شاهری
۴۵۲۲ ضایع

بسم الله الرحمن الرحیم

صفحات ۱۲۴ و ۱۳۸ موجود نمی باشد

۱۰۹۹۹۱

۸۷/۱/۱۰ ۸۷۱۴
۸۷/۱۲/۱۳

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی
گروه اصلاح نباتات

رساله دکتری

عنوان:

مطالعه سیتولوژیکی هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم با تریتی‌پایرم به وسیله هیبریداسیون DNA ژنومی در محل

ارائه دهنده:

قادر میرزاقادری

اساتید راهنما:

دکتر قاسم کریم‌زاده

دکتر حسین شاهسوند حسنی

اساتید مشاور:

دکتر مختار جلالی جواران

دکتر امین باقی‌زاده

۱۳۸۸ /۱/ ۱۸

پاییز ۱۳۸۷

۱۰۹۹۹۱

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای قادر میرزاقادری رساله واحدی خود را با عنـوان: **مطالعه سیتولوژیکی هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم با تریتی‌پایرم به وسیله هیبریداسیون DNA ژنومی در محل**، در تاریخ ۱۰/٤ ۸۷ ارائه کردند.

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تاییـد کـرده اسـت و پـذیرش آن را بـرای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر قاسم کریم‌زاده	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر حسین شاهسوند حسنی	استادیار	
۳- استاد مشاور اول	دکتر امین باقی‌زاده	استادیار	
٤- استاد مشاور دوم	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	
٥- استاد ناظر	دکتر سید محمود غفاری	دانشیار	
٦- استاد ناظر	دکتر محمود خسروشاهلی	استاد	
۷- استاد ناظر	دکتر احمد معینی	دانشیار	
۸- استاد ناظر	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحـصیلات تکمیلی	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد/ رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته اصلاح نباتات است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقایان دکتر قاسم کریم زاده و دکتر حسین شاهسوند حسنی و مشاورهٔ جناب آقایان دکتر امین باقی زاده و دکتر مختار جلالی جواران از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ٤ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ٤ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ٦ اینجانب قادر میرزاقادری دانشجوی رشته اصلاح نباتات مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: قادر میرزاقادری

تاریخ و امضاء: ۹۱/۱۸

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه : با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح در مورد نتایج پژوهش های علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرح های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها، رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه و رساله منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه، راسله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این دستورالعمل در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲٥ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

۸۷/۱۱/۱٤

تقدیم به:

پدرم، مادرم و همسرم

تشکر و قدردانی

سپاس خدای بی‌همتا را که فرصتی عطا فرمود تا آغازی را به پایان رسانم. پیداست که انجام این تحقیق جز با عنایت پروردگار، راهنمایی و مشاورت اساتید ارجمند و مساعدت دوستان میسر نگردیده است. لذا بر خود لازم می‌دانم که مراتب تقدیر و امتنان خود را تقدیم این عزیزان نمایم:

در وهله اول از جناب آقایان دکتر قاسم کریم‌زاده و دکتر حسین شاهسوند حسنی اساتید راهنمای بزرگوارم که در تمام مراحل این تحقیق از راهنمائی‌های ایشان بهره‌مند بوده‌ام، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از آقای دکتر مایکل فرانسکی محقق دانشگاه مرداک استرالیا به خاطر آموزش‌های ایشان بر روی روش هیبریداسیون در محل در طول دوره فرصت مطالعاتی، کمال تشکر را دارم.

از اساتید فرزانه دکتر امین باقی‌زاده و دکتر مختار جلالی جواران که مشاوره این رساله را عهده‌دار بوده‌اند کمال تشکر و سپاس را دارم.

جای آن دارد که از اساتید محترم آقایان دکتر سید محمود غفاری، دکتر محمود خسروشاهلی، دکتر احمد معینی و دکتر حمید دهقانی که داوری این رساله را به عهده داشته و نکات ارزنده‌ای را ارائه نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی را داشته باشم.

