

بررسی میزان خویشاوندی ژنوم های تریتی پایروم (EbEb) و گندم (RR) با استفاده از مارکرهای مولکولی

مبتنی بر PCR

مریم الهدو^{*}، براتعلی سیاهسر^۲، حسین شاهسوندحسنی^۳، محمد رضا نارویی راد^۴،
علی کاظمی پور^۵، عباسعلی امام جمعه^۶

۱- به ترتیب مریمی، استادیار، مریبی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل

۲- به ترتیب استادیار و مریبی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- مریبی 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)، لاین های 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 پرایمر تصادفی تکثیر شد. نوارهایی که در علف شور ساحل، لاین های اولیه تریتی پایرم و لاین های 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 ضرب تشابه جاکارد استفاده شد. دو پرایمر نیمه تصادفی ET34 و 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) ۸/۱۶ درصد بین ژنوم تریتی پایروم (EbEb) و گندم مشترک بودند. همچنین ۴/۰۲ درصد از نشانگرهای RAPD به ژنوم تریتی پایروم (EbEb) اختصاص یافتد. متوسط میزان تشابه ژنتیکی لاین های محتمل تریتیکاله، تریتی پایرم و علف شور ساحل ۱/۷۹، لاین های تریتیکاله ۱/۶۱ 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 قطعات DNA یا کروماتین هیبریدهای بین جنسی با گندم را تایید نمود.

واژه های کلیدی

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

مقدمه

ویروس کوتولگی زرد جو بود را در ژنوم گندم شناسایی نمودند. Langridge و Weining (در سال ۱۹۹۱) از پرایمرهای نیمه تصادفی طراحی شده از نواحی اتصال ایترون- اگرون 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 سال ۲۰۰۷) 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 نسبتاً زیاد این ژنوتیپ‌ها داشت. زمانی که فراوانی کروموزوم‌های 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 (Cr/b, Ka/b, La/b, Az/b, St/b, Ma/b, La(4B)4D/b), علف وحشی شور ساحل، گندم رقم چینی بهاره، گندم تترابلوئید رقم St، ارقام گندم نان شامل هیرمند، هامون و لاین‌های محتمل تریتیکاله (لاین‌های ۴۱۰۳، ۴۱۱۵، ۴۱۱۶، ۴۱۱۸ و M₄₅) 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 آکاراز ۱ درصد و دستگاه بیوفتومنتر انجام شد (۲۶).

آمفی‌بلوئید مصنوعی تریتی پایرم حاصل تلاقی گندم تترابلوئید (*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 اوخر 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 هیریداسیون (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 هیریداهای بین جنسی به کار رود (۱ و ۱۴). Gale و Devos (در سال ۱۹۹۲)، قطعات تکثیر شده بوسیله RAPD را برای شناسایی کروموزوم شماره ۴ جو در ژنوم گندم، Gourmet و Rayburn (در سال ۱۹۹۶) نشانگرهای RAPD را برای شناسایی کروموزوم بیگانه B در جمعیت‌های ذرت و King و همکاران (در سال ۱۹۹۳) 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 سال ۲۰۰۲) نیز دو نشانگر RAPD مربوط Hughes به ژنوم چاودار را در ژنوم گندم شناسایی کردند. He و (در سال ۲۰۰۳)، یک نشانگر RAPD مربوط به ژن مقاومت به زنگ معمولی از نژاد T₁ را در گندم رقم اسپلت شناسایی کردند. Zhang و همکاران (در سال ۱۹۹۸) یک نشانگر RAPD مربوط به کروموزوم 2A-2Ai از جنس تینوپایرم را که حاوی ژن مقاومت به

