استفاده از تکنیک PCRبعنوان مارکر DNA در براسیکا

سیروس عبد میشانی

دانشیار گروه زارعت و اصلاح نباتات،دانشکده کشاورزی

دانشگاه تهران،کرج،ایران

تاریخ وصول هفدهم خرداد ماه ۱۳۷۳

چکیده

از تلاقی بین دو گونه مختلف Brassica napus ژنوم AACC با ۲n=۳۸ کروموزوم و Brassica nigra ژنوم BBبا ۲n=۱۶ کروموزوم تعدادی لاین با کروموزوم اضافی از ژنوم B بدست آمد.تعدادی از این لاینها پس از خود تلقیحی فاقد کروموزم اضافه بودند (یعنی ۲n=۳۸).لیکن سه صفت مقاومت گیاه به بیماری phoma lingam،بالا بودن مقداراسید اورسیک و glucosinolate در بذر را از خود نشان دادند. یعنی ژنهای مربوط به این صفات از B.nigraبه B.napus منتقل شده است. هدف از این مطالعه نشان دادن این موضوع از طریق استفاده از مارکرهای RAPD مختص ژنوم B در این لاینها بود که فاقد کروموزومهای ژنوم B بودند. برای این منظور تعداد ۴۶ تک بوته مربوط به ۱۳ لاین مختلف وگیاهان مربوط به گونه های B.nigra وB.napus مورد استفاده قرارگرفتند. تعداد ۲۰ primerکه مختص ژنوم B بود بکار رفت. از روش سریع Micropreparation برای استخراج DNAاستفاده شد. مقدار DNAاستخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر DU-6 اندازه گیری شد.حجم فعل وانفعال برای PCR ۱۵ میکرولیتر بود فقط یک پرایمر(OP-A۱۹)،مارکر مختص ژنوم B را در ۸ گیاه مربوط به ۳ لاین نشان داد.اندازه این مارکر یا Band حدود۱/۳Kb بود. تکرار آزمایش نشان داد که این مارکر(۱/۳ Kb) باثبات است.

