ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره٤ ، زمستان ۱۳۸۷
صفحه۸۳-۷۵

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

بررسی میزان خویشاوندی ژنوم های‌تریتی پایروم (EbEb)، تریتیکاله (RR) و گندم (ABD) با استفاده از مارکرهای مولکولی مبتنی بر PCR

مریم اله‌دو*[1]، براتعلی سیاه‌سر[2]، حسین شاهسوندحسنی[3]، محمدرضا نارویی‌راد[4]، علی کاظمی‌پور[5]، عباسعلی امام‌جمعه[6]

۱،۲،۶- به ترتیب مربی، استادیار، مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل

۵،۳- به ترتیب استادیار و مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنرکرمان

۴- مربی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان زابل

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : maryam_llhd@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۲- تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۱۶)

چکیده

به منظور تعیین قرابت ژنتیکی ژنوم تریتیکاله، تریتی پایروم و گندم، DNA ژنومی علف شور ساحل (EbEb)، لاین‌های محتمل تریتیکاله (AABBRR)، لاین اولیه تریتی پایرم (AABBEbEb)، رقم چینی بهاره و ارقام اصلاح شده گندم (AABBDD) با استفاده از ۲۲ پرایمر نیمه تصادفی و ۳۲ پرایمرتصادفی تکثیر شد. نوارهایی که در علف شور ساحل، لاین‌های اولیه تریتی پایرم و لاین‌های محتمل تریتیکاله حضور ولی در رقم چینی بهاره و ارقام اصلاح شده گندم حضور نداشتند، به عنوان نوارهای مشترک بین ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (EbEb) در نظر گرفته شد. برای بررسی میزان قرابت ژنتیکی ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (EbEb) با گندم، از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. دو پرایمر نیمه تصادفی ET34، ET37 و پرایمر تصادفی OPM06 توانستند نوارهای مشترک بین ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (EbEb) را تکثیر کنند. از ۲۳۰ نوار تکثیر شده توسط پرایمرهای به کار رفته در این تحقیق، ۲/۲ درصد بین ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم ((EbEb، 8/16 درصد بین ژنوم تریتی پایروم (EbEb) و گندم مشترک بودند. همچنین ٤/۰۲ درصد از نشانگرهای RAPD، به ژنوم تریتی پایروم (EbEb) اختصاص یافتند. متوسط میزان تشابه ژنتیکی لاین‌های محتمل تریتیکاله، تریتی پایرم و علف شور ساحل ۰/۱۷۹، لاین‌های تریتی پایرم و ارقام اصلاح شده گندم ۰/۱۹٤ و ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های تریتیکاله ۰/۱٦۱ بود. این تحقیق همیولوژی زیاد ژنوم تریتی پایروم (EbEb) با ژنوم گندم، همیولوژی نسبی ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (EbEb) و همچنین کارایی پرایمرهای تصادفی و نیمه تصادفی برای شناسایی قطعاتDNA یا کروماتین هیبریدهای بین جنسی با گندم را تایید نمود.

