بسم الله الرحمن الرحيم

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

دانشگاه شهید باهنر کرمان

دانشکده کشاورزی

گروه مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی

گرایش بیوتکنولوژی

تولید لاین‌های ثانویه تریتی‌پایرم و استفاده از مارکرهای ژنومی و مولکولی در گزینش لاین‌های مطلوب در نسل‌های تفرق F_2 و F_3 با روش‌های مرسوم سیتولوژی و نوین سیتوژنتیک

استاد راهنما:

دکتر حسین شاهسوند حسنی

استادان مشاور:

دکتر امین باقی زاده

دکتر غلامرضا شریفی سیرچی

مؤلف:

زهره پورفریدونی

شهریور ماه ۱۳۸۸

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

گرو ه مهندسی بیوتکنولوژی

دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی‌شود.

دانشجو: زهره پورفریدونی

استاد راهنما: دکتر حسین شاهسوند حسنی

استاد مشاور ۱: دکتر امین باقی زاده

استاد مشاور۲: دکتر غلامرضا شریفی سیرچی

داور: دکتر قاسم محمدی نژاد

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر محمد حسن فولادی

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان و مرکز بین‌المللی علوم وتکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی است.

تقدیم به:

بانوی دو عالم حضرت فاطمه زهرا (س)

کاشکی هستی زبانی داشتی تا ز هستان پرده‌ها برداشتی
هرچه گویی ای دم هستی از آن پرده‌ای دیگر بر آن بستی بدان

خدای را شاکرم که همواره پیش از ندایم اجابتم کرد و به کرمش عطایم فرمود.
یاد می‌کنم از روح پاک پدرمهربانم و از مادر عزیزم به پاس محبت‌های بی‌دریغشان تشکر می‌کنم و همچنین از خواهران خوبم و برادر دوست داشتنی‌ام که همواره مایه دلگرمی من هستند متشکرم و برای ایشان آرزوی سرفرازی و سلامتی دارم.
وبه نیکی یاد می‌کنم از روح بلند مهندس افضلی پور و بانو فاخره صبا که گذر زمان نمی‌تواند بزرگی عملشان را کمرنگ سازد.
بر خود لازم می‌دانم که از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر شاهسوند حسنی که درانجام این پایان نامه مرا راهنمایی کردند و مرهون نجابت وآموزه‌های ارزنده ایشان هستم سپاسگزاری کنم. از همکاری اساتید ارجمند جناب آقای دکتر باقی‌زاده و جناب آقای دکتر شریفی سیرچی با اینجانب متشکرم. از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر محمدی‌نژاد برای راهنمایی‌های صمیمانه‌شان و تقبل زحمت داوری این پایان نامه تشکر می‌کنم. از راهنمایی‌های ارزنده اساتید گرامی آقایان دکتر آروین، دکتر پورسیدی و دکتر ذوالعلی سپاسگزارم. از مسئولین محترم مرکز بین المللی علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی برای در اختیار قرار دادن امکانات انجام این تحقیق، همچنین از همکاری آقایان دکتر یعقوبی، دکتر کریم زاده، دکتر میرزاقادری، مهندس میرزایی و مهندس یزدان‌پناه و خانم‌ها دکتر پاک-کیش، دکتر خالقی، مهندس عبدلی‌نسب، مهندس فرهمند، مهندس قطب‌زاده، مهندس پورتبریزی، مهندس یکتاپور و خانم عامری تشکر می‌کنم.
از دوستان عزیزم خانم‌ها محمدی، گرگین، گلستانی، محمدی‌نژاد، رمشی، موسوی، خدادادی، محمدی، نژادعلی، زارع، حسینی، بهشتی، عادلی، بهرامی، تکلوزاده، ابراهیمی و شهریاری متشکرم و برای همه این عزیزان آرزوی موفقیت دارم.

چکیده

هیبریداسیون بین جنسی یکی از روش‌های انتقال ژنوم‌های مفید به گونه‌های زراعی است. به منظور انتقال صفات مطلوب ژنوم D به لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم ($2n=6x=42$, AABBE^{b}E^b)، تعداد ۱۶۷ تلاقی بین ارقام گندم نان ($2n=6x=42$, AABBDD) و لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم انجام و۱۴۸ بذر دورگ F_1 ایجاد شد. ساختارکروموزومی ٤٤ گیاه (۲۹۱ سلول متافاز میتوزی) و ۱۹گیاه (۲۱۷سلول متافاز میوزی) از گیاهان جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه مقاوم به شوری (NPSSTTIPs) با روش‌های مرسوم سیتولوژی بررسی و نتایج به ترتیب نشان داد اولاً میزان آنیوپلوئیدی با افزایش نسل‌های خودگشنی کاهش می‌یابد.ثانیاً وجود کروموزوم‌های منفرد در سلول‌های متافازی میوز حاکی از عدم همولوژی کامل بین کروموزوم‌های ژنوم‌های D و E^b است. وجود کروموزوم‌های گونه تینوپایرم بسارابیکوم($2n=2x=14$, E^{b}E^b) در چهار گیاه (۲۰ سلول متافاز میتوزی) و چهار گیاه (۲۷ سلول متافاز میتوزی) از نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه مقاوم به شوری به ترتیب حاصل از تلاقی رقم امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b و رقم گندم نان نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه (Ka/b)(C*f*b) با استفاده از روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل (GISH) با کاوشگر DNA ژنومی گونه سودورجینریا استیپی فولیا($2n=2x=14$, SS) نشاندار شده به روش غیرمستقیم با بیوتین-۱۱dUTP مطالعه و نتایج حاکی از وجود ٦-۱ کروموزوم از ژنوم E^b در آن‌ها بود. نتایج حاصل از تکنیک هیبریداسیون در محل با کاوشگر ریبوزومی PTa71 نشاندار شده با بیوتین-۱۱dUTP روی سه گیاه (ده سلول میتوزی) لاین اولیه تریتی‌پایرم (Ka/b)(C*f*b) و سه گیاه (۱۵ سلول میتوزی) از ژنوتیپ جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه مقاوم به شوری (NPSSTTIPs) حاصل از تلاقی رقم گندم نان نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه (Ka/b)(C*f*b) وجود ۸-٦ محل دورگه ریبوزومی نورانی در لاین تریتی‌پایرم اولیه و ۸-۵ محل دورگه نورانی کاوشگر ریبوزومی PTa71 در گیاهان جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه مقاوم به شوری را نشان داد. بنابراین می‌توان از این نشانگر برای انتخاب گیاهان جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه مقاوم به شوری (NPSSTTIPs) حاوی ١٤ کروموزوم ژنوم A ، ۱۴ کروموزوم ژنوم B، ۱۲ کروموزوم ژنوم D و یک جفت کروموزوم ۵E^b، در نسل‌های تفرق F_2 به بعد حاصل از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم و گندم نان استفاده نمود.

