

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

بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و تا کائوکوما تسودا

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 نایکخواخت بود. این پدیده نشان دهنده آن است که نوکلئوتیدها بطور تصادفی در ساختمان DNA تنظیم نشده اند. 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

ساخت ساختار ژرم پلاسما 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. هر صفت 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) می تواند 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 برنامه های اصلاح کاربردی است (۱ و ۲)، دانشمندان را به ساده کردن این روش واداشت. آغازگرهای ساخته شده بر اساس توالی

DNA کاوشگرهای مورد استفاده در روش ساترن بلاتینگ، یکی از این روشهاست که می تواند در تکنیک PCR (۱۱) مورد استفاده قرار گیرند. به این ترتیب علاوه بر حذف 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 آشکار سازی 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 می رسد 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

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، و در پایان در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

هر محلول واکنش با استفاده از آغازگر ۱/۸٪ و یا متافور ۳٪، تهیه شده در محلول $\times 5/0$ TBE (محلول $\times 1$ 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 $\phi 174$ استفاده گردید. ژل ها به مدت لازم در شرایط ۵ ولت بر سانتی متر قرار داده شده و سپس بوسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده از فیلم ۶۶۷ پولاوید 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, AvalI, AluI, AccII*) قرار گرفتند (شکل ۱). در صورت عدم مشاهده پلی مورفیسم، نوارهای حاصل از واکنش 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. ۱۶ 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

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 کانتونیکت گولد و آزوما موگی که واکنش متفاوتی در کشت بافت آن مشاهده شده بود، انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند. کانتونیکت 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 DNA گیاهان والد و F1 برای تجزیه STS-PCR بر اساس روش دلاپورتا و همکاران انجام گردید (۶). 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 میکرو لیتری با یک قطره روغن معدنی انجام گردید. اجزا محلول واکنش از شرکت پرومگا و حاوی ۲۵/۰ واحد Taq پلیمرز، ۳/۰ میکرومول آغازگر، تقریباً ۲۰ نانوگرم DNA، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۱-۴ میلی مول کلرور منیزیم (بر حسب مقدار مناسب برای هر آغازگر) و بافر $1 \times (10 \times)$ 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 و اسرشت 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 به DNA (بر حسب هر

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 جهت آغازگر (۳' → ۵')	غلظت MgCl ₂ (mM)	غلظت (°C) DNA	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آنزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزما موگی	کانتوریکیت گرید	
ABA 001	GGG GAG ATA TCG ACC AAA GT CAC GCC CTC GCC AAC GCT CTC CA	۱/۵	۵۶	۱۱۰۰+۷۰۰	۱۱۰۰+۷۰۰	<i>AluI, NdeII, RsaI, TaqI</i>
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	<i>AluI, HaeIII, HinfI, MspI, RsaI, SeeFI, TaqI</i>
ABC 151	GTG CCG TAG ATA GGA AGG TG CAT GGT ACA AAC TCT CAA CT	۱/۰	۵۴	*	*	
ABC 152	TCC GCA AGT ACC AGA AGA GC GAC AAG GAA AGC CAA TCA AC	۱/۰	۵۶	۲۵۰	۲۵۰	
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	۱/۰	۶۲	۱۶۰	۱۶۰	
ABC 156.2	TCA TCA TCC AAG AAC GAA GG GAA TAT GAA GAT TCT GAT CT	۱/۵	۵۰	۳۱۰	۳۱۰	
ABC 156.5	CAT AAT GTG GGG TGC CAT AC CAA GGA GGA TCA AGT AGT CA	۱/۰	۵۶	*	*	
ABC 160	AAC AAG GCC GCA TGG ATG TA GCC AGC GCT CCG GTC TGG TC	۱/۰	۶۲	۲۴۰	۲۴۰	<i>HinfI</i>
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	۱/۰	۵۲	*	*	
ABC 170	ACG GTT GCT GTG GGT GTG AT AAC GAT ACA ATG ACC AGA GC	۱/۰	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	۱/۰	۵۶	۶۰۰-۵۰۰	۶۰۰	<i>AvaII</i>
ABC 255	CGA ATT CCG AGA CAT CAA AT GAT CAT CGT GGA TGG AGT GT	۱/۰	۵۶	۶۵۰	۶۵۰	
ABC 261	AAA GTC AAG AGT TGC ATC AA AGG AAG CTC AAG AAG GTG AA	۱/۰	۵۲	۱۸۰۰	۱۸۰۰	<i>AluI, HaeIII, HhaI, HinfI, MspI, RsaI, TaqI</i>
ABC 302.1	GTG GTA AAG GAG CCG TTG AT CAG AGT ACA GGA CAG ACA GT	۱/۵	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	۱/۰	۵۸	۱۳۰۰+۲۵۰	۱۳۰۰+۲۵۰	