از کارشناس‌های محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، آقای مهندس ایری و خانم مهندس آزموده و همچنین از همه دوستانی که به نحوی بنده را در طول انجام این تحقیق یاری داده‌اند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

در پایان از خداوند متعال خواهانم بنده را همتی عطا فرماید تا با بهره‌گیری از آموخته‌ها و تجربیاتم، در راه پیشرفت و آبادانی هر چه بیشتر کشورم قدم بردارم.

خلاصه

تریتی‌پایرم[1] اولیه یک آلوهگزاپلوئید مصنوعی جدید است که از تلاقی گندم دوروم[2] با یک گونه مقاوم به شوری به نام تینوپایرم بسارابیکوم[3] و سپس دو برابر کردن کروموزوم‌های هیبرید حاصل به وسیله کلشی‌سین به وجود آمده است. تریتی‌پایرم پتانسیل ظهور به عنوان یک گیاه زراعی جدید مقاوم به شوری را دارد ولی دارای ناپایداری جزئی کروموزومی، دیررسی، شکنندگی محور سنبله، باروری کم و پنجه زنی مستمر می‌باشد. امکان اصلاح مقاومت به شوری گندم نان[4] با جایگزین نمودن برخی کروموزوم‌های ژنوم D آن با کروموزوم های ژنوم E^b (تینوپایرم بسارابیکوم) به عنوان تریتی‌پایرم ثانویه وجود دارد. در تحقیق حاضر برخی از ارقام گندم نان ایرانی (♂) را با لاین‌های مختلف تریتی‌پایرم (♀) اولیه تلاقی داده و نتاج F_1 بدست آمد. از خودگشنی بذور F_1، بذور نسل دوم (F_2) ایجاد شده و عدد کروموزومی گیاهان F_2 تعیین گردید. گیاهان ۴۲ کروموزومی F_2 مورد بررسی میوزی قرار گرفته و نهایتاً ترکیب کروموزومی ۲۵ بذر F_3 با روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل (GISH) بررسی گردید. برخی ناهنجاری‌های میوزی از قبیل پل‌های آنافازی، کروموزوم‌های تأخیری و قطعات کروموزومی یا ریزهسته‌ها در نتاج F_2 مشاهده گردید. روش GISH نشان داد که تعداد کل کروموزوم‌ها و تعداد کروموزوم‌های Eb در بذور F3 به ترتیب بین ۳۹ تا ۴۵ و ۰ تا ۱۰ قرار داشت. تعداد بذور هایپرپلوئید (دارای بیش از ۴۲ کروموزوم) به طور معنی‌داری بیش از بذور هایپوپلوید بودند. الگوی نواربندی کروموزوم‌های گندم، تینوپایرم بسارابیکوم و تریتی‌پایرم اولیه با استفاده از روش نواربندی سی[5] انجام شده و ایدیوگرام کروموزوم‌های ژنوم E^b رسم گردید. کروموزوم‌های ژنوم E^b الگویی متفاوت از کروموزوم‌های گندم نان نشان دادند. کروموزوم‌های ژنوم E^b برخلاف کروموزوم‌های ژنوم D گندم، اغلب دارای باندهای تیره‌ای در انتهای کروموزوم‌ها بوده و نواحی بینابینی بدون باند مشاهده شد. نتایج نواربندی نشان داد که این روش می‌تواند به عنوان یک ابزار مناسب و کم هزینه در بررسی و غربال ژنوتیپ‌های حاصل از تلاقی گندم و تریتی‌پایرم در نسل‌های در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرد. همچنین روش هیبریداسیون DNA فلوروسنت در محل با استفاده از کاوشگر 18S-26S rDNA ، مناطق سازمان‌دهنده هستکی (NORs) را بر روی دو جفت از کروموزوم‌های تینوپایرم بسارابیکوم نشان داد.