واژه های کلیدی

قرابت ژنتیکی ،
تریتی پایرم ،
تریتیکاله ،
گندم ،
علف شور ساحل

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

مقدمه

آمفی‌پلوئید مصنوعی تریتی‌پایرم حاصل تلاقی گندم تتراپلوئید (*Triticum durum*) و یک گونه از علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*) می‌باشد (۹، ۱۷ و ۱۸). بعضی از گونه‌های وحشی تیره گندمیان، مانند گونه‌های مربوط به جنس *Thinopyrum* دارای خزانه ژنی با ارزشی برای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی بوده و می‌توانند به آسانی با گندم تلاقی یابند (۱). در اواخر سال ۱۹۳۶ انتقال مواد ژنتیکی از جنس *Thinopyrum* به گندم به منظور افزایش تنوع ژنتیکی در گندم برای ایجاد مقاومت به بیماری‌ها، تنش شوری، خشکی و دیگر صفات افزایش یافت (۲). علف شور ساحل، علف وحشی بومی کشور اکراین بوده که داری تحمل به شوری قابل توجه‌ای است. بذور لاین‌های اولیه تریتی پایرم می‌توانند شوری ۲۵۰ میلی مول نمک طعام را تحمل و مقاومت نشان دهند (۶، ۱۲، ۱۷ و ۱۸). شناسایی و توصیف کروماتین یا قطعات کروموزومی بیگانه داخل ژنوم گندم، در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱). تکنیک‌های سیتوژنتیک مولکولی مانند هیبریداسیون فلورسنت در محل (FISH=florescent *in situ* hybridization)، چند شکلی DNA حاصل از تکنیک‌های RAPD و RFLP و یا ترکیب هر دوی آنها، می‌تواند برای شناسایی کروماتین بیگانه در هیبریدهای بین جنسی به کار رود (۱ و ۱۴). Devos و Gale (در سال۱۹۹۲)، قطعات تکثیر شده بوسیله RAPD را برای شناسایی کروموزوم شمار ۴ جو در ژنوم گندم، Gourmet و Rayburn (در سال۱۹۹۶) نشانگرهای RAPD را برای شناسایی کروموزوم بیگانه B در جمعیت‌های ذرت و King و همکاران (در سال۱۹۹۳) نشانگرهای RAPD را برای شناسایی کروموزوم شماره ۵ مربوط به ژنوم E^b از جنس تینوپایرم در ژنوم گندم استفاده کردند. Minko و همکاران (در سال۲۰۰۲) نیز دو نشانگر RAPD مربوط به ژنوم چاودار را در ژنوم گندم شناسایی کردند. He و Hughes (در سال۲۰۰۳)، یک نشانگر RAPD مربوط به ژن مقاومت به زنگ معمولی از نژاد T_1 را در گندم رقم اسپلت شناسایی کردند. Zhang و همکاران (در سال۱۹۹۸) یک نشانگر RAPD مربوط به کروموزوم $2A_i$-2 از جنس تینوپایرم را که حاوی ژن مقاومت به ویروس کوتولگی زرد جو بود را در ژنوم گندم شناسایی نمودند. Weining و Langridge (در سال۱۹۹۱) از پرایمرهای نیمه تصادفی طراحی شده از نواحی اتصال اینترون- اگزون برای شناسایی چند شکلی در غلات استفاده نموده و نشان دادند که این پرایمرها نسبت به پرایمرهای تصادفی از چندشکلی و الگوی باند دهی بیشتری برخوردار هستند. Iqbal و همکاران (در سال۲۰۰۷) میزان شباهت ژنتیکی ۱۳ ژنوتیپ گندم را با استفاده از ۱۵ پرایمر تصادفی مورد بررسی قرار دادند. میزان شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۸۶/۲ تا ۹۳ درصد بود که اشاره به تشابه ژنتیکی نسبتا زیاد این ژنوتیپ‌ها داشت. زمانی که فراوانی کروموزم‌های چاودار و یا علف شور ساحل در یک جمعیت افزایش یابد، فرصت تولید لاین‌های دارای کروموزوم اضافی یا جایگزین از ژنوم تریتیکاله (RR) و یا تریتی پایروم (E^bE^b) افزایش می‌یابد، استفاده از نشانگرهای مولکولی مختص ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (E^bE^b) در این جمعیت امکان شناسایی سریع لاین‌های محتوی کروموزوم اضافی یا جایگزین از این دو ژنوم را افزایش می‌دهد. هدف از این تحقیق نیز شناسایی نشانگرهای تصادفی و نیمه تصادفی مربوط به ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (E^bE^b) و نیز بررسی میزان قرابت ژنتیکی ژنوم تریتیکاله (RR) با تریتی پایروم (E^bE^b)، ژنوم تریتی پایروم (E^bE^b) با گندم و ژنوم تریتیکاله (RR) با گندم بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل لاین‌های اولیه تریتی (La/b، Ka/b، Cr/b، Ma/b، St/b، Az/b، La(4B)4D/b)، علف وحشی شور ساحل، گندم رقم چینی بهاره، گندم تتراپلوئید رقم St، ارقام گندم نان شامل هیرمند، هامون و لاین‌های محتمل تریتیکاله (لاین‌های ۴۱۰۳، ۴۱۱۵، ۴۱۱۶، ۴۱۰۸ و M_{45}) بودند.

استخراج DNA

استخراج DNA از مخلوط برگ جوان ۲۰ تک بوته تصادفی با روش Chen و Ronald با تغییرات اندکی انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA حاصله با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه بیوفتومتر انجام شد (۲۶).

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از ۳۲ پرایمر تصادفی (10bp) طراحی شده توسط شرکت ایران و ۲۲ پرایمر نیمه تصادفی گروه ET (Exon Targeting) و IT (Intron Targeting) طراحی شده توسط Rafalski و همکاران (در سال۲۰۰۲) و Weining و Langridge (در سال۱۹۹۱) تکثیر شدند (جدول ۱ و ۲). ۱۱ پرایمر تصافی و ۹ پرایمر نیمه تصادفی که توانستند نوارهای چند شکل، واضح و تکرارپذیر تولید نمایند، برای مطالعات بیشتر استفاده شدند. تکثیر DNA با استفاده از پرایمرهای تصادفی و نیمه تصادفی، در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل آب دوبار تقطیراستریل، بافر PCR با غلظت 1x، $Mgcl_2$ با غلظت ۳ میلی مولار، dNTP با غلظت ۲۰۰ میکرومول، پرایمر با غلظت ۰/۴ میکرومول، DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم و آنزیم تک پلی مراز ۱ واحد، درمیکروتیوپ های ۰/۲ سی‌سی صورت گرفت. برنامه ترموسایکلر شامل: واسرشته سازی اولیه در۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۲ سیکل؛ واسرشته سازی ثانویه در ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، با دمای اتصال ۳۶ درجه برای پرایمرهای تصادفی، ۶۰ درجه برای پرایمرهای نیمه تصادفی ۱۵ نوکلئوتیدی و ۶۳ درجه برای پرایمرهای نیمه تصادفی ۱۸ نوکلئوتیدی؛ دمای بسط ۷۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت بسط نهایی۷۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸ درصد تفکیک شد و نوارها توسط رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری با دستگاه ژل خوان مشاهده گردید. اندازه قطعات تکثیری، با دو نشانگر وزنی 100-1000bp و DNA فاژ لامبدا برش داده شده با دو آنزیم *HIND III* و *ECORI* تخمین زده شد.

