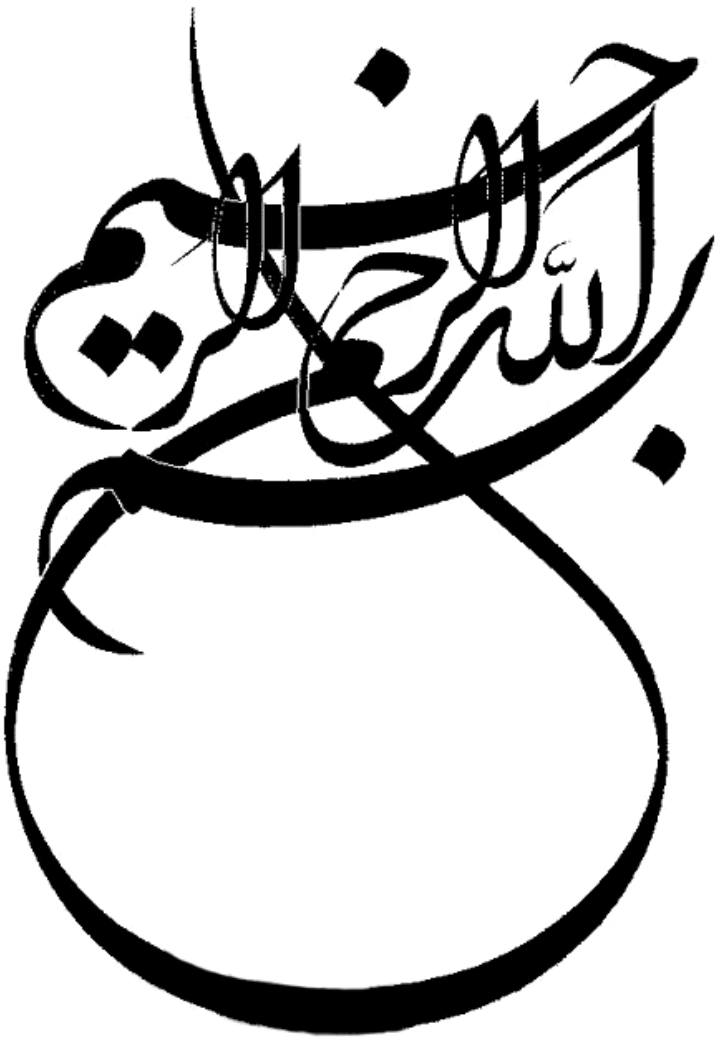
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح‌نباتات

پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح‌نباتات

عنوان

مطالعه ویژگی‌های کاریولوژیکی و تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای گونه *Aegilops biuncialis*

استاد راهنما

دکتر رسول اصغری‌زکریا

استاد مشاور

دکتر حسین شهبازی

محقق

فاطمه احمدپور

اردیبهشت 1390

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

فصل اول- مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

1-1- مقدمه 1

2-1- جنس آژیلوپس 2

1-2-1-گونه *Aegilops biuncialis* 3

3-1- روابط ژنومی در جنس آژیلوپس 5

4-1- اهمیت گونه های آژیلوپس در اصلاح گندم 7

5-1- سیتوژنتیک 9

1-5-1- اهمیت سیتوژنتیک در اصلاح نباتات 10

2-5-1- مطالعات کروموزومی 11

1-2-5-1- کاریوتیپ 11

2-2-5-1- تقارن کاریوتیپ و پارامترهای سنجش آن 12

3-2-5-1- فنون نواربندی کروموزوم 14

4-2-5-1- هتروموفیسم نوارها و اندازه‌گیری هتروموفیسم 18

3-5-1- مطالعات سیتوژنتیکی در گونه *Aegilops biuncialis* 19

6-1- الکتروفورز 23

1-6-1- پروتئین‌های ذخیره ای بذر 24

1-1-6-1- گلیادین 26

2-1-6-1-رابطه‌ی بین کیفیت گلوتن و باندهای گلیادین 27

3-1-6-1- اهمیت مطالعه اجزاء گلیادین‌ها 27

2-6-1 A-PAGE 28

3-6-1- مطالعات الکتروفورزی در *Aegilops biuncialis* 29

اهداف تحقیق 30

فصل دوم- مواد و روش‌ها

2-1- مواد گیاهی 31

2-2- بررسی‌های سیتوژنتیکی 32

2-2-1- بررسی کاریولوژیکی کروموزوم‌ها 32

2-2-2- نواربندی C- 33

2-2-3- اندازه‌گیری صفات کروموزومی 33

2-3- الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر 34

2-3-1- مراحل انجام الکتروفورز A-PAGE 34

2-3-1-1- استخراج پروتئین‌ها 34

2-3-1-2- بافر استخراج 32

2-3-1-3- بافرالکترود 34

2-3-1-4-محلول ژل 34

2-3-2-5- انجام الکتروفورز 35

2-3-2-6- محلول رنگ‌آمیزی 35

2-3-2- روش‌های آماری 36

فصل سوم- نتایج و بحث

3-1- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت‌های گونه *Aegilops biuncialis* 37

3-1-1- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 1 37

3-1-2- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 2 38

3-1-3- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 3 38

3-1-4- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 4 39

3-1-5- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 5 39

3-1-6- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 6 39

3-1-7- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 7 40

3-1-8- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 8 40

3-1-9- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 9 41

3-1-10- بررسی سیتوژنتیکی جمعیت 10 41

3-1-11- وضعیت تقارن کاریوتیپ در جمعیت‌های مورد مطالعه 63

3-2- بررسی الگوی نواربندی C در جمعیت‌های گونه *Aegilops biuncialis* 68
3-3- A-PAGE 78
3-4- نتیجه‌گیری کلی 88
3-5- پیشنهادات 90

منابع مورد استفاده

منابع 91

نام خانوادگی دانشجو: احمدپور **نام:** فاطمه

عنوان: مطالعه ویژگی‌های کاریولوژیکی و تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای گونه *Aegilops biuncialis*

استاد راهنما: دکتر رسول اصغری‌زکریا **اساتید مشاور:** دکتر حسین شهبازی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** اصلاح نباتات **گرایش:** اصلاح نباتات

دانشگاه: محقق اردبیلی **تاریخ فارغ التحصیلی:** 90/2/24 **تعداد صفحه:** 106

واژه‌های کلیدی: *Aegilops biuncialis*، کاریوتیپ، نواربندیC، A-PAGE، تنوع ژنتیکی و چندشکلی.

