مقایسه لاینهای افزایشی دیزومیک گندم- جو بر اساس خصوصیات سیتوژنتیکی و مولکولی

محسن فرشادفر[۱]، هوشمند صفری[۲*]، هومن شیروانی[۱] و صالحه آقایی‌نیا[۳]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی

[۲] ایران، کرمانشاه، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، بخش تحقیقات جنگلها و مراتع

[۳] ایران، کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، گروه اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۸

چکیده

محصولات ژنتیکی مانند لاینهای افزایشی و جایگزینی، منابع ژنتیکی با ارزشی در جهت برنامه‌های اصلاحی و تحقیقات بنیادی می‌باشند. هدف از این تحقیق مقایسه لاینهای افزایشی گندم – جو، که در آن کروموزومهای جو زراعی واریته Betzes به زمینه ژنتیکی گندم نان واریته Chinese spring منتقل شده، بر اساس نشانگرهای سیتوژنتیکی و مولکولی بود. بر اساس مطالعات سیتوژنتیکی وجود کروموزومهای اضافی در لاینهای افزایشی تأیید شد و تطابق کاریوتیپ حاصل از این کروموزومها با کاریوتیپ والد دهنده نیز تأیید گردید. مطالعات سیتوژنتیکی مشخص کرد که سه کروموزوم H1، H4 و H5 بیشترین تفاوت مورفولوژیکی با والد گیرنده داشتند و کروموزوم H6 دارای بیشترین شباهت مورفولوژیکی با والد گیرنده بود. تنوع ژنتیکی مطلوبی بر اساس مارکر ISSR در بین لاینها مشاهده شد. آغازگرهای IS_{10} و IS_{15} بهترین چندشکلی را در بین لاینها نشان دادند. آغازگرهای مورد بررسی بیشتر مناطقی از کروموزومهای H2، H3 و H7 را در جو تکثیر کردند. مناطق تکثیری توسط آغازگرهای مورد استفاده برای مارکر ISSR کمتر بر روی کروموزومهای H4، H5 و H6 قرار داشتند.

واژه های کلیدی: جو، لاین افزایشی، مارکر ISSR، سیتوژنتیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۳۰۵۸۲۳ ، پست الکترونیکی: hooshmand.safari@gmail.com

مقدمه

امروزه گندم (*Triticum aestivum*) غذای اصلی مردم بسیاری از کشورها می‌باشد به طوری که بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت جهان را تأمین می‌کند (۹). گندم به علت داشتن نشاسته، پروتئین و خواص نانوایی خوب بر سایر غلات ترجیح داده می‌شود. اگر چه از سایر غلات نیز می‌توان نان تهیه نمود، ولی تا امروز هیچ گیاهی در تهیه نان برای تغذیه انسان نتوانسته است با گندم رقابت کند (۱۷). جو (*Hordeum vulgare*) از نظر اهمیت غذایی و سطح زیر کشت در میان غلات، پس از گندم، ذرت و برنج مقام چهارم را دارد. اما با توجه به اینکه در شرایط متنوع آب و هوایی قابل کشت است، از نظر دامنه گسترش کشت مقام اول را داراست (۱۶). لاینهای افزایشی دیزومیک که حامل یک جفت کروموزوم از گونه‌های خویشاوند به زمینه ژنتیکی گونه گیرنده هستند، می‌توانند به منظور تعیین کروموزومهایی که حامل ژنهای کنترل کننده مقاومت به شوری، خشکی و غیره باشند، مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). لاینهای دارای یک کروموزوم اضافی از طریق اضافه شدن یک کروموزوم به گونه دریافت کننده تولید می‌گردد

و لاینهای دارای دو کروموزوم اضافی، از افزوده شدن یک جفت کروموزوم همولوگ از یک گونه خویشاوند به زمینه ژنتیکی گونه گیرنده به دست می‌آیند (۱۳). لاینهای افزایشی منابع ژنتیکی با ارزشی برای اصلاح گیاهان و تحقیقات پایه‌ای هستند (۲۸). یک لاین کروموزوم افزایشی محصولات پیشرفته‌ای در یک نوع گونه گیاهی است که برای اهداف زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد، از قبیل معرفی ویژگیهای با ارزش نوع گیرنده، نقشه ژنی و نشان‌گذاری یک کروموزوم بیگانه وارد شده، یک ژن بیگانه آزمایشی و فهم رفتار جفت شدگی میتوزی و ساختار کروموزوم و جدا کردن ژنهای منحصر به‌فرد (۸، ۱۸، ۲۳ و ۲۸). برای شناسایی لاینهای افزایشی که حامل کروموزومهای مختلف انتقال داده شده می‌باشند از یکی از تکنیکهای مورفولوژی، کاریوتیپ کروموزوم اضافه شده، جفت شدن کروموزوم میوزی در گیاهان F1 حاصل از تلاقی بین دو لاین افزایشی بیگانه (DAAL) (Disomic aline addition lines) ، تشخیص بیوشیمیایی و تلاقی داخلی (Inter crossing) استفاده می گردد. لاینهای اضافی مونوسومیک و دی‌سومیک را می‌توان از نظر مورفولوژیکی از همدیگر و از والد دریافت‌کننده شناسایی نمود زیرا کروموزومهای اضافه شده ویژگیهای مورفولوژیکی سنبله و ویژگیهای رویشی را تغییر می‌دهد. جا به جاییها ممکن است هم کیفی و هم کمی باشد. بیشتر تغییرات به‌خاطر کنش متقابل بین ژنهای والدهای دهنده و گیرنده می‌باشد و هر کروموزوم یک اثر خاصی روی مورفولوژی و باروری گیاه دارد (۱۴، ۲۴ و ۲۶). لاینهای افزایشی دیزومیک گندم – جو برای مطالعه و بررسی بیان ژنهای خارجی در ژنوم گندم و ترسیم نقشه فیزیکی ژنوم جو توسط Cho و همکاران (۲۰۰۶) مورد استفاده قرار گرفته است و از این طریق نقشه فیزیکی ژنهای موجود در لاین 6H مشخص شده است. نتایج این پژوهش نشان‌دهنده بی‌نظمی (فعالیت و عدم فعالیت) لوکوسها بود که پدیده‌ای مرسوم و عادی در لاینهای افزایشی دیزومیک گندم – جواست. لاینهای افزایشی دیزومیک جو–گندم برای تهیه نقشه فیزیکی ژنی کروموزومهای جو یک منبع عالی ژنی می‌باشد. از این طریق بررسی سازمان ژنی در جو امکان‌پذیر شده است (۱۰). لذا در تحقیق حاضر از طریق روشهای سیتوژنتیکی و مولکولی بر اساس مارکر ISSR لاینهای افزایشی کروموزومی جو–گندم که در آن جو به عنوان والد دهنده و گندم به عنوان والد گیرنده بود مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد آزمایش: به منظور بررسی خصوصیات کروموزومی گونه جو زراعی بر اساس نشانگرهای کاریوتیپی و مولکولی از هفت لاین افزایشی که هرکدام دارای یک جفت کروموزوم اضافی منتقل شده به زمینه ژنتیکی گندم زراعی، واریته بهاره چینی (Chinese spring)، از والد گونه جو زراعی واریته L. Betzes بودند، استفاده گردید (جدول ۱).