انگله جدول ۱

آزمایش تکثیر کننده پایی موربوس

نام آنزیم	توالی جهت آغازگر (۳' → ۵')	مطابقت اتصال آغازگر به DNA (°C)		اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		آزومای	کفایت تکثیر	نوع آنزیم	
		غلظت MgCl ₂ (mM)	دما	دما	آزومای				
ABC 305	GAC AAC GGC CAA CAA ATC TA AGC ATG TCA TTG AAC ACT TC ACG GCC TCA GGA CCT ACT CC GCA TAC ACA TAC ATT CAC AT CCT CGC TGA AAC TAA TCA AA ACA TGG TGC CAT TCA CAA AT TCC TGA TGG TCC TCT TAT GC ACA TAG TTC TCT TCC CAG TA CCA ACC AAT GTG AAC TAA CA AGT GTC CCT CCT GAA GTC AT GCC ACA TCA CCC TCT T TCG TCA CAG GTT TCA C	۲/۰	۵۲	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰		
ABC 306	CAG TAA CCA AAA CGA CAA AC TTC AAC GAG GGA TCA ATC TT GCG TGC GAG GGG AAG GAG AA TTC ACA GCC GAA ACA CTT GT GTG GGT TCC TCT TTG TTG AG CAC GCT CCT AAA CGC ACT CC CAC GAC AGA CCG ACC AAA TG GCT ACT GGG ACA AAA TCT CC CCA CCA GAT AAC TCT TCA TA TGA GCA ATA CAG GGC TGA TG GGG CAC GAC GAC ACA CTC AG TGC ATC ACC GAC GAC AGA CC CAA TAC GGC AAC AAA TAA CA CCC CAC CAA AAT TAC CAG TC CAA CAG AAA GCT GCT AGA GC ATA GGA ACG GTG GTT ATT TT CGG GAG GAG GGG AAG AGG AC AGG ACC AAA GCA CCT GAA CC TGA GTT CCT TGA TAG ATA CA CTT AGC ATT TGA GTT TGA GA TCG CGA TGA TGT TCT TCA GG ACT CTC CTT CTG GGT CCA GG GCA AAG CGA CTA TTT TTC AT TGG ACC CAG AAG GAG AGT GC TGG CGA TGA TGT TCT TCA GG TGG ACC CAG AAG GAG AGT GC TAA TTG CAT GAG TCT GAA TC ACT TAA AAA TAG TCC CAC TG GAT GTC CAA CCG TGG CTT GA GTG CTT GGC GGT CGA CCA GT	۱/۰	۵۲	۵۵۰	۵۵۰	۵۵۰	۵۵۰	۵۵۰	
ABC 308		۱/۵	۴۸	*	*	*	*		
ABC 310		۲/۵	۵۲	*	*	*	*		
ABC 311		۲/۰	۴۸	۷۱۰+۲۰۰+۶۱۰+۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰		
ABC 323		۱/۰	۴۸	۶۵۰	۶۵۰	۶۵۰	۶۵۰		
ABC 451		۲/۵	۵۲	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	AvonII	
ABC 454		۱/۰	۶۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	#	
ABC 455		۲/۵	۵۸	*	*	*	*		
ABC 465		۱/۵	۵۸	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰		
ABC 468		۲/۵	۵۲	۱۷۰۰+۸۰۰	۱۷۰۰+۸۰۰	۱۷۰۰+۸۰۰	۱۷۰۰+۸۰۰	#	
ABC 483		۲/۰	۶۲	۹۰۰	۹۰۰	۹۰۰	۹۰۰		
ABC 717		۱/۰	۵۲	۷۵۰	۷۵۰	۷۵۰	۷۵۰	HindI	
ABC 718		۴/۰	۵۸	۲۷۰	۲۷۰	۲۷۰	۲۷۰		
ABG 004		۲/۵	۶۲	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰		
ABG 010		۲/۵	۵۲	*	*	*	*		
ABG 020.1		۲/۰	۵۲	۸۰۰+۵۰۰	۸۰۰	۸۰۰	۸۰۰		
ABG 020.11		۱/۰	۵۲	۱۰۰۰+۶۰۰	۱۰۰۰+۶۰۰	۱۰۰۰+۶۰۰	۱۰۰۰+۶۰۰		
ABG 020.12		۲/۵	۶۲	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰	۱۲۰۰		
ABG 053		۱/۵	۵۲	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰		
ABG 054		۱/۰	۶۲	۲۲۵	۲۲۵	۲۲۵	۲۲۵		