واحد، در میکروتیوب های ۰/۲ سی سی صورت گرفت. برنامه ترموسایکلر شامل: واسرتته سازی اولیه در ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۲ سیکل؛ واسرتته سازی ثانویه در ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، با دمای اتصال ۳۶ درجه برای پرایمراهای نیمه تصادفی ۱۵ نوکلئوتیدی و ۶۳ درجه برای پرایمراهای نیمه تصادفی ۱۸ نوکلئوتیدی؛ دمای بسط ۷۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت بسط نهایی ۷۱ درجه سانتی گراد 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 عکس برداری با دستگاه ژل خوان مشاهده گردید. اندازه قطعات تکثیری، با دو نشانگر وزنی ۱۰۰-۱۰۰۰bp و DNA میکرومول، پرشن داده شده با دو آنزیم *HIND III* و *ECORI* تخمین زده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از ۳۲ پرایمر تصادفی (10bp) طراحی شده توسط شرکت اپران و ۲۲ پرایمر نیمه تصادفی گروه (Intron Targeting) ET و (Exon Targeting) IT طراحی شده توسط Weining و Rafalski و همکاران (در سال ۲۰۰۲) و Langridge (در سال ۱۹۹۱) تکثیر شدند (جدول ۱ و ۲). پرایمر تصادفی و ۹ پرایمر نیمه تصادفی که توanstند نوارهای چند شکل، واضح و تکرارپذیر تولید نمایند، برای مطالعات بیشتر استفاده شدند. تکثیر DNA با استفاده از پرایمراهای تصادفی و نیمه تصادفی، در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل آب دوبار تعطیراستریل، بافر PCR با غلظت ۱x، MgCl₂ 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

جدول ۱- پرایمراهای تصادفی استفاده شده، توالی و دمای اتصال آنها

پرایم	توالی پرایم	دما اتصال	پرایم	توالی پرایم	دما اتصال
OPF03	5' CCTGATCACC 3'	36	no code 2	5' TGCCGAGCTG 3'	
OPN 15	5' CAGCGACTGT 3'	36	OPN 05	5' ACTGAACGCC 3'	
OPN 06	5' GAGACGCACA 3'	36	OPH 19	5' CTGACCAGCC 3'	
OPC 05	5' GATGACCGCC 3'	36	OPH-12	5' ACGCGCATGT 3'	
OPM 04	5' GGCGGTTGTC 3'	36	OPH -7	5' CTGCATCGTG 3'	
OPN 12	5' CACAGACACC 3'	36	OPB-20	5' GGACCCTTAC 3'	
OPN 16	5' AAGCGACCTG 3'	36	OPB 18	5' CCACAGCAGT 3'	
OPM 06	5' CTGGGCAACT 3'	36	OPA-1	5' CAGGCCCTTC 3'	
OPF 01	5' ACGGATCCTG 3'	36	OPA-4	5' AATCGGGCTG 3'	
OPC 11	5' AAAGCTCGGG 3'	36	OPA-11	5' CAATCGCCGT 3'	
no code 4	5' GACCGACCCA 3'	36	OPA-13	5' CAGCACCCAC 3'	
OPH 18	5' GAATCGGCCA 3'	36	OPA-18	5' AGGTGACCGT 3'	
OPH 04	5' CGAACGTCGCC 3'	36	OPB-1	5' GTTTCGCTCC 3'	
OPV 10	5' GGACCTGCTG 3'	36	OPN 14	5' TCGTGC GGTT 3'	
OPI 06	5' AAGGCGGCAG 3'	36	OPP-3	5' CTGATAACGCC 3'	
OPI 08	5' TTTGCCCGGT 3'	36	OPI 10	5' ACAACGCGAG 3'	