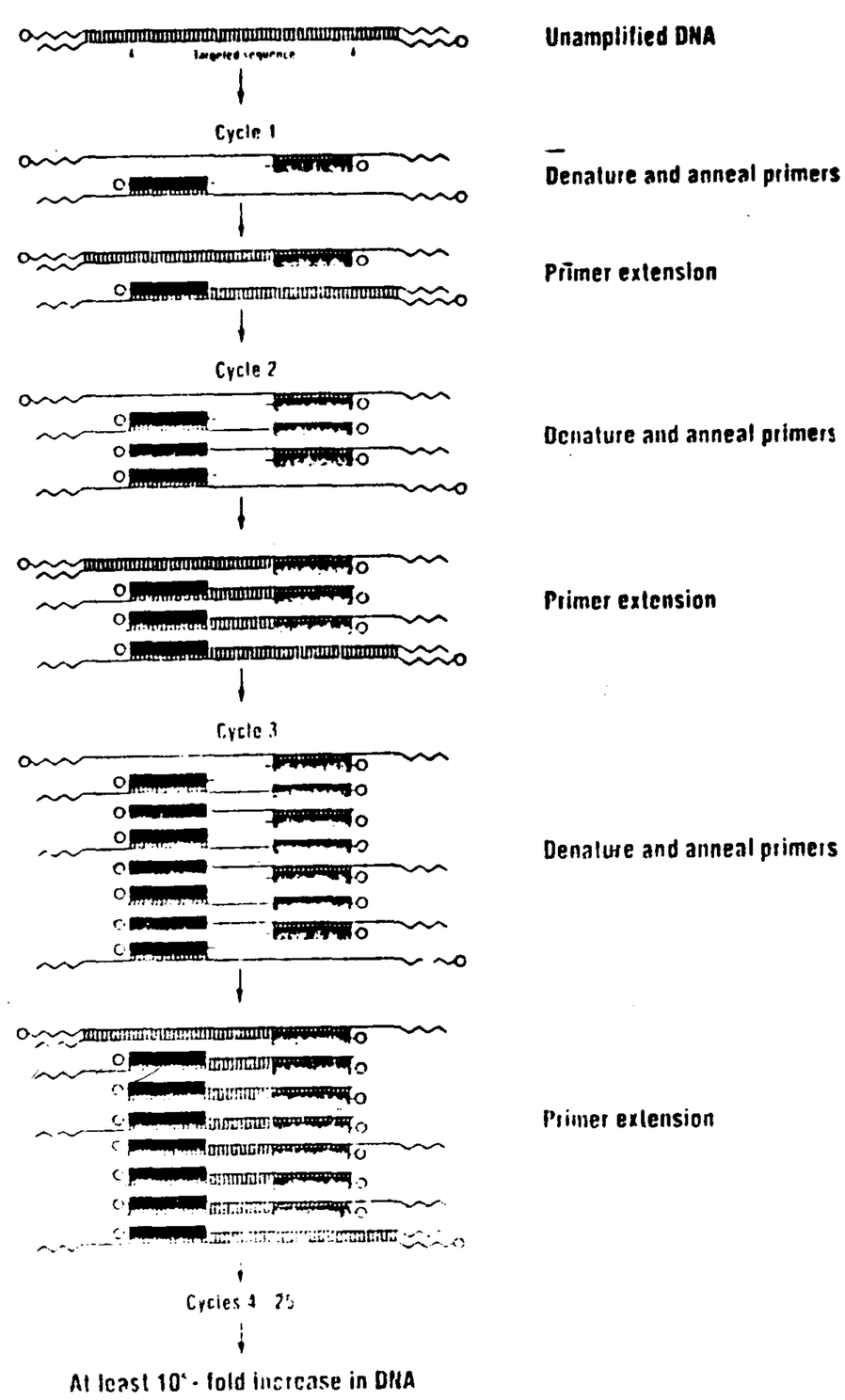
مقدمه

اصلاح نباتات کلاسیک بر پایه گزینش افراد برتر در میان نتایج در حال تفرق استوار است. گزینش معمولاً بر اساس فنوتیپ قابل روئیت یا صفات قابل اندازه گیری است.سودمندی سلکسیون بر اساس وضیعت فنوتیپ ممکن اسب بعلت اثرات محیط بر صفت اندازه گیری شده وتأثیر وراثت پیچیده صفاتی‌که توسط چندین ژن کنترل میشوندکاهش یابد.بسیاری از پیچیدگیهای گزینش بر اساس فنوتیپ رامیتوان‌از طریق گزینش مستقیم ژنوتیپ وبا استفاده از مارکرهای DNA که با صفات مورد نظر لینکاژ دارند برطرف نمود.امروزه از تکنیک RFLP[1] جهت تهیه نقشه لینکاژ گونه های مهم زراعی وتعیین محل ژن کنترل کننده صفات بسیار استفاده میشود(تانکسلی وهمکاران ۱۹۸۹). تکنیک RFLP دارای معایبی مانند طولانی بودن روش،هزینه زیاد،استفاده از مواد رادیو اکتیو وعدم تشخیص پلی مورفیسم کافی در بسیاری از گونه‌های زراعی است.لذا استفاده از این روش در بسیاری از گونه‌های زراعی است. لذا استفاده از این روش در بسیاری از آزمایشگاهها دارای محدودیت است.اخیراً تکنیک جدیدی بنام PCR[2] (RAPD[3]) توسط ویلیامز وهمکاران (۱۹۹۰)و ولش و همکاران (۱۹۹۱)گزارش شده است.استفاده ازاین تکنیک در ژنتیک واصلاح نباتات جدیدترین روش استفاده از مارکرهای DNA است. مزایای این روش ،سهولت ،سرعت ونیاز به مقدار کم DNAنمونه است.این تکنیک در ژنتیک واصلاح نباتات در موارد مختلفی استفاده شده‌است. از این بین میتوان به شناسائی سریع مارکرهائی که با ژنهای مقاومت به بیماری لینکاژ دارند با استفاده از پرایمرهای