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر (۳' → ۵')	(mM) MgCl ₂ غلظت	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	اندازه باز حاصل در واکنش PCR		انزیم آشکار کننده پلی مورفیسم
				آزودا مورفی	کانتیو کیت گولد	
ABG 055	CAG GCA AGA TTG ACG CAG TA ATC CGC AGC AGA TGG AGG AC	۱/۵	۶۲	۷۵۰	۷۵۰	<i>AluI, AvaII, HhaI, HinfI</i>
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 GGG GT SCA CGA GTG AGC TGA GAG TG	۱/۵	۵۴	۲۷۰	۲۷۰	
ABG 057.4	TTA TAA GCA TAG ACT GGG GT GGT CAC CCA TCC AGT TCT TG	۲/۱۰	۵۶	۱۲۰۰	۱۲۰۰	<i>HaeIII</i>
ABG 058	AGA ACT GGA GGA ACG AGA TA ACC CAG GCT TGA TTA TTA GG	۲/۱۵	۵۸	-	۱۰۰۰	
ABG 059	GCC ATC ACG AGT TTA GTC TT TTC GGG TTG AGT CTG TTA GC	۲/۱۵	۵۶	۲۷۵	۲۷۵	
ABG 064	GGG TAT GCA TGG ACG TGG TC GGC TGA ATC ATC CGC TCA TA	۲/۱۵	۶۲	۵۵۵	۵۵۵	<i>AccII, HaeIII, TaqI</i>
ABG 065	TGA GTA TCT ATC GGC GGT TA GGC GAC TCT GAT GCT ACG AT	۲/۱۵	۵۶	*	*	
ABG 070	GGA CCA AGC AAA TAT CTC AG AAC ACG AGT TTG AAT TTT AC	۲/۱۵	۵۲	۵۰۰	۵۰۰	<i>AluI, AvaII, HinfI, MspI, NdeII, TaqI</i>
ABG 075	AGC ATG TAC AAG AAC AGA AA CCA TTA GTG ACA CAG GTG AG	۱/۱۵	۵۴	-	۱۲۰۰	
ABG 153	AAA CAC CTC CTG GCT CTC AG GCC TCT GCC GCT GGA ACT AC	۱/۱۵	۶۰	۲۷۰	۲۷۰	
ABG 317	AAC TCT GGG TGG TTT GTG AA CAT GAT GGG TCA AGC TCT GT	۲/۱۰	۵۴	۱۰۰۰+۴۵۰+۲۵۰	۱۰۰۰+۴۵۰+۲۵۰	
ABG 320	AGA CGA GTG GAC ACA TGA TG TCA ACT GAG GTA GAA TAC TA	۲/۱۰	۵۶	۵۶۰+۵۵۰+۵۳۰	۵۶۰+۵۵۰	
ABG 356	GAT CCA ACA GCA AGG AAA GA CCA ACA ATA AAG AAT CAA AT	**	**	-	-	
ABG 366	AAC CCC GAC AAG CCA AGA GC CGC ACC CGC AGC CAC AGA GG	۲/۱۰	۶۲	۸۰۰+۴۰۰	۸۰۰+۴۰۰	<i>TaqI</i>
ABG 377.1	GCT GCT ATG AGG AGA GAA CC TGG TAT GAA ACA GGT GAA TA	۲/۱۵	۵۶	۵۰۰	۵۰۰	
ABG 378	TTA GTC ATA GAA TCC CTG TT AAA AAT CGC CTG TGC TGT GT	۲/۱۵	۵۰	۲۵۰	۲۵۰	
ABG 379	GCT GAG TTA CAG AAA GTT CC TTT GTA GTT CTG ATG GTG TG	۲/۱۰	۵۴	۶۰۰	۶۰۰	
ABG 380	CAC GAA CAG AAG GAG ACT AA AAA CCC TAC ATC ATC TTT TT	۲/۱۵	۵۲	۵۰۰+۳۲۰+۴۰۰+۲۰۰	۵۲۰+۳۲۰	
ABG 391	CAT CAA ACT CAA TGC AAG TG CGG TGA ATT CCG TGC ATT T	۲/۱۰	۵۶	۶۰۰	۶۰۰	<i>TaqI</i>
ABG 394	GGG TGT TGC TCA TGC TCT TT CGA TGT AAT AAA AAT TAG GT	۱/۱۵	۵۰	۲۸۰	۲۸۰	

