بررسی پلی مورفیسم در جو با استفاده از روش STS-PCR

بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و تاکائوکوماتسودا

استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و

محقق گروه بیوتکنولوژی موسسه ملی بیولوژی کشاورزی ژاپن

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۸/۵

خلاصه

به منظور بررسی پلی مورفیسم در DNA جوهای ژاپنی ، تعداد ۱۱۷ آغازگر STS در دو ژنوتیپ مختلف مورد استفاده قرار گرفت که تنها ۹۲ آغازگر در واکنش PCR تولید نوار کردند. از این تعداد ۱۶ آغازگر بدون استفاده از آنزیم های برشی و ۲۴ آغازگر پس از برش نوارهای حاصل از واکنش PCR بوسیله آنزیم های برشی ، پلی مورفیسم نشان دادند. فراوانی محل های برش کمتر از فراوانی مورد انتظار و پراکندگی آنها بر روی قطعات DNA نایکنواخت بود. این پدیده نشان دهنده آن است که نوکلئوتیدها بطور تصادفی در ساختمان DNA تنظیم نشده‌اند. علت اصلی پلی مورفیسم مشاهده شده را می توان به حذف یا اضافه شدن محل های قابل تشخیص بوسیله آنزیم های برشی نسبت داد.

واژه های کلیدی : جو ، STS ، PCR ، پلی مورفیسم

مقدمه

شناخت ساختار ژرم پلاسم یک کلکسیون گیاهی برای ارزیابی و استفاده بهینه از آن ضروری است . این مهم با استفاده از نشانگرها و تهیه نقشه ژنتیکی در گیاهان مهم از نظر کشاورزی امکان پذیر است. هرصفت قابل توارثی که دارای تنوع در ژنوتیپ های مختلف باشد، می تواند به عنوان یک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. برای اینکه تمامی قسمت های کروموزوم های موجود در گیاه دارای نشانگر باشد ، به تعداد زیادی از آنها نیاز است که تنها با استفاده از نشانگرهای مولکولی می توان به این مهم دست یافت. کاربرد نشانگرهای حاصل از تنوع موجود در سطح DNA (RFLP ها) می‌تواند وسیله بسیار موثری در مطالعات پایه و کاربردی ژنتیک گیاهی باشد. اما پیچیدگی موجود در روش رایج RFLP مانند ساترن بلاتینگ (۱۲) که روشی پر زحمت و گران، به ویژه در برنامه‌های اصلاح کاربردی است (۱ و ۲)، دانشمندان را به ساده کردن این روش واداشت . آغازگرهای ساخته شده بر اساس توالی DNAی کاوشگرهای مورد استفاده در روش ساترن بلاتینگ ، یکی از این روشها است که‌می تواند در تکنیک PCR (۱۱) مورد استفاده قرار گیرند. به این ترتیب علاوه بر حذف مواد مضر رادیوایزوتوپ که جهت آشکار سازی پلی مورفیسم به کار می رود، هزینه و زمان لازم برای تجزیه و تحلیل (واکاوی) RFLP ها نیز کاهش می یابد. این روش قادر به آشکارسازی علت تنوع موجود در سطح DNA نیز هست. محدودیت اصلی این روش، آگاهی از توالی DNA برای ساختن آغازگر است. محصول این آغازگرها (STS) نوارهای کوتاه و منحصر به فردی هستند که مکان های معینی را روی کروموزوم ها مشخص می کنند. به نظر می‌رسد که تجزیه و تحلیل STS-PCR سریع، با ثبات و وسیله ای کارآدر ایجاد محتوای ژنتیکی گیاهان باشد. از مزایای دیگر این روش قابلیت انجام آن در هر آزمایشگاه با حداقل امکانات ، تکرار پذیری و همچنین کاربرد آن در میان جوامع مختلف گیاهی است . بنابراین روشی ایده آل برای اصلاح نباتات می باشد.

کاربرد تکنیک STS-PCR در اصلاح نباتات بستگی به

وجود پلی مورفیسم قطعات DNA در جامعه گیاهی تحت بررسی دارد. این موضوعی است که در این تحقیق مد نظر بوده و برای بررسی میزان پلی مورفیسم در جوهای ژاپنی مورد استفاده قرار گرفته است.

مواد و روشها

دو رقم جو ژاپنی کانتونکیت گولد و آزوما موگی که واکنش متفاوتی در کشت بافت آن مشاهده شده بود، انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند. کانتونکیت گولد یک جو دو ردیفه است که توانایی جنین زایی و باززایی رویشی مناسبی نشان می دهد، در صورتی که آزوما موگی یک جو شش ردیفه بوده و کال زایی و باززایی حاصل از کشت جنین نارس آن بسیار ضعیف است (۹).

استخراج DNAی گیاهان والد و F1 برای تجزیه STS-PCR بر اساس روش دلاپورتا و همکاران انجام گردید (٦). یکصد و هفده آغازگر که توسط بلیک بر اساس کاوشگر های مورد استفاده در پروژه نقشه ژنومی جوهای امریکای شمالی (۸) تهیه شده، و پراکندگی آنها بر روی کروموزوم های جو مشخص گردیده بود (۳)، مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). در مرحله اول آزمایش شرایط مناسب واکنش PCR تمامی آغازگرها بر مبنای میزان یون منیزیم در محلول واکنش و دمای مناسب برای اتصال آغازگر به DNA مورد نظر تعیین گردید. سپس آغازگرهای انتخابی بر مبنای وجود پلی مورفیسم بین دو رقم دسته بندی شدند.

واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرو لیتر در لوله های آزمایشگاهی درب دار (اپندورف) ۲۰۰ میکرولیتری با یک قطره روغن معدنی انجام گردید. اجزا محلول واکنش ازشرکت پرومگا و حاوی ۰/۲۵ واحد Taq پلیمراز، ۰/۳ میکرومول آغازگر ،تقریبا" ۲۰ نانوگرم DNA، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP ، ۱-۴ میلی مول کلرور منیزیم (بر حسب مقدار مناسب برای هر آغازگر) و بافر ۱× (۱۰ × بافر پرومگا: ۱۰۰ میلی مول تریس با pH=۹، ۵۰۰ میلی مول کلرور پتاسیم و ۱٪ تریتون) بود. واکنش در دستگاه PCR مدل ۱۰۰ - PTC انجام و پس از مرحله اولیه واسرشت سازی DNA (۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه) در ۳۲ سیکل ادامه یافت. هر سیکل شامل ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد ، ۲ دقیقه در دمای مناسب برای اتصال آغازگر بهDNA (بر حسب هر آغازگر،جدول ۱) و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت ساختن قطعه مورد نظر DNA بود. پس از اتمام سیکل ها ، محلول واکنش به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای تکمیل شدن قطعات DNA تولیدی، ودر پایان در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

هر محلول واکنش با استفاده از آگارز ۱/۸٪ و یا متافور ۳٪، تهیه شده در محلول × ۰/۵ TBE (محلول × ۱ TEB شامل ۸۹ میلی مول بورات تریس و ۲ میلی مول EDTA بود) مورد بررسی قرار گرفت . برای تعیین اندازه نوارهای به دست آمده از نشانگر مولکولی ϕ۱۷۴ استفاده گردید. ژل ها به مدت لازم در شرایط ۵ ولت بر سانتیمتر قرار داده شده و سپس بوسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از فیلم ٦٦٧ پولاروید بر روی منبع UV ترانس الومیناتور عکس برداری شدند.

آغازگرهایی که در بین ارقام مورد استفاده پلی مورفیسم نشان دادند انتخاب و نوارهای حاصل از واکنش PCR در بقیه آغازگر ها ، توسط ۱۲ آنزیم برشی مخصوص محل های ۴ یا ۵ جفت بازی (*NciI, MspI, HinfI ,HhaI, HaeIII, AvaII, AluI, AccII, ScrFI, RsaI, NdeII* و *TaqI*) برش داده شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱). در صورت عدم مشاهده پلی مورفیسم ، نوارهای حاصل ازواکنش PCR که دارای حداقل اندازه ۳۰۰ جفت باز بودند توسط ۴۳ آنزیم برش دهنده دیگر (جدول ۲) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

از ۱۱۷ آغازگر مورد آزمایش (جدول ۱)، شرایط مناسب برای واکنش PCR در ۹۲ آغازگر تعیین گردید. ۲۵ آغازگری که شرایط مناسب برای واکنش PCR آنها مشخص نشده بود (جدول ۱)، مورد آزمایش بعدی قرار نگرفتند. اندازه نوارهای حاصل از آغازگرها بین ۱۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بود. ۱٦ آغازگر از بین آغازگرهای انتخابی ، بدون استفاده از آنزیم های برش دهنده (۱۷/۴٪) بین ارقام مورد استفاده پلی مورفیسم نشان دادند. حداقل یکی از ۱۲ آنزیم مذکور، باعث تبدیل نوارهای منومورفیک به نوارهای پلی مورفیک در ۲۰ آغازگر گردید (۲۱/۷٪) با استفاده از ۴۳ آنزیم برش دهنده ذکر شده در جدول ۲، تنها ۴ آغازگر

جدول ۱: توالی و شرایط مناسب آغازگرهای مورد استفاده، در واکنش PCR و اندازه نوارهای حاصل از واکنش و آنزیم های برشی مناسب برای پلی مورفیسم

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳' → ۵')	غلظت $MgCl_2$ (mM)	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزوما موگی	کانتو نکیت گولد	
ABA 001	GGG GAG ATA TCG ACC AAA GT CAC GCC CTC GCC AAC GCT CTC CA	۲/۵	۵۶	۱۱۰۰ + ۷۰۰	۱۱۰۰ + ۷۰۰	*AluI, NdeII, RsaI, TaqI*
ABA 003	GCT GCG CGC TTC AGC T GAC CTC CAC GAG TTG C	۱/۰	۵۰	*	*	
ABA 004	CCA CCA AGC GTG GAG TC GGG TGG CGT GGG GTG	۱/۵	۵۴	*	*	
ABA 005	GGT ACG AAC ATG GAG GTA CT ATC CAG TTC TTG TGC ACC TG	۱/۵	۶۰	۱۱۰۰	۱۱۰۰	*AluI, HaeIII, HinfI, MspI, RsaI, SceFI, TaqI*
ABC 151	GTG CCG TAG ATA GGA AGG TG CAT GGT ACA AAC TCT CAA CT	۲/۰	۵۴	*	*	
ABC 152	TCC GCA AGT ACC AGA AGA GC GAC AAG GAA AGC CAA TCA AC	۴/۰	۵۶	۳۵۰	۳۵۰	
ABC 155	TCT GTG TGT TAT TCC TCT TA ACG AAA AAT CAA TAC TGG TC	۱/۵	۴۶	۴۰۰	-	
ABC 156.1	ATG AGG AAG GAC ACA CTG GT GAG AGG AGG ACA AGC AAC AC	۲/۰	۶۲	۱۶۰	۱۶۰	
ABC 156.2	TCA TCA TCC AAG AAC GAA GG GAA TAT GAA GAT TCT GAT CT	۲/۵	۵۰	۳۱۰	۳۱۰	
ABC 156.5	CAT AAT GTG GGG TGC CAT AC CAA GGA GGA TCA AGT AGT CA	۲/۰	۵۶	*	*	
ABC 160	AAC AAG GCC GCA TGG ATG TA GCC AGC GCT CCG GTC TGG TC	۲/۰	۶۲	۲۴۰	۲۴۰	*HifI*
ABC 164	CGC ACA CCT CTC CCT CCT TC ATG CCC ATC TTC TGC AAC TC	۱/۵	۶۰	۱۴۰۰	۱۴۰۰	
ABC 168	GTA AGA ACA AAA CCC AAA AC GGA GAC CCA GCG GAA GGA GA	۲/۰	۵۲	*	*	
ABC 170	ACG GTT GCT GTG GGT GTG AT AAC GAT ACA ATG ACC AGA GC	۲/۰	۵۶	*	*	
ABC 252	AAG CTC ACC AAG TCC CAG TC CAC AAG GCT CAA AAC ATA AC	۱/۰	۵۶	۳۰۰	۳۰۰	
ABC 253	GCA TGG TGA CAG ATT TCA AA AGG GAA TGC AGA TCT CAC AC	۳/۰	۵۶	۶۰۰ - ۵۰۰	۶۰۰	
ABC 255	CGA ATT CCG AGA CAT CAA AT GAT CAT CGT GGA TGG AGT GT	۴/۰	۵۶	۶۵۰	۶۵۰	*AvaII*
ABC 261	AAA GTC AAG AGT TGC ATC AA AGG AAG CTC AAG AAG GTG AA	۱/۰	۵۲	۱۸۰۰	۱۸۰۰	*AluI, HaeIII, HhaI, HinfI, MspI, RsaI, TaqI*
ABC 302.1	GTG GTA AAG GAG CGG TTG AT CAG AGT ACA GGA CAG ACA GT	۲/۵	۶۰	*	*	
ABC 302.3	ATA AAG GAG AAG ATT GAG TC ATA AGG AAC AGG AAC AGA GT	۱/۵	۵۶	۸۵۰	۸۵۰	
ABC 303	GAG GCT GTT ATT ATC TTA CC CTT TAC AGC GAC GAG ACC AG	۴/۰	۵۸	۱۳۰۰ + ۳۵۰	۱۳۰۰ + ۳۵۰	