کلید واژه: تریتی‌پایرم اولیه، تریتی‌پایرم ثانویه ، دورگ‌گیری بین جنسی، هیبریداسیون DNA ژنومی در محل، کاوشگر ریبوزومی PTa71.

فهرست مطالب :

فصل اول :کلیات و بررسی منابع..... ۱
۱- ۱- مقدمه..... ۱
۱-۲-کاربرد سیتوژنتیک مولکولی در گیاهان..... ۳
۱-۳- اهمیت اصلاح گندم..... ۶
۱-۴- شوری..... ۷
۱-۵- اساس مقاومت به شوری..... ۸
۱-۶- انتقال ژن‌های مفید از گونه‌های وحشی به گندم..... ۹
۱-۷- مقاومت به شوری در گونه‌های آجیلوپس..... ۱۱
۱-۸- مقاومت به شوری در گونه‌های تینوپایرم..... ۱۳
۱-۸-۱ لفوپایرم الانگیتوم..... ۱۳
۱-۸-۲ تینوپایرم جانسی‌یم..... ۱۴
۱-۸-۳ تینوپایرم پونتیکوم..... ۱۴
۱-۸-۴ تینوپایرم بسارابیکوم..... ۱۵
۱-۹ آمفی‌پلوئید های مصنوعی..... ۱۷
۱-۱۰ تینوپایرم پل انتقال ژن‌های مقاومت به شوری..... ۱۸
۱-۱۱ بررسی‌های انجام شده روی تریتی‌پایرم..... ۱۹
۱-۱۲ اهداف..... ۲۲
فصل دوم: تولید لاین‌های ممکن ثانویه جدید و مقاوم به شوری تریتی‌پایرم و مطالعات مزرعه‌ای.... ۲۳
۲-۱ مقدمه..... ۲۳
۲-۲ اصلاح لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه..... ۲۴
۲-۳ مواد و روش‌ها..... ۲۵
۲-۳-۱ مواد گیاهی..... ۲۵
۲-۳-۲ روش کار..... ۲۵
۲-۳-۲-۱ اخته کردن لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم ۲۵
۲-۳-۲-۲ گرده افشانی گل‌های اخته شده لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم..... ۲۵
۲-۴ نتایج و بحث..... ۲۶
فصل سوم: بررسی میزان آنیوپلوئیدی و همولوژی در نتاج F_2 و F_3 ژنوتیپ‌های ممکن ثانویه تریتی-پایرم با روش‌های مرسوم سیتولوژی..... ۲۹

۳-۱ مقدمه..... ۲۹
۳-۱-۱تقسیم میتوز..... ۲۹
۳-۱-۲ تقسیم میوز..... ۳۰
۳-۱-۳ مطالعات کروموزومی..... ۳۱
۳-۱-۳-۱ پیش تیمار..... ۳۲
۳-۱-۳-۲ تثبیت..... ۳۲
۳-۱-۳-۳ هیدرولیز..... ۳۲
۳-۱-۳-۴ رنگ آمیزی..... ۳۳
۳-۱-۳-۵ له کردن..... ۳۳
۳-۲ مواد و روش‌ها..... ۳۳
۳-۲-۱ تهیه نمونه کروموزومی میتوز..... ۳۳
۳-۲-۱-۱ تهیه ریشه‌چه..... ۳۳
۳-۲-۱-۲ پیش تیمار..... ۳۳
۳-۲-۱-۳ تثبیت..... ۳۴
۳-۲-۱-۴ هیدرولیز..... ۳۴
۳-۲-۱-۵ تهیه اسلاید کروموزومی..... ۳۴
۳-۲-۱-۶بررسی‌های میکروسکوپی..... ۳۴
۳-۲-۲ تهیه نمونه کروموزومی میوز..... ۳۴
۳-۲-۲-۱ انتخاب بساک‌های مناسب..... ۳۵
۳-۲-۲-۲ تثبیت بساک‌ها..... ۳۵
۳-۲-۲-۳ تهیه اسلاید نمونه سلول‌های میکروسپور..... ۳۵
۳-۲-۲-۴ محاسبه شاخص همولوژی و تجزیه و تحلیل آماری ۳۶
۳-۳ نتایج و بحث..... ۳۶
فصل چهارم: ردیابی توزیع کروموزوم‌های ژنوم E^b در ژنوتیپ‌های ممکن تریتی‌پایرم ثانویه با تکنیک هیبریداسیون DNA ژنومی در محل ۴۱
۴-۱ مقدمه..... ۴۱
۴-۲ هیبریداسیون DNA در محل..... ۴۱
۴-۲-۱ تهیه اسلاید کروموزومی نمونه‌های هدف ۴۲
۴-۲-۲ تهیه کاوشگر..... ۴۲