ادامه جدول ۱

نام آغازگر	توالی جهت آغازگر (۵' → ۳')	(mM) MgCl ₂	غلظت DNA (°C)	اندازه نوار حاصل در واکنش PCR		انزیم آشکار کننده پلای مورفسم
				آزوما موگی	کانتو نیکت گولد	
ABG 396.1	GGG TCA CAA AGA CGG AGG AG AGG AAA CCT ATG TAA TCA TC	۱/۰	۵۲	۴۰۰	۴۰۰	SerFI
ABG 397.1	GCA AAA CAC ACT AGA TTT TA ATG CGA GCA GAA ACT TAG GA	۳/۰	۵۴	۱۷۰	۱۷۰	
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	MspI
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	۶۸	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	FokI
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 473.1.1	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 + ۱۲۵۰ + ۶۵۰ + ۲۷۰	۱۶۰۰ + ۱۲۵۰ + 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	NdeII
ABG 603	AAG TGC AAG CAG GCT CTG AC GGT GTT GGT GTC GAG CAC TC	۲/۵	۶۲	۲۵۰	۲۵۰	
ABG 608	TGA ACC ACG AAG CCA CCA CT AGC CCT CCA ACC TCT TCT CC	۱/۰	۶۰	۹۰۰ + ۶۰۰	۹۰۰ + ۶۰۰	MspI, NdeII, NciI, ScrFI
ABG 609	ATC AAT GGA GAT TTG CTT AC TTA TTG CAA AGG AAA CAA AA	۱/۵	۵۶	۱۱۰۰	۱۱۰۰	
ABG 613	ACA TAT TTC CCT TCC CAG TC GAG ATG GTG TCG GAG CTT AG	۲/۰	۲۸	۴۰۰ + ۲۰۰	۴۰۰ + ۲۰۰	AseI
ABG 616	CCC TGA AGG ATG ACT CTC TA	۱/۵	۵۸	۱۳۰۰	۱۳۰۰	HaeIII, ScrFI, TaqI

ادامه جدول ۱

نام انزیم	توالی جهت آغازگر (۳' → ۵')	(mM) MgCl ₂ غلظت	دمای اتصال آغازگر به DNA (°C)	انزیم بول حاصل در واکنش PCR		انزیم اشکار کننده باس مولوسم
				آزوما مولی	کنترو تکیت مولد	
MST 107	ATG GCC CGC AC(C/G) AAG CAG AC AGC TGG ATG TCC TTG GGC AT	۷/۵	۶۰	۲۵۰ + ۳۰۰	۲۵۰ + ۳۰۰	
MST 108	ATG GCC CGC AC(C/G) AAG CAG AC GAC TTC CT(C/G) GCC GCC TGC AA	۷/۵	۶۶	۲۶۰	۲۸۰ + ۲۵۰	
MST 126	GCT GTC CTC ACC ACC GTC GT ACT GAT GCC ACC AAA CA	۷/۰	۶۴	۲۵۰	۲۵۰	
MST 310	GGT CTT TCA TGT ACC TAC C CGA GCT CCT GTC GAG G	۷/۰	۵۴	۷۰۰	۵۰۰	
Pst 337	ATC CAG TTC TTG TGC ACC TG AGC TAC GTG GAT CAG ACC AC	۷/۵	۵۸	۱۳۰۰	۱۳۰۰	
Rrm 581	TGG GAA GTC CTC GAG TTG CA CGC GGT GGG AAA AGT CAG AG	۷/۵	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	۷/۰	۵۶	۱۴۰۰	۱۴۰۰	
WG 541	AAT TCG ATC GCA CCG TCG GA TCC AAC CAA AGG AAC GAA GG	۷/۰	۵۸	*	*	
WG 669	AAA GGA GGA GCC CAG TGA TT GAA GGA AAG GTT CCC CAT CC	۷/۵	۶۰	۳۲۰	۳۲۰	
WG 940	GCA CAC ACA AAC GAC GAC GG GCA TTG CAA TAC AGT GAG TC	۷/۵	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	Bsp I 286 I	Hpa I	Nsi I	Sph I
Afl II	BstH II	Mbo II	Nsp V	Ssp I
Age II	Dde I	Mlu I	Pst I	Stu I
Alw44 I	EcoO 109 I	Nar I	Pvu II	Spy 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	