---

1 - Tritipyrum (2n=6x=42; AABBE^{b}E^b)
2 - *Triticum turgidum* (2n=4x=28; AABB)
3 - *Thinopyrum bessarabicum (Elytrigia bessarabica* or Synonyme: *Agropyron bessarabicum*; 2n=2x=14; JJ Syn.: E^{b}E^b)
4 - *Triticum aestivum* (2n=6x=42; AABBDD)
5 - Giemsa C-banding

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۱ مقدمه ۱

۲ بررسی منابع ٤

۲-۱ منشاء و تکامل گندم ۵

۲-۲ مهندسی کروموزوم در گندم ٦

۲-۳ تحمل به شوری در گندم ۱۲

۲-۳-۱ ساس فیزیولوژیکی مقاومت به شوری در گراس‌ها ۱۳

۲-۳-۲ نقش خویشاوندان وحشی گندم در اصلاح برای مقاومت به شوری ۱۵

۲-۳-۳ تینوپایرم بسارابیکوم و مقاومت به شوری در گندم ۱۵

۲-۳-۳-۱ تریتی‌پایرم، پلی برای انتقال مقاومت به شوری به گندم ۱٦

۲-٤ تولید لاین‌های دارای کروموزوم‌های اضافی یا جایگزینی ۲۱

۲-٤-۱ آمفی‌پلوئیدهای کامل گندم-تینوپایرم ۲۱

۲-٤-۲ آمفی‌پلوئیدهای جزئی گندم-تینوپایرم ۲۲

۲-۵ پیشینه مطالعات انجام شده بر روی تریتی‌پایرم ۲٦

۲-۵-۱ مطالعات سیتوژنتیکی ۲٦

۲-۵-۲ سازگاری به شرایط آب و هوایی ۲۷

۲-۵-۳ بررسی تنوع فنوتیپی لاین‌های تریتی‌پایرم ۲۸

۲-٦ چاودار و نقش آن در اصلاح گندم ۳۲

۲-۷ مارکرهای مولکولی و شناسایی نوترکیب‌ها ۳۳

۲-۷-۱ نقشه ESTها در کروموزوم‌های هومیولوگ گندم ۳۵

۲-۷-۲ نشانگرهای توالی‌های تکراری ساده ۳۹

۲-۸ مطالعه کاریوتیپ ٤۰

۲-۸-۱ دسته بندی استبینز ٤۱

۲-۸-۲ دسته بندی رومرو-زارکو ٤۱

۲-۸-۳ روش لوان و همکاران ٤۲

۲-۹ نواربندی C در سیتوژنتیک گندم ٤٢

۲-۱۰ هیبریداسیون DNA ژنومی در محل ٤٤

۲-۱۰-۱ مراحل انجام هیبریداسیون DNA فلوروسنت درمحل ٤٦

۲-۱۰-۱-۱ همزمان‌سازی سلول‌های نوک ریشه و تهیه اسلایدها ٤٦

۲-۱۰-۱-۲ نشاندار کردن مستقیم یا غیر مستقیم DNA و تهیه کاوشگر ٤٨

۲-۱۰-۱-۳ انتخاب روش نشاندار کردن DNA ٤٩

۲-۱۰-۱-٤ کیفیت DNA در تهیه کاوشگر ٥١

۲-۱۰-۱-٥ بررسی کمی و کیفی کاوشگرهای نشاندار شده ٥٢