چکیده:

این تحقیق به منظور مطالعه ویژگی‌های کاریولوژیکی و الگوی نواربندی C کروموزوم‌های چند جمعیت از گونه *Ae. biuncialis* و ارزیابی تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای آن به روش الکتروفورز A-PAGE انجام گرفت. کاریوگرام هر جمعیت، حداقل در 12 فرد با استفاده از رنگ‌آمیزی استو-فریک-هماتوکسیلین تهیه و ویژگی‌های کروموزومی شامل طول بازوی کوچک و بزرگ، طول کروموزوم، شاخص نسبت بازو و طول نسبی آن تعیین گردیدند. همچنین الگوی نواربندی و تعداد نوارهای C در هر یک از بازوهای کروموزومی در حداقل 5 بوته مختلف از هر جمعیت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مجموعه کروموزومی این گونه 6 جفت کروموزوم متاسانتریک، 6 جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک و 2 جفت کروموزوم ساب‌تلوسانتریک وجود دارد که سه جفت کروموزوم آن دارای فرورفتگی ثانویه و ماهواره بود (کروموزوم‌های 1، 8 و12). از نظر طول نسبی در همه کروموزوم‌ها به‌جز در کروموزوم‌های 10 و 13 و از نظر شاخص نسبت بازو در کروموزوم‌های 2، 3، 4، 8، 9 و 11 بین جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. همچنین چندشکلی (هترومورفیسم) قابل ملاحظه‌ای در وجود یا عدم وجود برخی از نوارهای C در بین جمعیت‌های مختلف وجود داشت. با این حال، هر یک از کروموزوم‌ها دارای نوارهای C منومورفی بودند که به شناسایی آنها کمک نمود. الکتروفورز گلیادین‌ها در جمعیت‌های *Ae. biuncialis*، آن‌ها را به زیرواحدهای ω، γ، β و α تفکیک نمود. بیشترین میزان تنوع در بین جمعیت‌ها، مربوط به نوارهای ناحیه ω بود. در تجزیه خوشه‌ای، 13 جمعیت از گونه *Ae. biuncialis* در 3 گروه مجزا قرار گرفتند و گروه‌بندی آن‌ها از فاصله جغرافیایی جمعیت‌ها تبعیت می‌کرد. جمعیت مرند و دو جمعیت از شبستر با داشتن فراوانی بالا برای نوار مرتبط با کیفیت بالای گلوتن (γ-45)، از کیفیت نانوایی بالایی برخوردار بودند. همچنین با توجه به فراوانی بالای نوارهای γ-45 و γ-43/5 که به کیفیت بالای گلوتن مرتبط می‌شوند، و نیز به‌دلیل عدم وجود نوار γ-42 و γ-40 (شاخص کیفیت پائین) در کل جمعیت‌ها، می‌توان از این گونه در برنامه‌های اصلاحی برای بهبود کیفیت گندم نان استفاده نمود.

فصل اول- مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

1-1- مقدمه

افزایش تصاعدی جمعیت کره خاکی، حیات گونه‌های وحشی را در معرض خطر انقراض قرار داده و ضرورت نیاز به تولید واریته‌های پرمحصول به کمک روش‌های اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی باعث کاهش تنوع واریته‌های بومی در طبیعت شده است (رید و بنت، 1999). گندم از مهمترین منابع غذایی بشر محسوب می‌گردد و تلاش‌های بسیاری در زمینه جمع‌آوری، حفظ و بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی آن صورت می‌گیرد تا در برنامه‌های به‌نژادی و افزایش سطح تولید استفاده شود (هویزینگتون و همکاران، 1999). تنوع و گزینش دو عامل اساسی در برنامه‌های اصلاحی به‌شمار می‌آیند (سینگ، 1990 و فارسی و باقری، 1383). گونه‌های خویشاوند و اجداد وحشی گندم منبع ژنی مفیدی برای ایجاد لاین‌های مقاوم به تنش‌های غیرزیستی (خشکی، سرما، گرما، شوری و علف‌کش‌ها) و تنش‌های زیستی (پاتوژن، پارازیت‌ها) بوده و همچنین منبع ژنتیکی غنی برای صفات مختلف زراعی، عملکرد فتوسنتزی و پروتئین‌های مؤثر در کیفیت آن می‌باشند (نوو، 1998). خاستگاه اجداد وحشی گندم نان، مناطق نیمه خشک آسیای مرکزی و غربی بوده، به همین دلیل به‌خوبی به تنش‌های زنده و غیرزنده و نوسانات اقلیمی سازگار شده و دارای مقاومت در برابر این تنش‌ها هستند و از این نظر از اهمیت ویژه‌ای در اصلاح گندم در مناطقی با سیستم‌های کشاورزی کم‌بازده و کم‌باران برخوردار هستند (والکون، 2001).

مطالعه ترکیب ژنی و تنوع اجداد گندم به دو دلیل مهم است: از دیدگاه تئوری، درک و مشاهده مسیر تکاملی اجداد گندم و از دیدگاه عملی، توانایی استفاده از این منابع ژنتیکی در تولید محصول بیشتر (پاین، 1987). در اصلاح گندم از چهار منبع ژنی استفاده شده است: تنوع درون‌گونه‌ای در گندم نان، گونه‌های متعلق به جنس Triticum، جنس‌های دیگری از طایفه Triticeae به‌ویژه گونه‌های مختلف آژیلوپس و جنس‌های بسیار دور از تیره Poaceae (مرژکو، 1998). گونه‌های مختلف جنس آژیلوپس بخش بزرگی از خزانه ژنی ثانویه گندم را تشکیل می‌دهند که دارای خزانه وسیعی از منابع ژنی مفید، مخصوصاً برای مقاوت به عوامل بیماریزای گیاهی شناخته شده است (والکون و همکاران، 1985).