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳' → ۵')	غلظت $MgCl_2$ (mM)	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزوما موگی	کلتو نکیت گولد	
ABC 305	GAC AAC GGC CAA CAA ATC TA AGC ATG TCA TTG AAC ACT TC	۳/۰	۵۶	۳۰۰	۳۰۰	
ABC 306	ACG GCC TCA GGA CCT ACT CC GCA TAC ACA TAC ATT CAC AT	۱/۰	۵۴	۵۵۰	۵۵۰	
ABC 308	CCT CGC TGA AAC TAA TCA AA ACA TGG TGC CAT TCA CAA AT	۱/۵	۴۸	*	*	
ABC 310	TCC TGA TGG TCC TCT TAT GC ACA TAG TTC TCT TCC CAG TA	۲/۵	۵۶	*	*	
ABC 311	CCA ACC AAT GTG AAC TAA CA AGT GTC CCT CCT GAA GTC AT	۲/۰	۴۸	۷۱۰ + ۷۰۰ + ۶۱۰ + ۵۰۰	۵۰۰	
ABC 323	GCC ACA TCA CCC TCT T TCG TCA CAG GTT TCA C	۱/۰	۴۸	۶۵۰	۶۵۰	
ABC 451	CAG TAA CCA AAA CGA CAA AC TTC AAC GAG GCA TCA ATC TT	۲/۵	۵۴	۱۳۰۰	۱۳۰۰	*AvaII*
ABC 454	GCG TGC GAG GGG AAG GAG AA TTC ACA GCC GAA ACA CTT GT	۱/۰	۶۰	۲۵۰	۲۵۰	#
ABC 455	GTG GGT TCC TCT TTG TTG AG CAC GCT CCT AAA CGC ACT CC	۲/۵	۵۸	*	*	
ABC 465	CAC GAC AGA CGG ACC AAA TG GCT ACT GGG ACA AAA TCT CC	۱/۵	۵۸	۵۰۰	۵۰۰	
ABC 468	CCA CCA GAT AAC TCT TCA TA TGA GCA ATA CAG GGC TGA TG	۲/۵	۵۴	۱۷۰۰ + ۸۰۰	۱۷۰۰ + ۸۰۰	#
ABC 483	GGG CAC GAC GAC ACA CTC AG TGC ATC ACC GAC GAC AGA CC	۲/۰	۶۲	۹۰۰	۹۰۰	
ABC 717	CAA TAC GGC AAC AAA TAA CA CCC CAC CAA AAT TAC CAG TC	۱/۰	۵۲	۷۵۰	۷۵۰	*HinfI*
ABC 718	CAA CAG AAA GCT GCT AGA GC ATA GGA ACG GTG GTG ACT TT	۴/۰	۵۸	۲۷۰	۲۷۰	
ABG 004	CGG GAG GAG GGG AAG AGG AC AGC ACC AAA GCA CCT GAA CC	۲/۵	۶۴	۵۰۰	۵۰۰	
ABG 010	TGA GTT CCT TGA TAG ATA CA CTT AGC ATT TGA GTT TGA GA	۲/۵	۵۲	*	*	
ABG 020.1	TCG CGA TGA TGT TCT TCA GG ACT CTC CTT CTG GGT CCA GG	۲/۰	۵۶	۸۰۰ + ۵۰۰	۸۰۰	
ABG 020.11	GCA AAG CGA CTA TTT TTC AT TGG ACC CAG AAG GAG AGT GC	۱/۰	۵۲	۱۰۰۰ + ۶۰۰	۱۰۰۰ + ۶۰۰	
ABG 020.12	TCG CGA TGA TGT TCT TCA GG TGG ACC CAG AAG GAG AGT GC	۲/۵	۶۲	۱۳۰۰	۱۳۰۰	
ABG 053	TAA TTG CAT GAG TCT GAA TC ACT TAA AAA TAG TCC CAC TG	۱/۵	۵۲	۳۰۰	۳۰۰	
ABG 054	GAT GTC CAA CGG TGG CTT GA GTG CTT GGC GGT CGA CCA GT	۱/۰	۶۲	۲۳۵	۲۳۵	