آزمایش سیتوژنتیکی: در ابتدا بذور داخل پتری‌دیش و روی کاغذ صافی کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت ریشه تحت پیش تیمار محلول آلفا برومونفتالین ۰/۱ درصد (وزنی/حجمی) به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. پس از این مرحله ریشه‌ها برای عمل تثبیت مدت ۱۸ ساعت در محلول لویتسکی قرار گرفتند. بعد از تثبیت برای نگهداری طولانی بلافاصله در اتانول ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) به یخچال منتقل شدند. جهت مطالعه لاین، نمونه‌ها در ماده هیدرولیزکننده (هیدروکسید سدیم ۱ نرمال) در درجه حرارت ۶۴ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شدند. بعد از هیدرولیز، نمونه‌ها در محلول رنگ هماتوکسیلین به‌مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. پس از قرار دادن نمونه‌ها روی لام، منطقه مریستمی با استفاده از تیغ مخصوص برش داده شد و پس از قرار دادن یک قطره محلول استیک اسید ۴۵ درصد (حجمی/حجمی) روی نمونه، لامل روی آن گذاشته شد. با وارد کردن ضربات آهسته بر روی نمونه سلولهای ریشه پخش شدند. تصاویر کروموزومی با میکروسکوپ نوری (Olympus BH2) مجهز به دوربین ذخیره شدند.

جدول ۱- لیست لاینهای مورد بررسی در این مطالعه

شماره	لاین	مشخصات لاین
۱	H1	کروموزوم شماره یک والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۲	H2	کروموزوم شماره دو والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۳	H3	کروموزوم شماره سه والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۴	H4	کروموزوم شماره چهار والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۵	H5	کروموزوم شماره پنج والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۶	H6	کروموزوم شماره شش والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۷	H7	کروموزوم شماره هفت والد دهنده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده اضافه شده است
۸	Ch.S	والد گیرنده که واریته بهاره چینی (Chinese spring) گندم زراعی بود
۹	H.V	والد دهنده که واریته L. Betzes جو زراعی بود

کروموزومهای ۵ سلول متافازی عکس برداری شده از هر لاین در یک فایل جداگانه، مرتب گردید. با استفاده از نرم افزار MicroMeasure 3.3 و از طریق مشخص کردن ابتدا و انتهای کروموزوم و محل سانترومر آنها، ویژگیهای کروموزومی نظیر طول بازوی بلند (L) (Long arm)، طول بازوی کوتاه (S) (Short arm)، طول کل کروموزوم (CL) (Total chromosome length)، نسبت بازوها (AR) (Arm ratio)، شاخص سانترومری (CI) (Centromer index) محاسبه و در محیط Excel ذخیره شدند، همچنین نوع کروموزومها (K.F) (karyotype formula) بر اساس روش Levan تعیین گردید (۲۱).

آزمایش مولکولی: استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (۱۲) برای ژنوتیپها انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد (وزنی / حجمی) و روش اسپکتروفتومتری مشخص شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۰۵ میلی مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار ۱x) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سلسیوس، زمان اتصال آغازگر ۴۵ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر (جدول ۲) متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس بود. توسعه نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد (وزنی / حجمی) با بافر TBE (Tris base, Boric acid and EDTA) یک درصد برای بارگذاری محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) (Polymerase chain reaction) استفاده گردید و سپس رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم برماید (یک میکروگرم در میکرولیتر) انجام گردید و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شدن باندها استفاده شد. در پایان نیز با استفاده از نرم افزار Darwin 5 داده‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت. محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) (Polymorphic information content) از طریق فرمول $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} PI^2$ (۲۵) محاسبه گردید.

نتایج

مطالعات سیتوژنتیکی: بررسی سلولهای متافازی لاینهای افزایشی مورد مطالعه، وجود جفت کروموزوم اضافی برای تمام لاینها را نشان داد.