جدول ۲- پرایمراهای نیمه تصادفی استفاده شده، توالی و دمای اتصال آنها

پرایم	توالی پرایم	دما اتصال	پرایم	توالی پرایم	دما اتصال
ET40	5' ACTTACCTGGCCAGCTGC 3'		ET 1	5' ACTTACCTGAGCGAC 3'	63
ET 2	5' ACTTACCTGGCCGGAT 3'		ET33	5' ACTTACCTGCTGGCCGGA 3'	63
ET41	5' ACTTACCTGGCGAG 3'		ET34	5' ACTTACCTGCCTGGCGAG 3'	63
IT 1	5' ACTTACCTGGGGCTC 3'		ET36	5' CCGGCAGGTCAAGTAAGT 3'	63
IT 3	5' ACTTACCTGAGCGCGAC 3'		ET37	5' GCAGAGGGCCAGGTAAAGT 3'	63
IT 4	5' ACTTACCTGCTGGCCCGA 3'		ET38	5' CTGCGGCCACAGGTAAAGT 3'	63
IT 5	5' ACTTACCTGCCAGCTGC 3'		ET39	5' GGCAGAGAGCAGGTAAAGT 3'	63
IT 31	5' ACTTACCTGCCTACGCCG 3'		ET42	5' GAAGCCGCAGGTAAAG 3'	60
IT 33	5' ACTTACCTGGGCACG 3'		ET32	5' GATGCCGCAGGTAAAG 3'	60
IT34	5' ACCTACCTGCCGCAG 3'		ET35	5' GCGGCATCAGGTAAAG 3'	60
IT 32	5' ACTTACCTGCTGGCCGG 3'		ET39	5' GACTCGCCAGGTAAAG 3'	60

و گندم مشترک بودند. ۴۰۲ 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 ژنوم تکثیر شده با پرایمر OPM06، یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۰۰ جفت باز تکثیر نمود (شکل ۱) که این قطعه تقریباً در تمام لاینهای اولیه تریتی پایرم و علف شور ساحل حاوی کروموزوم های 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 تقریباً در همه لاینهای به جز لاینهای La(4B)4D/b و Ka/b حضور داشت (شکل ۱). بنابراین، پرایمر OPM06 می تواند به عنوان یک نشانگر برای شناسایی کروموزوم های ژنوم E^bE^b در لاینهای تریتی پایرم و سایر لاینهای و ارقامی که حاوی کروموزوم های 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 در علف شور ساحل و لاینهای محتمل تریتیکاله به جز لاین M₄₅ 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 ۰/۱۹۴ (جدول ۳)، لاینهای محتمل تریتیکاله، تریتی پایرم و علف شور ساحل در دامنه ۰/۰۵۶ تا ۰/۰۴۳ با میانگین ۰/۱۷۹ (جدول ۴) و ارقام گندم و لاینهای تریتیکاله در دامنه ۰/۰۴۳ تا ۰/۰۲۸ با میانگین ۰/۱۶۱ (جدول ۵) قرار داشت.

جزیههای دادهها

نوارهای تولید شده توسط پرایمراهای تصادفی و نیمه تصادفی براساس حضور و عدم حضور نوار به ترتیب به صورت ۱ و ۰ رتبه بندی 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 در گندم 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 پرایمراهای 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 ۱۳۸۷

جدول ۳ - میزان شباهت ژنتیکی (براساس ضریب تشابه جاکارد) ارقام گندم و لاینهای تریتی پایرم

St	Ha	Hi	DH	CS	گندم / تریتی پایریم ^x
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	۰/۲۳۸	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

^x (CS)، گندم رقم چینی بهاره: (DH)، گندم هاپلوبیت مضاعف: (Hi)، گندم رقم هیرمند: (Ha)، گندم رقم هامون: (St)، گندم تراپلوبیت رقم استوارد: (La/b)، لاین تریتی پایرم (Ma/b)؛ La/b؛ (Az/b)، لاین تریتی پایرم (Ka/b)؛ Az/b؛ (St/b)؛ Ka/b، لاین تریتی پایرم (La/b)؛ (Cr/b)، لاین تریتی پایرم (TNP)، علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*) (St/b).

جدول ۴- میزان تشابه ژنتیکی (براساس ضریب تشابه جاکارد) لاین‌های تریتیکاله و لاین‌های تریتی پاییم