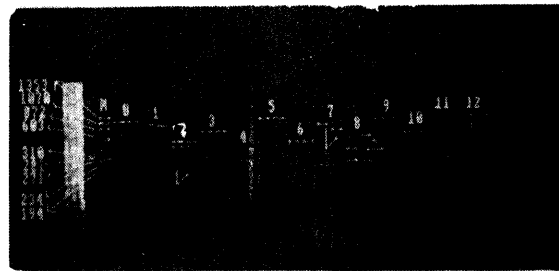
بنابراین برای مطالعات بعدی توصیه می گردند.

از مجموع ۱۱۷ آغازگر به کار رفته در این آزمایش، ۷۷ آغازگر قادر به مشخص کردن RFLP بودند (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 در مورد ۴۰ آغازگر دیگر اضافه یا حذف شدن قطعه ای از کروموزوم معکوس شدن قطعه ای از کروموزوم و یا جهش های نقطه ای 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 همباز بود (بدون استفاده از آنزیم های برشی) با استفاده از آنزیم های برشی نیز اکثر پلی مورفیسم مشاهده شده به صورت همباز 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 محدود کننده) و ABG366 (پس از برش با آنزیم *TaqI*)، با استفاده از نوار هترو دو پلکس (۵ و ۱۰) در افراد ناخالص به پلی مورفیسم همباز تبدیل گشت. دو نوار مستقل از هم (متعلق به دو مکان ژنی مختلف) در آغازگرهای BTA2 و ABC311 تشخیص داده شد.

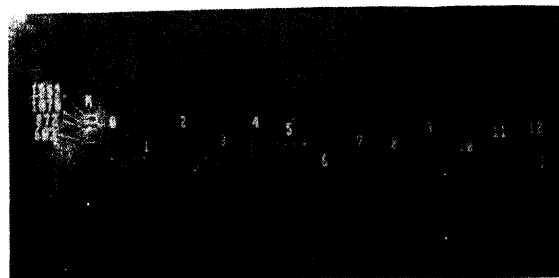
بحث

RFLP دقیق ترین وسیله برای تشخیص اختلاف های DNA در بین 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 محدود کننده به علت وقوع جهش های 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 همباز بدون استفاده از آنزیم های 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



آغازگر ABG 616



آغازگر ABG 055

شکل ۱- نوارهای حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز

M: نشانگر ۱۷۴ϕ بدون استفاده از آنزیم برشی، ۱-۱۲: با استفاده

از آنزیم 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) کاملاً 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

PCR نمایانگر آن است که نوکلئوتیدها به طور تصادفی بر روی قطعه DNA تنظیم نشده اند که موافق گفته های براون (۴) می باشد.

تمامی آغازگرهایی که منشاء آنها *Aegilops squarrosa* (D14) یولاف (CDO475, CDO673, CDO213, CDO474) و همچنین ۴ عدد از ۶ 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 احتمالاً نشان دهنده آن است که این گونه آغازگرها برای مطالعه ژنوم جو مناسب نیستند.

اکثر پلی مورفیسم بررسی شده در این آزمایش با ثبات و تنها یک نوار (احتمالاً مربوط به یک مکان ژنی) نشان دادند. آغازگرهای MST107 و ABG474 نوارهای نسبتاً زیاد با کیفیت 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.

پلی مورفیسم ایجاد شده پس از برش با آنزیم، حذف و یا اضافه شدن محل های قابل تشخیص به وسیله آنزیم های برشی و یا کوچک 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 بسین 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 آنزیم های 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 نایکخواخت محل های برش و فراوانی کمتر از حد انتظار آنها بر روی نوارهای حاصل از واکنش

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 improvement : methodologies, mapping costs. *Theor Appl Genet* 67:35-43.
3. Blake, T. K. D. Kadryzhanova, K. W. Shephers; A. K. M. R. íslam. 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. Hoffman R. 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-globin 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. Skolnick, 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 Resources, 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 pairs, 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 occurred 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