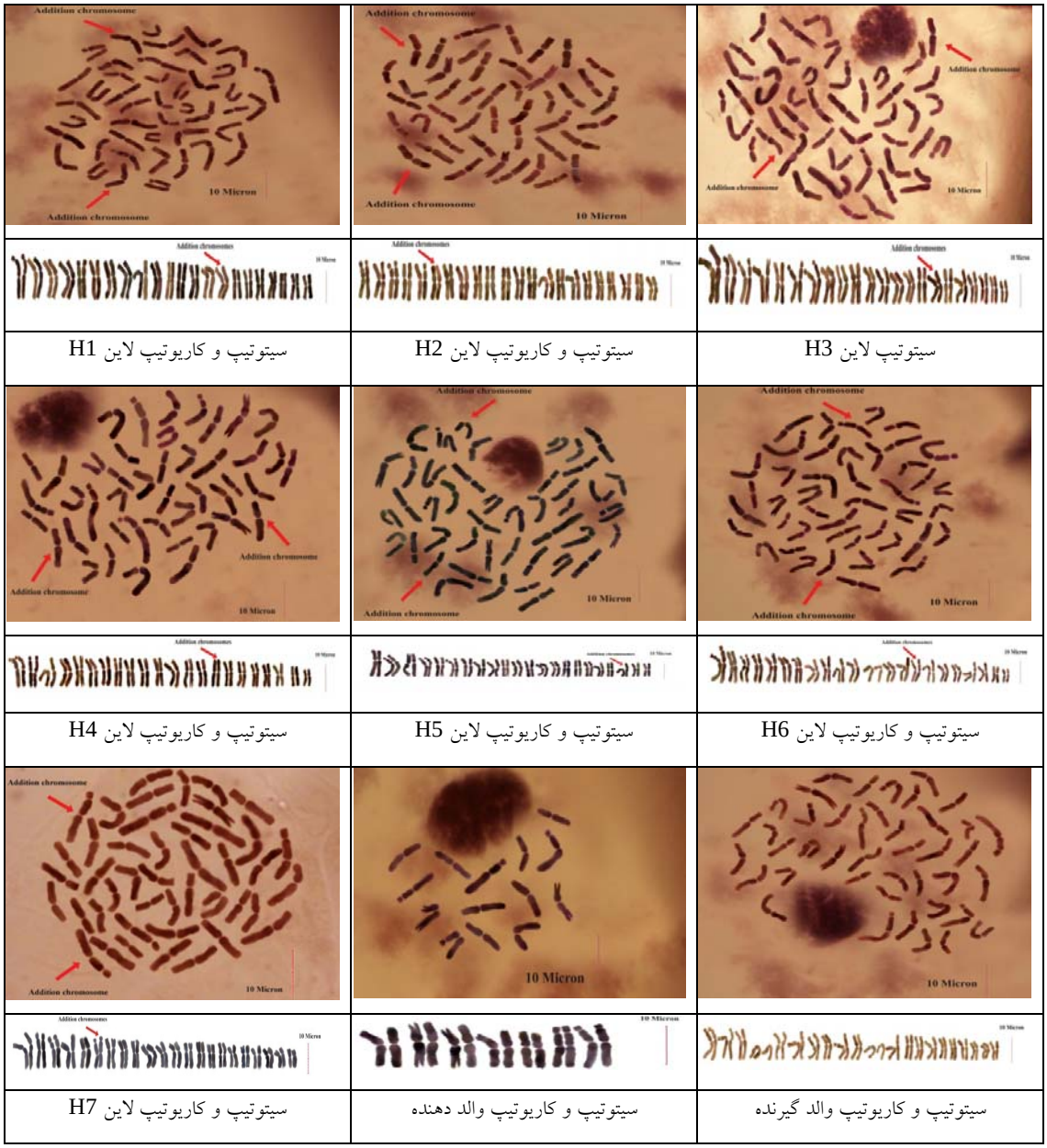
جدول ۲- درصد چند شکلی، تعداد کل باند و محتوای اطلاعات چند شکلی در آغازگرهای مورد استفاده

کد آغازگر	توالی آغازگر	مکان‌های تکثیر شده	مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC
IS_5	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	۹	۸	٪۸۸/۸۹	۰/۳۰۲
IS_9	5'- CTCTCTCTCTCTCTCTG-3'	۵	۴	٪۸۰	۰/۳۲۶
IS_{10}	5'- GAGAGAGAGAGAGAGA Rc-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۰/۴۹۴
IS_{11}	5'-ACACACACACACACACC-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۰/۳۴۶
IS_{12}	5'-TGTGTGTGTGTGTGTGG-3'	۸	۷	٪۸۷/۵	۰/۲۴۷
IS_{13}	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	۹	۶	٪۶۶/۶۷	۰/۲۹۶
IS_{14}	5'- GACAGACAGACAGACA-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۰/۳۱۶
IS_{15}	5'- GGATGGATGGATGGAT-3'	۴	۴	٪۱۰۰	۰/۳۹۵
IS_{16}	5'-DBDACACACACACACACA-3'	۸	۶	٪۷۵	۰/۲۴۱
میانگین		۶/۴۴	۵/۵۶	٪۸۸/۶۷	۰/۳۲۹

در شکل ۱ سیتوتیپ و **کاریوتیپ** لاینهای افزایشی، والد دهنده و گیرنده ارائه شده است. به منظور تعیین کروموزم اضافه شده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده از مطالعات انجام شده توسط Tjio و Hagber (۱۹۵۱)، که مورد قبول اکثر سیتولوژیستهایی است که روی جو کار می‌کنند، استفاده شد (۲۸)، هرچند از مطالعات Tuleen (۱۹۷۳) و Kunzel (۱۹۷۶) نیز در شناسایی کروموزومهای ۱، ۲ و ۳ استفاده گردید (۲۰ و ۳۰). در مجموع تعداد هفت جفت کروموزوم منتقل شده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده شناسایی شد و از این کروموزومها یک کاریوتیپ ساختگی تهیه گردید که این کاریوتیپ تحت عنوان کاریوتیپ $H.V_s$ نامگذاری شد (شکل ۲).