جدول۱- پرایمرهای تصادفی استفاده شده، توالی و دمای اتصال آنها

پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال	پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال
no code 2	5` TGCCGAGCTG 3`	36	OPFo3	5` CCTGATCACC 3`	36
OPN 05	5` ACTGAACGCC 3`	36	OPN 15	5` CAGCGACTGT 3`	36
OPH 19	5` CTGACCAGCC 3`	36	OPN 06	5` GAGACGCACA 3`	36
OPH-12	5` ACGCGCATGT 3`	36	OPC 05	5` GATGACCGCC 3`	36
OPH -7	5` CTGCATCGTG 3`	36	OPM 04	5` GGCGGTTGTC 3`	36
OPB-20	5` GGACCCTTAC 3`	36	OPN 12	5` CACAGACACC 3`	36
OPB 18	5` CCACAGCAGT 3`	36	OPN 16	5` AAGCGACCTG 3`	36
OPA-1	5` CAGGCCCTTC 3`	36	OPM 06	5` CTGGGCAACT 3`	36
OPA-4	5` AATCGGGCTG 3`	36	OPF 01	5` ACGGATCCTG 3`	36
OPA-11	5` CAATCGCCGT 3`	36	OPC 11	5` AAAGCTGCGG 3`	36
OPA-13	5` CAGCACCCAC 3`	36	no code 4	5` GACCGACCCA 3`	36
OPA-18	5` AGGTGACCGT 3`	36	OPH 18	5` GAATCGGCCA 3`	36
OPB-1	5` GTTTCGCTCC 3`	36	OPH 04	5` CGAAGTCGCC 3`	36
OPN 14	5` TCGTGCGGGT 3`	36	OPV 10	5` GGACCTGCTG 3`	36
OPP-3	5` CTGATACGCC 3`	36	OPI 06	5` AAGGCGGCAG 3`	36
OPI 10	5` ACAACGCGAG 3`	36	OPI 08	5` TTTGCCCGGT 3`	36

جدول۲- پرایمرهای نیمه تصادفی استفاده شده، توالی و دمای اتصال آنها

پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال	پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال
ET40	5` ACTTACCTGGCCAGCTGC 3`	63	ET 1	5` ACTTACCTGAGGCGCGAC 3`	63
ET 2	5` ACTTACCTGCTGGCCGGA 3`	63	ET33	5` ACCTACCTGGCCGAT 3`	60
ET41	5` ACTTACCTGCCTGCCGAG 3`	63	ET34	5` ACCTACCTGGGCGAG 3`	60
IT 1	5` CCGGCAGGTCAGGTAAGT 3`	63	ET36	5` ACCTACCTGGGGCTC 3`	62
IT 3	5` GCAGAGGGCCAGGTAAGT 3`	63	ET37	5` ACTTACCTGAGGCGCGAC 3`	63
IT 4	5` CTGCGGCCACAGGTAAGT 3`	63	ET38	5` ACTTACCTGCTGGCCGGA 3`	63
IT 5	5` GGCGGAGAGCAGGTAAGT 3`	63	ET39	5` ACTTACCTGGCCAGCTGC 3`	63
IT 31	5` GAAGCCGCAGGTAAG 3`	60	ET42	5` ACTTACCTGCCTACGCGG 3`	63
IT 33	5` GATGCCCCAGGTAAG 3`	60	ET32	5` ACTTACCTGGGCACG 3`	60
IT34	5`GCGGCATCAGGTAAG 3`	60	ET35	5` ACCTACCTGCCGCAG 3`	60
IT 32	5` GACTCGCCAGGTAAG 3`	60	ET39	5` ACTTACCTGCTGGCCGGA 3`	63

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

تجزیه داده‌ها

نوارهای تولید شده توسط پرایمرهای تصادفی و نیمه تصادفی براساس حضور و عدم حضور نوار به ترتیب به صورت ۱ و ۰ رتبه‌بندی شد و نوارهای چند شکل، واضح و تکرارپذیر برای تشکیل ماتریس داده‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور شناسایی قطعات ژنوم E^bE^b در لاین‌های اولیه تریتی پایرم، لاین‌های محتمل تریتیکاله وارقام گندم، نوارهایی که در لاین‌های تریتی پایرم ($AABBE^bE^b$) و علف شور ساحل(E^bE^b) حضور ولی درگندم رقم چینی بهاره، سایر ارقام گندم و لاین‌های محتمل تریتیکاله حضور نداشتند، به عنوان نشانگرهای مختص ژنوم E^bE^b در نظر گرفته شدند و نوارهایی که در علف شور ساحل و لاین‌های محتمل تریتیکاله حضور ولی در لاین‌های تریتی پایرم و ارقام گندم حضور نداشتند، به عنوان نوارهای مشترک بین ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (E^bE^b) در نظر گرفته شدند. میزان شباهت ژنتیکی بین ژنوم تریتیکاله (RR)، تریتی پایروم (E^bE^b) و گندم با استفاده از ضریب تشابه جاکارد با نرم افزار NTSYS- PC نسخه ۲/۰۲ (۱۶) محاسبه و میانگین تشابه ژنتیکی بین لاین‌های تریتیکاله و گندم، تریتی پایرم و گندم و لاین‌های تریتیکاله و تریتی پایرم محاسبه شد.