1- Random Fragment Length Polymorphism 2- Plymerase Chain Reaction 3- Random Amplified Polymorphic DNA

تصادفی ولاینهای ایزوژن (مارتین وهمکاران ۱۹۹۱)،تجزیه بالک تفکیک شده BSA[1](میچل مور وهمکاران ۱۹۹۱) طبقه بندی ژنوتیپ‌ها (هو وهمکاران ۱۹۹۱)،شیافنک وکایروس ۱۹۹۳ وتعیین پلی مورفیسم در واریته های زراعی (دوویلت وهمکاران ۱۹۹۳،فولاد وهمکاران ۱۹۹۳،عبدمیشانی وکوالست،۱۹۹۴) اشاره کرد انتظار میرود در آینده پس از رفع برخی از نقایص آن،یعنی عدم تشخیص هیبرید وعدم تکرار پذیری بعضی از باندها،این روش جایگزین ویا مکمل روش RFLPشود. در این روش DNAنمونه مورد نظر همراه با یک قطعه DNA مصنوعی بنام پرایمر که طول آن بسیار کوتاه (حدود ۱۰ جفت باز) است در مجاورت آنزیم Taq polymerase ،بازهای dNTP وکلرومنیزیم وبافرتریس در میکروتیوب (۵۰۰ میکرولیتری) و حجم محلول که حدود ۲۵ میکرولیتر است واصطلاحاً حجم فعل وانفعال نامیده میشود در دستگاه ترموسیکلر (دستگاه PCR) قرار میگیرد. در داخل میکروتیوب فعل وانفعالاتی انجام می شود(شکل ۱). قطعه DNA مورد نظر در اثر حرارت تولید شده توسط دستگاه (۹۲درجه سانتیگراد) تک رشته شده که این فرآیند را denaturingگویند.DNAمصنوعی با پرایمر که دارای توالی باز مشخص است توالی مشابه خود را در رشته‌های انفرادی DNAنمونه پیدا کرده وبه آن جفت میشود (Annealing) سپس به کمک آنزیمTaq polymeraseتکثیر یا اصطلاحاً Amplify میشود که آنرا Extensionگویند. در اینجا تکثیر DNAتمام میشود واین مراحل برای سیکلها یا دورهای متعدد (حدود ۵۰-۴۵ دور) صورت گرفته ودر نهایت میلیونها قطعه DNAبا اندازه‌های مختلف تکثیر میشود که این فرآیند را"تکثیرتصادفی DNA" گویند. اصطلاح "راپید" از جمله "چند شکلی یاپلی مورفیسم در DNAحاصل از تکثیر تصادفی "آمده است. پلی مورفیسم یا چند شکلی حاصل تغییرات باز در محل اتصال پرایمر به (DNA مانند موتاسیون نقطه‌ای) یا تغییرات کروموزومی (مانند اضافه شدن، حذف یامعکوس شدن) است که در نتیجه اندازه قطعه DNA را تغییر داده و یا اینکه از تکثیر موفقیت آمیز آن جلوگیری میکند. از آنجائیکه Southern hybridization مورد نیاز نیست در نتیجه"پلی مورفیسم" را میتوان در قطعاتی که دارای توالیهای مکرر زیادی است نیز دید که این خود مزیتی بر تجزیه RFLP است.

قطعات تکثیر شده حاصل (راپید) بر طبق اصول مندل تفرق پیدا



شکل ۱ - فرآیند مراحل مختلف فعل و انفعال در زنجیره پلی مراز

کرده بنابراین از آن میتوان بعنوان مارکر های ژنتیکی یا اصطلاحاً مارکرهایDNA استفاده نمود. مزایای این تکنیک قابلیت تشخیص پلی مورفیسم زیاد، سادگی، سرعت و نیاز به مقدار کم DNA نمونه است.