گونه‌های آژیلوپس قرابت نزدیکی با گندم دارند اما قرار دادن آن در جنس گندم عموماً پذیرفته نشده است (وان‌اسلاجرن، 1994). ژنوم های B و D گندم از گونه‌های آژیلوپس مشتق شده است. بخشنده ژنوم B هنوز مشخص نیست، اما ژنوم گونه *Ae. speltoides* شباهت زیادی به آن دارد. ژنوم D گندم از گونه *Ae. tauschii* (مک فادن و سیرز، 1946) گرفته شده است. آنالیز RFLP تأیید کرده که ژنوم U با ژنوم D گندم هومیولوگ است (ژنگ و همکاران، 1998). ژنوم U اهمیت بیشتری در جنس آژیلوپس دارد به‌طوری‌که 11 تا از 23 گونه آژیلوپس حاوی ژنوم U هستند. ژنوم M نیز در 10 گونه آژیلوپس یافت می‌شود (وان اسلاجرن، 1994). همچنین ژنوم M با ژنوم گندم قرابت دارد. با استفاده از روش RFLP، ناسودا و همکاران (1998) ثابت کردند که قطعه بزرگی از 2ML با گروه 2 بازوهای کوچک گندم هومیولوگ است. سیتوژنتیک مولکولی کروموزوم های U و M جزئیات بیشتری را در مورد گونه های آژیلوپس آشکار ساخته است. گونه *Aegilops biuncialis* از آژیلوپس‌های دارای ژنوم U و M می‌باشد.

با توجه به اینکه گونه‌های آژیلوپس از اجداد وحشی گندم بوده و منبع ژنی مهمی در اصلاح گندم محسوب می‌شوند و نیز با توجه به این‌که تنوع ژنتیکی اولین قدم در اصلاح نباتات محسوب می‌شود به‌گونه‌ای که انتقال ژن‌ها از اجداد وحشی گندم برای تولید واریته‌های مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و بهبود کیفی آن ضروری است، شناسایی ژن‌ها و عوامل مربوطه (صفات، پپتیدها، پروتئین ها، ساختار کروموزومی و...) نیاز اساسی برای این کار محسوب می‌گردد (فارسی و باقری، 1383). به همین دلیل در این پژوهش ویژگی‌های کاریولوژیکی و نیز الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه *Aegilops biuncialis* به‌عنوان یکی از گونه‌های آژیلوپس مورد بررسی قرار گرفته است.

1-2- جنس آژیلوپس

جنس *Aegilops*، به زیرطایفه Triticinae، طایفه Triticeae از تیره Gramineae تعلق دارد. علاوه بر این، جنس‌های *Agropyron*، *Secale*، *Hynaldia* و *Triticum* نیز در این زیر طایفه قرار می‌گیرند (گوپتا و بائوم 1986). جنس Amblyophyrum نیز به آنها اضافه شده است (وان‌اسلاجرن، 1994) که تقریباً در تمام نقاط دنیا، به جز در مناطقی با یخبندان‌های دائمی و برخی از مناطق بیابانی رویش دارد (دوریس، 1971). نزدیک‌ترین جنس‌ها به *Aegilops*، جنس‌های *Amblyopyrum* و *Triticum* می‌باشند که هر سه متعلق به طایفه گندم بوده و گونه‌های آنها قادر به تشکیل هیبرید با یکدیگر می‌باشند.

این جنس شامل گیاهانی است یکساله، دارای برگ‌هایی با پهنک تخت و یا بندرت لوله شده می‌باشند. سنبلچه‌ها به‌طور منفرد واقع در بندهای محور گل‌آذین، به‌صورت دوردیفی، بدون پایک، پهن یا محدب هستند که دارای گل‌های متعددی بوده که 1 تا 3 گل بالایی آن رشدنیافته، ناقص، نازا و باریک‌اند. گل‌های زایای سنبلچه‌ها 2 تا 8 عدد و دوجنسی هستند. پوشه سنبلچه‌ها پهن، دراز، سرنیزه‌ای یا تخم‌مرغی، دارای نوک کند یا تیز و فاقد فرورفتگی، پوشه ضخیم و چرمی، یک ناوی یا در سطح پشتی مدور و پهن، پوشه و پوشینه بیرونی در سطح پشتی مدور، در انتها مقطع و دارای دندانه، دارای چندین رگه واگرا که در انتها بهم نمی‌رسند. گندمه محصور در پوشینه‌ها و چسبیده به آن‌ها، رگه‌های پوشینه بیرونی در انتها غیرمشبک و بدون کرک، زبر و یا دارای کرک‌های بلند ساده یا سیخک‌دار، پوشینه درونی چرمی و محدب، پرچم‌ها 3 عدد و پوشینک‌ها 2 عدد، گوه‌ای شکل است (قهرمان، 1373).

این جنس، شامل 22 گونه (11 گونه دیپلوئید، 10 گونه تتراپلوئید و 2 گونه هگزاپلوئید) می‌باشد که در 4 بخش مختلف Platystachys Eig، Pachystachys، Monoleptathera و Macrathera Eig طبقه‌بندی گردیده‌اند. از تلاقی بین دو جنس *Aegilops* و *Triticum*، هیبرید بین‌جنسی به نام *Aegilotriticum* بوجود آمده است (وان‌اسلاجرن، 1994). گونه‌های مختلف این جنس، جزو دومین و بزرگترین خزانه ژنی گندم محسوب می‌شوند. کلیه گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید موجود در این جنس؛ یکساله و علفی بوده و اغلب خود بارور می‌باشند. البته، گونه‌های دگرباروری نیز در بین آن‌ها وجود دارند که در کارهای اصلاحی از ارزش خاصی برخوردارند (هامر و ماتسک، 1993).

1-2-1-گونه *Aegilops biuncialis*

این گونه متعلق به بخش Macrathera Eig است. همرده این گونه گونه‌های *Ae. columnaris* Zhuk.، *Ae. kotschyii* Boiss.، *Ae. geniculata* Roth.، *Ae. neglecta* Reg. ex Bertol. و *Ae. triuncialis* L. می‌باشند (وان‌اسلاجرن، 1994).