نتایج

از ۳۲ پرایمر تصادفی ۱۱ پرایمر و از ۲۲ پرایمر نیمه تصادفی گروه ET و IT، ۹ پرایمر توانستند نوار چندشکل، واضح و تکرارپذیر تولید کنند. کل نوارهای تکثیر شده توسط این پرایمرها ۲۳۰ نوار بود که ۲/۲ درصد آنها بین ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (E^bE^b) و ۱۶/۸ درصد آنها بین ژنوم تریتی پایروم (E^bE^b) و گندم مشترک بودند. ۴/۰۲ درصد از نشانگرهای RAPD مختص ژنوم تریتی پایروم (E^bE^b) بود. DNA ژنومی تکثیر شده با پرایمر OPF03 یک قطعه با اندازه ۱۲۹۶ جفت باز مربوط به ژنوم تریتی پایروم (E^bE^b) را در لاین‌های اولیه تریتی پایرم و علف شور ساحل تکثیر نمود که این قطعه در رقم چینی بهاره، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های محتمل تریتیکاله تکثیر نشد. DNA ژنومی تکثیر شده با پرایمر OPM06، یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۰۰ جفت باز تکثیر نمود (شکل ۱) که این قطعه تقریبا در تمام لاین‌های اولیه تریتی پایرم و علف شور ساحل حاوی کروموزوم‌های ژنوم E^bE^b، به جز لاین La(4B)4D/b حضور داشت. علاوه بر این، این پرایمر یک قطعه با اندازه تقریبی ۸۰۰ جفت باز نیز تکثیر نمود که این قطعه تقریبا در همه لاین‌ها به جز لاین‌های La(4B)4D/b و Ka/b حضور داشت (شکل ۱). بنابراین، پرایمر OPM06 می‌تواند به عنوان یک نشانگر برای شناسایی کروموزوم‌های ژنوم E^bE^b در لاین‌های تریتی پایرم و سایر لاین‌ها و ارقامی که حاوی کروموزوم‌های ژنوم E^bE^b هستند، به کار رود. پرایمر ET34 یک نوار خاص با اندازه تقریبی ۸۳۰ جفت باز تولید کرد که این نوار فقط درعلف شور ساحل و لاین‌های محتمل تریتیکاله به جز لاین M_{45} حضور داشت، ولی در لاین‌های اولیه تریتی پایرم و رقم چینی بهاره حضور نداشت (شکل ۲).

شباهت ژنتیکی ارقام گندم و لاین‌های تریتی پایرم در دامنه ۰/۳۳ تا ۰/۰۵ با میانگین ۰/۱۹٤ (جدول ۳)، لاین‌های محتمل تریتیکاله، تریتی پایرم و علف شور ساحل در دامنه ۳۳ /۰ تا ۰/۰٥٦ با میانگین ۰/۱۷۹ (جدول ٤) و ارقام گندم و لاین‌های تریتیکاله در دامنه ۰/۰٤۳ تا ۰/۲٦۸ با میانگین ۰/۱٦۱ (جدول ٥) قرار داشت.

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

جدول۳ – میزان شباهت ژنتیکی (براساس ضریب تشابه جاکارد) ارقام گندم و لاین‌های تریتی پایرم

St	Ha	Hi	DH	CS	×گندم/ تریتی پایرم
۰/۱۲۹	۰/۱۵۳	۰/۰۹۸۵	۰/۲۵۰	۰/۱۵۲	La/b
۰/۱۸۱	۰/۲۶۰	۰/۲۶۶	۰/۲۷۵	۰/۲۷۷	Ma/b
۰/۰۶۵	۰/۰۸۶	۰/۱۳۷۹	۰/۱۴۰	۰/۱۲۳	Az/b
۰/۱۲۹	۰/۳۲۸	۰/۱۸۱۸	۰/۳۰۵	۰/۲۷۸	Ka/b
۰/۰۵۶	۰/۲۲۷	۰/۲۰۶۵	۰/۱۹۱	۰/۲۷۲	St/b
۰/۰۸۱	۰/۱۷۵	۰/۱۷۰۲	۰/۲۳۱	۰/۲۸۵	Cr/b
۰/۰۶۵	۰/۲۸۷	۰/۱۷۳۴	۰/۲۵۷	۰/۳۳۸	La(4B/4D)/b
۰/۱۱۱	۰/۲۴۰	۰/۱۲۲۹	۰/۲۱۰	۰/۲۵۰	TNP
۰/۱۰۲	۰/ ۲۲۰	۰/۱۶۹۷	۰/۲۳۲	۰/۲۴۷	میانگین

×(CS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (DH)، گندم هاپلوئید مضاعف؛ (Hi)، گندم رقم هیرمند؛ (Ha)، گندم رقم هامون؛ (St)، گندم تتراپلوئید رقم استوارد؛ (La/b)، لاین تریتی پایرم La/b؛ (Ma/b)، لاین تریتی پایرم Ma/b؛ (Az/b)، لاین تریتی پایرم Az/b؛ (Ka/b)، لاین تریتی پایرم Ka/b؛ (St/b)، لاین تریتی پایرم St/b؛ (Cr/b)، لاین تریتی پایرم Cr/b؛ (La(4B)4D/b)، لاین تریتی پایرم La(4B)4D/b؛ (TNP)، علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*).