مواد و روشها

۱ - مواد گیاهی از تلاقی بین دو گونه مختلفBrassica napusبا ژنوم AACC و ۳۸ =۲n کروموزوم وBrassica nigra با ژنوم BB و ۱۶ =۲n کروموزوم تعدادی لاین با کروموزوم اضافی از ژنوم B بدست آمد. تعدادی از این لاینها پس از خود تلقیحی فاقد کروموزوم اضافه ازB.nigraبود (یعنی ۳۸ =۲n کروموزوم) لیکن سه صفت مقاومت به بیماری Phoma lingan،بالا بودن مقدار اسید اورسیک و Glucosinulate در بذر را از خود نشان دادند.

۲ - استخراج DNA:از روشMicropreparation (هو و همکاران ،

1- Bulk Segregant Analysis

۱۹۹۱) برای استخراج DNAبرگ گیاهان استفاده شد. مقدار ۳۰۰ میلیگرم برگ از ۲ تا ۳ گیاه جوان (طول عمر دو هفته) همراه با ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی مولTris,(PH=۸) ۵۰ میلی مول EDTA (PH=۸) ۵۰۰ میلی مول کلرورسدیم و ۱/۲۵ در صد SDS، در ظروف مخصوص با هاون چینی له شد. نمونه استخراج شده به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید و در حمام آب گرم با حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم ۵ مول به تیوب اضافه گردید و برای مدت ۱۰ دقیقه در حرارت صفر درجه باقی ماند. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوب اضافه شد و پس از مخلوط کردن براین مدت ۵ دقیقه در میکروسانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (۹۰۰۰×G) قرار گرفت ، عصاره حاصل به تیوب جدید منتقل گردید. بعد ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به تیوب اضافه شد و برای مدت ۲ دقیقه بحالت سکون قرار گرفت. سپس برای مدت ۱۰ دقیقه در میکرو سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه(۹۰۰۰×G) قرار گرفت تاDNA رسوب کند. در این زمان DNAحاصل در میکروتیوب با اتانول ۷۰ درصد سرد شسته شد و برای مدت ۵ دقیقه بحالت وارونه روی دستمال کاغذی قرار گرفت تا خشک شود. سپس مقدار ۳۰۰ میکرولیتر بافر"TE"(Tris ۱۰میلی مول و EDTA۱ میلی مول) و ۵ میکرولیتر RNase(۱۰mg/mL) به DNA اضافه شد و پس از مدت ۲۰ دقیقه نمونه هایDNA به یخچال با ۴درجه حرارت سانتیگراد منتقل گردید. برای اندازه‌گیری مقدارDNA استخراج شده از اسپکتروفوتومتر Beckman با طول موج UV برابر nm ۲۶۰ استفاده شد.

۳ - تکثیر DAN : تعدادی پرایمر تصادفی (بطول ۱۰ جفت باز) که از کارخانه (Operon Technologies,Alameda,CAL) خریداری شده و باندهای خاص ژنوم Bرا نشان میداد جهت انجام PCRبکار رفت. این پرایمرها عبارت بودند از :

OPA19,OPA18,OPA16,POA15,OPA12
OPA10,OPA8,OPA3,OPA2,

OPB18, OPB17,OPB16,OPB12,OPB11,OPB10,
OPB9,OPB7,OPB5,OPB4 , OPB3,

از پروتکل گزارش شده توسط هو و کایروس (۱۹۹۱)برای انجام PCRاستفاده شد. اجزاء فعل و انفعال (Reaction Component) برای یک نمونه عبارت بود از10Xبافر [X-100