۲-۱۰-۱-٦ نفوذ کاوشگر و دسترسی آن به توالی‌های هدف ٥٣

۲-۱۰-۱-۷ تشخیص با میکروسکوپ فلوروسنت ٥٣

۲-۱۰-۱-۸ شدت در آزمایش هیبریداسیون DNA فلوروسنت در محل ٥٤

۲-۱۰-۱-۹ مسدود کردن توالی‌های تکراری مشترک ٥٥

۳ مواد و روش‌ها ٥٦

۳-۱ مواد گیاهی ٥٦

۳-۲ دورگ‌گیری ٥٧

۳-۳ تهیه محلول‌ها و رنگ‌ها ٦٢

۳-۳-۱ محلول‌های لازم برای بررسی‌های سیتوژنتیکی ٦٢

۳-۳-۱-۱ استو اورسئین ٦٢

۳-۳-۱-۲ استو کارمن ٦٢

۳-۳-۱-۳ معرف فولگن ٦٢

۳-۳-۱-۳-۱ طرز تهیه محلول فولگن ٦٣

۳-۳-۲ محلول‌های لازم برای نواربندی C ٦٣

۳-۳-۲-۱ محلول تثبیت کننده شماره ۱ کارنوی ٦٣

۳-۳-۲-۲ محلول کلشی‌سین ٦٣

۳-۳-۲-۳ محلول پایه گیمسا ٦٤

۳-۳-۲-٤ محلول اسید کلریدریک ۰/۲ N ٦٤

۳-۳-۲-٥ محلول هیدروکسید باریم اشباع شده ٦٥

۳-۳-۲-٦ الکل ٦٥

۳-۳-۲-۷ محلول SSC ×۲ ..... ٦٥

۳-۳-۲-۸ بافر سورنسون ٦٦
۳-۳-۲-۹ محلول رنگ‌آمیزی گیمسا ٦٦
۳-۳-۳ محلول‌های لازم برای هیبریداسیون DNA فلوروسنت در محل ٦٦
۳-۳-۳-۱ محلول ۲×SSC ٦٦
۳-۳-۳-۲ محلول تریس ۱ M ٦٦
۳-۳-۳-۳ محلول‌های اتانل ٦٦
۳-۳-۳-٤ فرمامايد ۹۹/۵٪ (v/v) ٦٧
۳-۳-۳-۵ محلول RNase A ٦٧
۳-۳-۳-٦ محلول مسدود کننده ٦٧
۳-۳-۳-۷ بافر شستشو ٦٧
۳-۳-۳-۸ محلول TBST ٦٧
۳-۳-۳-۹ محلول ۵۰٪ دکستران سولفات ٦٧
۳-۳-۳-۱۰ اسید کلریدریک ۱۰ mM ٦٨
۳-۳-۳-۱۱ هیدروکسید سدیم (NaOH) ٤M ٦٨
۳-۳-۳-۱۲ پپسین ٦٨
۳-۳-۳-۱۳ محلول ۱۰×PBS ٦٨
۳-۳-۳-۱٤ محلول پارافرمالدئید ٦٨
۳-۳-۳-۱۵ بافر برای استخراج DNA ژنومی ٦٨
۳-۳-۳-۱٦ بافر ۱× TE ٦٩
۳-۳-۳-۱۷ محلول R40 ..... ٦٩
۳-۳-۳-۱۸ بافر شکاف-ترجمه ×۱۰، pH ۷/۵ ..... ٦٩
۳-۳-۳-۱۹ محلول آنتی‌فید محتوی پروپیدیم یدید یا دپی ٦٩
۳-۳-۳-۲۰ محلول ۱× Casein ۷۰
۳-٤ همزمان‌سازی سلول‌های مریستم نوک ریشه ۷۰
۳-۵ متوقف کردن سلول‌های نوک ریشه در مرحله متافاز ۷۰
۳-۵-۱ پش تیمار سرمایی ۷۰
۳-۵-۲ پیش تیمار شیمیایی ۷۱
۳-٦ تثبیت نمونه‌ها ۷۱
۳-٦-۱ تثبیت نمونه‌های میتوزی (ریشه‌ها) ۷۱
۳-٦-۲ تثبیت نمونه‌های میوزی (سنبله‌های نارس) ۷۱