شاخه‌ها راست، در پایه زانویی و به طرف پائین خمیده، به استثنای سنبله‌ها ارتفاع 10 تا 40 سانتی‌متر داشته، شاخ و برگ‌ها تقریباً توزیع متعادل داشته اما در نوک شاخه‌ها با فاصله بیشتری از هم قرار دارند. تیغه‌های برگ تیز و راست، 6-2/5 سانتی متر طول و 0/4-0/2 سانتی متر پهنا دارند. لبه‌های غلاف در قسمت بالا مودار، آرایش سنبله تخم‌مرغی باریک می‌باشد که به‌جز ریشک‌ها 3/5-1/5 سانتی‌متر

طول و 0/3-0/9 سانتی‌متر پهنا دارد. موقع رسیدن غلاف‌ها به‌طور مجزا جدا شده و ممکن است تعدادی از سنبلچه‌های رأس باقی ماند، 3-2 تا از سنبلچه‌ها بارور و 2-1 عقیم است. سنبلچه‌ها چسبیده بهم و یک‌پایه، بیضوی که به‌جز ریشک‌ها 1-0/6 طول و 0/5-0/3 سانتی‌متر پهنا با 5-2 گل کوچک که کمتر از 3-1تای آنها بارور است. گلوم‌ها چرم مانند، بیضوی کشیده، 10-8 میلی‌متر طول دارند. سطح گلوم ناصاف بوده به رنگ سبز مایل به ارغوانی می‌باشد. نوک سرشاخه‌های کناری گلوم به 3-2 ریشک ختم می‌شود اما معمولاً سنبل‌های رأس 3 ریشک دارند. در نوک سرشاخه‌ها طول سنبله‌ها کمتر ولی در قسمت پائین‌تر طول سنبله‌ها افزایش می‌یابد. لمای گل‌ها بارور، 10-8 میلی‌متر طول داشته، تخم‌مرغی-بیضوی باریک و قایقی شکل می‌باشد که 2 یا 3 ریشک ضعیف دارد. ریشک‌ها 4-0/4 سانتی‌متر طول داشته، موقعیت ریشک شبیه به ریشک گلوم‌ها می‌باشد و هر دو قسمت داخلی و بیرونی نوک لما صاف و مخملی می‌باشد. پالئا تخم مرغی-بیضوی باریک، با 2 تیغه تیز که انتهای تیغه‌ها خاردار می‌باشد. گندمه 8-5 میلی‌متر طول داشته جدا و رها از لما و پالئا می‌باشد (وان‌اسلاجرن، 1994).

این گونه در مناطقی با بارندگی متفاوت از 225 تا 800 میلی‌متر و در ارتفاع 0 تا 1750 متر از سطح دریا (وان‌اسلاجرن، 1994) تا مناطق مرتفع مثلاً در اسپانیا (روئیز-فرناندز و همکاران، 1995) یافت می‌شود. این گیاه در کشورهای مدیترانه‌ای، غرب آسیا، جنوب شرقی اروپا و مجاور آسیا (قبرس، بلغارستان، ترکیه) در قسمت جنوب سواحل شبه‌جزیره کریمه، روسیه و اوکراین، همچنین با فراوانی کمتر در دیگر کشورهای مدیترانه‌ای اروپا، شمال افریقا و جنوب فرانسه یافت می‌شود. ترکمنستان و مناطق شمالی ایران نیز ممکن است مناطق رویش این گونه می‌باشد (وان‌اسلاجرن، 1994). در شمال‌غرب اروپا، آلمان، سوئیس و اسکاتلند نیز می‌روید (روتردام و جانسن، 1951). این گونه سازگاری اکولوژی بالایی در بلغارستان نشان داده است (زهریوا و همکاران، 2003).

این گونه در طول زمان طی تقسیم‌بندی محققان مختلف با اسامی متفاوت خوانده شده است (جدول 1-2).

جدول1-2- طبقه بندی گونه *Aegilops biuncialis* در بخش‌های متفاوت

نام محقق	Zhukovsky (1928)	Eig (1929)	Kihara (1959)	Hammer (1980)	Whitcombe (1983)	Kimber & Sears (1984)	van Slageren (1994)
بخش	Polyeides Zhuk.	Pleionathera Eig	Polyeides Zhuk.	Monococcon Dum.	Polyeides Zhuk.	-	Aegilops L.
گونه	*Aegilops biuncialis* Vis.	*Aegilops biuncialis* Vis.	*Aegilops biuncialis* Vis.	*Aegilops lorentii* Hochst.	*Aegilops lorentii* Hochst.	*Triticum macrochaetum* (Shuttl. & Huet) Richter	*Aegilops biuncialis* Vis.

1-3- روابط ژنومی در جنس آژیلوپس

سه ژنوم پایه A، D و U در گروه گندم/آژیلوپس شناخته شده است و تمامی گونه‌های پلی‌پلوئید به سه زیرمجموعه تقسیم شده‌اند. دسته دارای ژنوم D شامل گونه دیپلوئید *Ae.tauschi*i Coss. و پنج گونه پلی‌پلوئید بخش vertebrata و cylindropyron می‌باشد. دسته دارای ژنوم U نیز گونه شامل دیپلوئید *Ae. umbellulata* Zhuk. و هفت گونه پلی‌پلوئید بخش pleionathera یا Polyedes می‌باشد (موریس و سیرز، 1967 و کیمبر و فلدمن، 1987).

گونه‌های پلی‌پلوئید آژیلوپس از ترکیب ژنوم گونه‌های دیپلوئید با یکدیگر بوجود آمده‌اند. در این مسیر تکاملی یکی از ژنوم‌ها ثابت مانده و ژنوم‌های دوم یا سوم دستخوش تغییر شده‌اند. زوهاری و فلدمن (1962) بیان کردند که تلاقی بین تعدادی آمفی‌پلوئید اولیه با یک ژنوم مشترک و محوری[1] باعث حفظ ژنوم مشترک و تغییر در ژنوم‌های دیگر می‌شود. در گونه‌های تتراپلوئید، ژنوم U می‌تواند با ژنوم C (*Ae. triuncialis* L.)، ژنوم S (*Ae. peregrina* و *Ae. kotschyi* Boiss) یا ژنوم‌های M (*Ae. geniculata* Roth.، *Ae .biuncialis* Vis.، *Ae. columnaris* Zhuk. و *Ae. neglecta* Req.) و هگزاپلوئید تتراپلوئیدی تلفیق یابد (لیلیفلد، 1951؛ کیهارا، 1954 و 1963؛ موریس و سیرز، 1967؛ کیمبر و فلدمن، 1987؛ کیمبر و تسونواکی، 1989 و وان‌اسلاجرن، 1994). ژنوم U در تمامی گونه‌های این دسته مشابه با یکدیگر و با گونه والدی دیپلوئید *Ae. umbellulata* است، در صورتی‌که ژنوم‌های دوم در مقایسه با ژنوم U تغییر یافته‌اند (کیهارا، 1954 و 1963؛ چناویریا، 1960؛ کیمبر و ابوبکر، 1981؛ کیمبر و زائو، 1983؛ کیمبر و فلدمن، 1987 و کیمبر و ین، 1989). دامنه تغییرات ژنومی بین گونه‌ها متفاوت است. تغییرات