۴-۲-۳ بررسی کمی و کیفی کاوشگر..... ۴۴
۴-۲-۴ بررسی‌های میکروسکوپی..... ۴۴
۴-۳ برخی تحقیقات انجام شده کاربرد تکنیک گیش در ردیابی کروموزوم‌ها..... ۴۵
۴-۴ مواد و روش‌ها..... ۴۸
۴-۴-۱ محلول‌های مورد نیاز برای هیبریداسیون DNA در محل..... ۴۸
۴-۴-۱-۱ بافر استخراج DNA ژنومی..... ۴۸
۴-۴-۱-۲ محلول نمکی سیترات سدیم ۲۰X..... ۴۸
۴-۴-۱-۳ محلول ۵۰ درصد دکستران سولفات..... ۴۸
۴-۴-۱-۴ محلول پارافرمالدئید..... ۴۸
۴-۴-۱-۵ محلول بافر پروتئیناز K با ده برابر غلظت محلول پایه..... ۴۸
۴-۴-۱-۶ محلول بافر متوقف کننده فعالیت آنزیم پروتئیناز K با ده برابر غلظت محلول پایه..... ۴۹
۴-۴-۱-۷ بافر شستشو..... ۴۹
۴-۴-۱-۸ محلول مسدود کننده..... ۴۹
۴-۴-۱-۹ آنتی فید محتوی دپی..... ۴۹
۴-۴-۱-۱۰ محلول مسدود کننده برای تعیین کیفیت کاوشگر نشاندار شده با بیوتین ۴۹
۴-۴-۱-۱۱ محلول کانژوگه آلکالین فسفاتاز استرپت آویدین..... ۵۰
۴-۴-۱-۱۲ محلول سوبسترا..... ۵۰
۴-۴-۲ مواد گیاهی..... ۵۰
۴-۴-۳ هیبریداسیون DNA ژنومی در محل..... ۵۰
۴-۴-۳-۱ تهیه اسلاید کروموزومی..... ۵۰
۴-۴-۳-۲ استخراج DNA ژنومی..... ۵۱
۴-۴-۳-۳تهیه کاوشگر..... ۵۱
۴-۴-۳-۴ تعیین کیفیت DNA نشاندار شده..... ۵۲
۴-۴-۳-۵ هیبریداسیون DNA ژنومی در محل روی اسلایدهای سلول‌های میکروسپور ژنوتیپ‌های ممکن تریتی‌پایرم ثانویه به روش مستقیم ۵۳
۴-۴-۳-۶ هیبریداسیون DNA ژنومی در محل به روش غیر مستقیم بر روی سلول‌های متافازی میتوز..... ۵۵
۴-۵ نتایج و بحث..... ۵۸
فصل پنجم: بررسی نواحی ریبوزومی در ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم..... ۶۱

۵-۱ مقدمه..... ۶۱
۵-۲ بررسی‌های انجام شده در ردیابی نواحی ریبوزومی در گیاهان..... ۶۳
۵-۳ مواد و روش‌ها..... ۶۶
۵-۳-۱ محلول‌های مورد نیاز..... ۶۶
۵-۳-۱-۱ محیط کشت LB..... ۶۶
۵-۳-۱-۲ محلول GET..... ۶۶
۵-۳-۱-۳ بافر لیز کننده..... ۶۶
۵-۳-۱-۴ محلول استات پتاسیم..... ۶۶
۵-۳-۲ کشت باکتری..... ۶۷
۵-۳-۳ استخراج پلاسمید..... ۶۷
۵-۳-۴ نشاندار کردن پلاسمید..... ۶۷
۵-۳-۵ تهیه اسلاید..... ۶۸
۵-۳-۶ آزمایش هیبریداسیون DNA در محل..... ۶۸
۵-۴ نتایج و بحث..... ۶۸
پیشنهادها ۷۱
پیوست: شکل‌ها و جداول..... ۷۲
شکل۱-۱ روند صعودی تعداد ارجاعات به روش هیبریداسیون DNA فلورسنت در محل (برگرفته از PubMed)..... ۷۳
شکل ۱-۲ نمای برخی از لاین‌های تریتی‌پایرم..... ۷۳
شکل ۳-۱ وضعیت پلوئیدی در سلول‌های متافازی ژنوتیپ‌های ممکن تریتی‌پایرم ثانویه..... ۷۸
شکل ۳-۲ وضعیت همولوژی در مرحله متافاز سلول‌های مادر گرده ژنوتیپ‌های ممکن تریتی‌پایرم ثانویه..... ۷۹
شکل ۴-۱- مراحل تکنیک هیبریداسیون DNA در محل..... ۸۰
شکل ٤-۲ بررسی کیفیت کاوشگر تهیه شده به روش نشاندار کردن غیر مستقیم با روش رنگ سنجی..... ۸۰
شکل ٤-۳ ردیابی محل‌های دورگه شدن DNA کاوشگر با DNA هدف با فلوروکروم‌های FITC و PI پس از تابش نور فلورسنت..... ۸۱
شکل۴-۴ ارتباط ژنتیکی بین ژنوم‌های A، B، D، E و St..... ۸۱
شکل ۴-۵ ژل آگارز DNA استخراج شده از گونه سودورجینریا استیپی‌فولیا به روش دلاپورتا.... ۸۲