۰/۲,[50mM KCl ,10mM Tris-Hcl(pH 9.O),O.01%Triton
میلی مولdNTP, ۰/۲ میکرومول پرایمر ، ۱ واحد آنزیم Taq polymerase ، ۲۵ نانوگرام DNA نمونه، آب استریل دو بار تقطیر شده و ۱/۹ میلی مول کلرورمنیزیوم. حجم نهائی فعل و انفعال در هر میکروتیوب برای تکثیر DNA ۲۵ میکرولیتر بود. آنزیم Taq polymerase و10x بافراز شرکت promega (Madison,Wisconsin) خریداری شد. برای تکثیرDNA از دستگاه ترموسیکلر ساخت Perkin ELmer استفاده شد. برنامه داده شده به دستگاه بشرح زیر بود:

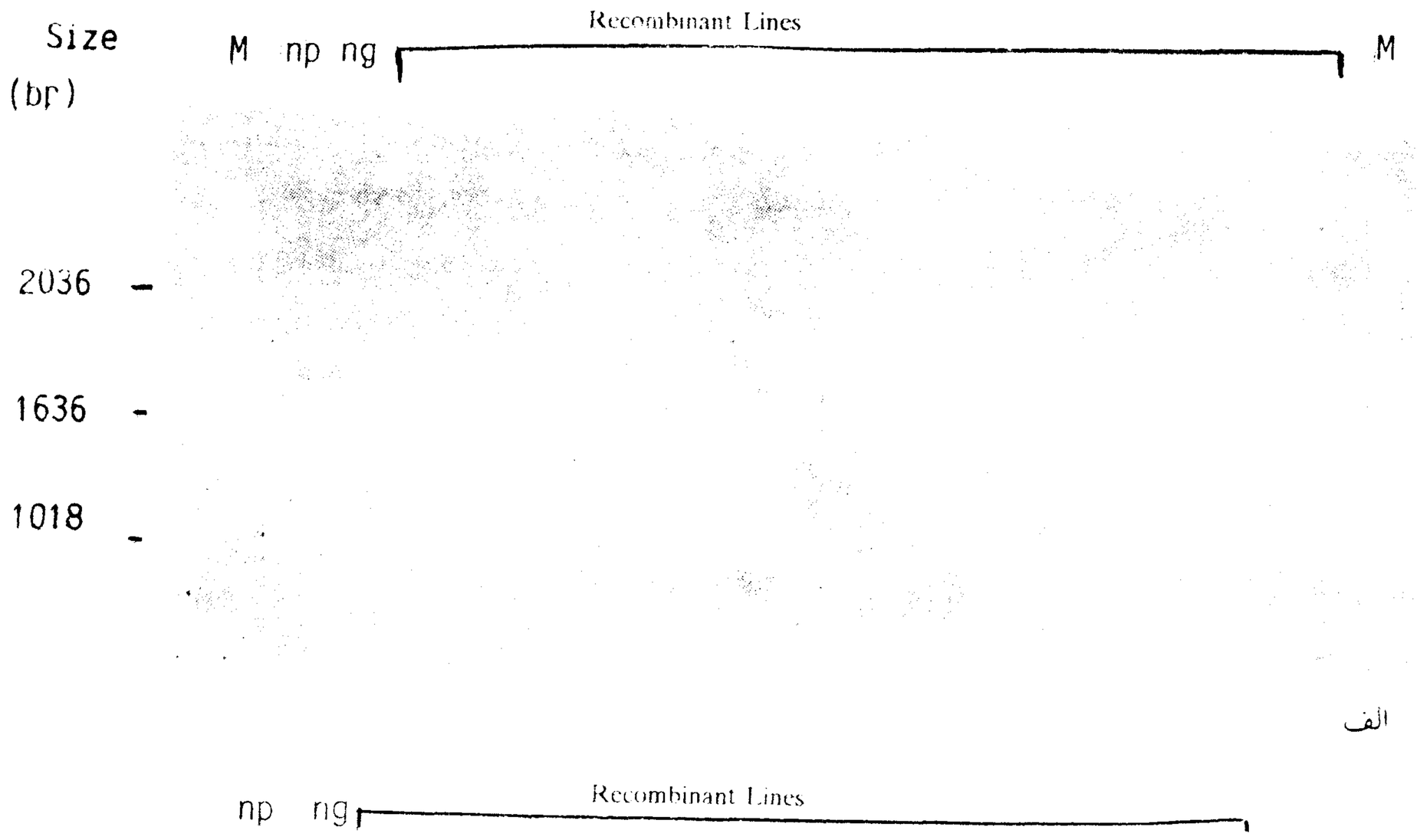
۱،۹۲C° دقیقه برای denaturing یاتک رشته شدنDNA
۱،۳۵C° دقیقه برایAnnealing یا چسبیدن پرایمر بهDAN تک رشته شده
۲،۷۲C° دقیقه برای Extensionیاتکثیر DAN