جدول ٤– میزان تشابه ژنتیکی (براساس ضریب تشابه جاکارد) لاین‌های تریتیکاله و لاین‌های تریتی پایرم

۴۱۱۵	M_{45}	٤١٠٨	٤١١٦	٤١٠٣	*تریتیکاله/ تریتی پایرم
۰/۰٥٦	۰/۰٥۹	۰/۰۸۰	۰/۱۳۹	۰/۱۲۱	La/b
۰/۱٥۰	۰/۱۲۸	۰/۱۲۷	۰/۱۷۱	۰/۱٥۲	Ma/b
۰/۰۷٤	۰/۱۱۳	۰/۰۷۹	۰/۱۳۲	۰/۱۲۲	Az/b
۰/۱۹۸	۰/۱۲۷	۰/۱٦٦	۰/۳۳۳	۰/۱۸۱	Ka/b
۰/۲۱٦	۰/۱٤۲	۰/۲۳۸	۰/۱۹۸	۰/۲٥٦	St/b
۰/۲۲۸	۰/۱۹۷	۰/۲۳۰	۰/۲۰۰	۰/۲۱٤	Cr/b
۰/۲٦۰	۰/۱۷۳	۰/۲۱۰	۰/۳۱۱	۰/۳۱۷	La(4B/4D)/b
۰/۲۱۹	۰/۱٥۰	۰/۲۱۱	۰/۲٦۹	۰/۲۱٦	TNP
۰/۱۷٥	۰/۱۳٦	۰/۱٦۸	۰/۲۱۹	۰/۱۹۷	میانگین

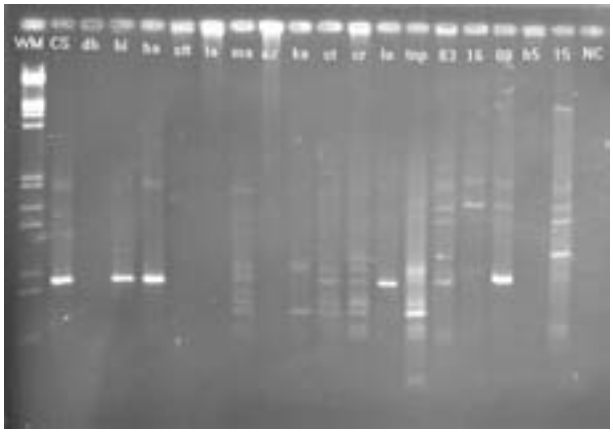
× (La/b)، لاین تریتی پایرم La/b؛ (Ma/b)، لاین تریتی پایرم Ma/b؛ (Az/b)، لاین تریتی پایرم Az/b؛ (Ka/b)، لاین تریتی پایرم Ka/b؛ (St/b)، لاین تریتی پایرم St/b؛ (Cr/b)، لاین تریتی پایرم Cr/b؛ (La(4B)4D/b)، لاین تریتی پایرم La(4B)4D/b؛ (TNP)، علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*)؛ (۴۱۰۳)، لاین تریتیکاله ۴۱۰۳؛ (۴۱۱۶)، لاین تریتیکاله۴۱۱۶؛ (۴۱۰۸)، لاین تریتیکاله ۴۱۰۸؛ (M45)، لاین تریتیکاله M_{45}؛ (۴۱۱۵)، لاین تریتیکاله۴۱۱۵.

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

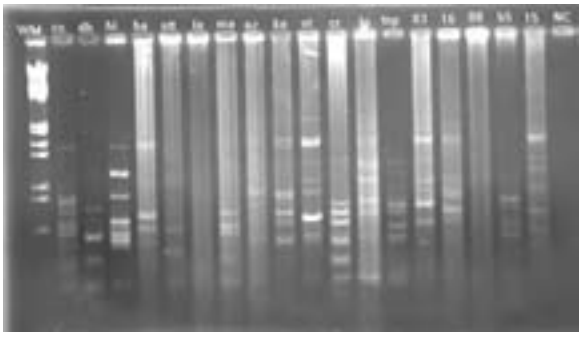
جدول ۵- میزان تشابه ژنتیکی (بر اساس ضریب تشابه جاکارد) لاین‌های تریتیکاله و گندم.

