شناسایی ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه با هیبریداسیون DNA ژنومی در محل (GISH)

سوده خنامانی فلاحتی پور[۱*]، حسین شاهسوند حسنی[۱]، امین باقی زاده[۲] و قاسم کریم زاده[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۸/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۳۰)

چکیده

از روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل به منظور شناسایی ترکیب کروموزومی آنیوپلوئید و یوپلوئید نسل‌های در حال تفکیک گیاهان مختلف استفاده شده است. در این مطالعه روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل روی سلول‌های مریستم ریشه ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی پایرم ثانویه (F_2: 2n=6x=42, AABBDE^b)، با نشان‌دار کردن DNA ژنومی علف شور ساحل (2n=2x=14, E^{b}E^b) با نوکلئوتید فلئورسین 12-dUTP و پیش هیبریداسیون DNA ژنومی غیر نشان‌دار گندم هگزاپلوئید بهاره چینی (2n=6x=42, AABBDD) برای اولین بار در ایران انجام شده و نتایج نشان داد که نه تنها تعداد کروموزوم‌های ژنوم E^b این ژنوتیپ‌ها بسیار متنوع است بلکه حاوی تعداد متفاوتی از کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B و D در مقابل E^b نیز هستند. درصد آنیوپلوئیدی در ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی پایرم ثانویه (F_2) از ۳۰ تا ۶۶/۷ درصد متغیر بود. می‌توان این تغییرات آنیوپلوئیدی را به وجود ترکیبات مختلفی از تعداد کروموزوم‌های E^b و D در ساختار ژنومی این ژنوتیپ‌ها نسبت داد. خودگشنی یا تلاقی برگشتی ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی پایرم ثانویه (F_2) با ارقام گندم نان در طی چندین نسل ممکن است منجر به ایجاد ثبات کروموزومی در آنها شده و درصد آنیو پلوئیدی کاهش یابد.

واژه‌های کلیدی: هیبریداسیون DNA ژنومی در محل، تریتی پایرم ثانویه، نوکلئوتید فلئورسین 12-dUTP، علف شور ساحل، آنیوپلوئیدی

مقدمه

خاک‌های متأثر از شوری مشکل عمده و فراگیر اکثر کشورها از جمله ایران است که اراضی قابل توجهی را از تولید محصولات زراعی خارج نموده است. اصلاح واریته‌های ژنتیکی متحمل به شوری مستلزم دانش و آگاهی در مورد ماهیت و کنترل ژنتیکی این صفت پیچیده خواهد بود (۸). لاین‌های تریتی پایرم اولیه اکتاپلوئید (2n=8x=56, AABBDDE^{b}E^b) و هگزاپلوئید (2n=6x=42, AABBE^{b}E^b) که به ترتیب از تلاقی گندم هگزاپلوئید نان و گندم دوروم با گونه علف شور ساحل (2n=2x=14, E^{b}E^b) ایجاد شده‌اند، تنوع وسیعی را در صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، زراعی و سیتوژنتیکی نشان داده‌اند (۱۱). هر چند که در این غله جدید به‌ویژه لاین‌های هگزاپلوئید

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه باهنر کرمان

۲. استادیار مرکز بین المللی علوم تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان

۳. دانشیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: falahati7777@yahoo.com

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

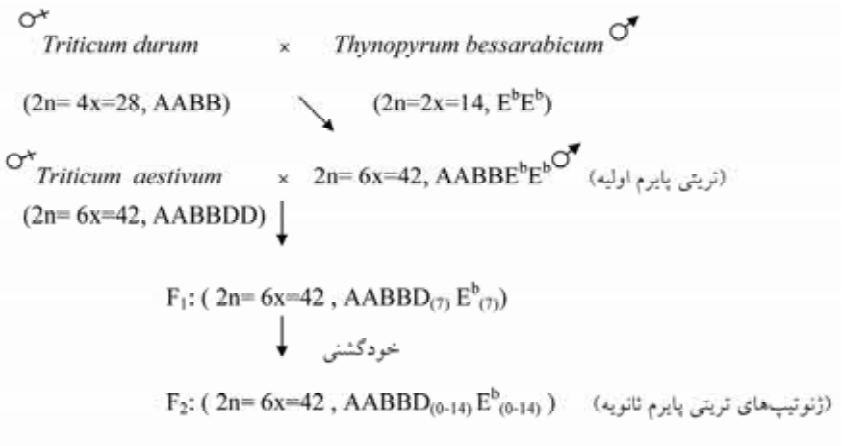
[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

آن شواهدی محکم مبنی بر وجود پتانسیل ژنتیکی برای معرفی به عنوان یک گیاه زراعی جدید و مقاوم به تنش شوری دیده می‌شود با این وجود صفات دیررسی، شکنندگی محور سنبله و بارروی پایین احتمالاً به دلیل وجود برخی ژن‌های نامطلوب مستقل روی کروموزوم‌های پایه پدری علف شور ساحل (E^bE^b) بوده و به لاین‌های تریتی پایرم اولیه به ارث رسیده است، مانع توسعه زراعی این گیاه می‌شود(۱). اصلاحگران با انتقال ژن‌های صفات زراعی مطلوب مانند تحمل به انواع بیماری‌ها و تنش‌های محیطی شامل شوری و خشکی از گونه‌های وحشی به گونه‌های زراعی اقدام به تولید آلوپلوئیدهای مصنوعی نموده‌اند (۲۳).