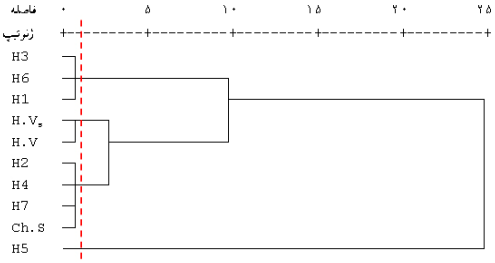
بررسی ویژگیهای کروموزومهای اضافی: در شکل ۲ کاریوتیپ ساختگی کروموزومهای اضافه شده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده ارائه شده است. همان طور که ملاحظه می‌گردد، تمام کروموزومها متاسنتریک بودند. نتایج نشان داد که کروموزوم شماره یک، پانزدهمین کروموزوم لاین H1؛ کروموزوم شماره دو، ششمین کروموزوم لاین H2؛ کروموزوم شماره سه، شانزدهمین کروموزوم لاین H3؛ کروموزوم شماره چهار، پانزدهمین کروموزوم لاین H4؛ کروموزوم شماره پنج، بیستمین کروموزوم لاین H5؛ کروموزوم شماره شش، پانزدهمین کروموزوم لاین H6 و کروموزوم شماره هفت، ششمین کروموزوم لاین H7 بود (شکل ۱).

تجزیه خوشه‌ای صفات کاریوتیپی: به منظور تأیید تعیین کروموزومهای اضافی مشخص شده برای کاریوتیپ لاینهای افزایشی (H1، H2، H3، H4، H5، H6 و H7)، والد گیرنده (Ch.S)، والد دهنده (H.V) و کاریوتیپ ساختگی از کروموزومهای اضافی تعیین شده ($H.V_s$) صفات کاریوتیپی طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، شاخص سانترومری و نسبت بازوی بلند به کوتاه محاسبه شد و بر اساس خصوصیات کاریوتیپی تجزیه کلاستر به روش Ward انجام شد که نمودار خوشه‌ای حاصل در شکل ۳ ارائه شده است. چنانکه ملاحظه می‌گردد، والد دهنده به همراه کاریوتیپ حاصل از کروموزومهای منتقل شده در یک گروه قرار گرفتند و این مسئله تأییدی بر شناسایی کروموزومهای منتقل شده بود. بنابراین می‌توان بیان داشت که کروموزومهای مشخص شده به عنوان کروموزومهای انتقالی در لاینهای افزایش مورد بررسی، به درستی مشخص شدند. کاریوتیپ ارائه شده بر اساس کروموزومهای اضافی تطابق بالایی با کاریوتیپ والد دهنده داشت.



شکل ۱- سیتوتیپ و **کاریوتیپ** لاین‌های افزایشی، والد دهنده و گیرنده

شکل ۲- کاریوتیپ ساختگی کروموزومهای اضافه شده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده



شکل ۳- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه کلاستر لاینهای افزایشی، والد دهنده (H.V)، والد گیرنده (Ch.S) و کاریوتیپ ساختگی

کروموزومهای ($H.V_s$) اضافی تعیین شده بر اساس خصوصیات کاریوتیپی به روش Ward

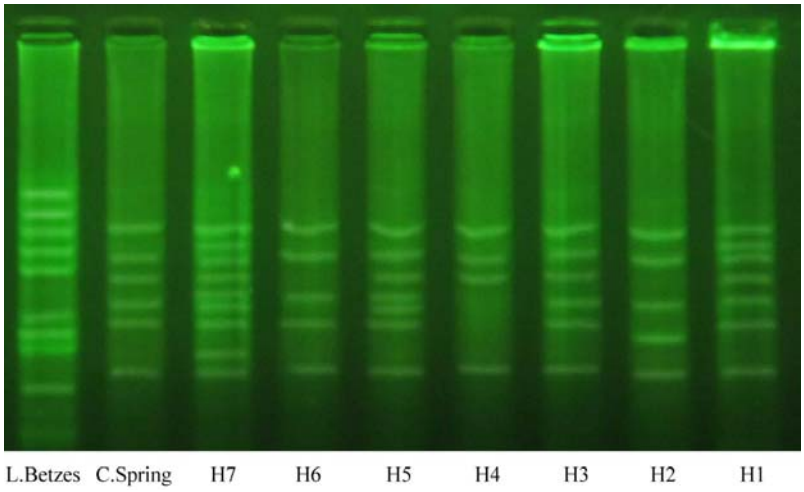
بررسی‌های مولکولی: به منظور مکان‌یابی بیشترین مناطق تکثیر شده در لاینهای مورد بررسی برای کروموزوم اضافه شده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده ۱۲ آغازگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت؛ که از این ۱۲ آغازگر تنها ۹ عدد دارای باندهای قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۵۸ مکان مارکری را شناسایی کنند که از این تعداد ۸ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. آغازگرهای IS_5 و IS_{13} بیشترین تعداد باند (تعداد ۹ باند) و آغازگر IS_{15} کمترین تعداد باند (تعداد ۴ باند) را نشان دادند. الگوی باندی ۹ لاین مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS_5 در شکل ۴ نشان داده شده است. هر ژنوتیپ به طور متوسط ۳۲/۳۳ باند برای ۹ پرایمر نشان داد و لاین H7 با تعداد ۳۶ باند دارای بیشترین تعداد باند و لاین H6 با تعداد ۲۵ باند دارای کمترین تعداد باند بود. نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده، در جدول ۲ ارائه شده است. کمترین میزان درصد چند شکلی را آغازگرهای IS_{13} و IS_{16} به ترتیب به میزان ۶۶/۶۷ درصد و ۷۵ درصد داشتند و بیشترین درصد چند شکلی برای آغازگرهای IS_{10}، IS_{11}، IS_{14} و IS_{15} به میزان ۱۰۰ درصد بود، همچنین میانگین درصد چند شکلی برابر ۸۸/۶۷ درصد بود. متوسط تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای ۹ لاین برابر ۶/۴۴ بود و متوسط تعداد باند-های چندشکل ۵/۵۶ بود. بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای IS_{10} و IS_{15} بود.

ماتریس تشابه ژنوتیپها با استفاده از ضریب تشابه دایس: تشابه ژنتیکی لاینهای مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۴۳۴ تا ۰/۸۴۵ متغیر بود (جدول ۳)، میانگین تشابه بین لاینها برابر ۰/۶۵۵ بود. بنابراین می‌توان بیان داشت تنوع نسبتاً مطلوبی در بین لاینهای مورد بررسی بر اساس نشانگر ISSR وجود داشت.