عمل فوق یک سیکل خوانده میشود و برنامه دستگاهPCR برای ۴۵ سیکل تنظیم شد.

پس از اتمام سیکلها و ساخته شدن میلیون‌ها قطعه DNA، برای دیدن قطعاتDNAتکثیر شده از الکتروفورز ژل آگارز با بافر TAE استفاده شد. برای این منظور مقدار ۱۰/۳ میکرولیترDNA از هر نمونه برداشته و در ژل اگارز ۲٪ قرارگرفت. عمل الکتروفورز با ولتاژ ۹۵ ولت و برای مدت ۴ ساعت انجام شد. از مارکر DNAبنام(1 Kb DNA Ladder,BRL) بعنوان استاندارد مولکولی استفاده گردید. سپس ژل با محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ppm برای مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از شستشو با آب معمولی به مدت ۱۰ دقیقه، از ژلها با استفاده از نور UV و دور بین پولاروید و فیلم ۶۶۷ عکس گرفته شد. از عکسهای گرفته شده برای تفسیر باندهایRAPDاستفاده گردید.

نتایج و بحث

باندهای نتایج تولید شدهRAPDکه بعنوان مارکر در این مطالعه مفید تشخیص داده شده بود در جدول ۱ نشان داده شده اند. هر باند بوسیله نام کارخانه تولید کننده پرایمر ، نام پرایمر و اندازه



شکل ۲ . نمونه هائی از باندهای تولید شده مختص ژنوم Bالف . باندهای مختص ژنوم B که توسط پرایمر OPA19 در بعضی از لاینهای نوترکیب دیده شده بافلش نمایش داده شده است. ب باندهای تولید شده توسط پرایمر OPA10 در B.nigra,B.napus و تعدادی از لاینهای نوترکیب.

باند بر حسب جفت باز (bp) مشخص شده است. استفاده از پرایمرها نشان داد که مقدار پلی مورفیسم برای باندهای DNA زیاد است. از نظر اندازه بین ۳۰۰ (OPA10) تا ۱۷۰۰ (OPB11) جفت باز برای ژنوم A متغیر است. بعضی از پرایمر ها تولید یک باند و بعضی بیش از یک باند تولید می کنند. باندهای تولید شده را میتوان در سه گروه قرار داد: (۱) باندهای مختص ژنوم که در گونه های دیپلوئید و آمفی دیپلوئید دیده میشوند. (۲) باندهای مختص گونه که فقط در یک گونه خاص ظاهر میشود و (۳) باندهای مختص واریته که فقط مختص یک واریته یا ژنوتیپ خاص هستند. از این باندهای خاص در برنامه های انگشت نگاری DNA برای تعیین هویت ژنومها ، گونه ها و ژنوتیپها ، گروه بندی واریته ها، تعیین روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها و انتقال ژن از یک ژنوم ، گونه یا واریته به یکدیگر میتوان استفاده کرد. البته بایستی از باندهائی استفاده کرد که وضوح خوبی داشته و همچنین تکرار پذیر باشند یعنی در صورت تکرار آزمایش مجدداً ظاهر شوند. نقایص تکنیک PAPD عبارتند از عدم تشخیص هیبرید بعلت غالب بودن مارکرها ، عدم وضوح کافی و خصوصا عدم تکرار پذیری بعضی از باندها. بنابراین لازم است که در این نوع مطالعات حتماً آزمایش تکرار شود تاتکرار