در مطالعات مولکولی دو راه برای شناسایی کروماتین وحشی در دورگ‌های بین گونه‌ای وجود دارد. نخستین راه، استفاده از DNA ی تکراری اختصاصی گونه گندم می‌باشد. بخش زیادی از DNA در غلات را توالی‌های تکراری تشکیل می‌دهد که در گونه‌هایی از گندم، چاودار و جو شناسایی شده است (۱۷). راه دیگر استفاده از DNA ی ژنومی گونه وحشی پس از نشان‌دار شدن به عنوان شناساگر (Probe) است که آن را هیبریداسیون DNA ژنومی در محل (Genomic *In Situ* Hybridization) می‌نامند DNA ی کامل گونه‌ای که به عنوان DNA ی مسدود کننده(DNA Blocking) توالی‌های مشترک در نتاج حاصل از نسل‌های تفکیک یافته بین گونه‌ای استفاده می‌شود نشان‌دار نشده و با غلظت بالاتری نسبت به DNA ی شناساگر استفاده می‌گردد. DNA ی مسدود کننده زودتر از DNA ی شناساگر نشان‌دار به DNA ژنومی روی نتاج هیبرید هدف دورگه سازی(Hybridization) می‌شود (۲۱). کلون‌های ژنومی از گیاهان عالی اغلب شامل توالی‌های تکراری و همین طور توالی‌های مربوط به ژن هدف بوده که می‌توان از آنها در هیبریداسیون DNA ژنومی در محل استفاده کرد. هیبریداسیون DNA در محل یک ابزار قدرتمند برای نقشه یابی کروموزوم و تجزیه و تحلیل ساختار ژنوم و تکامل آن است. در زمینه سیتوژنتیک گیاهی، از این تکنیک به منظور شناسایی ژنوم والدین در آلوپلوئیدها و هم‌چنین شناسایی قطعات کروموزوم‌های غیر ژنوم اصلی در لاین‌های دارای کروموزوم مبادله شده، مشاهده بیان ژن و هم‌چنین به منظور تعیین موقعیت توالی‌های خاص روی کروموزوم‌ها استفاده شده است. هیبریداسیون DNA در محل روشی مستقیم را برای نقشه‌یابی فیزیکی توالی‌های DNA روی کروموزوم‌ها فراهم نموده است. با این تکنیک ترتیب توالی‌ها و فواصل فیزیکی بین آنها مشخص می‌شود. بسته به هدف هیبریداسیون، فواصل یک مگا جفت بازی در کروموزوم‌های متافازی (۱۵)، ۱۰۰-۵۰ کیلوبازی در هسته‌های اینترفازی (۲۲) و ۳ کیلو بازی در فیبرهای کروماتینی گسترش یافته در گیاه (۱۰) قابل تشخیص است. این تکنیک یکی از مکمل‌های مهم، در پروژه‌های نقشه‌یابی ژنومی در چندین گونه به شمار می‌رود. بیش از دو دهه است که از این روش در گونه‌های گیاهی برای تعیین محل توالی‌های تکراری روی کروموزوم‌ها و نیز شناسایی کروموزوم‌های وارد شده از اجداد وحشی به گیاهان زراعی استفاده می‌شود (۱۴). از این روش برای مطالعه ساختار کروموزومی و وضعیت یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی در ژنوتیپ‌های دورگ حاصل از تلاقی گندم با جو (۱۶و۱۷)، آجیلوپس (*Aegilops*) (۴)، چاودار (*Secale cereale*) (2n=2x=14, RR) (۲۰) و گونه‌های مختلف جنس *تینوپایرم* اعم از *تینوپایرم پونتیکم* (*Thinopyrum ponticum* (2n=10x=70)) (۲ و۳)، *تینوپایرم اینترمدیم* (*Thinopyrum intermedium* (2n=6x=42)) (۶، ۷ و۱۲) و *تینوپایرم بسارابیکم* (*Thinopyrum bessarabicum* (2n=2x=14, E^bE^b)) (۹ و۲۴) استفاده شده است. هدف از این مطالعه تولید توده مبدأ (F_1) حاصل از تلاقی ارقام مختلف گندم نان ایرانی و لاین‌های اولیه تریتی پایرم و نتاج تریتی پایرم ثانویه (F_2) حاصل از خودگشنی نسل F_1 و بررسی ساختار کروموزومی و مطالعه آنیوپلوئیدی در تریتی پایرم‌های ثانویه (F_2) با روش نوین سیتوژنتیک مولکولی هیبریداسیون DNA ژنومی در محل روی نمونه سلول‌های مریستم ریشه این ژنوتیپ‌هاست تا بتوان در جهت اصلاح

[Downloaded from jstmar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]



نمودار ۱. مراحل تهیه لاین‌های اولیه ($2n= 6x=42, AABBE^bE^b$) و ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی پایرم هگزاپلوئید [$2n= 6x=42, AABBD_{(0-14)}E^b_{(14-0)}$]

جدول۱. انواع ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) حاصل از خودگشنی نتاج F_1 به‌دست آمده از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی پایرم با ارقام گندم نان ایرانی

نوع تلاقی		تعداد بذرهای F_1	تعداد بذرهای F_2
پایه پدری	پایه مادری		
امید	St/b	۱۰	۱۰۱۷
کویر	Ka/b	۱	۰
نوید	(Ka/b)×(Cr/b), F_2	۱	۱۱۰
نوید	(St/b)×(Cr/b), F_3	۱	۱۱۰
نوید	Az/b	۱	۱۱۰
نوید	La/b	۱	۱۲۰
	جمع کل	۱۵	۱۴۶۷

لاین‌های اولیه تریتی پایرم با بهره‌گیری از این نشانگر سیتوژنتیکی، به گزینش ژنوتیپ‌هایی از تریتی پایرم ثانویه (F_2) اقدام کرد که در ضمن حفظ صفات مطلوب لاین‌های اولیه تریتی پایرم به خصوص صفت مقاومت به شوری، سایر خصوصیات نامطلوب نیز در آنها حذف و یا کاهش یافته باشد.