1 . Pivotal

معنی‌داری در ژنوم‌های والدی در *Ae. columnaris* و *Ae. neglecta* مانع شناسایی منشاء این گونه‌ها شده است (رستا و همکاران، 1996). طبق یک فرضیه جایگزین (زوهاری و فلدمن، 1962 و کیمبر و فلدمن، 1987) سرعت تغییر ژنوم والدی در گونه‌های پلی‌پلوئید متفاوت بوده است. تالبرت و همکاران (1993) اعلام کردند که اجداد دیپلوئید ژنوم M تغییرپذیری بیشتری در گونه‌های تتراپلوئید نشان می‌دهند.

Ae. triuncialis از تلاقی گونه‌های *Ae. umbellulata* با *Ae. caudata* به‌وجود آمده است (کیهارا، 1949 و 1954؛ کیمبر و ین، 1989 و کیمبر و تسونواکی، 1989). الگوی جفت‌شدگی میوزی، آنالیز کاریوتیپ (سنیانینوا-کورچاقینا، 1982؛ کیهارا، 1949 و 1954؛ لیلینفلد، 1951؛ چناویرا، 1960؛ تسونواکی، 1980 و کیمبر و ین، 1989) و تنوع توالی‌های تکراری در ژنوم هسته‌ای (دوبکواسکی و دوراک، 1994) نشان داد که ژنوم‌های این گونه نسبت به ژنوم‌های والدی تغییر یافته است. سه نوع پلاسمون در این گونه شناسایی شده است، اول مطابق با *Ae. umbellulata*، دوم با *Ae. caudata* و سوم *Ae. mutica* (اندو و تسونواکی، 1975 و تسونواکی، 1996). بر پایه آنالیز هیبریدهای بین‌گونه‌ای، واینز و بارنهارت (1992) پیشنهاد کردند که *Ae. umbellulata* والد مادری *Ae .triuncialis* Var. triuncialis و *Ae. caudata* والد مادری *Ae. triuncialis* Var. persica می‌باشد. تفاوت‌های موجود در ساختار کاریوتیپ بین این دو واریته توسط سنیانینوا-کورچاقینا (1932) و چناویریا (1960) گزارش شده است.

گونه *Ae. pergrina* (S^pU^p) از تلاقی گونه‌های دیپلوئید *Ae. umbellulata* با *Ae. longissima* مشتق شده است. در صورتی‌که *Ae. umbellulata* و *Ae. sharonensis* گونه‌های اجدادی دیپلوئید گونه *Ae. kotschyi* (S^kU^k) هستند (بدایوا و همکاران، 2004). *Ae. speltoides* و *Ae. bicornis* از دیگر گونه‌هایی هستند که دارای ژنوم S می‌باشند (کیهارا، 1954). گونه‌های تتراپلوئید *Ae. geniculata* (U^gM^g) و *Ae. biuncialis* (U^bM^b) از اجداد دیپلوئید *Ae. umbellulata* و *Ae. comosa* اشتقاق یافته‌اند (بدایوا و همکاران، 2004).

شباهت‌های موجود در نواربندی C و الگوی FISH[1] کروموزوم‌های دو گونه تتراپلوئید *Ae. columnaris* و *Ae. neglecta* احتمال اشتقاق آنها را از یک جد مشترک نشان می‌دهد. در صورتی‌که تفاوت‌های متمایزکننده بین 3 جفت کروموزوم آن‌ها، واگرایی این گونه‌ها را نشان داد که ممکن است با

1 . Florecance *In Situ* Hybridization (FISH)

نوآرایی کروموزوم‌ها در ارتباط باشد. هیبریداسیون *Ae. umbellulata* با این گونه‌ها در شناسایی منبع ژنوم U می‌تواند مؤثر باشد، اگرچه منبع ژنوم دوم این‌ها ناشناخته مانده است. در ضمن گونه ($C^nX^nN^n$) *Ae. neglecta* تغییرات زیادی نسبت به ژنوم های والدی خود ندارد. از گونه‌های هگزاپلوئید و نیز در جنس آژیلوپس می‌توان به گونه‌های *Ae. crassa* با ژنوم $DDD^2D^2M^{cr}M^{cr}$ (کیهارا و تاناکا، 1970) و *Ae. vavilovii* با ترکیب ژنومی D، M و S اشاره کرد. در ابتدا *Ae. vavilovii* هم‌گروه با *Ae. crassa* قرار داشت اما چناویرایا (1960) آن را در گروه دیگر طبقه‌بندی کرد.

1-4- اهمیت گونه‌های آژیلوپس در اصلاح گندم

مثال‌های متعددی از انتقال موفق ژن‌های حامل مقاومت به عوامل بیماریزا، تنش‌های محیطی و نیز ژن‌های مفید کیفی وجود دارد که از طریق تلاقی‌های دور به داخل ژنوم گندم‌های پلی‌پلوئید انتقال یافته است (گاله و میلر،1987 و اپلز و لاگودا، 1990). *Triticum dicoccoides* به‌عنوان بخشنده ژنوم A و B گندم نان و دوروم شناخته شده است (کیمبر و فلدمن، 1987) و گونه دیپلوئید وحشی، *Ae. tauschii* منشاء ژنوم D گندم نان می‌باشد (کیهارا، 1944).