جدول ۳- ماتریس تشابه با استفاده ضریب تشابه دایس برای لاینهای مورد بررسی با استفاده از نشانگر ISSR

لاین	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	Ch.S
H2	۰/۶۰۳							
H3	۰/۶۳۸	۰/۸۲۸						
H4	۰/۵۰۰	۰/۷۲۴	۰/۶۹۰					
H5	۰/۶۲۱	۰/۶۳۸	۰/۶۳۸	۰/۸۴۵				
H6	۰/۵۰۹	۰/۷۷۴	۰/۶۶۰	۰/۸۱۱	۰/۸۳۰			
H7	۰/۵۸۶	۰/۸۱۰	۰/۸۱۰	۰/۷۰۷	۰/۶۹۰	۰/۶۷۹		
Ch.S	۰/۵۵۲	۰/۷۰۷	۰/۶۷۲	۰/۸۱۰	۰/۷۹۳	۰/۷۹۲	۰/۷۲۴	
H.V	۰/۵۰۹	۰/۴۷۲	۰/۵۰۹	۰/۴۳۴	۰/۴۵۳	۰/۵۰۹	۰/۶۰۴	۰/۴۵۳

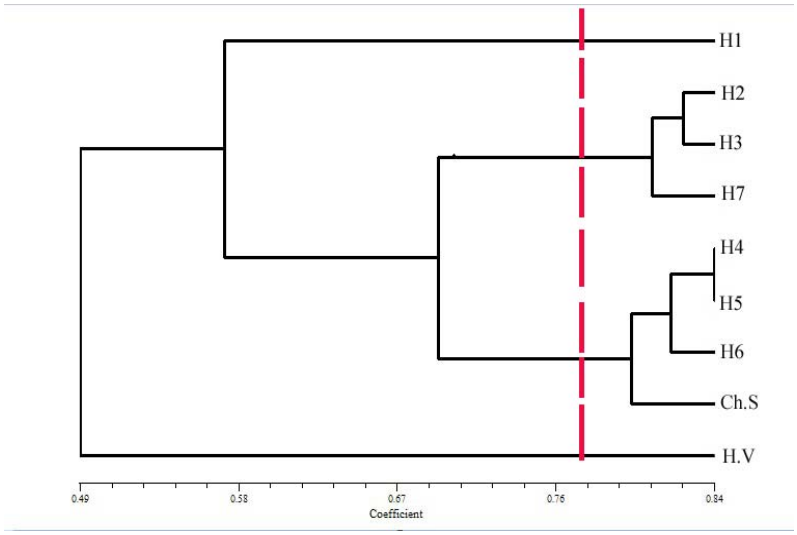
متوسط تشابه بین لاینهای افزایشی ۰/۶۹۵ بود، بنابراین شباهت بین لاینهای افزایشی از متوسط تشابه بیشتر بود. متوسط تشابه لاینهای افزایشی با والد گیرنده ۰/۷۲۲ بود، این متوسط ضریب تشابه بالا دلالت بر این دارد که کروموزومهای منتقل شده تأثیر بالایی بر تغییر زمینه ژنتیکی والد گیرنده بر اساس پرایمرهای ISSR مورد بررسی نداشتند. متوسط تشابه لاینهای افزایشی با والد دهنده ۰/۴۹۹ بود، پایین بودن این ضریب تشابه نیز بیانگر تأثیر کم کروموزومهای انتقالی در زمینه ژنتیکی والد گیرنده بر اساس مارکرهای ISSR مورد بررسی بود. والد دهنده و گیرنده فاصله ژنتیکی بالایی داشتند (۰/۴۵۳) و پرایمرهای مورد بررسی به خوبی دو گونه مورد مطالعه را ازهمدیگر تفکیک کردند.



شکل ۴- الگوی باندی لاینهای مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS_5

لاینهای H4، H5 و H6 بیشترین شباهت (به ترتیب با ضریب تشابه ۰/۸۱۰، ۰/۷۹۳ و ۰/۷۹۲) با والد گیرنده را داشتند و دارای بیشترین فاصله (به ترتیب با ضریب تشابه ۰/۴۳۴، ۰/۴۵۳ و ۰/۵۰۹) با والد دهنده بودند. ازطرف دیگر لاین H7 دارای بیشترین شباهت (۰/۶۰۴) با والد دهنده بود، تشابه بالای این لاین با والد دهنده نشانگر این مطلب بود که پرایمرهای مورد بررسی مکانهای بیشتری را بر روی کروموزوم VH در جو را تکثیر کردند. لاین H1 دارای بیشترین فاصله (۰/۵۵۲) با والد گیرنده بود و با والد دهنده تشابه نسبتاً بالایی (۰/۵۰۵) را نشان داد. در مجموع هرچقدر تشابه لاینها به والد گیرنده بیشتر بود آغازگرهای مورد بررسی مکانهای مارکری کمتری از کروموزومهای اضافه شده به زمینه ژنتیکی والد گیرنده را تکثیر کردند.

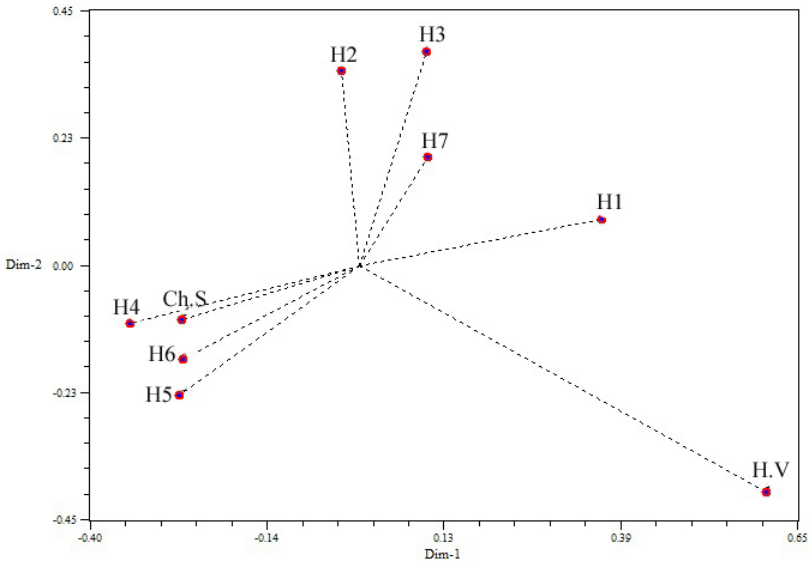
تجزیه خوشه‌ای: نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس باعث گروه‌بندی لاینها در چهار گروه شد (شکل ۵).



