

بررسی میزان خویشاوندی ژنوم های تریتی پایروم (EbEb)،

تریتیکاله (RR) و گندم (ABD) با استفاده از مارکرهای مولکولی

مبتنی بر PCR

مریم اله دو*^۱، براتعلی سیاه سر^۲، حسین شاهسوند حسنی^۳، محمدرضا نارویی راد^۴،
علی کاظمی پور^۵، عباسعلی امام جمعه^۶

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

کشاورزی دانشگاه زابل

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

دانشگاه شهید باهنر کرمان

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

واژه های کلیدی

قربان ژنتیکی ،
تریتی پایروم ،
تریتیکاله ،
گندم ،
علف شور ساحل

به منظور تعیین قربان ژنتیکی ژنوم تریتیکاله، تریتی پایروم و گندم، DNA ژنومی علف شور ساحل (EbEb)، لاین های محتمل تریتیکاله (AABBRR)، لاین اولیه تریتی پایروم (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 پایروم 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 قربان 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)، 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 یافتند. متوسط میزان تشابه ژنتیکی لاین های محتمل تریتیکاله، تریتی پایروم و علف شور ساحل ۰/۱۷۹، لاین های تریتی پایروم و ارقام اصلاح شده گندم ۰/۱۹۴ و ارقام اصلاح شده گندم و لاین های تریتیکاله ۰/۱۶۱ بود. این تحقیق همولوژی زیاد ژنوم تریتی پایروم (EbEb) با ژنوم گندم، همولوژی 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.

مقدمه

آمفی پلوئید مصنوعی تریتی پایرم حاصل تلاقی گندم تتراپلوئید (*Triticum durum*) و یک گونه از علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*) می باشد (۹، ۱۷ و ۱۸). بعضی از گونه های وحشی تیره گندمیان، مانند گونه های مربوط به جنس *Thinopyrum* دارای خزانه ژنی با ارزشی برای مقاومت به تنش های زیستی و غیر زیستی بوده و می توانند 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 بیماری ها، تنش شوری، خشکی و دیگر صفات افزایش یافت (۲). علف شور ساحل، علف وحشی بومی کشور اکراین بوده که داری تحمل به شوری قابل توجهی است. بذور لاین های اولیه تریتی پایرم می توانند 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 برنامه های اصلاحی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۱). تکنیک های سیتوژنتیک مولکولی مانند هیبریداسیون فلورسنت در محل (FISH=florescent in situ hybridization)، چند شکلی DNA حاصل از تکنیک های RAPD و RFLP و یا ترکیب هر دوی آنها، می تواند برای شناسایی کروماتین بیگانه در هیبریدهای بین جنسی به کار رود (۱ و ۱۴). Gale و Devos (در سال ۱۹۹۲)، قطعات تکثیر شده بوسیله RAPD را برای شناسایی کروموزوم شمار ۴ جو در ژنوم گندم، Gourmet و Rayburn (در سال ۱۹۹۶) نشانگرهای RAPD را برای شناسایی کروموزوم بیگانه B در جمعیت های 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 به ژنوم چاودار را در ژنوم گندم شناسایی کردند. He و Hughes (در سال ۲۰۰۳)، 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 سال ۱۹۹۸) 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 سال ۱۹۹۱) 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 چند شکلی 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 ژنوتیپ ها ۸۶/۲ تا ۹۳ درصد بود که اشاره به شباهت ژنتیکی نسبتاً زیاد این ژنوتیپ ها داشت. زمانی که فراوانی کروموزوم های چاودار و یا علف شور ساحل در یک جمعیت افزایش یابد، فرصت تولید لاین های دارای کروموزوم اضافی یا جایگزین از ژنوم تریتیکاله (RR) و یا تریتی پایروم (E^bE^b) افزایش می یابد، استفاده از نشانگرهای مولکولی مختص ژنوم تریتیکاله (RR) و تریتی پایروم (E^bE^b) در این جمعیت امکان شناسایی سریع لاین های محتوی کروموزوم اضافی یا جایگزین از این دو ژنوم را افزایش می دهد. 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 روش ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل لاین های اولیه تریتی (Cr/b , Ka/b , La/b), $La(4B)4D/b$, Az/b , St/b , Ma/b ، علف وحشی شور ساحل، گندم رقم چینی بهاره، گندم تتراپلوئید رقم St، ارقام گندم نان شامل هیرمند، هامون و لاین های محتمل تریتیکاله (لاین های 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 نمونه های DNA حاصله با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه بیوفتومتر انجام شد (۲۶).