۳-۷ آماده سازی مواد ژنتیکی و رنگ‌آمیزی ۷۳
۳-۷-۱ آبکشی با آب مقطر ۷۳
۳-۷-۲ هیدرولیز مواد ژنتیکی برای رنگ آمیزی ۷۳
۳-۷-۳ قطع سریع عملیات هیدرولیز و آبکشی با آب مقطر ۷۳
۳-۷-٤ رنگ آمیزی مواد ژنتیکی ۷۳
۳-۷-٤-۱ رنگ‌آمیزی نمونه‌های میتوزی ۷۳
۳-۷-٤-۲ رنگ‌آمیزی نمونه‌های میوزی ۷٤
۳-۷-٥ له کردن نمونه های مریستم ریشه ۷٤
۳-۷-٦ برداشتن لامل ۷٥
۳-۷-۷ آبگیری و شفاف سازی نمونه‌های میکروسکوپی ۷٥
۳-۷-۸ دائمی کردن لام‌ها ۷٦
۳-۸ بررسی‌های کروموزومی ۷٦
۳-۸-۱ بررسی‌های میتوزی ۷٦
۳-۸-۲ بررسی‌های میوزی ۷۷
۳-۸-۲-۱ محاسبه ارتباط بازویی و فراوانی کیاسما ۷۷
۳-۹ انجام نواربندی C ۷۸
۳-۹-۱ تهیه لام‌ها از مریستم نوک ریشه ۷۸
۳-۹-۲ انجام نواربندی ۷۸
۳-۹-۳ محاسبه پارامترهای کاریوتیپی ۷۹
۳-۱۰ هیبریداسیون DNA ژنومی در محل ۸۰
۳-۱۰-۱ استخراج DNA ژنومی ۸۰
۳-۱۰-۲ تکثیر توالی تکراری موجود در پلاسمیدهای pAWRC.1 و pAW161 ..... ۸۱
۳-۱۰-۳ نشاندار کردن DNA به روش فتولیبلینگ ۸۲
۳-۱۰-٤ نشاندار کردن به روش شکاف-ترجمه ۸۳
۳-۱۰-٥ تعیین غلظت و کیفیت DNA نشاندار شده ۸٤
۳-۱۰-٦ تهیه لام‌ها برای هیبریداسیون درمحل ۸٥
۳-۱۱ هیبریداسیون ۸٦
۳-۱۲ شستشوی لام‌ها و آشکارسازی نمونه‌ها ۸۸

۳-۱۳ نشانگر مولکولی SSR ۸۹
۳-۱۳-۱ استخراج DNA ۸۹
۳-۱۳-۲ آغازگرها ۹۰
۳-۱٤ شرایط PCR ۹۱
٤ نتایج و بحث ۹۳
٤-۱ ارزیابی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم و نتاج حاصل از تلاقی آنها با گندم نان از نظر نیاز به بهاره‌سازی ۹٤
٤-۲ تلاقی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم با ارقام گندم ۹٤
٤-۳ بررسی‌های میتوزی ۱۰۰
٤-٤ بررسی‌های میوزی ۱۰۲
٤-٥ نواربندی C ۱۱۰
٤-٦ بهینه‌سازی روش هیبریداسیون در محل ۱۱۹
٤-۷ شناسایی ارقام گندم ایرانی دارای جابجایی 1RS.1BL ۱۲٥
٤-۸ شناسایی کروموزوم‌های تینوپایرم بساراپیکوم در هیبریدهای حاصل از تلاقی بعضی از گندم‌های نان ایرانی و لاین‌های تریتی‌پایرم ۱۳٥
٤-۹ مارکرهای SSR ۱٤۳
٤-۱۰ نتیجه‌گیری ۱٤٥
٤-۱۱ پیشنهادات ۱٤٦
فهرست منابع ۱٤۸