شکل ۵- نمودار حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاینها بر اساس داده‌های نشانگر ISSR با روش UPGMA

چنانکه ملاحظه می‌گردد گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای به خوبی والد دهنده و گیرنده را در دو گروه جداگانه قرار داد. از طرف دیگر تمام لاینهای افزایشی با والد گیرنده در فاصله نسبتاً بالاتری نسبت به خط برش در یک گروه قرار گرفتند. اما ملاحظه می‌گردد که لاینهای H4، H5 و H6 با بیشترین شباهت با والد گیرنده در یک گروه قرار داشتند. و گروه بعدی شامل لاینهای H2، H3 و H7 بود، که لاینهای این گروه اکثراً شباهت بالاتری با والد دهنده داشتند. گروه سوم لاین H1 بود که به تنهایی در یک گروه قرار داشت و در نهایت گروه چهارم بود که شامل والد دهنده بود.

تجزیه به مختصات اصلی: با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه به مختصات و بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنوتیپها رسم شد، که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای بیشتر با توجه به مختصات اول مطابقت داشت، اما بر اساس مختصات دوم نیز تا حدودی تطابق مشاهده گردید (شکل ۶). در مجموع والد دهنده و گیرنده بر اساس دو محور مختصات اصلی اول و دوم از همدیگر تفکیک شدند و از طرف دیگر لاینهای H4، H5 و H6 با بیشترین شباهت با والد گیرنده بر اساس نمودار در کنار والد گیرنده در یک گروه قرار داشتند. همچنین لاینهای H2، H3 و H7 نیز بر اساس دو محور مختصات در یک گروه بودند و لاین H1 نیز محور مختصات جداگانه‌ای داشت که بیشتر به والد دهنده نزدیک تر بود.



شکل ۶- بای پلات لاینها برای نشانگر ISSR بر اساس دو محور مختصات اصلی اول و دوم

بحث

در یک جمع بندی کلی می‌توان بیان داشت که وجود کروموزومهای اضافی در لاینهای افزایشی تأیید شد و کاریوتیپ حاصل از این کروموزومها با کاریوتیپ والد دهنده تطابق داشت. Gupta (۱۹۷۰) با استفاده از مورفولوژی کروموزومهای منتقل شده چاودار در زمینه ژنتیکی گندم گزارش کرد که برای این کروموزومهای انتقالی تنوع مورفولوژیکی وجود دارد (۱۵)، همچنین Szakacs و Molnar-lang (۲۰۱۰) عدم پایدارای کروموزومهای انتقالی چاودار به زمینه ژنتیکی گندم را گزارش نمودند (۲۸). از طرف دیگر وجود چندشکلی بین واریته‌ای برای مورفولوژی کروموزومهای جو زراعی گزارش شده است (۳۱). در هرحال اخوان و سعیدی (۱۳۸۹) بر اساس مورفولوژی کروموزومهای جو زراعی

کاریوتیپ آن را مشخص کردند، که کاریوتیپ به دست آمده در این تحقیق با کاریوتیپ گزارش شده توسط آنها تطابق بالایی داشت (۱).

همچنین در مطالعه دو کاریوتیپ H.V و $H.V_s$ مشخص گردید که عامل تفکیک این دو کاریوتیپ از همدیگر، بیشتر طول بازوی کوتاه و متوسط طول کل کروموزوم بود. دیگر صفات کاریوتیپی این دو کاریوتیپ با همدیگر یکسان بود و کلیه کروموزومها به صورت متاسانتریک بودند. اخوان و سعیدی (۱۳۸۹) برای جمعیتهای مختلف گونه جو زراعی کاریوتیپ متقارنی گزارش کردند و در اکثر جمعیتها تمام کروموزومها متاسانتریک بودند و در مواردی وجود یک کروموزوم ساب‌متاسنتریک نیز گزارش کردند (۱). یزدان‌ستا و همکاران (۱۳۸۳) فرمول کاریوتیپی ۷m را برای جو زراعی گزارش کردند (۶). با توجه به کاریوتیپهای تهیه شده مشخص گردید که کروموزومهای منتقل شده به والد گیرنده در چه محلی قرار گرفته اند . نتایج این بخش با نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی که بر روی جو توسط بخشی خانیکی (۱۳۸۴)، اخوان و سعیدی (۱۳۸۹)، Tjio و Hagber (۱۹۵۱) و همچنین مطالعات Tuleen (۱۹۷۳) و Kunzel (۱۹۷۶) صورت گرفته است مطابقت داشت (۱، ۳، ۲۰، ۲۹ و ۳۰). از طرف دیگر مشخص شد که سه کروموزوم H1، H4 و H5 بیشترین تفاوت مورفولوژیکی را با والد گیرنده داشتند و کروموزوم H6 دارای بیشترین شباهت مورفولوژیکی با والد گیرنده بود. موسوی و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه لاینهای جایگزینی کروموزومی گندم هوپ در زمینه ژنتیکی بهاره چینی نشان دادند که لاینهای 2B,7B,7D,4D,3D,7A,6A و هوپ در یک گروه قرار گرفتند ، لذا می‌توان از آنها برای اصلاح ژنتیکی تحمل به خشکی در گندم بهره جست (۵). Riley و Chapman (۱۹۵۸) جفت شدن میوزی را در لاینهای اضافی و جایگزین واریته گندم Chinese spring به روش سی-بندینگ مطالعه نمودند (۲۶). صبوری و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی مکان یابی صفات مربوط به سنبله در جو، کروموزم شماره ۴ را دارای اهمیت معرفی نمودند (۴).