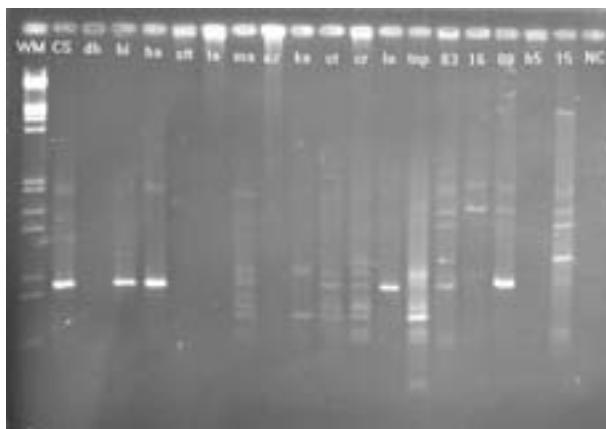
۴۱۱۵	M ₄₅	۴۱۰۸	۴۱۱۶	۴۱۰۳	*تربیتیکاله / تربیتی پایرم
۰/۰۵۶	۰/۰۵۹	۰/۰۸۰	۰/۱۳۹	۰/۱۲۱	La/b
۰/۱۰۰	۰/۱۲۸	۰/۱۲۷	۰/۱۷۱	۰/۱۵۲	Ma/b
۰/۰۷۴	۰/۱۱۳	۰/۰۷۹	۰/۱۳۲	۰/۱۲۲	Az/b
۰/۱۹۸	۰/۱۲۷	۰/۱۶۶	۰/۳۳۳	۰/۱۸۱	Ka/b
۰/۲۱۶	۰/۱۴۲	۰/۲۳۸	۰/۱۹۸	۰/۲۵۶	St/b
۰/۲۲۸	۰/۱۹۷	۰/۲۳۰	۰/۲۰۰	۰/۲۱۴	Cr/b
۰/۲۶۰	۰/۱۷۳	۰/۲۱۰	۰/۳۱۱	۰/۳۱۷	La(4B/4D)/b
۰/۲۱۹	۰/۱۵۰	۰/۲۱۱	۰/۲۶۹	۰/۲۱۶	TNP
۰/۱۷۵	۰/۱۳۶	۰/۱۶۸	۰/۲۱۹	۰/۱۹۷	میانگین

* (La/b)، لain تریتی پایرم (Ma/b)، لain تریتی پایرم (Az/b)، لain تریتی پایرم (Ka/b)، لain تریتی پایرم (St/b)، لain تریتی پایرم (Cr/b)، لain تریتی پایرم (La(4B)4D/b)، لain تریتی پایرم (TNP)، علف سور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*)؛ St/b (M45)، لain تریتکاله ۴۱۱۶، لain تریتکاله ۴۱۱۷، لain تریتکاله ۴۱۱۸، لain تریتکاله ۴۱۱۹، لain تریتکاله ۴۱۲۰.

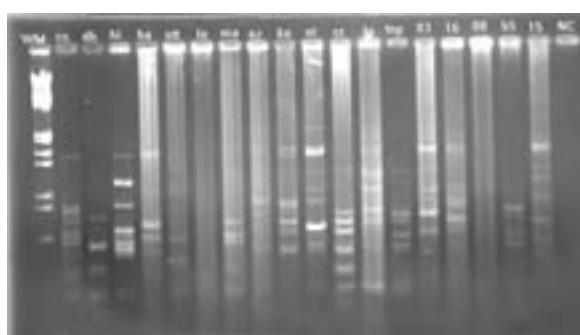
جدول ۵- میزان تشابه ژنتیکی (بر اساس ضریب تشابه جاکارد) لاین های تریتیکاله و گندم.

St	Ha	Hi	DH	CS	^x گندم / تریتیکاله
۰/۰۴۳	۰/۲۴۷	۰/۱۲۸	۰/۱۸۶	۰/۲۱۷	۴۱۰۳
۰/۱۰۰	۰/۲۲۸	۰/۱۰۴	۰/۲۶۸	۰/۲۴۲	۴۱۱۶
۰/۰۸۶	۰/۱۴۰	۰/۱۵۸	۰/۱۹۲	۰/۱۵۹	۴۱۰۸
۰/۱۲۲	۰/۰۶۸	۰/۱۹۱	۰/۱۸۹	۰/۱۲۷	M ₄₅
۰/۱۱۵	۰/۱۴۲	۰/۱۸۲	۰/۱۷۱	۰/۲۲۹	۴۱۱۵
۰/۰۹۳	۰/۱۶۵	۰/۱۵۳	۰/۲۰۱	۰/۱۹۵	میانگین