معمولاً، گونه‌های وحشی اجداد گندم بالاترین میزان تنوع ژنتیکی را در محتوای پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان داده‌اند (نوو و پاین، 1987 و کیافی و همکاران، 1993) که در بهبود کیفیت گندم‌های نان مورد استفاده قرار می‌گیرد. گونه‌های آژیلوپس نه تنها در تکامل گندم بلکه در توسعه تنوع ژنتیکی گندم نان نیز نقش مهمی را ایفا نموده‌اند (فادن و سیرز، 1946). ژن‌های مفید زیادی از گونه‌های آژیلوپس به گندم انتقال یافته و در اصلاح گندم به‌کار رفته‌اند (کوکس و همکاران، 1994؛ ژیل و همکاران 1987؛ رائوپ و همکاران، 1993 و فریبه و همکاران، 1994). گونه‌های آژیلوپس صفات مهمی را از قبیل مقاومت به بیماری‌ها از جمله زنگ‌ها (ژیل و همکاران، 1985 و رائوپ و همکاران، 1993 و 1995) و کیفیت بالای پروتئینی دارا هستند. حدود 200 هیبرید بین گونه‌ای گندم-آژیلوپس در دست است که شامل لاین‌های اضافی[1] و جابجایی[2] می‌باشند و 53 ژن مقاومت به بیماری و زنگ‌ها را دارا

1. Addition lines
2 . Translocation

هستند که از طریق تلاقی گندم با 15 گونه مختلف آژیلوپس به‌دست آمده‌اند (اشنایدر و همکاران، 2008).

ژن‌های مقاومت به سفیدک سطحی[1] *pm* در 33 مکان‌ژنی در گندم نان کشف شده است (لیو و همکاران، 2002؛ سینقرون و همکاران، 2004 و زو و همکاران، 2005). بعضی از آنها در واریته‌های گندم به‌کار برده شده، اما توسط نژادهای جدید پاتوژن این مقاومت شکسته شده است. استفاده از مخلوط کولتیوارها و مدیریت ژن‌ها، ممکن است مقاومت به سفیدک سطحی را افزایش دهد (پرستلی و بایلس، 1998 و حسام و زلر، 2002). بیشتر گونه‌های آژیلوپس بخشنده ژن‌های مقاومت به بیماری‌های مهم گیاهی هستند (وان‌اسلاجرن، 1994؛ والکون و بدو، 2001 و زهریوا و همکاران، 2003). گونه *Ae. geniculata* Roth. یک گونه تتراپلوئید وحشی است و می‌تواند با گندم تلاقی یافته، لاین‌های اضافی، جایگزین و لاین‌های جابجایی ایجاد نماید (فریبه و هیون، 1989؛ فریبه و همکاران، 1996 و مک‌اینتوش و همکاران، 2001) که ژن pm_{29} از این گونه به گندم نان انتقال یافته است (زلر و همکاران، 2002).

الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذور به‌عنوان نشانگر ژن‌های بیگانه در تلاقی برگشتی با گندم مورد استفاده قرار گرفته است. اجزاء گلیادین و گلوتنین به‌عنوان نشانگر برای ژن‌های مقاومت به سفیدک سطحی از *Ae. turcomanica* (واهل و همکاران، 1999)، *Ae. umbellulata* (استویلوا و همکاران، 1999 و اوزگن و همکاران، 2004) و *Ae. tauschii* (پفلوگر و همکاران، 2001) به‌کار برده شده است.

در گونه *Ae. biuncialis*، ژن مقاومت به ویروس زرد کوتولگی جو[2] (ماکوک و همکاران، 1994)، مقاومت به زنگ زرد (دامانیا و پکتی، 1990)، زنگ قهوه‌ای (دیمو و همکاران، 1993)، تنش خشکی (مولنار و همکاران، 2004)، تنش شوری (کولمر و همکاران، 2006) گزارش شده است. لوقوجان و مولنار-لنگ (2000) اولین هیبرید بین *Ae. biuncialis* را با گندم پاییزه لاین MV_9Kr_1 به‌دست آوردند. 5 لاین اضافی دیزومی گندم - *Ae. biuncialis* نیز توسط اشنایدر و همکاران (2005) ایجاد شدند. منابع مقاومت به پشه جوانه‌خوار گندم[3] در گونه‌های آژیلوپس توسط بوهسنی و همکاران (1998) در مراکش شناسایی شد. گونه‌های *Ae. geniculata* Roth.، *Ae. triuncialis* L.، *Ae. neglecta* Req.، *Ae. ventricosa*، *Ae.*

1 . powdery mildew (*Erysiphe graminis*)
2 . Yellow dwarf lateovirus
3 . Hessian fly (*Diptera cecidomiidae*)

cylindrica Host و *Ae. markgrafii* Hammer به این آفت مقاومت نشان دادند. در ضمن بیشترین مقاومت مربوط به *Ae. geniculata Roth.* بوده است. از این منابع می‌توان برای انتقال ژن مقاومت به گندم استفاده کرد. اما در تحقیق انجام یافته توسط بوهسنی و همکاران (1998) ژن مقاومت به این آفت در *Ae. biuncialis* مشاهده نشد. ژن مقاوم به زنگ برگ (Lr_9) در گونه اجدادی *Ae. umbellulata* (سیرز، 1956) وجود دارد و ژن مقاومت به زنگ ساقه (Sr_{34}) (فریبه و همکاران، 1996) همچنین زنگ نواری (Yr_8) روی کروموزوم 2M گونه اجدادی *Ae. comosa* قرار دارد (مک‌اینتوش و همکارن، 1982). به همین دلیل مولنار و مولنار-لنگ (2010) درصدد برآمدند تا با استفاده از تکنیک هیبریداسیون ژنومی درجا (GISH) لاین‌های مونوزومی و دیزومی بین *Ae. biuncialis* و گندم رقم بهاره چینی ایجاد نمودند. رابطه هومیولوگی بین گندم و *Ae. biuncialis* باعث ایجاد نوترکیبی‌های جدید می‌شود. آنالیز جفت‌شدگی کروموزومی هیبرید حاصل با استفاده از پروب‌های نشاندار (اسوارزاچر و همکاران، 1989؛ فریبه و همکاران، 2000؛ مولنار-لنگ و همکاران، 2000؛ بناونته و همکاران، 2001 و مولنار و همکاران، 2005) در لاین‌های اضافی دیزومی گندم-*Ae. biuncialis* برای کروموزوم‌های $2M^b$، $3M^b$، $7M^b$ و $3U^b$ نشان داد که کروموزم‌های $2M^b$ و $3M^b$ یک رابطه هومیولوگی با کروموزوم‌های گروه 2 و 3 گندم دارد و کروموزوم‌های $7M^b$ و $3U^b$ با کروموزوم‌های گندم هومیولوگ هستند. از این میان لاین دیزومی گندم-*Ae. biuncialis* ($2M^b$) بیشترین فراوانی را داشت.