با توجه به نتایج به دست آمده تنوع ژنتیکی مطلوبی بر اساس مارکر ISSR در بین لاینها مشاهده شد، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از صفر تا ۰/۵ متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپهای تحت بررسی می‌باشد بنابراین آغازگرهای IS_{10} و IS_{15} بهتر از سایر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی لاینها را مشخص کنند و آغازگر IS_{12}، IS_{13} و IS_{16} با کمترین میزان PIC و درصد چندشکلی توانایی خوبی در جداسازی لاینها نداشتند. Abou-Deif و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده ۸ آغازگر ISSR تعداد بیست ژنوتیپ گندم را مورد بررسی قرار دادند و متوسط درصد چندشکلی ۸۴/۸ درصد را گزارش نمودند (۷) همچنین Deshmukh و همکاران (۲۰۱۲) کاربرد مارکرهای مولکولی، بویژه ISSR را در زمینه تعیین مقاومت به خشکی ژنوتیپهای گندم گزارش کرده اند (۱۱). نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی بر اساس مارکر مولکولی ISSR با نتایج حاصل از بررسیهای سیتوژنتیکی تطابق چندانی نداشت. اما بر اساس پرایمرهای مورد بررسی لاینهای H2، H3 و H7 به والد دهنده شباهت بیشتری داشته و می‌توان بیان داشت که پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر بیشتر مناطقی از کروموزومهای H2، H3 و H7 را در جو تکثیر کردند. Jin-Kun و همکاران (۲۰۰۲) بر اساس مارکر ISSR ژنوتیپهای گندم را با روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی کرده و آنها را در چهار گروه قرار دادند و بیان داشتند که می‌توان با استفاده از مارکر ISSR تفاوت را در بین کولتیوارهای گندم مشخص نمود (۱۹). از طرف دیگر لاینهای H4، H5 و H6 بیشتر به والد گیرنده شبیه بودند و بنابراین می‌توان بیان داشت که مناطق تکثیری توسط آغازگرهای مورد استفاده برای مارکر ISSR کمتر بر روی کروموزومهای H4، آ۵ و H6 قرار داشتند. نکته جالب توجه لاین H1 بود که بر اساس دو روش مطالعه شده

(سیتوژنتیک و مارکر) فاصله بالایی با والد دهنده و گیرنده داشت. این امر بیانگر مطلبی بود که قبلاً نیز به آن اشاره شد و آن این است که کروموزومهای افزایشی بر اساس پرایمرهای مورد بررسی در زمینه ژنتیکی والد گیرنده تغییرات بالایی ایجاد نکردند. Sofalian و همکاران (۲۰۰۹) ۲۷ ژنوتیپ گندم را با ۱۵ آغازگر ISSR مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA ژنوتیپها را در سه گروه اصلی قرار داد و نشان داد که نشانگرهای ISSR می‌توانند تغییرات ژنتیکی ژرم‌پلاسم گندم را به خوبی نشان دهند (۲۷). اسماعیلی و همکاران (۱۳۹۶) نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی را ابزار مفیدی جهت بررسی گندم دیم معرفی نمودند (۲).

منابع

۱- اخوان، آ.، سعیدی، ح. ا.، ۱۳۸۹. بررسی روابط و تنوع درون گونه‌ای *Hordeum vulgare* L. (جو زراعی و خودرو) در ایران با استفاده از داده‌های سیتولوژی. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۲: ۴۷-۵۸.

۲- اسماعیلی، ا.، نظریان فیروزآبادی، ف.، سمیعی، ک.، دریکوند، ر.، ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپهای گندم دیم با استفاده ازآغازگرهای نیمه تصادفی اینترونی-اگزونی. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۳۰ (۲): ۱۱۷-۱۲۶.

۳- بخشی‌خانیکی، غ. ر.، ۱۳۸۴. سیتوژنتیک گیاهی. ترجمه، سینگ، آر. جی.، انتشارات دانشگاه پیام‌نور، تهران.

۴- صبوری، ح.، تقی زاده، ز.، حسینی مقدم، ح.، فلاحی، ح ع.، کاتوزی، م.،۱۳۹۶. اهمیت کروموزوم ۴ در کنترل ژنتیکی صفات مرتبط با سنبله در جو. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). پذیرفته شده. انتشار آنلاین از تاریخ ۲۲ آبان ۱۳۹۶.

۵- موسوی، س. ص.، هوشمند، س.، محمدی، ش.، خدامباشی، م.، ۱۳۸۹. تعیین کروموزوم‌های حامل ژن‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های کمی مرتبط با تحمل به خشکی در گندم نان با استفاده از لاین‌های جایگزین. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی، ۳: ۹۷-۱۱۴.

۶- یزدان‌ستا، س.، کریم‌زاده، ق. و طهماسبی سروستانی، ز. ع.، ۱۳۸۳. بررسی کاریوتیپی برخی از ژنوتیپهای جو بدون پوشینه (*Hordeum vulgare* L.). مجله علوم کشاورزی ایران، ۴: ۸۲۷-۸۳۷.

7- Abou-Deif, M H., Rashed, M A., Sallam, M A A., Mostafa, E A H., Ramadan, W A. (2013). Characterization of Twenty Wheat Varieties by ISSR Markers. Middle-East Journal of Scientific Research, 15: 168-175.

8- Bass, H W., Riera-Lizarazu, O., Ananiev, E V., Bordoli, S J., Rines, H W., Phillips, R L., Sedat, J. W., Agard, D A., Cande, W. Z. (2000). Evidence the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. J Cell Sci, 113: 1033-1042.