شکل ۴-۶ بررسی طول قطعات DNA مسدود کننده (گندم بهاره چینی).....۸۲
شکل ۴-۷ تعیین کیفیت کاوشگر ژنوم سودورجینریا استیپی فولیا نشاندار شده با بیوتین به روش رنگ سنجی.....۸۳
شکل ۴-۸ آزمایش گیش با کاربرد کاوشگر تینوپایرم بسارابیکوم نشاندار شده به روش مستقیم روی سلول متافازی میوز ژنوتیپ ممکن تریتی‌پایرم ثانویه.....۸۳
شکل۴- ۹ آزمایش گیش با کاوشگر سودورجینریا استیپی فولیا نشاندار شده با بیوتین روی ژنوتیپ ممکن تریتی‌پایرم ثانویه.....۸٤
شکل۴-۱۰ آزمایش گیش با کاوشگر سودورجینریا استیپی فولیا نشاندار شده با بیوتین روی ژنوتیپ ممکن تریتی‌پایرم ثانویه.....۸۵
شکل۵-۱ ژل آگارز پلاسمید PTa71.....۸٦
شکل ۵-۲ تعیین کیفیت کاوشگر PTa71 نشاندار شده با بیوتین با روش رنگ سنجی.....۸۶
شکل۵-۳ تعیین نواحی ریبوزومی۴۵srDNA در لاین ترکیبی تریتی‌پایرم اولیه.....۸۷
شکل۵-٤ تعیین نواحی ریبوزومی۴۵srDNA در لاین ترکیبی تریتی‌پایرم اولیه.....۸۷
شکل۵-۵ تعیین نواحی ریبوزومی۴۵srDNA درژنوتیپ ممکن تریتی‌پایرم ثانویه.....۸۸
جدول۱-۱ نوع و تعداد نشانگرهای شناسایی شده در هر یک از ۵ جفت کروموزوم گونه علف شور ساحل.....۷۴
جدول۱-۲ انواع لاین‌های هگزاپلوئید تریتی پایرم اولیه.....۷٤
جدول۲-۱نتاج F_1 حاصل از تلاقیلاین‌های اولیه تریتی پایرم با ارقام گندم نان ۸۶.....۷۵
جدول۲-۲ میانگین صفات مورفولوژی گیاهان F_1.....۷۶
جدول ۳-۱وضعیت آنیو پلوئیدی در نتاج F_2 و F_3 ژنوتیپ های ممکن تریتی پایرم ثانویه.....۷۷
جدول۳-۲ میزان همولوژی در ژنوتیپ‌های ممکن تریتی پایرم ثانویه در نسل‌های در حال تفرق F_2 و F_3.....۷۷
جدول۳-۳ آزمون تجزیه واریانس بررسی میزان همولوژی در نتاج F_2 وF_3 ژنوتیپ‌های ممکن تریتی پایرم ثانویه.....۷۷
جدول ۴-۱ تعداد کروموزوم‌های ژنومE^b در ژنوتیپ‌های ممکن ثانویه تریتی پایرم.....۸۳
منابع

فصل اول

کلیات و بررسی منابع

۱-۱- مقدمه

واژه کروموزوم به معنای جسم رنگ‌پذیر است که توسط والدیر[1] مطرح شد (شواریتزر[2]، ۲۰۰۳). کروموزوم‌ها ارگانل‌هایی هستند که ژن‌ها روی آن‌ها قرار دارند و سیتوژنتیک علمی است که روی ساختار و رفتارکروموزوم‌ها بحث می‌کند (گیل[3] و فرایب[4]، ۱۹۹۸). گیاهان با کروموزوم‌های بزرگ کاربرد زیادی در مطالعات سیتوژنتیکی دارند (پورتاس[5] و نارنج[6]، ۲۰۰۸).

در ابتدا کروموزوم‌ها براساس خصوصیاتی همچون اندازه، محل سانترومر، محل نواحی سازمان دهنده هستکی[7] با کاربرد تکنیک‌های رنگ‌آمیزی فولگن وکارمن بررسی می‌شدند. تکنیک بندینگ بررسی و تعیین نواحی هترو و یوکروماتین را مقدور ساخت (شواریتزر، ۲۰۰۰). هر چند با تکنیک بندینگ امکان بررسی‌های بیشتر فراهم شد اما برخی گیاهان دارای کروموزوم‌هایی با نقشه بندینگ مشابه بودند که بررسی آن‌ها با این تکنیک مشکل بود (شوبرت[8] و همکاران، ۲۰۰۱). اگرچه با تکنیک‌های کلاسیک سیتوژنتیک امکان شناسایی تغییرات کروموزومی از جمله کروموزوم‌های دی سانتریک و حلقوی وجود دارد اما ناهنجاری‌هایی مانند حذف و جابجایی را نمی‌توان شناسایی کرد (ناتارجان[9]، ۲۰۰۵). در اواخر قرن بیستم با معرفی روش‌های بندینگ، هیبریداسیون DNA فلورسنت در محل (فیش)[10] و سایر روش‌های مطالعه کروموزوم‌ها، پیشرفت در

1- waldeyer
2- Schwarzacher
3- Gill
4- Friebe
5-puertas
6- naranj
7- Nucleolar Organizer Region (NOR)
8- Schubert
9- Natarajan
10- Flourescent in situ hybridization (FISH)

تکنیک‌های سیتوژنتیکی دیده شد. روش‌های بندینگ در مقایسه با روش‌های رنگ‌آمیزی کلاسیک برتر هستند اما این روش‌ها وقت‌گیرند در حالیکه تکنیک فیش روشی سریع و مطمئن است (گیل و فرایب، ۱۹۹۸).

هیبریداسیونDNA در محل یکی از دستاوردهای مدرن و پیشرفته در زمینه سیتوژنتیک مولکولی است. این تکنیک در اواخر دهه ۱۹۶۰ با کاوشگرهای رادیواکتیو انجام شد. کاوشگرهای رادیواکتیو با نشاندارکردن غیر اختصاصی DNA همچون الحاق تصادفی بازهای رادیواکتیو به سلول‌های در حال رشد تهیه می‌شد. این روش‌های نشاندار کردن کاوشگر اشکالاتی دارد که کاربرد آن‌ها را محدود کرده است از جمله اینکه کاوشگرهای رادیواکتیو ناپایدارند و به مرور زمان فعالیت اختصاصی کاوشگر ثابت نمی‌ماند. دوم، دقت این کاوشگرها به دلیل حساسیت بالای رادیوگرافی پایین می‌آید. سوم، زمان زیادی باید فیلم در معرض این مواد قرار گیرد تا علائم نورانی قابل اندازه‌گیری بر روی آن ظاهر شود. چهارم،کاوشگرهای رادیواکتیو گران قیمت و خطرناک هستند لذا کاوشگرهای فلورسنت جایگزین این کاوشگرها شدند (لوسکی[1] و سینگر[2]، ۲۰۰۳).