1-5- سیتوژنتیک

سیتوژنتیک، علم کروموزوم‌هاست که شامل مطاله ویژگی‌های میکروسکوپی و مولکولی کروموزوم‌ها و نقش و رفتار آنها طی عمل تقسیم رویشی و زایشی است. سیتوژنتیک در مراحل مختلف و به روش‌های گوناگون، می‌تواند در اصلاح نباتات کاربرد داشته باشد. اصلاح نباتات به‌عنوان یک عملیات دستکاری ژنوتیپ، نیازمند فنون و اطلاعاتی است که علم سیتوژنتیک هر دو را فراهم می‌سازد. بعد از کشف کروموزوم توسط ویلهلم والدیر در سال 1888، تئوری کروموزومی وراثت در اوایل قرن بیستم با تحقیقات بوری، ساتن و مورگان پایه‌گذاری گردید. از آن زمان تاکنون، مطالعات کروموزومی و کاریولوژیکی جایگاه ثابتی را در مطالعات سیستماتیک و تنوع ژنتیکی داشته است (سشنز، 1996). یکی از جنبه‌های این علم، مطالعه ساختار و تعداد کروموزوم‌ها (کاریوتیپ) است که مجموعه کامل کروموزومی در یک سلول را

شامل می‌گردد که بر حسب شکل ظاهری خود در متافاز توصیف می‌شود، (یزدی صمدی و ولیزاده، 1383).

1-5-1- اهمیت سیتوژنتیک در اصلاح نباتات

بررسی‌های کلاسیک و مورفولوژیکی کروموزوم‌های گیاهی از سال 1910 شروع شد. اندازه‌گیری دقیق نسبت بازوها و طول نسبی کروموزوم‌ها، محل قرار گرفتن فرورفتگی‌های اولیه و ثانویه در کروموزوم‌های متافازی سلول‌های مریستمی، می‌تواند در تعیین سطح پلوئیدی و شباهت‌های کروموزومی گونه‌ها، مورد استفاده قرار گیرد (پالمر و همکاران، 1982 و 2003). این اطلاعات را می‌توان در برنامه‌های تلاقی بین‌گونه‌ای به‌منظور انتقال ژن‌های مطلوب و یا ترکیب چند ژن مطلوب در یک گونه، استفاده کرد. دانشمندان سیستماتیک گیاهی معتقدند که بررسی‌های کروموزومی، همراه با پژوهش‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی، جهت تشخیص و ارزیابی روابط خویشاوندی گونه‌های یک جنس بسیار مفیدند (کائو و همکاران، 2001). به همین دلیل مطالعات کروموزومی، در مطالعات سیستماتیک گیاهی و تنوع ژنتیکی نقش مهمی داشته است (پالمر و همکاران 2003). از جمله روش‌های کلاسیک مطالعه کروموزوم‌ها، رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها با استوکارمن، استواورسئین، فولگن و استو– فریک– هماتوکسیلین و غیره که فقط به مطالعه مورفولوژی کروموزوم‌ها می‌پردازد (پالمر و همکاران، 2003 و شوارزاچر، 2000).

اطلاعات سیتوژنتیکی در چند سال گذشته با توجه به برنامه‌های کامپیوتری و آنالیز تصویری مربوط به اندازه‌گیری کروموزوم‌ها و روش‌های نواربندی C و N، پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است. مطالعه تعداد و مورفولوژی کروموزوم‌ها و سطح پلوئیدی در انجام تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و هیبریدهای سوماتیکی حاصل از ادغام سلولی، مهم است (بوچان و حسین، 1998 و 2001). در پژوهش‌های به‌نژادی، انجام بررسی‌های سیتوژنتیکی از قدم‌های اولیه محسوب شده و تلاقی بین گونه‌هایی که از شباهت کروموزومی بیشتری برخوردارند، موفقیت‌آمیزتر است. دانشمندان سیستماتیک گیاهی معتقدند که بررسی‌های کروموزومی همراه با پژوهش‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی، می‌تواند شاخص قابل اعتمادی در ارزیابی روابط خویشاوندی گونه‌های یک جنس باشد (لویس، 1980). علاوه‌بر آن، در تعیین روابط خویشاوندی بین گونه‌های یک جنس، باید اطلاعاتی راجع به مورفولوژی و خصوصیات کاریوتیپی به‌دست آورد. پس از مطالعه کروموزومی و مورفولوژیکی، به‌نژادگر می‌تواند در مورد برنامه تلاقی بین‌گونه‌ای در تولید نتاج بارور و یا انتخاب کروموزوم واجد ژن مورد نظر تصمیم بگیرد (استبینز، 1971). انجام مطالعات سیتوژنتیکی در

گونه‌های گیاهی، بخصوص گیاهان غیر اهلی و بومی، اهمیت زیادی داشته و نقش عمومی در اصلاح گیاهان مختلف زراعی و هم‌چنین نقش‌های اختصاصی مختلفی بر حسب ساختار سیتولوژیکی و نیز اهداف اصلاحی در گونه‌های خاص ایفا می‌کند. نقش سیتوژنتیک عبارتست از فراهم آوردن اطلاعات کمی تاریخچه تکاملی گیاه، بررسی‌های سیتولوژیکی و تعیین مشخصات آن، قرابت و خویشاوندی گونه‌ها. برخی از این اطلاعات جهت دسترسی به اهداف اصلاحی و تعیین استراتژی مناسب و نیز در تنوع ژنتیکی ضروری است. نواربندی C و N نیز برای تشخیص درجه هیبریداسیون و تغییرات و تبادلات کروموزومی انجام گرفته در طی کراسینگ‌اور و شناسایی آنیوپلوئیدی به‌کار می‌رود (بوچان و حسین، 1998 و 2001).