فهرست اشکال

عنوان | صفحه

شکل ۲-۱. تکامل گندم هگزاپلوئید از اجداد دیپلوئید ٦
شکل ۲-۲. یکی از راهکارهای ایجاد گندم نوترکیب حاوی ژنوم یک گیاه خویشاوند ۱۱
شکل ۲-۳. رشد ریشه‌چه گندم دوروم، گندم معمولی، جو و گونه‌های علف گندمی در غلظت‌های مختلف نمک ۱۳
شکل ۲-٤. علف گندمی تینوپایرم بسارابیکوم که در حضور ۳۵۰ mM نمک طعام توان تکمیل دوره رشد را دارد..... ۱٦
شکل ۲-۵. طرز تشکیل آلوهگزاپلوئید تریتی‌پایرم حاصل از تلاقی گندم تتراپلوئید با گونه تینوپایرم بسارابیکوم..... ۱۷
شکل ۲-٦. نمای برخی از لاین‌های تریتی‌پایرم ۲۰
شکل ۲-۷. دیاگرام تولید لاین‌های مونوسومیک یا دی‌سومیک گندم دارای کروموزوم‌های اضافه از ژنوم E^b ۲۲
شکل ۲-۸. طرز تشکیل لاین‌های گندم دارای کروموزوم‌های جایگزینی از ژنوم E^b ۲٤
شکل ۲-۹. هیبریداسیون DNA ژنومی در محل بر روی کروموزوم‌های متافاز I میوز در یکی از سلول‌های مادر گرده تریتی‌پایرم لاین Kab ۲۷
شکل ۲-۱۰. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر بر روی ۸ ژنوتیپ تریتی‌پایرم بر اساس صفات فنوتیپی ۲۹
شکل ۲-۱۱. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر بر ردی ۱٤ ژنوتیپ تریتی‌پایرم بر اساس صفات فنوتیپی ۲۹
شکل ۲-۱۲. نقشه فیزیکی توافقی کروموزوم‌های هومیولوگ گروه ۵ ..... ۳۸
شکل ۲-۱۳. تعداد ارجاعات به روش هیبریداسیون DNA فلوروسنت در محل ٤۵
شکل ۲-۱٤. مراحل مختلف روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل ٤۹
شکل ۲-۱۵. نشاندار شدن DNA را در روش فتوپروب بیوتین ۵۱
شکل ۲-۱٦. بررسی کیفیت DNA نشاندار شده با مولکول‌های بیوتین توسط واکنش رنگ‌زا. ۵۲
شکل ۲-۱۷. تشخیص و شناسایی فلوروکروم‌های مختلف FITC و PI به وسیله تابش نورهای فلوروسنت..... ۵٤
شکل ۳-۱. خوشه رسیده بعضی از لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه ۵۷
شکل ۳-۲. خلاصه‌ای از تلاقی‌ها و اهم بررسی‌های سیتوژنتیکی انجام شده ۵۸
شکل ۳-۳. روش اخته کردن سنبلچه گندم ۵۹
شکل ۳-٤. چگونگی بیرون آوردن پرچم‌ها از داخل گل گندم ۵۹
شکل ۳-۵. اجزای مختف یکی از گل‌های باز شده در یک سنبلچه. ٦۰
شکل ۳-٦. موقع مناسب تهیه نمونه میوزی که در آن انتهای سنبله تا بیرون آمدن از برگ پرچم حدود ۱cm فاصله دارد. ۷۲
شکل ۳-۷. نمونه سلول‌های خوب بر روی لام در زیر میکروسکوپ..... ۸٦
شکل ٤-۱. تلاقی ارقام گندم و لاین‌های تریتی‌پایرم در در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان..... ۹۵
شکل ٤-۲. بعضی از گیاهان F_2 حاصل از تلاقی گندم نوید و تریتی‌پایرم لاین Azb ۹۷
شکل ٤-۳. نمونه‌ای از سنبله‌های گندم (رقم روشن) تلاقی داده شده با گرده گیاه تریتی‌پایرم لاین Azb. ۹۸
شکل ٤-٤. بذور تشکیل شده بر روی گیاهان F_1 و گیاهان BC1 ..... ۱۰۰
شکل ٤-۵. کروموزوم‌های متافازی میتوزی در سلول‌های مریستمی نوک ریشه گندم، تریتی‌پایرم و یک گیاه F_2 ..... ۱۰۱