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳' → ۵')	غلظت $MgCl_2$ (mM)	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزوما موگی	کانتو نکیت گولد	
ABG 055	CAG GCA AGA TTG ACG CAG TA ATC CGC AGC AGA TCG AGG AC	۱/۵	۶۲	۷۵۰	۷۵۰	*AluI, AvaII, HhaI, HinfI*
ABG 057.1	CCT TAT TCT ACA CAA CAG AT GGT CAC CCA TCC AGT TCT TG	۱/۵	۵۲	۱۱۰۰	۱۱۰۰	#
ABG 057.2	TTA TAA GCA TAG ACT GCG GT GCA CGA GTG AGC TGA GAG TG	۱/۵	۵۴	۲۷۰	۲۷۰	
ABG 057.4	TTA TAA GCA TAG ACT GCG GT GGT CAC CCA TCC AGT TCT TG	۲/۰	۵۶	۱۳۰۰	۱۳۰۰	*Hae*III
ABG 058	AGA ACT GGA GGA ACG AGA TA ACC CAG GCT TGA TTA TTA GG	۲/۵	۵۸	-	۱۰۰۰	
ABG 059	GCC ATC ACG AGT TTA GTC TT TTC GGG TTG AGT CTG TTA GC	۲/۵	۵۶	۲۷۵	۲۷۵	
ABG 064	GGG TAT GCA TGG ACG TGG TC GGC TGA ATC ATC CGC TCA TA	۲/۵	۶۲	۵۵۵	۵۵۵	*Acc*II, *Hae*III, *Taq*I
ABG 065	TGA GTA TCT ATC GGC GGT TA GGC GAC TCT GAT GCT ACG AT	۲/۵	۵۶	*	*	
ABG 070	GGA CCA AGC AAA TAT CTC AG AAC ACG AGT TTG AAT TTT AC	۲/۵	۵۲	۵۰۰	۵۰۰	*AluI, AvaII, HinfI, MspI, Nde*II, *Taq*I
ABG 075	AGC ATG TAC AAG AAC AGA AA CCA TTA GTG ACA CAG GTG AG	۱/۵	۵۴	-	۱۳۰۰	
ABG 153	AAA CAC CTC CTG GCT CTC AG GCC TCT GCC GCT GGA ACT AC	۱/۵	۶۰	۲۷۰	۲۷۰	
ABG 317	AAC TCT GGG TGG TTT GTG AA CAT GAT GGG TCA AGC TCT GT	۳/۰	۵۴	۱۰۰۰ + ۴۵۰ + ۲۵۰	۱۰۰۰ + ۴۵۰ + ۲۵۰	
ABG 320	AGA CGA GTG GAC ACA TGA TG GAT CCA ACA GCA AGG AAA GA	۳/۰	۵۶	۵۶۰ + ۵۵۰ + ۵۳۰	۵۶۰ + ۵۵۰	
ABG 356	TCA ACT GAG GTA GAA TAC TA CCA ACA ATA AAG AAT CAA AT	**	**	-	-	
ABG 366	AAC CCC GAC AAG CCA AGA GC CGC ACC CGC AGC CAC AGA GG	۲/۰	۶۲	۸۰۰ + ۴۰۰	۸۰۰ + ۴۰۰	*Taq*I
ABG 377.1	GCT GCT ATG AGG AGA GAA CC TGG TAT GAA ACA GGT GAA TA	۲/۵	۵۶	۵۰۰	۵۰۰	
ABG 378	TTA GTC ATA GAA TCC CTG TT AAA ATT CGC CTG TGC TGT GT	۲/۵	۵۰	۳۵۰	۳۵۰	
ABG 379	GCT GAG TTA CAG AAA GTT CC TTT GTA GTT CTG ATG GTG TG	۳/۰	۵۴	۶۰۰	۶۰۰	
ABG 380	CAC GAA CAG AAG GAG ACT AA AAA CCC TAC ATC ATC TTT TT	۲/۵	۵۲	۵۰۰ + ۴۳۰ + ۴۰۰ + ۳۰۰	۵۳۰ + ۴۳۰	
ABG 391	CAT CAA ACT CAA TGC AAG TG CGG TGA ATT CCG TGC ATT T	۲/۰	۵۶	۶۰۰	۶۰۰	*Taq*I
ABG 394	GGG TGT TGC TCA TGC TCT TT CGA TGT AAT AAA AAT TAG GT	۱/۵	۵۰	۲۸۰	۲۸۰	