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز

DNA ژنومی نمونه‌ها با استفاده از ۳۲ پرایمر تصادفی (10bp) طراحی شده توسط شرکت اپران و ۲۲ پرایمر نیمه تصادفی گروه ET (Exon Targeting) و IT (Intron Targeting) طراحی شده توسط Rafalski و همکاران (در سال ۲۰۰۲) و Weining و Langridge (در سال ۱۹۹۱) تکثیر شدند (جدول ۱ و ۲). ۱۱ پرایمر تصادفی 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 مرز ۱

واحد، در میکروتیوپ های ۰/۲ سی سی صورت گرفت. برنامه ترموسایکلر شامل: واسرشته سازی اولیه در ۹۳ 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 نهایی ۷۱ 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.

جدول ۱- 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' ACGGATCTCG 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

جدول ۲- 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' ACCTACCTGCCGACG 3'	60
IT 32	5' GACTCGCCAGGTAAG 3'	60	ET39	5' ACTTACCTGCTGGCCGGA 3'	63

تجزیه داده ها

نوارهای تولید شده توسط پرایمرهای 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 داده ها مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور شناسایی قطعات ژنوم E^bE^b در لاین های اولیه تریتی پایرم، لاین های محتمل تربیتکاله و ارقام گندم، نوارهایی که در لاین های تریتی پایرم ($AABBE^bE^b$) و علف شور ساحل (E^bE^b) حضور ولی در گندم رقم چینی بهاره، سایر ارقام گندم و لاین های محتمل تربیتکاله حضور نداشتند، به عنوان نشانگرهای مختص ژنوم E^bE^b در نظر گرفته شدند و نوارهایی که در علف شور ساحل و لاین های محتمل تربیتکاله حضور ولی در لاین های تریتی پایرم و ارقام گندم حضور نداشتند، به عنوان نوارهای مشترک بین ژنوم تربیتکاله (RR) و تریتی پایروم (E^bE^b) در نظر گرفته شدند. میزان شباهت ژنتیکی بین ژنوم تربیتکاله (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 لاین های تربیتکاله و گندم، تریتی پایرم و گندم و لاین های تربیتکاله 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 تربیتکاله (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 لاین های اولیه تریتی پایرم و علف شور ساحل تکثیر نمود که این قطعه در رقم چینی بهاره، ارقام اصلاح شده گندم و لاین های محتمل تربیتکاله تکثیر نشد. DNA ژنومی تکثیر شده با پرایمر OPM06، یک قطعه با اندازه تقریبی ۷۰۰ جفت باز تکثیر نمود (شکل ۱) که این قطعه تقریباً در تمام لاین های 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 لاین ها به جز لاین های 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 لاین های تریتی پایرم و سایر لاین ها 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 لاین های محتمل تربیتکاله به جز لاین M_{45} حضور داشت، ولی در لاین های اولیه تریتی پایرم و رقم چینی بهاره حضور نداشت (شکل ۲).

شباهت ژنتیکی ارقام گندم و لاین های تریتی پایرم در دامنه ۰/۳۳ تا ۰/۰۵ با میانگین ۰/۱۹۴ (جدول ۳)، لاین های محتمل تربیتکاله، تریتی پایرم و علف شور ساحل در دامنه ۰/۳۳ تا ۰/۰۵۶ با میانگین ۰/۱۷۹ (جدول ۴) و ارقام گندم و لاین های تربیتکاله در دامنه ۰/۰۴۳ تا ۰/۲۶۸ با میانگین ۰/۱۶۱ (جدول ۵) قرار داشت.