شکل ٤-٦. (a) متافاز I میوز در سلول‌های مادر گرده گیاه گندم و تریتی‌پایرم ... ۱۰۳
شکل ٤-٧. رنگ آمیزی کروموزوم‌های متافاز I میوز در گیاهان نسل دوم حاصل از تلاقی گندم نوید با تریتی‌پایرم... ۱۰٤
شکل ٤-٨. آنافاز I تقسیم میوز در سلول‌های مادر گرده در گیاهان F_2 ... ۱۰٦
شکل ٤-٩. وجود قطعات کروموزومی در دانه میکروسپور گیاهان F_2 ... ۱۰۸
شکل ٤-۱۰. کروموزوم‌های متافازی میتوز در سلول نوک ریشه گیاه تینوپایرم بساراپیکوم پس از انجام نواربندی C..... ۱۱۱
شکل ٤-۱۱. کروموزوم‌های متافازی میتوزی در گیاه تریتی‌پایرم لاین Azb پس از انجام نواربندی C ... ۱۱۲
شکل ٤-۱۲. کروموزوم‌های متافازی میتوزی در گیاه تریتی‌پایرم لاین KabCrb... ۱۱۳
شکل ٤-۱۳. کروموزوم‌های متافازی میتوزی در گندم روشن بعد از انجام نواربندی C..... ۱۱۳
شکل ٤-۱٤. کروموزوم‌های متافازی میتوزی در سلول مریستمی نوک ریشه یکی از گیاهان BC1..... ۱۱٤
شکل ٤-۱٥. کروموزوم‌های متافازی میتوزی در گیاه تریتی‌پایرم لاین StbCrb..... ۱۱٤
شکل ٤-۱٦. ایدیوگرام کروموزوم‌های ژنوم E^b..... ۱۱٥
شکل ٤-۱۷. هیبریداسیون در محل بر روی کروموزوم‌های ژنوم E^b با کاوشگر توالی تکراری مناطق NOR ... ۱۱٦
شکل ٤-۱۸. الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز..... ۱۲۰
شکل ٤-۱۹. کارایی نشاندار شدن DNA بر روی غشای نایلونی به روش کالری‌متری..... ۱۲۰
شکل ٤-۲۰. الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز..... ۱۲۱
شکل ٤-۲۱. ۱) DNA نشاندار شده چاودار و پلاسمید نشاندار شده pAWRC1 بر روی ژل آگارز... ۱۲۲
شکل ٤-۲۲. هیبریداسیون DNA ژنومی در محل با استفاده DNA ژنومی چاودار بر روی گندم 6HWRSN..... ۱۲٤
شکل ٤-۲۳. لکه‌گذاری نقطه‌ای برای بررسی کارایی نشاندار شدن DNA حاصل از ٦ واکنش آنزیمی..... ۱۲٦
شکل ٤-۲٤. هیبریداسیون در محل بر روی کروموزوم‌های متافازی گندم اترک با استفاده از کاوشگر چاودار ۱۳۱
شکل ٤-۲٥. ناحیه‌ای از بازوی چاودار در گندم اترک، رسول، فلات، دز که کاوشگر چاودار در آنجا هیبرید نمی‌شود.. ۱۳۲
شکل ٤-۲٦. بررسی ارقام گندم ایرانی برای شناسایی جابجایی 1RS.1BL..... ۱۳٤
شکل ٤-۲۷. هیبریداسیون DNA ژنومی در محل بر روی کروموزوم‌های متافازی برخی از ژنوتیپ‌های F_3..... ۱۳۷
شکل ٤-۲۸.a) کروموزوم‌های متافازی میتوزی در سلول مریستمی ریشه‌چه یکی از گیاهان F_1 ... ۱۳۹
شکل ٤-۲۹. کروموزوم‌های متافازی تریتی‌پایرم لاین KabCrb بعد از هیبریداسیون در محل..... ۱٤۰
شکل ٤-۳۰. الگوی باندی نشانگر SSR بر روی گیاهان گندم و تریتی‌پایرم..... ۱٤٤