^xCS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (DH)، گندم هاپلوبloid مضاعف؛ (Hi)، گندم رقم هیرمند؛ (Ha)، گندم رقم هامون؛ (St)، گندم تراپلوبloid رقم استوارد؛ (M₄₅)، لاین تریتیکاله ۴۱۱۵؛ (۴۱۱۶)، لاین تریتیکاله ۴۱۰۸؛ (۴۱۰۳)، لاین تریتیکاله ۴۱۱۶؛ (۴۱۰۳)، لاین تریتیکاله ۴۱۰۳.



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



شکل ۲ - تکثیر DNA لاین های اولیه تریتی پایرم، ارقام گندم و لاین های محتمل تریتیکاله با پرایمر (IT34: WM)، نشانگر وزنی؛ (CS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (hi)، گندم هاپلوبloid مضاعف؛ (dh)، گندم نان رقم هیرمند؛ (ha)، گندم نان رقم هامون؛ (stt)، گندم تراپلوبloid رقم استوارد، (la)، لاین تریتی پایرم (az)، لاین تریتی پایرم Ma/b (Ma/b)، لاین تریتی پایرم Az/b (Az/b)، لاین تریتی پایرم ka (ka)، لاین تریتی پایرم St/b (St/b)، لاین تریتی پایرم La/b (La/b)، لاین تریتی پایرم Cr/b (Cr/b)، لاین تریتی پایرم (lo)، لاین تریتی پایرم (tnp)، علف شور ساحل؛ (۰۳)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۰۳؛ (۱۶)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۱۶؛ (۰۸)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۰۸؛ (h5)، لاین امید بخش تریتیکاله M45؛ (۱۵)، لاین امید بخش تریتیکاله ۴۱۱۵؛ (۴۱۱۶)، کنترل منفی.

می گند ولی این نشانگر به سختی تبدیل به نشانگرهای STS می شود (۲۴). نشانگرهای RAPD و ISJ در بیشتر آزمایشگاهها مورد استفاده قرار گرفته و می توانند به آسانی تبدیل به نشانگر STS شوند (۱۱). در این تحقیق، دو پرایمر تصادفی RAPD و OPM06 و OPF03 مختص ژنوم *E^bE^b* شناسایی شدند. Wang و همکاران (۲۱)، در آمپی پلولید مصنوعی *Cs/Th. bessarabicum* و سایر لاین های دی زومیک حاوی کروموزوم اضافی از ژنوم *E^bE^b* شش نشانگر RAPD مربوط به ژنوم *E^bE^b* را شناسایی نمودند. پرایمر تصادفی OPM06 قبلًاً توسط Zhang و همکاران (۲۵) گزارش شده بود که یک نوار اختصاصی (۱۲۹۶ جفت باز) در تمام کروموزوم های ژنوم *E^bE^b* تکثیر می نماید. در این تحقیق نیز این نشانگر تصادفی مربوط به ژنوم *E^bE^b* در لاین های اولیه تریتی پایرم و علف شور ساحل حضور داشت ولی در رقم چینی بهاره، ارقام اصلاح شده گندم و لاین های محتمل تریتیکاله حضور نداشت. بنابراین انتقال کروماتین های ژنوم *E^bE^b* را در لاین های اولیه تریتی پایرم تأیید نمود. پرایمر OPM06 نیز قطعاتی از کروموزوم *E^bE^b* را تکثیر نمود ولی ما هیچ گونه اطلاعی از جایگاه این قطعه بر روی کروموزوم نداشتیم، بنابراین برای تعیین محل آن بر روی کروموزوم ها نیاز به آزمایشات بیشتر مانند تجزیه ساترن بلاط و هیبریداسیون DNA فلورسنت، می باشد. پرایمر نیمه تصادفی ET34 نیز قطعات DNA مشترک بین علف شور ساحل و لاین های محتمل تریتیکاله تکثیر نمود که احتمالاً این قطعات مشترک، خویشاوندی ژنوم *E^bE^b* از علف شور ساحل و ژنوم RR چاودار را تأیید می نماید. میزان شباهت ژنتیکی بین این دو ژنوم (۰/۱۷۹) نیز حاکی از قرابت ژنتیکی آنها می باشد.