مواد و روش‌ها

- **تولید مواد گیاهی**

از سال زراعی ۸۵-۱۳۸۳ تلاقی‌های متعددی بین لاین‌های اولیه تریتی پایرم ($2n=6x=42, AABBE^bE^b$) (جدول ۲) با ارقام گندم‌های هگزاپلوئید ایرانی ($2n=6x=42, AABBDD$) برای رفع برخی خصوصیات نامطلوب از طریق جایگزین کردن کروموزوم‌هایی از ژنوم D گندم نان با کروموزوم‌های ژنوم E^b در تریتی پایرم‌های اولیه انجام و نتاج حاصل (F_2) ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (Secondary Tritipyrum) نامیده شدند (نمودار ۱). به منظور شناسایی کروموزوم‌های گونه وحشی علف شور ساحل در تریتی پایرم‌های ثانویه (F_2)از روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل استفاده شد.

ریشه‌چه‌های بذری ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی پایرم (F_2) حاصل از خودگشنی نسل F_1 که از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی پایرم با ارقام ایرانی گندم نان به دست آمده‌اند، به منظور تهیه نمونه کروموزومی میتوز مورد استفاده قرار گرفتند (جدول۱).

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

جدول ۲. انواع لاین‌های هگزاپلوئید تریتی پایرم اولیه

علائم اختصاری	انواع لاین‌های هگزاپلوئید تریتی پایرم اولیه	پایه پدری (علف شور ساحل)	پایه مادری (ارقام دوروم)
Az/b	Aziziah/ *Thinopyrum bessarabicum*	*Thinopyrum bessarabicum*	Aziziah
Ka/b	Karim/ *Thinopyrum bessarabicum*	*Thinopyrum bessarabicum*	Karim
La/b	Langdon/ *Thinopyrum bessarabicum*	*Thinopyrum bessarabicum*	Langdon
St/b	Stewart /*Thinopyrum bessarabicum*	*Thinopyrum bessarabicum*	Stewart
(Ka/b) (Cr/b)	Karim/*Thinopyrum bessarabicum* × Creso/ *Thinopyrum bessarabicum*	Creso/*Thinopyrum bessarabicum*	Karim/*Thinopyrum bessarabicum*
(St/b) (Cr/b)	Stewart/ *Thinopyrum bessarabicum* × Creso/ *Thinopyrum bessarabicum*	Creso/*Thinopyrum bessarabicum*	Stewart/*Thinopyrum bessarabicum*

- **هیبریداسیون DNA ژنومی در محل (GISH)**

شامل مراحل زیر انجام شد.

۱- استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی از علف شور ساحل و گندم رقم بهاره چینی بر طبق روش کوماتسودا و همکاران (۱۳) با اندکی تغییرات انجام و غلظتDNA با دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer) مدل کری ۵۰ (CARY50) ساخت شرکت واریان (VARIAN) استرالیا تعیین شد (۱۳). از DNA ژنومی گیاه علف شور ساحل به منظور تهیه نشانگر ژنومی نشان‌دار شده با نوکلئوتید فلئورسین 12-dUTP (-Fluorescein 12-dUTP: 1- Fluorescein-6-carboxaminocaproyl-[5-{3-aminoallyl}-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate]) و از DNA ژنومی گندم رقم بهاره چینی به منظور تهیه نشانگر ژنومی غیر نشان‌دار جهت مسدود کردن نواحی غیر هدف روی کروموزوم‌های ژنوم گیاهان دورگ F_1 حاصل از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی پایرم با ارقام ایرانی گندم نان و ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) حاصل از خودگشنی نسل F_1 استفاده گردید.

۲- تهیه اسلاید سلول‌های مریستم ریشه چه (DNA هدف)

اسلایدهای کروموزومی از مریستم ریشه گیاهان دورگ F_1 و F_2 مطابق با روش شوآرتزر و همکاران (۲۱) و حسنی (۸) تهیه گردید (۹ و ۲۱).

۳- تهیه نشانگر DNA ژنومی علف شور ساحل با نوکلئوتید فلئورسین12-dUTP

نشانگر ژنومی DNA از علف شور ساحل با واکنش شکاف و ترجمه (Nick translation) طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز(Fermentaz) انجام گردید. روش کار بدین صورت بود که هشت ماده شامل ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر با غلظت ده برابر (10X reaction buffer for DNA Polymerase I) برای DNA پلیمرازI، ۱ میکرولیتر مخلوط سه نوکلئوتید غیر نشان‌دار (2'-deoxythymidine5'-triphosphate, 1mM) با غلظت یک میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر نوکلئوتید dTTP با غلظت یک میلی مولار، ۱ میکرولیتر فلئورسین 12-dUTP با غلظت یک میلی مولار، ۱ میکرولیتر دی اکسی ریبونوکلئاز I (Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase-free) با غلظت ۰/۰۰۲ واحد بر میکرولیتر و عاری از ریبونوکلئاز، ۱/۵-۰/۵ میکرولیتر(۱۵-۵ واحد) از DNA پلیمراز I مربوط به اشرشیاکلی (*E.coli*)، ۰/۵-۰/۲۵ میکروگرم تقریباً معادل ۱ میکرولیتر از DNA ژنومی علف شور ساحل با یکدیگر در یک ویال کوچک ۰/۲ میلی‌لیتری تهیه و حجم واکنش با آب مقطر دو بار تقطیر

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

استریل عاری از نوکلئاز به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (۵ و ۱۹) سپس محلول تهیه شده به یک انکوباتور یخچال دار با دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت منتقل شد و سپس بلافاصله در درون قرار گرفت. برای توقف واکنش، مقدار یک میکرولیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار با pH =۸ به ویال اضافه شد.