1-5-2- مطالعات کروموزومی

1-2-5-1- کاریوتیپ

ویژگی‌های کروموزومی یک فرد را کاریوتیپ آن می‌گویند. خصوصیاتی که در کاریوتیپ مورد بررسی قرار می‌گیرند شامل اندازه و نوع کروموزوم‌ها با توجه به محل قرارگیری سانترومرها، وجود فرورفتگی ثانویه، تعداد کروموزوم‌های ماهواره‌دار، تفاوت در رنگ‌پذیری آن‌ها (مناطق هتروکرماتینی)، به‌ویژه با استفاده از روش‌های نواربندی کروموزومی و استفاده از شاخص‌های کروموزومی به منظور نمایش تقارن کاریوتیپی می‌باشد. کروموزوم‌های یک سلول در حال تقسیم به سادگی در مرحله متافاز یا پرومتافاز میتوز آنالیز می‌شوند. معمولاً، همه اعضای طبیعی یک گونه، کاریوتیپ مشابهی دارند (ساچان و تانکا، 1976). از این‌رو، کاریوتیپ یک سلول طبیعی در یک فرد طبیعی، نماینده کاریوتیپ آن گونه است. نمایش کاریوتیپ به روش کاریوگرام و ایدیوگرام، علاوه‌بر کمک به شناسایی دقیق‌تر کروموزوم‌های هومولوگ، در مطالعه پلی‌مورفیسم موجود در داخل گونه‌ها و بین گونه‌ها که از انواع تغییرات ساختاری کروموزوم منشاء می‌گیرند، استفاده می‌شود (سینگ، 2003).

1-2-5-2- تقارن کاریوتیپ و پارامترهای سنجش آن

کاریوتیپ بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی کروموزوم‌ها به دو دسته تقسیم می‌شود:

الف: کاریوتیپ متقارن: کاریوتیپی که در آن کروموزوم‌ها تاحدودی هم‌اندازه بوده و متاسانتریک هستند. عقیده بر این است که این نوع کاریوتیپ نسبت به کاریوتیپ نامتقارن از نظر تکاملی ابتدایی‌تر است. در حقیقت در طی فرآیند تکامل، کاریوتیپ به‌سمت عدم تقارن میل می‌کند.

ب: کاریوتیپ نامتقارن: کاریوتیپی است که در آن کروموزوم‌ها بیشتر به صورت آکروسانتریک و تلوسانتریک بوده و شامل دو دسته کروموزوم با اندازه کاملاً متفاوت (به صورت بزرگ و کوچک) می‌باشند. عدم تقارن می‌تواند از طریق تغییر در محل سانترومر از حالت میانی به انتهایی یا تقریباً انتهایی و یا از طریق اختلاف اندازه نسبی مجموعه کروموزوم‌های یک فرد به‌وجود آید (استبینز، 1971).

پارامترهای مختلفی برای سنجش تقارن کاریوتیپی توسط محققان مختلف به‌شرح زیر ارائه شده است:

1- دامنه نسبی طول کروموزوم‌ها:

[طول نسبی حداقل- طول نسبی حداکثر]= اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها

2- شکل کلی کاریوتیپ (TF ě) (جون، 1989):

$$TF\ \check{e} = \frac{\sum_i S_i}{\sum_i (S_i + L_i)} \times 100$$

$\sum_i S_i$: مجموع طول کل بازوهای کوتاه

$\sum_i (S_i + L_i)$: مجموع طول کل کروموزوم‌ها

3- نامتقارنی درون‌کروموزومی (A_1) و نامتقارنی بین‌کروموزومی (A_2):

این روش توسط رومروزارکو (1986) ارائه شد. در این روش برای اندازه‌گیری تقارن کاریوتیپ از روش‌های کمی و آنالیز گرافیکی استفاده شده است. وی دو پارامتر عددی را برای این منظور پیشنهاد کرد که یکی ازآن‌ها نامتقارنی درون‌کروموزومی(A_1) و دیگری نامتقارنی بین‌کروموزمی (A_2) نام گرفت.

A_1 که از صفر تا یک تغییر می‌کند به‌کمک رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_i^n \frac{q_i}{p_i}}{n}$$

q_i: میانگین طول بازوی کوتاه در هر هومولوگ

p_i: میانگین طول بازوی بلند در هر هومولوگ

n: تعداد کروموزوم‌های هومولوگ

A_2: عبارت است از نسبت بین انحراف استاندارد طول کروموزوم و میانگین طول کروموزوم است.

S_{cl} : انحراف استاندارد طول کروموزوم

$$A_2 = \frac{S_{cl}}{X_{cl}}$$

X_{cl} : میانگین طول کروموزوم

4- شاخص تقارن استبینز: متداول‌ترین روش برای تعیین تقارن کاریوتیپ روش استبینز (1971) است. وی دو شاخص را برای تعیین کاریوتیپ مورد استفاده قرار داد: شاخص اول نسبت بین بلندترین کروموزوم به کوتاهترین کروموزوم و شاخص دوم درصد کروموزوم‌هایی است که نسبت بازوی آن‌ها بیش از 2 به 1 است. در جدول 2-1 از چپ به راست و از بالا به پایین کاریوتیپ نامتقارن‌تر می‌شود.

جدول2-1- دسته‌بندی کاریوتیپ براساس میزان تقارن آن (استبینز، 1971)

نسبت بزرگترین کروموزوم به کوچکترین کروموزوم	درصد کروموزوم‌هایی که شاخص نسبت بازوی آن‌ها بیش از 2:1 است			
	0٪	1-50٪	50-99٪	100٪
≤2:1	1A	2A	3A	4A
2:1-4:1	1B	2B	3B	4B
≥4	1C	2C	3C	4C

5- طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (TS) (لونگ و فستر، 1996): طول نسبی کوتاهترین کروموزوم عبارت از نسبت بین طول کوتاهترین کروموزوم به مجموعه طول کروموزوم‌ها به درصد است.

6- شاخص پراکندگی DI (لاوانیا و سریواستاوا، 1992):

$$DI = \frac{CG \times CV}{100} \qquad CV = \frac{S_{cl}}{X_{cl}} \times 100 \qquad CG = \frac{\frac{\sum_i^n S_i}{n}}{\frac{\sum_i^n (S_i + L_i)}{n}}$$

$\sum_i^n S_i$: مجموع طول کل بازوهای کوتاه

$\sum_i^n (S_i + L_i)$: مجموع طول کل کروموزوم‌ها