جدول ۱ - لیست مارکرهای مختص ژنوم

ژنوم A	ژنوم B	ژنوم C
OPA3-850	OPA2-500	OPA3-1150
OPA8-400	OPA3-1600	OPA9-1000
OPA8-800	OPA8-300	OPA11-400
OPA9-850	OPA10-700	OPA13-700
OPA12-600	OPA12-900	OPA17-800
OPB3-1400	OPA16-900	OPA18-600
OPB6-800	OPA16-1400	OPA19-800
OPA16-300	OPA15-800	OPB14-1100
OPB11-1700	OPA18-550	
OPB12-500	OPA18-1050	
OPB18-900	OPA19-1000	
OPB19-450	OPB3-850	
	OPB4-1000	
	OPB5-650	
	OPB7-900	
	OPB7-900	
	OPB9-1200	
	OPB10-350	
	OPB10-1100	
	OPB11-1400	
	OPB12-450	
	OPB16-1800	
	OPB17-600	
	OPB18-350	
تعدادکل ۱۶	۲۳	۸

یذیری باندها مشخص شود.

از تعداد کل ۴۷ باندتولید شده مختص ژنوم ، تعداد ۱۶ باند مختص ژنومA ، ۲۳ باند مختص ژنومB, ۸ باند مختص ژنوم C است. بطور کلی هر پرایمر یک باند ژنوم تولید میکند. در مورد ژنوم A پرایمر OPA8 تعداد دو باند و پرایمرهای OPA18,OPA16 وOPB10 برای ژنومB تعداد دو باند تولید کرده است. اندازه باندها برای ژنوم A حداقل ۳۰۰ جفت باز در(OPA8) و حداکثر ۷۰۰ جفت باز در(OPA3) و برای ژنومC حداقل ۴۰۰ جفت باز در (OPA11)و حداکثر ۱۱۵۰ جفت باز در(OPA3) است. استفاده از تعداد ۲۰ پرایمر که باندهای مختص ژنومB راتولید کردند، در لاینهای نوترکیب نشان داد که فقط یک پرایمر(OPA19) مارکر یا باندمختص ژنومB را در۴ گیاه از لاین ۸۲۵یک گیاه از لاین ۸۲۷ و ۳ گیاه از لاین ۸۲۸ نشان داد. ۲ تا از این لاینها ۸۲۵ و۸۲۷ صفت بالا بودن اسید اورسیک و لاین دیگر ۸۲۸ صفت مقاومت به بیماری Phoma را از خود نشان داده‌اند.اندازه‌این مارکر یاباند حدود ۱۳۰۰ جفت‌بازاست.تکرار آزمایش‌نشان دادکه‌این مارکر(۱۳۰۰bp)تکرارپذیراست.(شکل ۲)

وجود باندهای مختص ژنوم B در لاینهای نوترکیب حاصل از تلاقی B.nigra وB.napus که فاقد کروموزوم اضافه ازB.nigraبودند نشان دهنده انتقال ژن ازB.nigra به لاینهای نوترکیب است. اما با توجه به اینکه این باند در لاینهائی با صفات متفاوت ظاهر شده نمیتوان با قاطعیت نتیجه گرفت که بین این باند وبالا بودن اسیداورسیک و مقاومت به بیماری phoma همبستگی وجود دارد. برای اثبات همبستگی و لینکاژ بین مارکرRAPD و یک صفت خاص لازم است که مطالعه لینکاژ را با استفاده از مواد ژنتیکی خاص نظیر توده F۲، یک کراسها و لاینهای نو ترکیب حاصل ازتلاقی یک رقم حاوی آن صفت خاص و رقمی که فاقد آن صفت است انجام داد. تعیین لینکاژ بین مارکرهایRAPD وصفات مهم از نظر اقتصادی به متخصصین اصلاح نبات کمک میکند که سلکسیون را به کمک این مارکرها در سطح ژنوتیپ انجام دهند که در نتیجه سودمندی برنامه سلکسیون افزایش می یابد.