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳′ → ۵′)	غلظت $MgCl_2$ (mM)	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزوما موگی	کانتو نکیت گولد	
ABG 396.1	GGG TCA CAA AGA CGG AGG AG AGG AAA CCT ATG TAA TCA TC	۱/۰	۵۲	۴۰۰	۴۰۰	*Scr*FI
ABG 397.1	GCA AAA CAC ACT AGA TTT TA ATG CGA GCA GAA ACT TAG GA	۳/۰	۵۴	۲۷۰	۲۷۰	
ABG 452	TCT ACC TAG CTT CTT TCA AA AGC TGC CAC CAC CCC CAG TG	۲/۵	۵۶	۶۰۰	۶۰۰	
ABG 458.1	AGT CTT GCG CAT GGT GAC AC CAC CAA TTG CAT CAA AGC TC	۱/۰	۶۰	۳۵۰	۳۵۰	*Msp*I
ABG 459	CCA CGC TCG CTT GCT GAC TC GCC ACC ACG CTC TCC ATT GT	۲/۰	۶۴	۱۵۰	۱۵۰	#
ABG 460	TGG AGG AGA GCG GAA GAG AT TTG TGT GGT AAA AGT AAA AT	۱/۰	۴۸	۱۵۰۰	۱۵۰۰	#
ABG 466	TGC ACG CGC TGT GGC ATC TC CCA AGC ATT CCA ACC TTA GC	۲/۵	۶۲	۳۳۰	۳۳۰	
ABG 471	TGG ATT TGA TGG CGG AGA CC CAA GAC TGA CAA CAC AAG AC	۲/۵	۵۸	۱۶۰۰	۱۶۰۰	*Fok*I
ABG 472	GGC GAA GAT GTC CTT AGA TA GGG ATT TGG AAA AAG TTT AT	۲/۵	۵۲	۱۳۰۰	۶۰۰	
ABG 473.1	ACT TTG TTC TCC ATT ATG AG TGT CGC TTT ACT GTA TTT AT	۱/۵	۵۰	۳۳۰	۳۳۰	
ABG 473.11	TTC CTG GCT ACA AAT ACA CC GGG CAA TGT CGC TTT ACT GT	۲/۵	۶۰	۲۸۰	۲۸۰	
ABG 474	TGT CAC TAG CCT TCA GAA CC ATA TGC CTG GAC GAA AAT CT	۲/۵	۵۶	۱۶۰۰ + ۱۳۵۰ + ۶۵۰ + ۲۷۰	۱۶۰۰ + ۱۳۵۰ + ۶۵۰ + ۲۷۰	
ABG 484	TAA ATC ACC AAC ATT GAA AC TAG TTA GAG AGG GAG AAC AA	۲/۵	۵۲	۱۰۰۰	۱۰۰۰	
ABG 498	CTG ACT ACT GGA TGG ACC AC TTA CTG AAG AAA AAC CTG TC	۱/۰	۵۰	۵۵۰	۵۵۰	
ABG 500	AAG AAG AAC CCG GAG AAT CT GCT AGA ACT TGA CCA ATC TC	۲/۵	۵۶	۲۹۰	۲۹۰	
ABG 602	GCA AAA TCC CTC CAT ACA TC CTT CCT TCT ATC GCC TTC TC	۲/۵	۵۸	۱۲۵۰	۱۲۵۰	*Nde*II
ABG 603	AAG TGC AAG CAG GCT CTG AC GGT GTT GGT GTC GAG CAC TC	۲/۵	۶۲	۳۵۰	۳۵۰	
ABG 608	TGA ACC ACG AAG CCA GCA CT ACG CCT CCA ACC TCT TCT CC	۱/۰	۶۰	۹۰۰ + ۶۰۰	۹۰۰ + ۶۰۰	*Msp*I, *Nde*II, *Nci*I, *Scr*FI
ABG 609	ATC AAT GGA GAT TTG CTT AC GTG TTT ACA TGC TTG TCA TA	۱/۵	۵۶	۱۱۰۰	۱۱۰۰	
ABG 613	TTA TTG CAA AGG AAA CAA AA ACA TAT TTC CCT TCC CAG TC	۲/۰	۴۸	۴۰۰ + ۲۰۰	۴۰۰ + ۲۰۰	*Ase*I
ABG 616	GAG ATG GTG TCG GAG CTT AG CCC TGA AGG ATG ACT CTC TA	۱/۵	۵۸	۱۳۰۰	۱۳۰۰	*Hae*III, *Scr*FI, *Taq*I

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳' → ۵')	غلظت $MgCl_2$ (mM)	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				کانتو نکیت گولد	آزوما موگی	
ABG 618	GTT CAT CTC AAC GGG TCA GT CTG TGG TCA TCA ATC CAG TG	۳/۰	۶۲	۵۵۰	۵۵۰	*HinfI, RsaI*
ABG 654	ACA GCG GAG AAA AAG ATA CA AAG TTC GGA TGG GAC AAG AT	۱/۰	۵۴	۱۸۰۰	۱۸۰۰	#
ABG 701	GAA TAC CTG TTG CCC AAA GA CAA CTG AAT GCC AGC AAT AC	۳/۰	۵۶	۴۰۰	۴۰۰	*Alw44I*
ABG 711	GGG GTA CAC GAA GAG CTA GA AAT AGA GAA GGG GGA GAG GT	۲/۰	۶۰	۵۰۰	۵۰۰	*SacII, NheI*
ABG 712	GCT TCT GGT CTG TGT TCT TG AAA TAT GGT TGG TCA AAG TT	۲/۰	۵۰	۵۰۰	۵۰۰	
ABG 715	GGG ACG ACT GTT AAT GAG AT GGG CAT GAG AGC AAT TCA AG	۲/۵	۵۸	۵۷۰	۵۸۰	
ABG 716	ATG GCA TTA GAA GTC GAT CT CTC CAC ACC ATA CTT GAA TC	۳/۰	۵۸	۱۲۰۰	۱۲۰۰	
BARG 010	CCA ACA AAA CAA AAC ACA TA TGA AGC CCA AGC AGG ACA TT	۱/۵	۵۲	۲۱۰	۲۱۰	
BCD 175.1	TGT AAA CCA GCC ATC CGA CA CAT GGA GGA TGT CGC TCA TC	۴/۰	۵۸	۳۲۰	۳۲۰	*HaeIII*
BCD 269	ATT CGG CAC GAG CAA TGG CT CCA ACA CAC ACC ATT ACA CC	**	**	-	-	
BCD 402.1	ACC TTG ATC ACC TGA TCC AC TGC CAC AAC GAC GTG ACG CA	۲/۰	۶۰	۱۵۰۰	۱۵۰۰	#
BCD 828	GTA AAA CGA CGG CCA CT AAC AGC TAT GAC CAT G	۱/۰	۴۸	*	*	
BG 123	TCC AAG AAG AGT CAA GTA AA CAA GCA GTA GGA ATA AGA AC	۱/۵	۵۲	۱۵۰۰	۱۵۰۰	
BTA 002	CCG TGT GGT ATT TCT TTC TC TTG TCC TCG CTG ACG AAC TC	۴/۰	۶۰	۱۵۰۰ + ۲۷۵	۲۸۸	
CDO 213	GGC AGT TGA ATG AGT TTG AG TAA TCA CGA GGT CAC TAA TC	۲/۵	۵۴	*	*	
CDO 474	TTT GGA CCG TTC AGA GTT GC ACG TCC TCT CCA AGG CCA AT	۲/۰	۵۸	*	*	
CDO 475	GAC ACA TTG ACC GCA TCT TA CCT TCA CCT CGC TCC CTA CC	۲/۰	۵۶	*	*	
CDO 673	ACG AGC GTC AGT CGG TCA CT GCC ATT GGT ATT GCG AGA GG	۲/۰	۶۰	*	*	
D 14	CGC TTT TAC CGA GAT TGG TC CCA AAG AGC ATC CAT GGT GT	۲/۵	۵۸	*	*	
MST 101	CCA CCA TGA AGA CCT TCC TC ACC TTG CAT GGG TTT AGC TG	۲/۰	۶۴	۶۵۰ + ۵۵۰ + ۵۰۰	۵۵۰ + ۵۲۰ + ۴۷۰	
MST 102	CCA CCA TGA AGA CCT TCC TC TCG CAG GAT CCT GTA CAA CG	۱/۰	۶۲	۱۰۰۰	۸۰۰	