9- Bushuk, W., Rasper, V.F. (1994). Wheat proudaction, properties and quality. BlakieAcademicand professional an imprint Chapman and Hall.287-310pp

10- Cho, S., Garvin, D. F., Muehlbauer, G. J. (2004). Barley Gene Expression in wheat-Barley Chromosome Addition Lines and Transcriptome-Based Physical Mapping of Barley Genes. International Triticeae Mapping Initiative Workshop. Abstract, No. 18.

11- Deshmukh, R., Tomar, N. S., Tripathi, N., Tiwan, S. (2012). Identification of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Physiol. Mol. Biol. Plants, 18: 101-104.

12- Doyle, J J., Doyle, J. L. (1987). A rapd DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem bull. 19: 11-15.

13- Ellis, R P., Forster, B. P., Robinson, D., Handley, L. L., Gordon, D. C., Russell, J. R., Powell, W. (2000). Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century. J. Experimental Botany, 51: 9-17.

14- Evans, L. E., Jenkins, B. C. (1960). Individual *Secale cereale* chromosome additions to *Triticum aestivum*. I. The addition of individual "Dakold" fall rye chromosomes to "Kharkov" winter wheat and their subsequent identification. Can J Genet Cytol, 2: 205-215.

15- Gupta, P K. (1970). Variability in the Morphology of Rye {Secale cereale) Chromosomes when placed in Wheat {Triticiim aesti-vum) Background. Phyton, 14: 9-13.

16- Hayes, P M. (1992). Economic trait loci (quantitative trait loci- QTL) analysis progress report. North American Barley Genome

Mapping project (NABGMP). Barley Genetics Newsletter, 21: 30-31.

17- Heyne, E C. (1987). Wheat and wheat improvement. America Society of Agronomy ING. Madison. Wisconsin USA.

18- Jin, W., Melo, T. R., Nagaki, K., Talbert, P. B., Henikoff, S., Dawe, R. K., Jiang, J. (2004). Maize Centromeres: Organization and Functional Adaptation in the Genetic Background of Oat.The Plant Cell, 16: 571-581.

19- Jin-Kun, D., Ying-Yin, O., Zhong-Fu, N., Hui-Ru, P., Qi-Xin, S. (2002). Genetic Diversity Revealed by ISSR Molecular Marker in Common Wheat,Spelt,Compactum and Progeny of Recurrent Selection. J.G. G., 29: 445-452.

20- Kunzel, G. (1976). Indications for a necessary revision of the barley karyogramme by use of translocations. In: Barley Genetics IV, eds. M. J. C. Asher, R. P. Ellis, A. M. Hayter and R. N. H. Whitehouse; pp. 275-281. Edinb. Univ. Press.

21- Levan, A., Fredga, K., Sandbery, A. (1964). Nomencleature for centromeric position on chromosome. Heriditas, 52:201-220.

22- Mahmood, A. and Quarrie, S. A. (1993). Effects of salinity on growth, ionic relations and physiological traits of wheat, disomic addition lines from Thinopyrum bessarabicum, and two amphiploids. Plan Breeding, 110: 265-276.

23- Muehlbauer, G. J., Riera-Lizarazu, O., Kynast, R. G., Martin, D., Phillips, R. L., Rines, H. W. (2000). A maize-chromosome 3 addition line of oat exhibits expression of the maize homeobox gene liguleless3 and alterations of cell fate. Genome, 43: 1055-1064.

24- O'Mara, J. G. (1940). Cytogenetic studies on *Triticale*. I. A method for determining the effects of individual *Secale* chromosomes on *Triticum*. Genetics, 25: 401-408.

25- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.

26- Riley, R., Chapman, V. (1958). The production and phenotypes of wheat-rye chromosome addition lines. Heredity, 12: 301-315.

27- Sofalian, O., Chaparzadeh, N., Dolati, M. (2009). Genetic diversity in spring wheat landraces from northwest of Iran assessed by ISSR markers. Not. Bot. Hort. Agrobot., 37: 252-256.

28- Szakacs, E., Molnar-Lang, M. (2010). Molecular cytogenetic evaluation of chromosome instability in *Triticum aestivum*–Secale cereale disomic addition lines. J. Appl. Genet., 51: 149-152.

29- Tjio, J H., Hagberg, A. (1951). Cytological studies of some x-ray mutants of barley. An Estacion Experimental. Aula. Dei., 2: 149-167.

30- Tuleen, N. A. (1973). Karyotype analysis of multiple translocation stocks of barley. Can. J. Genet. Cytol. 15:267-273.

31- Vahidy, A A., Bushreen, J. (1995). Intervarietal polymorphism of constitutive heterochromatin in *Hordeum vulgare* L. Pak. J. Bot., 27: 417-423.

Comparison of wheat-barely disomic addition lines using cytogenetical and molecular markers

Farshadfar M.[1], Safari H.[2], Hooman Shirvani[1] and Aghaeinia S.[3]

[1] Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Research Dept. of Forests and Rangelands, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, I.R. of Iran

[3] Dept. of Plant Breeding, Islamic Azad University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

Genetic materials such as alien additions and substitutions are valuable genetic resources for both plant breeding and basic research. The objective of this study was determination of genetic diversity in wheat addition lines of *Hordeum vulgare* L., (2n = 2x =14. cv. Betzes) into the genetic background of bread wheat (*Triticum aestivum* L., 2n = 6x =24, AABBDD, cv. Chinese Spring) by cytogenetical and molecular markers. Cytogenetical study indicated that chromosomes of 1H, 4H and 5H had the morphological differences with recipient parent and 6H had the morphological similarity with recipient parent. A desirable genetic diversity observed based on ISSR markers between the lines. The primers of IS_{10} and IS_{15} showed the best polymorphism between the lines. The studied primers were amplified in barley the most regions of the chromosomes of 2H, 3H and 7H. The proliferation regions by using primers for ISSR marker lower placed on chromosomes of 4H, 5H and 6H.

Key words: Barely, Addition line, ISSR marker, Cytogenetic.