گندم/ تریتیکاله[x]	CS	DH	Hi	Ha	St
٤١٠٣	٠/٢١٧	٠/١٨٦	٠/١٢٨	٠/٢٤٧	٠/٠٤٣
٤١١٦	٠/٢٤٢	٠/٢٦٨	٠/١٠٤	٠/٢٢٨	٠/١٠٠
٤١٠٨	٠/١٥٩	٠/١٩٢	٠/١٥٨	٠/١٤٠	٠/٠٨٦
M_{45}	٠/١٢٧	٠/١٨٩	٠/١٩١	٠/٠٦٨	٠/١٢٢
٤١١٥	٠/٢٢٩	٠/١٧١	٠/١٨٢	٠/١٤٢	٠/١١٥
میانگین	٠/١٩٥	٠/٢٠١	٠/١٥٣	٠/١٦٥	٠/٠٩٣

[x](CS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (DH)، گندم هاپلوئید مضاعف؛ (Hi)، گندم رقم هیرمند؛ (Ha)، گندم رقم هامون؛ (St)، گندم تتراپلوئید رقم استوارد؛ ؛ (۴۱۰۳)، لاین تریتیکاله ۴۱۰۳؛ (۴۱۱۶)، لاین تریتیکاله۴۱۱۶؛ (۴۱۰۸)، لاین تریتیکاله ۴۱۰۸؛ (M45)، لاین تریتیکاله M_{45}؛ (۴۱۱۵)، لاین تریتیکاله۴۱۱۵.



شکل ۱- تکثیر DNA لاین‌های اولیه تریتی پایرم، ارقام گندم و لاین‌های محتمل تریتیکاله با پرایمر OPM06



شکل۲ - تکثیر DNA لاین‌های اولیه تریتی پایرم، ارقام گندم و لاین‌های محتمل تریتیکاله با پرایمر IT34: (WM)، نشانگر وزنی؛ (CS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (dh)، گندم هاپلوئید مضاعف؛ (hi)، گندم نان رقم هیرمند؛ (ha)، گندم نان رقم هامون؛ (stt)، گندم تتراپلوئید رقم استوارد، (la)، لاین تریتی پایرم La/b؛ (ma)، لاین تریتی پایرم Ma/b؛ (az)، لاین تریتی پایرم Az/b؛ (ka)، لاین تریتی پایرم Ka/b؛ (st)، لاین تریتی پایرم St/b؛ (cr)، لاین تریتی پایرم Cr/b؛ (lo)، لاین تریتی پایرم La (4B)4D/b؛ (tnp)، علف شور ساحل؛ (۰۳)، لاین امید بخش تریتیکاله ٤١٠٣؛ (١٦)، لاین امید بخش تریتیکاله ٤١١٦؛ (۰۸)، لاین امید بخش تریتیکاله ٤١٠٨؛ (h5)، لاین امید بخش تریتیکاله M45؛ (١٥)، لاین امید بخش تریتیکاله ٤١١٥؛ (NC)، کنترل منفی.

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

بحث

ورود نشانگرهای مولکولی در اصلاح نباتات ابزار مفیدی را در شناسایی مواد ژنتیکی فراهم آورده است که در این بین، نشانگری RAPD به دلیل فواید زیاد به طور موفقیت آمیزی در ارزیابی ژرم پلاسم غلات استفاده شده است. Shahsevand Hassani و همکاران (در سال ۱۹۹۸) نشان دادند که لاین اولیه La(4B)4D/b نسبت به دیگر لاین‌های تریتی پایرم، بهترین نتیجه را برای صفات تعداد بوته سبز در مزرعه، باروری، ظهور خوشه، وزن هزار دانه، تعداد پنجه در بوته و میزان پروتئین ازخود نشان داد. در این مطالعه تشابه ژنتیکی لاین La(4B)4D/b با رقم چینی بهاره گندم (۰/۳۳)، بیشتراز سایر لاین‌های اولیه تریتی پایرم بود. میزان تشابه این لاین با علف شور ساحل (والد پدری) ۰/۳۰ بود (جدول ۳). احتمالاً این لاین خصوصیات مفید گندم رقم چینی بهاره و والد پدری (مقاومت به شوری و خشکی) را به ارث برده است که این خصوصیات می‌تواند به دلیل وجود کروموزوم D در این لاین باشد که در سایر لاین‌ها وجود ندارد. پرایمر OPM06 نیز یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۰۰ جفت باز در تمام لاین‌های تریتی پایرم به جز لاین La(4B)4D/b تکثیر کرد. عدم تکثیر این قطعه در این لاین شاید به وجود کروموزوم D در این لاین ارتباط داشته باشد. از ۲۳۰ نوار تکثیر شده توسط پرایمرهای تصادفی و نیمه تصادفی ٤٠ نوار (١٦/٨ درصد) بین علف شور ساحل حاوی ژنوم E^bE^b، و رقم چینی بهاره با فرمول ژنومی AABBDD مشترک بودند که نشان دهندهٔ تشابه ژنتیکی و همیولوژی ژنوم E^b با ژنوم‌های A، B و D می‌باشد. Shahsevand Hassani و همکاران (در سال۱۹۹۸) در تقسیم میوز این لاین‌ها مقادیر کمی مولتی والنت مشاهده کرده بودند که ناشی از جفت شدن همیولوگی بین ژنوم‌های A، B و E^b بود.