تکنیک فیش باعث انتقال از سیتوژنتیک کلاسیک به مدرن شد. این تکنیک سهم مهمی در سیتوژنتیک مولکولی داشته است (جیانگ[3] و گیل، ۲۰۰۶). سیتوژنتیک مولکولی و روش‌های هیبریداسیون DNA در محل، تحول عظیمی در درک بشر از ساختمان، عمل، تشکیلات و تکامل ژن‌ها و ژنوم به وجود آورده و امکان ارتباط بین اطلاعات مولکولی DNA با اطلاعات کروموزومی و تظاهر ژن‌ها در سطح بافت، سلول و اجزا سلولی را فراهم کرده است (شواریتزر، ۲۰۰۰). پیشرفت در این تکنیک باعث بهبود در تفکیک‌پذیری، سرعت و ایمنی می‌شود و ردیابی همزمان چند هدف، مطالعات کمی و تصویربرداری از سلول زنده را ممکن می‌سازد (لوسکی و سینگر، ۲۰۰۳).

این تکنیک روشی سودمند برای تعیین محل توالی اسیدهای نوکلئیک از نوع DNA یا RNA در سیتوپلاسم، اجزا سلول، کروموزوم‌ها و یا هسته مواد بیولوژیکی است. اساس این روش بر پایه هیبریداسیون کاوشگرهای DNA با کروموزوم‌های تک‌رشته‌ای می‌باشد. تمام کروموزوم‌ها، کروموزوم خاص و یا بازوهای کروموزومی خاصی می‌توانند به عنوان کاوشگر مورد استفاده قرار گیرند (ناتارجان، ۲۰۰۵). با دسته‌بندی کروموزوم‌ها[4] و ریز برشی[5] امکان تهیه کاوشگرهای کروموزوم‌های خاص وجود دارد. ریز برشی ابتدا در کروموزوم‌های پلی‌تن مگس سرکه انجام شد

1- Levsky
2-Singer
3- Jiang
4- Flow sorting
5- microdissection

و سپس در پستانداران برای تهیه کاوشگرهای کروموزوم‌های خاص مورد توجه قرارگرفت (هنینگ[1] و همکاران، ۲۰۰۸). مزایای فراوان تکنیک فیش، کاربرد آن را در علوم گیاهی و جانوری روز به روز افزایش می‌دهد. تعداد ارجاعات به این تکنیک در سال‌های اخیر در حال افزایش بوده است (شکل ۱-۱)، (لوسکی و سینگر، ۲۰۰۳).

۱-۲-کاربردهای سیتوژنتیک مولکولی در گیاهان

فیش تکنیکی است که در سال‌های اخیر پیشرفت‌های زیادی کرده است. هیریداسیون DNA ژنومی در محل (گیش[2]) شکل تغییر یافته فیش است که در آن کل DNA ژنومیک از یک گونه به عنوان کاوشگر در آزمایش هیبریداسیون DNA در محل به کار می‌رود. DNA غیر نشاندار (مسدود کننده) با توالی‌هایی که بین DNA مسدود کننده و DNA کاوشگر مشترکند هیبرید می‌شود و لذا توالی‌های خاص برای هیبرید شدن با کاوشگر باقی می‌مانند (رینا[3] و رانی[4]، ۲۰۰۱). این تکنیک ابزاری قدرتمند برای تعیین ترکیب ژنومی وتعیین روابط بین ژنوم‌ها و نسبت‌های ژنومی، جابجایی‌ها در کروموزوم‌ها و مطالعه منشأ ژنوم درآلوپلوئیدها است. همچنین روشی سودمند برای بررسی تکامل کروموزوم‌ها از لحاظ اندازه، مورفولوژی و تعداد می‌باشد (ژانگ[5] و همکاران، ۲۰۰۸; لی[6] و ژانگ، ۲۰۰۲).

فوکایی[7] و همکاران (۱۹۹۷) با این تکنیک ژنوم‌های A، B، C و D را در ارقام برنج بررسی کردند. مقایسه شدت علائم نورانی فلورسنت بین ژنوم‌های C و D درگونه اریزا لتیفولیا[8] و ژنوم‌های B و C درگونه اریزا مینوتا[9] نشان داد که ژنوم‌های C و D همولوژی بیشتری نسبت به ژنوم C باB دارند. آگاروال[10] و همکاران (۱۹۹۷) همولوژی بین ژنوم‌های A وC را بررسی کردند و نشان دادند که ژنوم C درگونه اریزا آیکینگری[11] در مقایسه با ژنوم c درگونه اریزا افیسینالیس[12] از ژنوم A دورتر است. ژنوم‌های A،B وC در هیبریدهای برنج با تکنیک هیبریداسیون DNA در محل چند رنگ بررسی شدند. ارتباط ژنوم‌های C، D و E برنج را با گیش چند رنگ با کاربرد ژنوم‌گونه‌های اریزا

1- Henning
2 -Genomic in situ hybridization (GISH)
3-Raina
4-Rani
5- zhang
6- Li
7-Fukui
8-Oryza latifolia, (2n=48, CCDD)
9-Oryza Minuta, (2n=48, BBCC)
10-Aggarwal
11-Oryza eichingeri, (2n=24, cc)
12-Oryza officinalism, (2n=24, cc)

افیسینالیس و اریزا استرالینسیس[1] مطالعه و نشان داده شد که ژنوم‌های C وD نسبت به ژنوم‌های E با C یا D تفاوت کمتری دارند (رینا و رانی، ۲۰۰۱). ویزن[2] و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که اندازه ژنوم گونه اریزا افیسینالیس از ژنوم گونه اریزا ساتیوا[3] بزرگتر و کروموزوم‌های آن هم از کروموزوم‌های گونه اریزا ساتیوا بلندتر هستند.