۴- هیبریداسیون DNA ژنومی در محل به منظور مطالعه ساختار کروموزومی در ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2)

هیبریداسیون DNA ژنومی در محل بر طبق روش شوآرتزر و همکاران (۲۱) و ریدر و همکاران (۱۸) و مرحله پیش هیبریداسیون ژنومی DNA غیر نشان‌دار مطابق روش اصلاح شده حسنی و همکاران (۹) روی اسلاید تهیه شده از سلول‌های مریستم ریشه چه ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) برای تعیین آنیوپلوئیدی و شمارش تعداد کروموزوم‌های E^b در آنها انجام گرفت (۹، ۱۸ و ۲۱). هیدرولیز اسیدی نمونه‌های میتوزی با اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال و هضم آنزیمی آنها با محلول پپسین(Pepsine) با غلظت ۰/۰۳۲ گرم بر میلی‌لیتر انجام و برای حذف RNA از نمونه‌های کروموزومی (DNA هدف) از RNase A با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. شستشوی اسلایدها با محلول نمکی سیترات سدیم(Saline sodium cytrate (SSC)) با غلظت دو برابر محلول پایه و تثبیت مواد گیاهی روی اسلایدها با محلول پارافرمالدهید تازه انجام گرفت. برای تک رشته‌ای کردن (Denaturation) DNA هدف روی اسلایدها از محلول فرماماید ۷۰ درصد استفاده و بعد از آبگیری، اسلایدها با محلول‌های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد اتانول در دمای اتاق خشک شدند. به منظور جلوگیری از اتصال پروب با DNA ژنوم غیر نشانگر و افزایش شانس اتصال پروب به نواحی DNA ژنوم هدف، از DNA ی ژنوم رقم بهاره چینی با غلظت ۵۴ برابر DNA ی نشانگر برای تهیه ۵۰ میکرولیتر محلول پیش دورگ‌گیری ژنومی غیر نشان‌دار (Pre blocking hybridization solution) بر طبق روش حسنی و همکاران (۹) استفاده شد. اسلایدها به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس محلول هیبریداسیون (Hybridization solution) DNA ژنومی علف شور ساحل نشان‌دار شده با نوکلئوتید فلئوروسین 12-dUTP به مقدار ۵۰ میکرولیتر، برای هر اسلاید کروموزومی سلول‌های متافازی مریستم ریشه چه ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) استفاده شد. اسلایدها سپس با محلول نمکی سدیم سیترات با غلظت ۰/۱ برابر محلول پایه شستشو شدند. ۵۰ میکرولیتر محلول دپی (4',6-diamidino-2-phenylindoledihydrochlorid (DAPI): حداکثر جذب نور را در طول موج ۳۵۹ نانومتر انجام داده و نور را با طول موج ۴۶۱ نانومتر ساطع می‌کند. این ماده با فیلتر ۰۱ به رنگ آبی دیده می‌شود.) با غلظت ۰/۱۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر برای رنگ‌آمیزی استفاده و اسلایدها زیر میکروسکوپ فلورسنت زایس (Zeiss) مدل آکسیو پلن۲ (Axioplan2) مشاهده شدند. تهیه عکس از اسلایدهای سلول‌های مریستم ریشه‌چه با دوربین کانن پاورشات A550 (Canon PowerShot A550) و با استفاده از ۴ فیلتر (Filter) ۰۱ مربوط به دپی، فیلتر ۰۹ مربوط به FITC، فیلتر ۱۵ مربوط به رودامین (Rhodamin) و فیلتر ۲۴ در استفاده هم‌زمان دپی و فلئورسین انجام شد.

در فیلتر ۰۱، زمینه اسلایدهای کروموزومی، آبی کم رنگ و نواحی نشان‌دار شده DNA کروموزوم‌های هدف، آبی پررنگ بود. در فیلتر ۰۹ زمینه اسلایدهای کروموزومی، سبز کم رنگ و نواحی نشان‌دار شده DNA کروموزوم‌های هدف، سبز پررنگ بودند. در فیلتر ۱۵ زمینه اسلاید کروموزومی، قرمز کم رنگ و نواحی نشان‌دار شده DNA کروموزوم‌های میتوزی هدف، قرمز پررنگ بودند و بالاخره در فیلتر ۲۴، زمینه اسلاید کروموزومی، زرد کم رنگ و نواحی نشان‌دار شده DNA کروموزوم‌های میتوزی هدف، زرد پررنگ بودند.

نتایج و بحث

لاین St/b در تلاقی با گندم رقم امید بیشترین بذر دورگ F_1 و F_2 را تولید کرد (جدول۱). دیررس بودن رقم امید همانند لاین