مهم‌ترین اصل در تولید یک لاین حاوی کروموزوم اضافی یا جایگزین، زحمت فراوان و زمان بر بودن شناسایی کروموزوم‌های بیگانه می‌باشد. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رادیو ایزوتوپ‌ها مانند RFLP، روش‌های سریع و آسان برای شناسایی کروموزوم‌های بیگانه نیستند. تکنیک AFLP ابزار مفیدی برای انگشت نگاری DNA بوده و تولید تعداد زیادی نشانگر مولکولی می‌کند ولی این نشانگر به سختی تبدیل به نشانگرهای STS می‌شود (۲۴). نشانگرهای RAPD و ISJ در بیشتر آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گرفته و می‌توانند به آسانی تبدیل به نشانگر STS شوند (۱۱). در این تحقیق، دو پرایمر تصادفی RAPD OPF03 و OPM06 مختص ژنوم E^bE^b شناسایی شدند. Wang و همکاران (۲۱)، در آمفی پلوئید مصنوعی *Cs/Th. bessarabicum* و سایر لاین‌های دی زومیک حاوی کروموزوم اضافی از ژنوم E^bE^b شش نشانگر RAPD مربوط به ژنوم E^bE^b را شناسایی نمودند. پرایمر تصادفی OPF03 قبلاً توسط Zhang و همکاران (۲۵) گزارش شده بود که یک نوار اختصاصی (۱۲۹۶ جفت باز) در تمام کروموزوم‌های ژنوم E^bE^b تکثیر می‌نماید. در این تحقیق نیز این نشانگر تصادفی مربوط به ژنوم E^bE^b، در لاین‌های اولیه تریتی پایرم و علف شور ساحل حضور داشت ولی در رقم چینی بهاره، ارقام اصلاح شده گندم و لاین‌های محتمل تریتیکاله حضور نداشت. بنابراین انتقال کروماتین‌های ژنوم E^bE^b را در لاین‌های اولیه تریتی پایرم تأیید نمود. پرایمر OPM06 نیز قطعاتی از کروموزوم E^bE^b را تکثیر نمود ولی ما هیچگونه اطلاعی از جایگاه این قطعه بر روی کروموزوم نداشته، بنابراین برای تعیین محل آن بر روی کروموزوم‌ها نیاز به آزمایشات بیشتر مانند تجزیه ساترن بلات و هیبریداسیون DNA فلورسنت، می‌باشد. پرایمر نیمه تصادفی ET34 نیز قطعات DNA مشترک بین علف شور ساحل و لاین‌های محتمل تریتیکاله تکثیر نمود که احتمالا این قطعات مشترک، خویشاوندی ژنوم E^bE^b از علف شور ساحل و ژنوم RR چاودار را تأیید می‌نماید. میزان شباهت ژنتیکی بین این دو ژنوم (۰/۱۷۹) نیز حاکی از قرابت ژنتیکی آنها می‌باشد.

Shan و همکاران (در سال۱۹۹۵) در مطالعه ۵ لاین گندم حاوی کروموزوم‌های جو گزارش کردند که، ۲۲/۳ درصد نوارهای AFLP مختص کروموزوم‌های جو، در ژنوم گندم وجود داشتند. این مقدار از ۱۰/۹ درصد گزارش شده توسط Zhang و همکاران (در سال ۲۰۰۲) برای ۵ لاین گندم حاوی کروموزوم‌های اضافی از جنس *Thinopyrum*، بیشتر بود که می‌تواند به دلیل تفاوت زیاد ژنوم جو زراعی، با ژنوم ABD گندم، نسبت به ژنوم E^bE^b با ژنوم ABD گندم باشد. در این تحقیق فقط با مطاله ۷ لاین اولیه

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021

تریتی‌پایرم، ٤/٠٦ درصد از نوارهای RAPD مختص کروموزوم‌های علف شور ساحل (*Th. bessarabicum*) بود که این مسئله نشان دهنده کارآیی مفید نشانگرهای تصادفی و نیمه تصادفی در شناسایی کروموزوم‌های ژنوم E^bE^b، می‌باشد. میزان شباهت ژنتیکی لاین‌های تریتی پایرم ($AABBE^bE^b$) و ارقام گندم (۰/۱۹۶) بیشتر از لاین‌های محتمل تریتیکاله (AABBRR) و ارقام گندم (۰/۱۶۹) بود که این مسئله می‌تواند نشان دهندهٔ تشابه بیشتر کروموزوم‌های ژنوم E^bE^b و ژنوم گندم، نسبت به ژنوم RR و ژنوم گندم باشد. با توجه به همیولوژی بیشتر ژنوم E^bE^b با ژنوم‌های گندم، نسبت به ژنوم RR و نیز کارایی مفید نشانگرهای مولکولی در اصلاح نباتات انتظار می‌رود در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به تریتیکاله، این غله مصنوعی ساخته دست بشر به عنوان یک رقم اصلاح شده مقاوم به شوری معرفی گردد.