ژنوم‌های A وB در هیبریدهای دو گونه موز اکومیناتا[4] و بالبیزیانا[5] بررسی شده‌اند. مطالعات بیشتری روی ژنوم‌های A، B، S وT موز انجام شد که کروموزوم‌ها فقط با به کار بردن ژنوم T به عنوان کاوشگر، به طور کامل نشاندار شدند اما با کاوشگرهای A، B و S بخش‌هایی با اندازه متفاوت بسته به ژنوم و اندازه آن نشاندار نشده باقی ماندند. این حالت در قهوه[6] وکلم[7] نیز دیده شده است (رینا و رانی، ۲۰۰۱). مطالعات گیش روی تنباکو[8] نشان دادکه این گیاه ژنوم S را از گونه سیلوسترس[9] (هیبرید بین دو گونه تومنتوسیفورمیس[10] وتومنتوزا[11]) و ژنوم T را ازگونه اتوفرا[12] گرفته است. کنتون[13] و همکاران (۱۹۹۳) برای اولین بار جابجایی هموزیگوس بین ژنوم‌های S وT در تنباکو را گزارش کردند. گونه‌های تتراپلوئید سولانوم استولونیفرم[14] و سولانوم جرتینگی[15] با تکنیک گیش بررسی و نتایج نشان داد منشأ ژنوم A در آنها گونه دیپلوئید سولانوم ورکاسوم[16] و منشأ ژنوم B گونه دیپلوئید سولانوم کاردیوفیلوم[17] می‌باشد (پندینن[18] و همکاران، ۲۰۰۸).

تکنیک گیش به طور گسترده‌ای برای مطالعه سازماندهی ژنوم در جنس‌های یولاف[19] به کار می‌رود. با این روش امکان شناسایی ژنوم‌های C و A/D وجود دارد اما امکان تشخیص ژنوم‌های A و

1- Oryza australiensis
2- weizhen
3- Oryza sativa
4-Musa acuminata
5- Musa balbisiana
6-Coffea
7-Brassica
8-Nicotiana tabacum, (2n=4x=48)
9- Nicotiana syluestrs
10-Nicotiana tomentosiformis
11-Nicotiana tomentosa
12-Nicotiana otophora
13-Kenton
14-Solanum stoloniferum
15-Solanum hjertingii
16-Solanum verrucosum
17-Solanum cardiophyllum
18-Pendinen

19- Avena

Dبه دلیل همولوژی زیاد بین این دو ژنوم وجود ندارد. با تکنیک گیش جابجایی‌های متعدد بین ژنومی که درجریان تکامل گونه‌های آلوتتراپلوئید و آلوهگزاپلوئید اتفاق افتاده مورد بررسی قرارگرفته است (رینا و رانی، ۲۰۰۱). لینک[1] وهمکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که ژنوم‌های C^D و D^C از آجیلوچس سیلندریکا[2] شباهت به ژنوم‌های C آجیلوچس کوداتا[3] و D ازآجیلوچس تاوشی[4] دارند. تفاوت بین کروموزوم‌های گندم و لیموس[5] در هیبرید بین این دو گیاه با روش گیش بررسی و مشخص شد که ۶ جفت کروموزوم از لیموس مولیس[6] و ۱۵ جفت کروموزوم از گونه گندم تتراپلوئید در این آلوپلی‌پلوئید وجود دارد. مطالعات نشان داد که یک جایگزینی پایدار در یکی از جفت کروموزوم‌های لیموس با کروموزوم‌های گندم صورت گرفته است که همولوژی بین گندم و لیموس را تأیید می‌کند. مارتین[7] و همکاران (۱۹۹۹) مطالعاتی روی هیبرید حاصل از تریتیکوم تاوشی تتراپلوئید و آگروپیرون کریستاتوم[8] انجام دادند. این گیاه ۲۹ کروموزومی حاوی یک کروموزوم اضافه از تاوشی است. بعدها نشان داده شد که گونه کریستاتوم یک آلوپلی‌پلوئید قطعه-ای است که دارای ژنوم‌های p_1 و p_2 می‌باشد که در سه جابجایی با هم متفاوتند.

رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها با تکنیک فیش برای ایجاد کاریوتیپ و مطالعات فیلوژنتیکی نیز به کار می رود. برای مثال کاوشگرهای چندین DNA تکراری، نقشه‌های هیبریداسیون خاصی روی کروموزوم‌های گندم ایجاد می‌کنند و براساس علائم نورانی بدست آمده کاریوتیپی برای هر گونه ایجاد می‌کند لذا از این تکنیک می‌توان برای تشخیص گونه استفاده کرد (جیانگ و گیل، ۲۰۰۶).

از توالی‌های تکراری و و ساتلیت به منظور بررسی کروموزوم‌ها و ژنوم‌ها در هیبریدهای بین گونه‌ای استفاده می‌شود (دیزل[9] و همکاران، ۲۰۰۲). توالی تکراری ۴۱۱ جفت باز که با تکنیک رپید[10] در ژنوم چاودار شناسایی و Psao5411 نامیده شد همولوگ بخشی از رتروترانسپوزون Ty1 است. این توالی در آمفی‌پلوئید بین گندم و گونه افریکانوم[11] چاودار با تکنیک فیش بررسی شد که همه کروموزوم‌های چاودار در آمفی‌پلوئید، به جز در نواحی انتهایی علائم نورانی (جی‌آ[12] و همکاران، ۲۰۰۹).

1- Linc
2- Aegilops cylindrica, (2n=4x=28, $C^DC^DD^CD^C$)
3- Aegilops caudata
4- Aegilops tauschii
5- Leymus
6- Leymus mollis, (2n=4x=28, NNXX)
7- Martin
8- Agropiron cristatum
9- Desel
10- RAPD
11- Secale africanum
12- Jia

DNA حاوی ماهواره کاوشگری مناسب به منظور مطالعه ژنوم‌های بین گونه‌ای است. ماهواره معمولاً محدود به نواحی سانترومری، ساب تلومری است یا فقط روی یک سری از کروموزوم‌های ژنوم وجود دارد لذا کاربرد آن در تعیین کروماتین بیگانه مانند جابجایی‌های انتهایی محدودیت‌هایی ایجاد می‌کند. از این کاوشگر برای بررسی کروموزوم‌ها در هیبریدها استفاده می‌شود. PBV1 دارای توالی ماهواره شامل ناحیه‌ای ۳۰۰۰ کیلو بازی در ناحیه سانترومری در گونه بتا ولگاریس است. این توالی به عنوان کاوشگر در آزمایش گیش در آمفی‌پلوئید بین گونه‌های بتا ولگاریس و بتا کرولیفلورا[1] بکار رفت که همه کروموزوم‌های آمفی‌پلوئید علائم نورانی دادند. توالی ماهواره ویژه بتا کرولیفلورا همراه با PBV1 در آزمایش‌های فیش بکار رفت. توالی PTS1 توالی ویژه ماهواره از چغندر وحشی پروکامبنت[2] است که در تعیین کروموزوم‌های این گونه در لاین‌های دارای کروموزوم اضافی یا منوزومیک به کار می‌رود (دیزل و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۳- اهمیت اصلاح گندم