جدول ۳ - میزان شباهت ژنتیکی (براساس ضریب تشابه جاکارد) ارقام گندم و لاین های تریتی پایروم

St	Ha	Hi	DH	CS	گندم/ تریتی پایروم
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 استوار؛
 (La/b)، لاین تریتی پایروم La/b؛ (Ma/b)، لاین تریتی پایروم Ma/b؛ (Az/b)، لاین تریتی پایروم Az/b؛ (Ka/b)، لاین تریتی پایروم Ka/b؛ (St/b)، لاین تریتی
 پایروم St/b؛ (Cr/b)، لاین تریتی پایروم Cr/b؛ La(4B)4D/b، لاین تریتی پایروم La(4B)4D/b؛ (TNP)، علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*).

جدول ۴ - میزان تشابه ژنتیکی (براساس ضریب تشابه جاکارد) لاین های تریتی کاله و لاین های تریتی پایروم

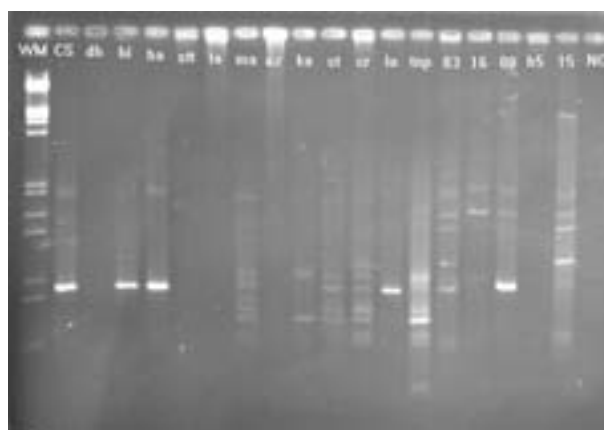
۴۱۱۵	M ₄₅	۴۱۰۸	۴۱۱۶	۴۱۰۳	تریتی کاله/ تریتی پایروم*
۰/۰۵۶	۰/۰۵۹	۰/۰۸۰	۰/۱۳۹	۰/۱۲۱	La/b
۰/۱۵۰	۰/۱۲۸	۰/۱۲۷	۰/۱۷۱	۰/۱۵۲	Ma/b
۰/۰۷۴	۰/۱۱۳	۰/۰۷۹	۰/۱۳۲	۰/۱۲۲	Az/b
۰/۱۹۸	۰/۱۲۷	۰/۱۶۶	۰/۳۳۳	۰/۱۸۱	Ka/b
۰/۲۱۶	۰/۱۴۲	۰/۲۳۸	۰/۱۹۸	۰/۲۵۶	St/b
۰/۲۲۸	۰/۱۹۷	۰/۲۳۰	۰/۲۰۰	۰/۲۱۴	Cr/b
۰/۲۶۰	۰/۱۷۳	۰/۲۱۰	۰/۳۱۱	۰/۳۱۷	La(4B/4D)/b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

× (La/b)، لاین تریتی پایروم La/b؛ (Ma/b)، لاین تریتی پایروم Ma/b؛ (Az/b)، لاین تریتی پایروم Az/b؛ (Ka/b)، لاین تریتی پایروم Ka/b؛ (St/b)، لاین تریتی
 پایروم St/b؛ (Cr/b)، لاین تریتی پایروم Cr/b؛ La(4B)4D/b، لاین تریتی پایروم La(4B)4D/b؛ (TNP)، علف شور ساحل (*Thinopyrum bessarabicum*)؛
 (۴۱۰۳)، لاین تریتی کاله ۴۱۰۳؛ (۴۱۱۶)، لاین تریتی کاله ۴۱۱۶؛ (۴۱۰۸)، لاین تریتی کاله ۴۱۰۸؛ (M₄₅)، لاین تریتی کاله M₄₅؛ (۴۱۱۵)، لاین تریتی کاله ۴۱۱۵.