منابع

1- Bommineni V R, Jauhar P P, Peterson T S, Chibbar R N (1997) Analysis of hybrids of durum wheat with *Thinopyrum junceiforme* using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 95:757-763.

2- Lima-Brito J, Carvolho A, Martin A, Heslop-Harrison J S, Guedes-Pinto H (2006) Morphological, Yield, Cytological and molecular characterization of a bread wheat×Tritordeum F1 hybrid. J. Genetics. 85(2):123-130.

3- Chen Q (2005) Detection of alien chromatin introgression from thinopyrum into wheat using S genomic DNA as a probe-a landmark approach for thinopyrum m genomic research. Cytogenetic Genome Res.109:350-359.

4- Chen D H, Ronald P C (1999) A rapid DNA mini preparation method suitable for AFLP and other PCR application. Plant Mol. Bio. Report. 17: 53-57.

5- Devos K M, Gale M D (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 84: 567-572.

6- Forster B P, Miler T E, Law C N (1988) Salt tolerance of two what *Agropyron Junceum* disomic addition lines. Genome. 30: 559-564.

7- Gourmet C, Rayburn A (1996). Identification of RAPD markers associated with the presence of B chromosomes in Maize. Heredity. 77:240-244.

8- He C, Hughes G R (2003) Development of RAPD markers associated with common bunt resistance to race T_1(*Tilletia tritici*) in spelt wheat. Plant Breed. 122:375-377.

9- Iqbal A, Khan A S, Khan I A, Awan F S (2007) Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA, Genet. Mol. Research. 6: 476-481.

10- King I P, Purdic K A, Rezanoor H N, Koebner R M D, Miler T E (1993) Characterization of *Thinopyrum bessarabicum* chromosome segments in wheat using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and genomic *in situ* hybridization. Theor. Appl. Genet. 86: 895-900.

11- Malgorzata G, Wisniewska I, Rafalski A (2002) Semi–specific PCR for the evaluation of diversity among cultivar of wheat and triticale. Cellular & Mol. Biol Lettes. 7:577-582.

12- Miler T E (2000) Can tritipyrum, a new salt tolerance amphiploid be successful cereal like triticale. J. Agricultural Science and Technology. 2:177-195.

13- Minko J, Geum-Sook D, Duck Y S (2002) Identification and chromosomal organization of two rye genome specific RAPD products useful as introgression markers in wheat. Genome. 45:157-164.

14- Nieto-Lopez R M, Solar C, Garcia B P (2003) Genetic diversity in wild Spanish population of *Thinopyrum Junceum* and *Th. Junceiform* using endosperm proteins and PCR- based markers. Heridiatas. 139:18-27.

15- Rafalski A, Gidzinska M, Wisniewsk I, Gawel M (2002) The genetic diversity of components of rye hybrids. Cellular & Mol. Biol Lettes. l 7: 471-475.

16- Rohlf, F J (1992) NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02, New York State University, Stony Brook, New York.

17- Shahsevand Hassani H, Caligari P D, Miller T E (2003) The chromosomal assessment of salt tolerance substituted tritipyrum using genomic florescent *in situ* hybridization (FISH). Iranian Biotech. 1(3):169-178.

18- Shahsevand Hassani H, Reader S M, Miler T E (2006) Agronomical and adaptation characters of tritipyrum lines in comparison with triticale and Iranian Wheat. Asian J. Plant Sci. 5(3):533-558.

19- Shahsevand Hassani H (1998) Development molecular cytogenetic studies of a new salt tolerant cereal, tritipyrum. PhD thesis. The University of Reading, Whiteknights, Reading, UK.

20- Shan X, Blak T K, Talbert L E (1999) Conversion of AFLP markers to sequence- specific PCR markers in barley and wheat. Theor. Appl. Genet. 98: 1072-1078.

21- Wang R R C, Li X M, Hu Z M, Zhang J (2003) Development of salinity-tolerant wheat recombination lines from a wheat disomic addition line carrying *Thinopyrum junceum* chromosome. Int. J. Plant Sci. 164(1):25-33.
22- Weining S, Langridge P (1991) Identification and mapping of polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. Theor. Appl. Genet. 82:209-216.
23- Zhang Z Y, Xin, Z Y, Larkin P J (2001) Molecular characterization of *Thinopyrum intermedium* group 2 chromosome (2Ai-2) conferring resistance to barley yellow dwarf virus. Genome. 44:1129-1135.
24- Zhang J Y, Xia-Mei L, Wang R R C, Cortes A (2002) Molecular cytogenetic characterization of E^b-genome chromosomes in *Thinopyrum bessarabicum* disomic addition lines of bread wheat. Int. J. Plant Sci. 163(1):167-174.
25- Zhang X Y, Dong Y S, Li P, Wang R R C (1998) Distribution of E- and St-specific RAPD fragments in few genomes of triticeae. Chin. J. Genet. 25: 113–124.
26- Zidani S, Ferchich A, Chaieb M (2005) Genomic DNA extraction method from Pearl millit (*Pennisetum glaucum*) leaves. Afri. J. Biot. 4(8):862-866.

Downloaded from mg.genetics.ir at 6:41 +0430 on Friday June 18th 2021