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

St/b منجر به هم‌زمانی مادگی و دانه گرده در رسیدن به مرحله مناسب برای گرده افشانی شده و طبیعتاً امکان تولید بذر دورگ F_1 نیز افزایش می‌یابد. در تلاقی بین گندم نان و لاین‌های تریتی پایرم اولیه، انتخاب تریتی پایرم اولیه به عنوان والد مادری، امکان تولید بذر دو رگ را بیشتر می‌نماید. ثبات کروموزومی در گندم نان بیشتر از تریتی پایرم اولیه است، چون در اکثر لاین‌های تریتی پایرم اولیه با وجود گذشت بیش از ۱۰ سال از زمان ایجاد آنها هنوز درصدی آنیوپلوئیدی و نواقص کروموزومی و در نتیجه کاهش جزئی باروری مشاهده شده است (۱). در این مطالعه با انتخاب گندم نان به عنوان والد پدری توازن کروموزوم‌ها در آندوسپرم اولیه حفظ شده تا در ایجاد و رشد لوله گرده خللی وارد نشود. بدین ترتیب امکان ایجاد بذر دورگ (F_1) و سپس ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) افزایش می‌یابد. بنابراین نه تنها تغییر لاین‌های مادری تریتی پایرم اولیه، بلکه تغییر ارقام پدری گندم نان هم ممکن است در تشکیل بذر در نسل‌های در حال تفرق توده‌های مبدأ بین گونه‌ای و بین جنسی موثر باشد. در این مطالعه با کاشت توده اولیه به تعداد ۱۵ بذر F_1 حاصل از تلاقی شش لاین تریتی پایرم اولیه با سه رقم گندم نان در سال زراعی ۸۵-۸۴، تعداد قابل توجهی بذرهای F_2 مربوط به تلاقی امید × St/b به‌دست آمد در حالی که بوته F_1 حاصل از تلاقی کویر×Ka/b بذری تولید نکرد (جدول۱). مطالعه وضعیت آنیوپلوئیدی و شمارش تعداد کروموزوم‌های E^b در نمونه‌های میتوزی تهیه شده از نوک مریستم ریشه چه بذرهای تریتی پایرم ثانویه (F_2) با استفاده از ۲۰- هیبریداسیون DNA ژنومی در محل نشان داد که تعداد کروموزوم‌های ژنوم E^b این ژنوتیپ‌ها بسیار متنوع و حاوی تعداد متفاوتی از کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B و D در مقابل E^b است. درصد آنیوپلوئیدی در ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) از ۳۰ تا ۶۶/۷ درصد متغیر بود (جدول ۳). دامنه گسترده تغییرات آنیوپلوئیدی مشاهده شده را می‌توان به وجود ترکیب مختلفی از تعداد کروموزوم‌های E^b و D در ساختار ژنومی این ژنوتیپ‌ها نسبت داد. انتظار می‌رود که خودگشن کردن یا تلاقی برگشتی ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) با ارقام گندم نان در طی چندین نسل منجر به ایجاد ثبات کروموزومی در آنها شده و درصد آنیو پلوئیدی را کاهش دهد. از نظر تئوری (نمودار ۱) امکان وجود ۰ تا ۱۴ کروموزوم E^b در ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) وجود دارد. در این مطالعه تعداد کروموزوم‌های E^b در ساختار ژنومی این دورگ‌ها از ۱ تا ۱۱ عدد متغیر بود. کمترین دامنه تعداد کروموزوم‌های E^b مربوط به ژنوتیپ نوید × La/b با میانگین ۲/۳۶ و بیشترین آن مربوط به ژنوتیپ نوید × Az/b با میانگین ۶/۸ عدد کروموزوم E^b در سلول‌های تهیه شده از مریستم ریشه چه بذرهای این گیاهان می‌باشد(جدول ۳). تشخیص کروموزوم‌های ژنوم E^b از کروموزوم‌های مربوط به ژنوم‌های A، B و D بسیار آسان‌تر از تشخیص کروموزوم‌های A، B و D از یکدیگر است. ژنوم‌های A، B و D گندم به دلیل ارتباط ژنومی بین آنها، بسیار مشابه همدیگر بوده و همیولوژی توالی‌های DNA در آنها بیشتر است، ولی ژنوم E^b از این سه ژنوم متفاوت‌تر است چون مربوط به جنس دیگری می‌باشد. سانچز و همکاران (۲۰) نیز در مطالعه دورگ‌های گندم با چاودار در رابطه با تشخیص کروموزوم‌های ژنوم R از کروموزوم‌های مربوط به ژنوم‌های A، B و D گندم، نتایج مشابهی را گزارش کردند. به علت وجود ارتباط ژنتیکی و فیلوژنی نزدیک ژنوم گیاه دیپلوئید علف شور ساحل با ژنوم گندم نان، امکان اتصال شناساگر تهیه شده از DNA ژنومی علف شور ساحل (E^b) با کروموزوم‌های ژنوم A، B و خصوصاً D گندم نان وجود دارد. ازاین رو در این مطالعه از DNA ژنوم گندم رقم بهاره چینی به منظور مسدود کردن توالی‌های مشترک و کم نمودن شانس اتصال پروب به نواحی غیر هدف استفاده شد. نسبت ۸ :۱ از DNA ی رقم بهاره چینی (DNA مسدود کننده) به DNA ی علف شور ساحل (DNA شناساگر)، بهترین نتیجه را در تفکیک کروموزوم‌های ژنوم E^b از کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B و D در بر داشت. موکایی و همکاران (۱۷) با استفاده از DNA ی ژنومی جو به عنوان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