گندم از خانواده گرامینه[3]، طایفه تریتیسه[4] و جنس تریتیکوم[5] است. جنس تریتیکوم شامل دو گونه دیپلوئید (اورارتا[6] و منوکوکوم[7])، دو گونه تتراپلوئید (تورجیدوم[8] و تیموفیوی[9]) و دو گونه هگزاپلوئید (استیوم[10] و زوکوفسکی[11]) می‌باشد که برخی از این گونه‌ها، زیر گونه‌هایی را شامل می‌شوند (ویلسون[12]، ۲۰۰۲). در طی تکامل گندم، گونه‌های وحشی با هم تلاقی و گونه‌هایی با پلوئیدی متفاوت ایجاد شده‌اند. گونه‌های مدرن شامل گندم نان و دوروم (از زیرگونه‌های تریتیکوم تورجیدوم) هستند. گندم نان[13] از مهمترین غلات و از جنس تریتیکوم و گونه استیوم است که دارای سه ژنوم A، B و D می‌باشد (گوپتا[14] و همکاران، ۲۰۰۸). این غله آلوهگزاپلوئید کمپلکسی از تریتیکوم و آجیلوپس[15] است. بررسی‌ها نشان داده که گونه تریتیکوم اورارتا منشأ ژنوم A و

1- Beta corolliflora
2- Beta procumbentes
3-Gramineae
4-Triticeae
5-Ttriticum
6 Ttriticum urartu, (2n=2x=14, A^uA^u)
7-Ttriticum monococcum, (2n=2x=14, AA)
8-Ttriticum turgidum, (2n=4x=28, AABB)
9-Ttriticum timopheevii, (2N=4X=28, AAGG)
10-Aestivum
11-zhukovskyi
12- Wilson
13-Ttriticum aestivum, (2n=6x=42)
14- Gupta
15-Aegilos

آجیلوپس تاوشی[1] منشأ ژنوم D می‌باشد. اگر چه در بسیاری از منابع آجیلوپس اسپلتوئیدس[2] به عنوان منشأ ژنوم B گندم نان معرفی شده است ولی در مورد منشأ ژنوم B اطلاعات قطعی در دست نیست (کولمر و همکاران، ۲۰۰۶ ; گوپتا و همکاران، ۲۰۰۸).

گندم از غلات مهم جهان و اصلی‌ترین غذا در بسیاری از کشورها است و عملکرد آن به عوامل مختلفی از جمله شرایط آب و هوایی و مقاومت به استرس‌های زیستی و غیر زیستی بستگی دارد. تولید سالیانه گندم در دنیا در سال ۲۰۰۹ بیش از ۶۷۴ میلیون تن بوده است. اطلاعات مرکز سیمیت بیان کننده این است که ۱۰- ۸ درصد زمین‌های زیر کشت گندم در هند، پاکستان، ایران، لیبی و مکزیک تحت تأثیر شوری هستند لذا افزایش مقاومت به شوری در گندم ضروری به نظر می‌رسد (کولمر و همکاران، ۲۰۰۶ ; تیونا[3] و همکاران، ۲۰۰۸).

وسعت اراضی شور ۱۴/۲درصد کل اراضی ایران می‌باشد. اگر چه گندم بطور نسبی به شوری مقاوم است اما قابل کشت در همه مناطق نیست. پتانسیل تنوع ژنتیکی مقاومت به شوری در ارقام اصلاح شده و بومی خانواده گندم در ایران و سایر نقاط دنیا و امکان اصلاح ارقام مقاوم به این تنش گزارش شده است (شاهسوند حسنی، ۱۳۷۹). با توجه به اینکه مقاومت به شوری صفتی کمی است و ژن‌های زیادی آن را کنترل می‌کنند لذا به نظر می‌رسد، دورگ‌گیری با خویشاوندان وحشی یا بعبارتی تلاقی‌های دور، امکان انتقال این صفت پیچیده را فراهم کند (فلاور[4]، ۲۰۰۵).

از بین گونه‌های زراعی بیشترین تلاقی‌ها در گندم زراعی انجام گرفته است. ام. سی. فادن[5] (۱۹۳۰) برای اولین بار از گونه‌های خویشاوند گندم، ژن مقاومت به زنگ سیاه را از گونه تریتیکوم دیکوکوئیدس[6] به گندم هگزاپلوئید زراعی انتقال و رقم گندم hope را تولید کرد. از آن به بعد تمامی گونه‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید گندم به طور موفقیت‌آمیزی با هم تلاقی داده شدند(گودمن[7] و همکاران، ۱۹۸۷).