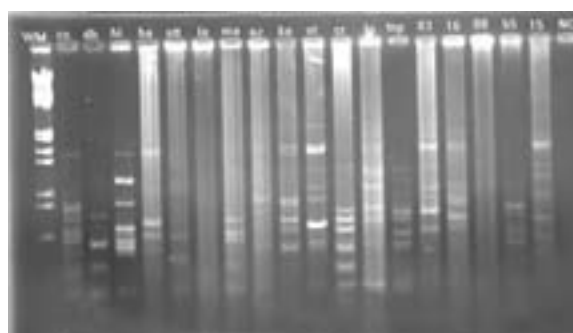
جدول ۵- میزان تشابه ژنتیکی (بر اساس ضریب تشابه جاکارد) لاین های تریتی کاله و گندم.

St	Ha	Hi	DH	CS	گندم / تریتی کاله
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

* (CS)، گندم رقم چینی بهاره؛ (DH)، گندم هاپلوئید مضاعف؛ (Hi)، گندم رقم هیرمند؛ (Ha)، گندم رقم هامون؛ (St)، گندم تتراپلوئید رقم استوارد؛ (۴۱۰۳)، لاین تریتی کاله ۴۱۰۳؛ (۴۱۱۶)، لاین تریتی کاله ۴۱۱۶؛ (۴۱۰۸)، لاین تریتی کاله ۴۱۰۸؛ (M₄₅)، لاین تریتی کاله M₄₅؛ (۴۱۱۵)، لاین تریتی کاله ۴۱۱۵.



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



شکل ۲ - تکثیر DNA لاین های اولیه تریتی پایرم، ارقام گندم و لاین های محتمل تریتی کاله 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 Ma/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 تریتی کاله ۴۱۰۳؛ (۱۶)، لاین امید بخش تریتی کاله ۴۱۱۶؛ (۰۸)، لاین امید بخش تریتی کاله ۴۱۰۸؛ (h5)، لاین امید بخش تریتی کاله M₄₅؛ (۱۵)، لاین امید بخش تریتی کاله ۴۱۱۵؛ (NC)، کنترل منفی.

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 پلاسما غلات استفاده شده است. Shahsevand Hassani و 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 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)، 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 همپولوژی 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 والنت مشاهده کرده بودند که ناشی از جفت شدن همپولوگی 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

می کند ولی این نشانگر به سختی تبدیل به نشانگرهای STS می شود (۲۴). نشانگرهای RAPD و ISJ در بیشتر آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار گرفته و می توانند 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 پلنئید 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 OPF03 قبلاً 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 تریتی کاله 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 هیچگونه اطلاعی از جایگاه این قطعه بر روی کروموزوم نداشته، بنابراین برای تعیین محل آن بر روی کروموزوم ها نیاز به آزمایشات بیشتر مانند تجزیه ساترن بلات و هیبریداسیون DNA فلورسنت، می باشد. پرایمر نیمه تصادفی ET34 نیز قطعات DNA مشترک بین علف شور ساحل و لاین های محتمل تریتی کاله 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

- 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- Malgorzata G, Wisniewska I, Rafalski A (2002) Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivar of wheat and triticales. *Cellular & Mol. Biol. Lettes.* 7:577-582.
- 12- Miler T E (2000) Can tritipyrum, a new salt tolerance amphiploid be successful cereal like triticales. *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. *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 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 triticales 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، ۴/۰۶ درصد از نوارهای RAPD مختص کروموزوم های علف شور ساحل (*Th. bessarabicum*) بود که این مسئله نشان دهنده کارایی مفید نشانگرهای تصادفی و نیمه تصادفی در شناسایی کروموزوم های ژنوم E^bE^b می باشد. 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 می تواند نشان دهنده تشابه بیشتر کروموزوم های 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 ژنوم های گندم، نسبت به ژنوم RR و نیز کارایی مفید نشانگرهای مولکولی در اصلاح نباتات انتظار می رود 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×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.

- 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.