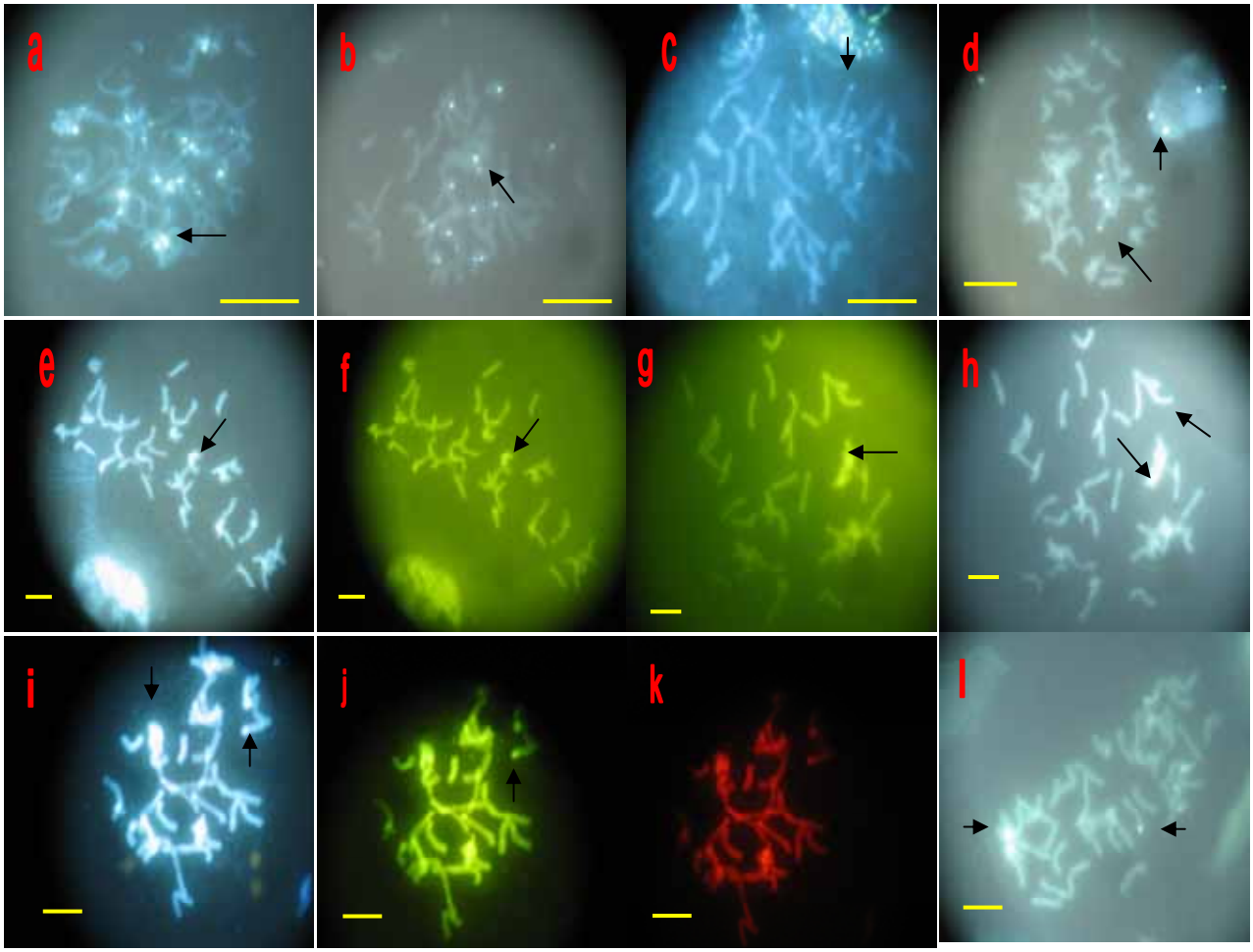
جدول ۳. مطالعه ساختار کروموزومی در سلول های متافازی مریستم ریشه چه ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه(F_2) با روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل

گیاهان F_2 از انواع تلاقی‌ها	تعداد گیاه	تعداد سلول‌های شمارش شده	ژنوتیپ‌های ۴۲ کروموزومی	آنیوپلوئید غیر ۴۲ (۴۴-۳۳ کروموزوم)	درصد آنیوپلوئیدی	تعداد کروموزوم های E^b (میانگین)
نوید×(St/b)×(Cr/b), F_3	۲	۲۰	۸	۱۲	۶۰/۰۰	۴-۶ (۵/۳۳)
نوید×Az.b	۷	۴۵	۱۵	۳۰	۶۶/۶۶	۵-۱۱ (۶/۸)
امید×St.b	۳	۲۵	۱۷	۸	۳۲/۰۰	۳-۸ (۵/۰۶)
نوید×La.b	۳	۲۷	۱۰	۱۷	۶۲/۹۶	۱-۳ (۲/۳۶)
نوید×(Ka/b)×(Cr/b), F_2	۶	۴۰	۱۸	۱۲	۳۰/۰۰	۳-۱۰ (۵/۵)

شناساگر توانستند کروماتین جو را در لاین‌های گندم حاوی کروموزوم اضافی از جو مشاهده کنند. آنها بعد از آزمایش نسبت‌های مختلف (۱:۰، ۱:۱، ۱:۴، ۱:۱۰ و ۱:۲)از DNA ی مسدود کننده به DNA ی شناساگر، دریافتند که نسبت ۱:۲ بهترین نتیجه را در بر دارد (۱۷). در مطالعه حاضر بعد از انجام هیبریداسیون DNA ی ژنومی در محل روی نمونه‌های کروموزومی میتوز تهیه شده از مریستم ریشه چه برخی گیاهان ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی پایرم (F_2)، بخش‌های نورانی روی بعضی از کروموزوم‌ها مشاهده شد که نمایانگر دورگه سازی شناساگر با این نواحی کروموزومی است. این نواحی روشن در نواحی تلومری و سانترومری این ۱- کروموزوم‌ها نورانی‌تر بود (شکل ۱ : a، b و c). شاید یکی از دلایل وجود نواحی نورانی تر در نواحی تلومری و سانترومری این کروموزوم‌ها، غنی بودن این نواحی در ژنوم غلات، از نوکلئوتیدهای A و T باشد و با توجه به استفاده از نوکلئوتید فلئورسین 12-dUTP در تهیه شناساگر در این مطالعه، مشاهده نواحی روشن در نواحی تلومری و سانترومری دور از انتظار نیست. با تهیه شناساگر ژنومی علف شور و نشان‌دار شده با نوکلئوتید فلئورسین 12-dUTP و DNA ی ژنومی رقم گندم بهاره چینی، امکان تمایز و شمارش کروموزوم‌های گونه علف شوری ساحل (E^b) از کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B و D گندم در DNA کروموزومی گیاهان ژنوتیپ‌های تریتی پایرم‌های ثانویه (F_2) فراهم شد (جدول ۳). در بعضی از ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2)، کروموزوم‌هایی مشاهده شد که علائم نورانی قوی‌تری را در تمام طول خود نشان دادند، این کروموزوم‌ها مربوط به ژنوم E^b بوده که از والد تریتی پایرم اولیه به ژنوم این دو رگ‌ها وارد شده است (شکل۱ : g و l). در ساختار ژنومی بعضی از ژنوتیپ‌ها ی تریتی پایرم ثانویه (F_2) علاوه بر وجود کروموزوم‌هایی که علائم نورانی قوی‌تری را در سراسر طول خود نشان دادند، کروموزوم‌هایی دیده شدند که تنها در قسمت خاصی از طول خود علائم نورانی ناشی از اتصال شناساگر ژنومی علف شور ساحل را نشان دادند. به عبارت دیگر این ژنوتیپ‌ها حاوی چند کروموزوم E^b و کروموزوم‌های حاوی قطعات جایگزین شده از کروموزوم‌های ژنوم گونه وحشی (E^b) در کروموزوم‌هایی از ژنوم‌های A، B و D گندم نان هستند (شکل ۱ : i، j، k، e و f). ساختار ژنومی بعضی از