۱-۴- شوری

تنش نتیجه روند غیر عادی فرآیندهای فیزیولوژیکی است که از تاثیر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی حاصل می‌شود. تنش‌ها به دو دسته زیستی و غیر زیستی تقسیم می‌شوند (میبدی و قره‌یاضی،

1- Aegilos Tauschii, (2n=2x=14, DD)
2-Aegilos speltoides, (2n=2x=14, SS)
3-Tuna
4- Flowers
5- M.C Fadden
6- Triticum dicoccoides
7- Goodman

۱۳۸۱). شوری خاک یکی از مهمترین تنش‌های غیر زیستی است که تولید محصولات کشاورزی را کاهش می‌دهد (یاماگوچی[1] و بلوموالد[2]، ۲۰۰۵). خاک شور بر اثر تجمع املاح محلول مانند یون‌های کلر، سولفات، بیکربنات و گاهی نیترات و بویژه از نوع سدیم و منیزیم و بندرت پتاسیم در خاک غیر شور حاصل می‌شود. این یون‌ها در بروز شوری سهیم هستند. از این میان کلریدها مانند نمک طعام و سولفات‌ها نظیر سولفات سدیم به علت حلالیت زیاد نقش مهمی را در ایجاد خسارت در گیاه ایفا می‌کنند. چنانچه مقدار هدایت الکتریکی عصاره اشباع محلول خاک از چهار دسی زیمنس بیشتر باشد آن خاک را شور گویند. گیاهان برحسب واکنش به شوری به دو دسته هالوفیت و گلیکوفیت تقسیم‌بندی می‌شوندکه هالوفیت‌ها اختیاری و یا اجباری‌اند. هالوفیت‌های اختیاری در محیط شور رشد می‌کنند اما در محیط غیر شور رشد خیلی خوبی دارند اما هالوفیت‌های اجباری فقط در محیط‌های شور رشد می‌کنند (میبدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱).

۱-۵- اساس مقاومت به شوری

ساز و کار تحمل به شوری از طریق تنظیم نمک یا تحمل نمک به اشکال مختلف در گیاهان مختلف گزارش و در بسیاری از گونه‌های زراعی و مرتعی مشاهده شده است.

گیاهان ممکن است با یک یا مجموعه‌ای از روش‌های زیر نسبت به محیط شور، مقاومت نشان دهند (میبدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱).

۱- تأخیر در جوانه زدن و بلوغ در شرایط شوری با ایجاد شرایط مطلوب رشد

۲- گسترش ریشه در نواحی غیرشور خاک و فرار ریشه از محیط شور

۳- تفاوت قدرت گیاه در جذب یا دفع نمک از طریق تنظیم نمک و یا تحمل نمک و فائق آمدن سلول‌های گیاهی بر غلظت‌های بالای یونی

تنظیم نمک شامل ایجاد موانع انتقال نمک در ریشه یا ساقه، حذف یا ترشح از سطح ساقه و ریشه و یا دفع نمک از طریق غده‌های ویژه و یا حباب‌های نمکی و یا ریزش برخی از قسمت های گیاه و همچنین اعمال ساز وکار رقیق‌سازی می‌باشد. در طی این سازوکار گیاهان، همزمان با رشد مقدار زیادی آب توسط گیاه جذب و در نتیجه غلظت نمک در حد مشخصی نگه داشته می‌شود به این عمل رقیق‌سازی[3] شیره سلولی همزمان با رشد اطلاق می‌شود (میبدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱).

1- Yamaguchi
2- Blumwald
3- Dilution

ایجاد بخش‌هایی ویژه مانند غده‌های ذخیره نمک و تجزیه نمک به صورت املاح غیر مضر برای رشد گیاه و هدایت املاح از قسمت‌های حساس و در حال رشد گیاه به سمت برگ‌های مسن و پیر گیاه و تجمع املاح در این قسمت‌ها بخشی از ساز وکار تنظیم نمک در گیاه قلمداد می‌شود. تحمل نمک در حقیقت فائق آمدن سلول‌های گیاه بر غلظت‌های بالای یونی در شرایط شوری می‌باشد. طی این سازوکار اثرات شوری از طریق ذخیره یون‌های غیر آلی خاص با غلظت بالا و تنظیم پتانسیل اسمزی درون بافت‌ها توسط گیاه تحمل می‌شود. اثرات یک یون خاص روی مقدار یون‌های مشکل‌ساز برای سیتوپلاسم در تحمل برخی گیاهان مؤثر است. علاوه بر این دو ساز وکاردر هر دو گروه گیاهان تنظیم‌کننده نمک و تحمل‌کنندگان شوری ساز وکار مهم تجمع نمک در واکوئل نقش مهمی در جلوگیری از اثرات سوء نمک روی متابولیسم گیاهی دارد. مطالعات مولکولی روی تعدادی از واریته‌های مختلف در شرایط تنش نشان داده است که دستجات ژنی معینی در این واریته‌ها در بروز پروتئین‌های مشابهی مثل دی‌هایدرین‌ها و پروتئین‌های پاسخ دهنده به پیام اسید آبسیسیک نقش دارند. یک جنبه مهم از مقاومت به شوری در گیاهان نگهداری غلظت پایین یون سدیم سمی (Na^+) در سیتوزول است. اگر چه یون سدیم در برخی گیاهان نیاز است امادر هالوفیت-ها غلظت‌های بالای کلرید سدیم سمی است و بر رشد سلول اثر دارد. تغییر نسبت یون‌ها در گیاهان جریان یون سدیم را از طریق مسیرهایی که در کسب یون پتاسیم عمل می‌کند کاهش می‌دهد (میبدی و قره‌یاضی، ۱۳۸۱).

۱-۶- انتقال ژن‌های مفید از گونه‌های وحشی به گندم

باتوجه به تنوع ژنتیکی سرشاری که در گونه‌های وحشی برای صفات مختلف وجود دارد نقش آنها در این خصوص از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گونه‌های وحشی و خویشاوندان محصولات زراعی سازگاری وسیعی به شرایط آب و هوایی مختلف داشته و حامل ژن‌های بسیار مفیدی هستند (جیانگ و همکاران، ۱۹۹۴).

مراحل مهمی در انتقال ژن‌های بیگانه به گیاهان زراعی وجود دارد. اولین مرحله شناسایی ژنوتیپ-های موجود در هر گونه است که حامل ژن‌های مفید هستند. ارزیابی دقیق در این مرحله موفقیت-های مراحل بعد را تضمین می‌کند. مراحل بعد شامل تلاقی و گزینش گیاهان براساس معیارهای مورد نظر می‌باشد. انتقال ژن در این مراحل به موارد متعددی از جمله سهولت تلاقی بین گونه وحشی و گونه زراعی، میزان قرابت ژنتیکی و ژنومی آنها، میزان نوترکیبی بین کروموزوم های دو