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳' → ۵')	غلظت $MgCl_2$ (mM)	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزوما موگی	کانتو نکیت گولد	
MST 107	ATG GCC CGC AC(C/G) AAG CAG AC AGC TGG ATG TCC TTG GGC AT	۲/۵	۶۰	۴۵۰ + ۴۰۰	۴۵۰ + ۴۰۰	
MST 108	ATG GCC CGC AC(C/G) AAG CAG AC GAC TTC CT(C/G) GCC GCC TGC AA	۱/۵	۶۶	۲۶۰	۲۸۰ + ۲۵۰	
MST 126	GCT GTC CTC ACC ACC GTC GT ACT GAT GCC GCC ACC AAA CA	۱/۰	۶۴	۴۵۰	۴۵۰	
MST 510	GGT CTT TCA TGT ACC TAC C CGA GCT CCT GTC GAG G	۱/۰	۵۴	۷۰۰	۵۰۰	
Pst 337	ATC CAG TTC TTG TGC ACC TG AGC TAC GTG GAT CAC ACC AC	۲/۵	۵۸	۱۳۰۰	۱۳۰۰	
Rm 5S1	TGG GAA GTC CTC GTG TTG CA CGC GGT GGG AAA AGT CAG AG	۲/۵	۵۸	*	*	
WG 232.1	CCG CTT TCC TCA GTG TTT CA TTC AAC CCC AGG TAT GCT GT	**	**	-	-	
WG 464	AGG ACT GTG AAG ATG CTA CT AGT CCA AAT GAT GTC ACA GG	۱/۰	۵۶	۱۴۰۰	۱۴۰۰	
WG 541	AAT TCG ATC GCA CCG TCG GA TCC AAC CAA AGG AAC GAA GG	۲/۰	۵۸	*	*	
WG 669	AAA GGA GGA GCC CAG TGA TT GAA GGA AAG GTT CCC CAT CC	۲/۵	۶۰	۳۲۰	۳۲۰	
WG 940	GCA CAC ACA AAC GAC GAC GG GCA TTG CAA TAC AGT GAG TC	۲/۵	۵۸	*	*	
WG 996	CCT TCA CTG ACC CCT AAA TA AGC CCA GGT TCT ACA ACA AC	**	**	-	-	

- عدم تولید نوار در واکنش PCR

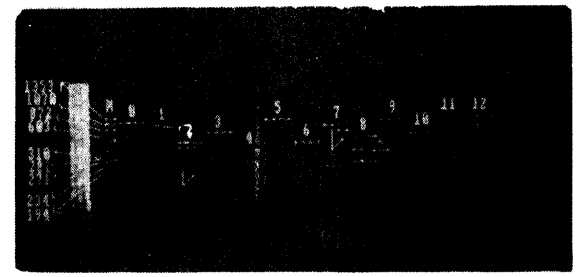
* تولید نوار(های) ضعیف در واکنش PCR

** عدم تعیین شرایط مناسب جهت واکنش PCR

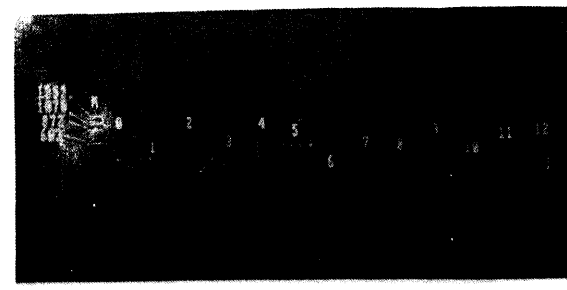
#عدم بررسی نتایج آنزیم های برشی محدود کننده