[Downloaded from jstmar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]



شکل۱. هیبریداسیون DNA ژنومی نشاندار شده با نوکلئوتید فلئورسین 12-dUTP در محل (GISH) روی سلول‌های متافاز میتوز در ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) (طول خط مقیاس ۲۰ میکرومتر)

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تنها حاوی قطعات کروموزومی جایگزین شده از ژنوم وحشی در کروموزوم‌های ژنوم گندم بود که علائم نورانی ناشی از اتصال شناساگر ژنومی تهیه شده از علف شور را تنها در ناحیه خاصی از یک کروموزوم، نشان دادند و کروموزومی که علائم نورانی را در سراسر طول خود نشان دهد در آنها دیده نشد (شکل ۱ : d و h). این ژنوتیپ‌ها می‌توانند منابع ارزشمندی برای انتقال ژن‌های ایجاد کننده صفات مطلوب زراعی از تریتی پایرم به گندم و برعکس باشند، زیرا همه ژن‌های مستقر روی یک کروموزوم کنترل کننده صفات مطلوب زراعی نیستند. با انتقال یک کروموزوم کامل به گیاه دورگ، ژن‌های ایجاد کننده صفات نامطلوب به همراه ژن‌های ایجاد کننده صفات مطلوب وارد گیاه دورگ می‌شوند. از این رو محققین اصلاح نبات به جای انتقال کامل یک کروموزوم به دنبال انتقال قطعاتی از کروموزوم حاوی ژن‌های مطلوب به نتاج گیاه دورگ هستند. شناسایی و گزینش این نوع ژنوتیپ‌ها با هیبریداسیون DNA ژنومی در محل امکان‌پذیر و از آنها می‌توان به عنوان والد در برنامه‌های اصلاحی بعدی استفاده کرد. بدین ترتیب شانس انتقال ژن‌های نامطلوب به نسل‌های بعد به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. یکی از اهداف ابتدایی تولید ژنوتیپ‌های ثانویه (F_2) حاصل از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی پایرم با ارقام اصلاح شده گندم نان، شناسایی ساختار کروموزومی آنها از نظر تعداد کروموزوم‌های E^b موجود

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

در این ژنوتیپ‌ها و سپس گزینش ژنوتیپ‌های ۴۲ کروموزومی است که خصوصیات نامطلوب لاین‌های اولیه تریتی پایرم در آنها حذف شده و یا کمتر باشند. بنابراین نتایج اولیه و بسیار امیدوارکننده حاصل از کاربرد هیبریداسیون DNA ژنومی در محل به عنوان ابزار گزینش در نسل‌های در حال تفرق حاصل از توده مبدأ اولیه بین لاین‌های اولیه تریتی پایرم و ارقام اصلاح شده گندم نان نشان داد که از تکنیک هیبریداسیون DNA ژنومی در محل می‌توان در شناسایی ژنوتیپ‌هایی با ترکیبات مختلف کروموزومی کمتر و یا بیشتر از ۴۲ کروموزوم از جمله لاین‌های دارای کروموزوم اضافه و یا لاین‌های دارای کروموزوم حذف شده و به‌ویژه ژنوتیپ‌های حاوی کروموزوم جایگزین استفاده نمود. نتاج حاصل از ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه (F_2) می‌تواند در آینده به عنوان یک ژرم پلاسم ارزشمند در برنامه‌های اصلاحی گیاه جدید و مقاوم به شوری تریتی پایرم مورد استفاده قرار گیرد. با ادامه برنامه‌های اصلاحی روی ژنوتیپ‌های ایجاد شده در این مطالعه خصوصاً ژنوتیپ تریتی پایرم ثانویه (F_2) نوید La/b ×، که در آن بسیاری از کروموزوم‌های E^b با کروموزوم‌های ژنوم D گندم نان جایگزین شده‌اند (جدول۳) اقدام به شناسایی ژنوتیپ‌هایی از تریتی پایرم ثانویه با ۴۲ کروموزوم نمود که تمام کروموزوم‌های E^b به‌جز جفت کروموزوم $5E^b$ آن با کروموزوم‌های D گندم نان جایگزین شده‌اند. بدین ترتیب امکان دست‌یابی به ژنوتیپی از تریتی پایرم وجود دارد که در ضمن حفظ صفت مقاومت به شوری، دیگر صفات نامطلوب زراعی در آن حذف شده است. البته ممکن است که جفت کروموزوم $5E^b$ تنها در کنار دیگر کروموزوم‌های E^b بتواند خصوصیت مقاومت به شوری را به طور کامل بروز دهد و در این دورگ‌های تریتی پایرم ثانویه، کروموزوم‌های D مانع از بروز کامل این صفت شده و ژنوتیپ تریتی پایرم ثانویه انتخابی نتواند صفت تحمل به شوری را مشابه لاین‌های اولیه تریتی پایرم نشان دهد که این موضوع بعد از شناسایی ژنوتیپ مورد نظر باید در مزرعه مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی که در تأمین هزینه پژوهش و دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در فراهم نمودن امکانات مزرعه تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع مورد استفاده