REFERENCES

1.Abdmishani, C., & C. O. Qualset. 1994 . Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers- A new technique in wheat genetics. Journal of Agric . Sci. and Tech. (in press).

2. D,Ovido, R., O.A. Tanzerlla , & E . proceddu. 1990 . Rapid and efficient detection of genetic polymorphism in wheat throug hamplification by polymerase chain reaction. plant Mol. Biol. 15:169-171.

3. Dweiket, I., S.Mackenzie, M. Levy, & H. Ohm. 1993. pedigree assesment using RAPD- DGGE in cereal crop species . Theor. Appl. Genet. 85:497-505.

4. Foolad, M.R., R.A.Jones, & R.L.Rodriguez.1993. RAPD markers for constructing interspecific tomato genetic maps. plant Celi Reports. 12:293-297.

5. Hu, H., & C.F.Quiros. 1991. Identification of Broccoli and Cauliflower cultivars with RAPD markers. plant Cell Report .10:505-511.

6. Klienlankhorst , R.M., A. Vermont, R.Weide, T.Liharsla, & L.Zable.1991. Isolation of molecular markers for tomato (L.esculentum) using random amplified polymorphic DNA(RAPD) . Theor.Appl . Genet. 83: 108-114.

7. Martin, G.B, J.G.K.Williams, & S.D.Thanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a pseudomonas resistance gene in tomato by using random primers and near- isogeneic lines. Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of the United States of America .88:2336-2340.

8. Michelmore, R.W, I. paran, & R.V. Kessele. 1991. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis - A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating poplations. Proc. of the Nat. Acad. of Sci. of the United States of America. 88:9828- 9832.

9. Quiros, C.F, J.Hu, P.This, A.M.Chevre, & M.Delseny. 1991. Development and chromosomal localization of genome - specific markers by polymerase chain reaction in Brassica . Theor. and Appl. genet. 82 : 627-632.

10. Tanksley , S.D, N.D. youmg, A.H. peterson, & M.D. Boneirbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science . Bio/Technology . 7:257-264.

11. Welsh, J., R.J.Honetcutter, M.McClelland, & B.W.S.Sobral. 1991. parentage determination in maize hybrids using the arbitrary primed polymerase chain reaction(AP- PCR). Theor. and Appl. Genet. 82:473-476.

12. Williams, J.G.Kubelik ,K.J.Livak. J.A.Rafalski, & S.C.Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 25: 6531-6533.

13. Xiafeng Yong ,and C.F. Quiros. 1993. polymorphism for RAPD markers in celery . Theor. Appl . Genet. (In press).

Iranian J. Agric.. Sci. Vol. 26, No.1,1995

Application of PCR (RAPD) Technique as DNA Marker in Brassica

C. ABD- MISHANI
Associate Professor, Department of Agronomy College of Agriculture , University of Tehran Karaj ,Iran .
Received for publication June ,7,1994

SUMMARY

Addition lines of the combination B.napus X B.nigra with added chromosomes of the B.nigra were obtained . A number of lines which were derived from addition lines but with 2n=38 chromosomes showed 3 characteristics from B.nigra (B-genome). The objective of this study was to find B-genome specific RAPD markers in these lines .A total of 46 individual plants including 13 different lines and 2 seperate bulked DNA from 5 plants of each parent ,B.napus and B.nigra were tesed with twenty 10-mer primers which were B. nigra specific markers . Leaf DNA extracted using a micropreparation method. Concentration of the DNA were determined with Beckman DU-6 spectrophotometer. 25 uI reaction for RAPD were used . Only one primer (opA-19) showed B-genome specific marker in 8 individual plants from 3 lines (825-1,825-3, 825-4, 825-5, 827-2,828-3,828-4, and 828-5). The size of the marker was 1.3 kb. The marker showed consistency with repeatted reaction .