جدول ۲: ۴۳ آنزیم های برشی محدود کننده مورد استفاده در آزمایش

Acc I	*Bal I*	*Hae II*	*Nla III*	*Sma I*
Acc III	*Bcl I*	*Hinc II*	*Nru I*	*Spe I*
Acy I	*Bsp1286 I*	*Hpa I*	*Nsi I*	*Sph I*
Afl II	*BssH II*	*Mbo II*	*Nsp V*	*Ssp I*
Age II	*Dde I*	*Mlu I*	*Pst I*	*Stu I*
Alw44 I	*EcoO109 I*	*Nar I*	*Pvu II*	*Sty I*
Apa I	*EcoR I*	*Nco I*	*Sac I*	*Xba I*
Ase I	*EcoT38 I*	*Nde I*	*Sac II*	
Ava I	*Fok I*	*Nhe I*	*Sca I*	



اغازگر ABG 616



آغازگر ABG 055

شکل ۱ - نوارهای حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز
M: نشانگر ۱۷۴ ϕ 0 : بدون استفاده از آنزیم برشی ، ۱-۱۲: با استفاده ازآنزیم های برشی ، به ترتیب *HinfI, HhaI, HaeIII, AluI AvaII, NciI, NdeII,AccII, TaqI, ScrFI, RsaI, MspI,*

(۴/۴٪) نوارهای پلی مورفیک نشان دادند، و هیچگونه پلی مورفیسم برای ۵۲ آغازگر دیگر مشاهده نشد.

فراوانی محل های برش یافته در مورد ۱۲ آنزیم برشی ذکر شده کمتر از فراوانی مورد انتظار، یعنی یک محل برش در هر ۲۵۶ جفت باز بود (به استثنای آنزیم های *AvaII, NciI* که یک محل برش برای هر ۵۱۲ جفت باز مورد انتظار بود). همبستگی موجود در بین تعداد کل محل های برش یافته و طول نوارهای تولید شده در واکنش PCR نشان دهنده آن است که نوارهای کوتاه حاصل از واکنش PCR کمتر برش یافته و در نتیجه حاصل از واکنش PCR برای هر آنزیم (به استثنای آغازگرهایی که قبل از برش یافت، پلی مورفیسم نشان دادند) کاملا" متنوع بود چهار آنزیم *NdeII, RsaI, AvaII, AluI* محل های برشی بیشتری را نسبت به دیگر آنزیم ها نشان دادند (بیشتر از نصف فراوانی مورد انتظار) و بنابراین برای مطالعات بعدی توصیه می گردند.

از مجموع ۱۱۷ آغازگر به کار رفته در این آزمایش ، ۷۷ آغازگر قادر به مشخص کردن RFLP نبودند (۴ آغازگر بدون نوار ، ۲۱ آغازگر حاوی نوارهای ضعیف و غیر قابل استفاده و ۵۲ آغازگر حاوی نوار و بدون پلی مورفیسم)، دلیل وجود پلی مورفیسم درمورد ۴۰ آغازگر دیگر اضافه یا حذف شدن قطعه ای از کروموزوم معکوس شدن قطعه ای از کروموزوم و یا جهش های نقطه‌ای بود. کمتر از نیمی از آغازگرهای مذکور به علت اضافه یا کم شدن قطعه ای از کروموزوم پلی مورفیسم نشان دادند که اکثر آنها به صورت همبارز بود (بدون استفاده از آنزیم های برشی) با استفاده از آنزیم های برشی نیز اکثر پلی مورفیسم مشاهده شده به صورت همبارز بود. دلیل پلی مورفیسم مشاهده شده در مورد آغازگر ABG70 پس از برش با آنزیم های *TaqI, AluI* به وارونگی قطعه ای از کروموزوم نسبت داده شد. پلی مورفیسم غالب مشاهده شده در نوارهای حاصل از آغازگرهای ABC253 (بدون استفاده از آنزیم برشی محدودکننده) و ABG366 (پس از برش با آنزیم *TaqI*)، با استفاده از نوار هترودوپلکس (۵ و ۱۰) در افراد ناخالص به پلی مورفیسم همبارز تبدیل گشت. دو نوار مستقل از هم (متعلق به دو مکان ژنی مختلف) در آغازگرهای BTA2 و ABC311 تشخیص داده شد.

بحث

RFLPها دقیق ترین وسیله برای تشخیص اختلاف های DNA دربین گیاهان یک گونه و همچنین بین گونه های مختلف است . اساس مولکولی RFLPها در کم یا زیاد شدن محل های قابل تشخیص برای آنزیم های برشی محدودکننده به علت وقوع جهش‌های نقطه ای و یا بروز یک واقعه مولکولی است که باعث اضافه ، حذف و یا معکوس شدن قطعه ای از کروموزوم می گردد. هر دو این علت ها که عامل پلی مورفیسم یا چند شکلی هستند قابل تشخیص در روش STS-PCR است (۷).

در مورد وجود پلی مورفیسم همبارز بدون استفاده از آنزیم‌های برشی، به دلیل اینکه ابتدا و انتهای نوارهای حاصل از واکنش PCR توالیهای آغازگرهای مورد استفاده است پلی مورفیسم به علت کم یا زیاد شدن قطعه DNA بین دو آغازگر می باشد. علت

پلی مورفیسم ایجاد شده پس از برش باآنزیم ، حذف و یا اضافه شدن محل های قابل تشخیص به وسیله آنزیم های برشی و یاکوچک بودن قطعات حذف یا اضافه شده DNA بین دو آغازگر است که قبل از برش قابل تشخیص نیستند (مورد اخیر در این آزمایش مشاهده نشد). معکوس شدن کروموزومی پس از برش با آنزیم های برشی قابل تشخیص است ، به این صورت که پس از استفاده از آنزیم ، به میزان بزرگتر شدن یکی از نوارها، نوار دیگر کوچکتر دیده می شود. در بین ژل های متعددی که مورد مطالعه قرار گرفت، تنها آغازگر ABG70 وارونه شدن قطعه کروموزومی را نشان داد. بنابراین علت اصلی پلی مورفیسم مشاهده شده پس از استفاده از آنزیم های برشی را می توان به حذف یا اضافه شدن محل های قابل تشخیص بوسیله آنزیم‌های برشی نسبت داد. به طور کلی نتایج این آزمایش نشان می دهد که علت اصلی پلی مورفیسم مشاهده شده ،حذف یا اضافه شدن محل های قابل تشخیص بوسیله آنزیم های برشی است که موافق نتایج تراگون رنگ (۱۴) و مخالف نتایج اسکولینک و والاس (۱۳) می باشد. پراکندگی نایکنواخت محل های برش و فراوانی کمتر از حد انتظار آنها بر روی نوارهای حاصل از واکنش PCR نمایانگر آن است که نوکلئوتیدها به طور تصادفی بر روی قطعه DNA تنظیم نشده اند که موافق گفته های براون (۴) می‌باشد.