۱. شاهسوند حسنی، ح.، ح. شیریان و ث. پور تبریزی. ۱۳۸۴. تولید گندم حاوی کروموزوم جایگزین $5E^b$ و شناسایی مقدماتی ساختار کروموزومی آن. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان (ماهان).

2. Brasileiro-Vidal, A. C., S. Brammer, M. J. Puertas, A. C. Zanatta, A. Prestes, M. I. B. Moraes-Fernandes and M. Guerra. 2005. Mitotic instability in wheat x *Thinopyrum ponticum* derivatives revealed by chromosome counting, nuclear DNA content and histone H_3 phosphorylation pattern. Plant Cell Rep. 24: 172-178.
3. Brasileiro-Vidal, A. C., A. Cuadrado, S. P. Brammer, A. C. A. Zanatta, A. M. Prestes, M. I. B. Moraes-Fernandes and M. Guerra. 2003. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. Genet. Mol. Biol. 26: 505-510.
4. Farooq, S., N. Iqbal, M. Asghar and T. M. Shah. 1992. Intergeneric hybridization for wheat improvement. VI. Production of salt tolerant germplasm through crossing wheat *(Triticum aestivum* L.) with *Aegilops cylindrica* and its significance in practical agriculture. J. Genet. Breed. 46: 125-132.
5. Gubler, U. and B. J. Hoffmann. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Genetics. 25: 263-269.
6. Han, F., B. Liu, G. Fedak and Z. Liu. 2004. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat-*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis. Theor. Appl. Genet. 109: 1070–1076.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]

7. Han, F. P., G. Fedak, A. Benabdelmouna, K. Armstrong and T. Ouellet. 2003. Characterization of six wheat × *Thinopyrum intermedium* derivatives by GISH, RFLP and multicolor GISH. Genome 6: 490–495.
8. Hassani, H. S., P. D. S. Caligari, S. M. Reader, I. P. King and T. E. Miller. 2000. Can tritipyrum, a new salt tolerant potential amphiploid, be a successful cereal like triticale? J. Agric. Sci. Technol. 2: 177-195.
9. Hassani, H. S. 1998. Development and cytogenetic studies of a potential new salt tolerant cereal, tritipyrum. PhD.Thesis, The University of Reading, UK.
10. Jackson, S. A., M. L. Wang, H. M. Goodman and J. Jiang. 1998. Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. Genome 41: 566–572.
11. King, I. P., C. N. Law, K. A. Cant, S. E. Orford, S. M. Reader and T. E. Miller. 1997. *Tritipyrum*, a potential new salt-tolerant cereal. Plant Breed. 116: 127-132.
12. Kishii, M., R. Wang and H. Tsuijimoto. 2005. Gish analysis revealed new aspect of genomic constitution of *Thinopyrum intermedium*. Czech J. Genetics and Plant Breed. 41: 92-95.
13. Komatsuda, T. 1998. Development of STS markers closely linked to the vrs1 locus in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 41: 680- 685.
14. Lapitan, N. L. V., M. W. Ganal and S. D. Tanksley. 1989. Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TGRI satellite repeat. Genome 32: 992–998.
15. Lichter, P., C. C. Tang, K. Call, G. Hermanson, G. A. Evans, D. Housman and D. C. Ward. 1990. High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. Science 247: 64–69.
16. Molnar-Lang, M., C. Novotny, G. Linc and E. D. Nagy. 2005. Changes in the meiotic pairing behaviour of a winter wheat-winter barley hybrid maintained for a long term in tissue culture and tracing the barley chromatin in the progeny using GISH and SSR markers. Plant Breed. 124: 247-252.
17. Mukai, Y. and B. S. Gill. 1991. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. Genome 34: 448-452.
18. Reader, S. M., S. Abbo, K. A. Purdie, I. P. King and T. E. Miller. 1994. Rapid *in situ* hybridization. Trends in Genet. *:256-266.
19. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. The 3rd ed., Cold Spring Horbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
20. Sanchez, M. E., E. Benavente and J. Orellana. 1999. Simultaneous identification of A, B, D and R genomes by genomic *in situ* hybridization in wheat-rye derivatives. Heredity 83: 249-252.
21. Schwarzacher, T., A. R. Leitch, M. D. Bennett and J. S. Heslop-Harrison. 1989. *In situ* location of parental genomes in a wide hybrid. Ann. Bot. 64: 315-324.
22. Trask, B., D. Pinkel and G. van den Engh. 1989. The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs. Genomics 5: 710–717.
23. Villareal, R. L., O. Bañuelos, J. Borja and M. MujeebKazi. 1998. Drought tolerance of synthetic bread wheats (*Triticum turgidum* x *Aegilops tauschii*). Ann Wheat Newsl 40: On-line version: Items from Mexico.
24. Zhang, J. Y., X. M. Li, R. R. C. Wang, A. Cortest, V. Rosast and A. Mujeeb-Kazit. 2002. Moleular cytogenetics characterization of E^b-genome choromosomes in *Thinopyrum bessarabicum* disomic addition lines of bread wheat. Intl. J. Plant Sci. 163: 167–174.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.48.6.6]