواهد گرفت و موقعیت خوبی را برای تهیه ارقام در غیاب فشارهای گزینشی فراهم می کند. این گونه تحقیقات احتمال استقرار نژاد خاصی از بیماری زنگ در مناطقی که هنوز حضور آنها به اثبات نرسیده راکاهش می دهد . به علاوه استفاده از ارزیابی مبتنی برDNA که نیاز به آلوده کردن گیاه ندارد از خطر فرار پاتوژن در محیط جدید می‌کاهد. اضافه می گردد که تأسیس شرکتهای ایرانی تامین کننده مواد و لوازم آزمایشگاهی ، نسبت به گذشته کمک شایانی به اقتصادی بودن این روش در ایران کرده است .

REFERENCES

1. Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. and P. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staning of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196, 80-83.
2. Caetano-Anolles, G. and B. J. Bassam. 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitary oligonucleotide primers. Applied Biochemisrty and Biotechnology. 24, 189-198.
3. Caetano-Anolles, G., Callahan, L. M., and P.M. Gresshoff. 1997. The origin of bermudagrass

(Cynodon) off-type inferred by DNA amplification fingerprinting. Crop Sci. 37, 81-87.

4. Caetano-Anolles, G. Callanhan, L. M., and P. E. Williams. 1995. DNA amplification fingerprinting analysis of bermudagrass (cynodon): genetic relationships species and interspecific crosses. Theor. Appl. Genet. 91, 228-235.
5. Caetano-Anolles, G., and P. M. Gresshoff. 1994. DNA amplification fingerprinting using arbirary mini-hairpin oligonucleotide primers. Bio/Technology. 12, 619-623.
6. Caetano-Anolles, G. and P. M. Gresshoff. 1996. Generation of sequence signatures from DNA amplification fingerprints with mini-hairpin and microsatellite primers. Biotechniques, 20, 1044-1056.
7. Cerny, T. A. Caetano-Anolles, G. and R. N. Trigiano. 1996. Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of petunia taxa. Theor. Appl. Genet. 92, 1009-1016.
8. Dweikat, I., Ohm, H., Patterson, F., and S. Cambron 1997. Identification of RAPD markers for 11 Hessian fly resistance genes in wheat . Theor. Appl. Genet. 94, 419-423.
9. Dellaporta, S. L., Wood J. and J. B. Hicks . 1983. A plant DNA minipreparation, version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1, 19-21.
10. Gresshoff, P. M., 1994. Plant genome analysis. CRC Press Inc.
11. Hu, X. Y. Ohm, H. W., and I. Dweikat. 1997. Identification of RAPD markers to the gene PM1 for resistance to Powdery mildew in wheat. Theor. Appl. Genet. 94, 632-840.
12. Michelmore, R. W., Paran,I., and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 9828-9832.
13. Miklass, P. N., Stavely. J. R., and J. D. Kelly. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. Theor. Appl. Genet. 85, 754-749.
14. Page, D., Delclos, B., Aubert, G. Bonavent, J. F., and C. Mousset-Declas. 1997. Sclerotinia rot ressistance in red clover. Identification on RAPD marker using bulk segregant analysis. plant breeding 116, 73-78.
15. Penner, G. A., Chong, J., Wight, C. P. Molnar, S. J., and G. Fedak. 1993. Identification of an RAPD marker for the crown rust resistance gene Pc68 in oats. Genome, 36, 818-820.
16. Prabhu R. R., Webb, D., Jessen, H. Luk, Smith, S. and P. M. Gresshoff. 1997. Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and Pedigree. Crop Sci. 37, 1590-1595.
17. Schachermayr, G., Siedler, H., Gate, M. D., and H. Winzeler. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leafrust resistance gene of wheat. Theor. Appl. Genet. 88, 110-115.
18. Subudhi, P. K., Borkakati, R. P., Virma, S. D., and N. Huang. 1997. Molecular mapping of a

thermosensitive genetic male sterility gene in rice using bulk segregant analysis. Genome, 40, 188-194

19. Weaver, K. R., Callahan, L. M., Caetano-Anolles, G., and P. M. Gresshoff. 1995. DNA amplification fingerprinting and hybridization alaysis of centipedegrass. Crop Sci. 35, 881-885.

20. Young, R. A., and J. D. Kelly. 1997. RAPD markers linked to three major anthracnose resistance genes in common bean. Crop Sci. 37, 940-946.

Identification of a DAF Marker for the Yellow Rust Resistance Gene Yr5 in Wheat

A. A. SHAHNEJAT-BUSHEHRI, B. YAZDI-SAMADI AND C. ABD-MISHANI

Respectively Ph.D. Student, and Professors Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Tehran Karaj Iran.

Accepted Sep 29, 1999

SUMMARY

Yellow rust in wheat occurs annually in most wheat-growing areas in Iran. The identification of molecular markers linked to yellow rust resistance has the potential to improve the efficiency of selection in wheat breeding programs. DNA Amplification Fingerprinting (DAF) technology was used with the objective of identifying DNA markers linked to the yellow rust resistance. Two bulks were made by pooling extracted DNA, each bulk (one resistant and one susceptible) being resulted from an F2 population obtained from a cross between a susceptible and a resistant parent. The bulks were evaluated with many random primers. One primer produced a band which was associated with the traget gene Yr5.

Key Words: Yellow rust, DAF, PCR, BSA, Molecular marker, Polymorphism, Linkage, Marker-assisted selection, Wheat, Resistance gene.