تمامی آغازگرهایی که منشاء آنها *Aegilops squarrosa (D14)* یولاف (CDO475, CDO673, CDO213, CDO474) و همچنین ۴ عدد از ٦ آغازگر استفاده شده در این آزمایش که منشا آنها گندم بود (WG232.1, WG541, WG940, WG996) در واکنش PCR فاقد نوار و یا نوارهای بسیار ضعیفی تولید کردند (دو آغازگر WG464 و WG669 پلی مورفیسم نشان ندادند) که احتمالا" نشان دهنده آن است که این گونه آغازگر ها برای مطالعه ژنوم جو مناسب نیستند.

اکثر پلی مورفیسم بررسی شده در این آزمایش با ثبات و تنها یک نوار (احتمالا" مربوط به یک مکان ژنی) نشان دادند. آغازگرهای MST107 و ABG474 نوارهای نسبتا" زیاد باکیفیت پایین تولید کردند که احتمال خطا را در تجزیه نتایج افزایش می داد و بنابراین آغازگرهای مناسبی برای بررسی های ژنتیکی بر پایه واکنش PCR نیستند .

REFERENCES

1. Beckmann, J. S. 1988. Oligonucleotide polymorphism: a new tool for genomic genetics. Bio/Technology 6: 1061-1063.
2. Bekmann, J. S. and M. Soller . 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvment : methodologies, mapping costs. Theor Appl Genet 67:35-43.
3. Blake, T. K. D. Kadryrzhanova, K. W. Shephers; A. K. M. R. Islam. P. L. Langridge; C. L. McDonald; J. Erpelding S. Larson, N. K. Blake and L. E. Talbert. 1966. STS-PCR markers appropriate for wheat-barly introgression. Theor Appl Genet 93:826-832.
4. Brown, T. A. 1996. Gene cloning : an introduction. Chapman and Hall, London
5. Davis, T. M., H. Yu, K. M. Haigis and P. J. McGowan. 1995. Template mixing; a method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. Theor Appl Genet 91:582-588.
6. Dellaporta, S. L. J. Wood and J. B. Hicks. 1985. Maize DNA miniprep. Molecular Biology of plants: a Laboratory Course Manual. (Ed R. Malmberg, J. Messing and I. Sussex) pp. 36-37. Cold spring Harbor Laboratory , New York.
7. Ghareyazie, B. N. Huang; G. Second and J. Bennett. 1995. Classification of rice germplasm I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. Theor Appl Genet 91:218-227.

8. Kleinhofs, A. A. Kilian, M. A. Saghai Maroof, R. M. Biyashev; P. Hayes, F. Q. Chen; N. Lapitan; A. Fenwick T. K. Blake, V. Kanazin, E. Ananiev, L. Dahleen, D. Kudrna; J. Bolinger, S. J. Knapp; B. Liu, M. Sorrells; M. Heun; J. D. Franckowiak, D. HoffmanR. Skadsen and B. J. Steffenson. 1993. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (Hordeum vulgare) genome. Theor Appl Genet 86:705-712.

9. Komatsuda, T. S. Enomoto and K. Nakajima. 1989. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. J. Hered 80: 345-350.

10. Novy, R. G. and N. Vorsa. 1996. Evidence for RAPD heteroduplex formation in cranberry; implication for pedigree and genetic-relatedness studies and a source of co-dominant RAPD markers.Theor Appl Genet 92: 840-849.

11. Saiki, R. K., S. Scarf, F. Faloona, K. B. Mullis , G. T. Horn; H. A. Rlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-glubin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anaemia. Science 230:1350-1354.

12. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol Biol 98:503-517.

13. Skolinck, M. H. and R. B. Wallace.1988. Simultaneous analysis of multiple polymorphic loci using amplified sequence polymorphism (ASPs). Genomics 2:273-279.

14. Tragoonrung , S; V. Kanazin, P. M. Hayes and T. K. Blake. 1992. Sequence-tagged-site facilitated PCR for barley genome mapping. Theor Appl Genet 84:1002-1008.

Study on Polymorphism of Barley Using STS-PCR

B. E. SAYED-TABATABAEI and T. KIMATSUDA

Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran Karaj, Iran and

Senior Researcher, National Institute of Agrobiological Resourses, Japan.

Accepted Oct. 27, 1999

SUMMARY

In order to study DNA polymorphism in barley, various STS primer-sets were tested on genomic DNAs of two Japanese barley cultivars. Out of total of 112 primer-sets used, 92 primer-sets generated DNA fragments either in one or both cultivars. Of 92 primer paris, 16 generated polymorphic fragments without using any restriction endonuclease. Twenty four monomorphic bands were converted to polymorphic bands after endonuclease digestion of PCR products with restriction enzymes. The restriction sites occured less frequently and they were not evenly spaced out along the DNA fragments indicating that the nucleotides were not randomly ordered. The main reason for polymorphism observed in this study might be attributed to the absence or presence of restriction endonuclease sites.

Key words: Barley, STS, PCR, Polymorphism