Shan و همکاران (در سال ۱۹۹۵) در مطالعه ۵ لاین گندم حاوی کروموزوم های جو گزارش کردند که، ۲۲/۳ درصد نوارهای AFLP مختص کروموزوم های 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 کروموزوم های اضافی از جنس *Thinopyrum*، بیشتر بود که می تواند 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 مطالعه ۷ لاین اولیه ABD

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 موقفيت آمیزی در ارزیابی ژرم پلاسم غلات استفاده شده است. La(4B)4D/b همکاران (در سال ۱۹۹۸) نشان دادند که لاین اولیه La(4B)4D/b نسبت به دیگر لاین های تریتی پایرم، بهترین نتیجه را برای صفات تعداد بوته سبز در مزرعه، باروری، ظهور خوش، وزن هزار دانه، تعداد پنجه در بوته و میزان پروتئین از خود نشان داد. در این مطالعه تشابه ژنتیکی لاین b La(4B)4D/b با رقم چینی بهاره گندم (۰/۳۳)، بیشتر از سایر لاین های 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 می تواند به دلیل وجود کروموزوم D در این لاین باشد که در سایر لاین ها وجود ندارد. پرایمر OPM06 نیز یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۰۰ جفت باز در تمام لاین های 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 ۴۰ نوار (۱۶/۸ درصد) بین علف شور ساحل حاوی ژنوم *E^bE^b* و رقم چینی بهاره با فرمول ژنومی AABBDD مشترک بودند که نشان دهنده تشابه ژنتیکی و همیولوژی ژنوم *E^b* با ژنوم های A، B و D می باشد. Shahsevand Hassani و همکاران (در سال ۱۹۹۸) در تقسیم میوز این لاین ها مقادیر کمی مولتی والت مشاهده کرده بودند که ناشی از جفت شدن همیولوگی بین ژنوم های A، B و *E^b* بود.

مهم ترین اصل در تولید یک لاین حاوی کروموزوم اضافی یا جایگزین، زحمت فراوان و زمان بر بودن شناسایی کروموزوم های بیگانه می باشد. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رادیو ایزوتوپ ها مانند RFLP، روش های سریع و آسان برای شناسایی کروموزوم های بیگانه نیستند. تکنیک AFLP ابزار مفیدی برای انگشت نگاری DNA بوده و تولید تعداد زیادی نشانگر مولکولی

- 8- He C, Hughes G R (2003) Development of RAPD markers associated with common bunt resistance to race T₁(*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- Małgorzata 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. Junceiforme* using endosperm proteins and PCR- based markers. *Hereditas.* 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.* 17: 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 fluorescent *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.

تریتی پایرم، ۴۰۶ درصد از نوارهای RAPD مختص کروموزومهای علف شور ساحل (*Th. bessarabicum*) بود که این مسئله نشان دهنده کارآبی مفید نشانگرهای تصادفی و نیمه تصادفی در شناسایی کروموزومهای ژنوم E^bE^b میباشد. میزان شباهت ژنتیکی لاین های تریتی پایرم (AABBE^bE^b) و ارقام گندم (۰/۱۹۶) بیشتر از لاین های محتمل تریتیکاله (AABBRR) و ارقام گندم (۰/۱۶۹) بود که این مسئله میتواند نشان دهنده 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 کارآبی مفید نشانگرهای مولکولی در اصلاح نباتات انتظار میرود در مدت زمان کوتاه تری 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, Carvalho A, Martin A, Heslop-Harrison J S, Guedes-Pinto H (2006) Morphological, Yield, Cytological and molecular characterization of a bread wheat×Triticordeum 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 in 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 wheat *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.

- بررسی میزان خویشاوندی ژنوم های تریتی پایروم ، تریتیکاله و گندم...
- 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 millet (*Pennisetum glaucum*) leaves. Afri. J. Biot. 4(8):862-866.