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول ۲-۱. فراوانی تشکل‌های میوزی در سلول‌های مادر گرده در چند لاین مختلف تریتی‌پایرم..... ۲۷
جدول ۲-۲. ضرایب عامل و مقادیر میزان اشتراک مربوط به پنج عامل منتخب بعد از چرخش وریماکس..... ۳۰
جدول ۲-۳. ضرایب عامل و میزان اشتراک مربوط به سه عامل منتخب بعد از چرخش وریماکس..... ۳۰
جدول ۲-٤. ضرایی همبستگی ساده بین دسته اول صفات مورد بررسی..... ۳۱
جدول ۲-۵. ضرایی همبستگی ساده بین دسته دوم صفات مورد بررسی..... ۳۲
جدول ۲-٦. دسته‌بندی کروموزوم‌ها به روش استبینز..... ٤۱
جدول ۲-۷. نامگذاری کروموزوم‌های هر کاریوتیپ در روش لوان..... ٤۲
جدول ۳-۱. شرایط PCR با استفاده از پرایمرهای مربوطه برای تکثیر توالی تلومری چاودار..... ۸۲
جدول ۳-۲. مواد لازم برای محلول هیبریداسیون در روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل..... ۸۷
جدول ۳-۳. مشخصات پرایمرهای نشانگرهای SSR مورد استفاده برای بررسی گیاهان والد..... ۹۱
جدول ۳-٤. شرایط PCR برای پرایمرهای مختلف SSR..... ۹۱
جدول ۳-۵. ترکیب و مقادیر مواد مورد استفاده برای هر واکنش PCR:..... ۹۲
جدول ۳-٦. ترکیب و مقدار مواد مورد استفاده برای تهیه یک ژل اکریل‌آمید ۸٪:..... ۹۲
جدول ٤-۱. میانگین صفات مورفولوژیکی والدین و گیاهان F_2 حاصل از تلاقی ارقام گندم با تریتی پایرم ۹٦
جدول ٤-۲. مجموع بذور F_1 تشکیل شده بر روی ارقام مختلف گندم... ..... ۹۸
جدول ٤-۳. وضعیت یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی گیاهان F_2 حاصل از تلاقی تریتی پایرم با گندم..... ۱۰۲
جدول ٤-٤. تعداد یونی‌والنت‌ها در متافاز I تقسیم میوز در گیاهان نسل دوم..... ۱۰۵
جدول ٤-۵. فراوانی تشکل‌های میوزی در سلول‌های مادر گرده در گیاهان نسل دوم..... ۱۰۵
جدول ٤-٦. طول و مشخصات مورفولوژیکی کروموزوم‌های ژنوم E^b..... ۱۱۵
جدول ٤-۷. هیبریداسیون در محل برای بررسی ارقام گندم ایرانی از نظر وجود جابجایی IBL/IRS..... ۱۲۷
جدول ٤-۸. تعداد کروموزوم‌های ژنوم E^b در ژنوتیپ‌های نسل F_3..... ۱٤۱
جدول ٤-۹. تعداد و درصد بذور F_3 که دارای تعداد یکسانی کروموزوم بودند..... ۱٤۱

فصل ۱

مقدمه

۱ مقدمه

گندم حدود ۱۵ تا ۱۸٪ مصرف غذایی مردم جهان را تشکیل داده و منبع غذایی اصلی در بیشتر کشورهایی است که از خشکی و شوری خاک رنج می‌برند. این محصول عمده ترین منبع غذایی مردم ایران را نیز تشکیل می‌دهد. به طوری که سطح زیر کشت آن در ایران در سال ۱۳۸٦ معادل۸/۲۳ میلیون هکتار و میزان تولید آن ۱۳/٤٥ میلیون تن بوده است. طبق گزارش‌های موجود در قاره آسیا بعد از شوروی سابق، چین،هند و پاکستان بیشترین گسترش خاک‌های شور مربوط به ایران است. مطالعات نشان می‌دهند که حدود ۲۷ میلیون هکتار از اراضی ایران به مقدار متفاوتی تحت تأثیر شوری هستند که متجاوز از ۵۰٪ اراضی تحت کشت آبی را نیز شامل می‌شود (آقایی و همکاران، ۱۳۸٤).

در حال حاضر اولویت‌های اصلی اصلاح گندم در دنیا بر روی مقاومت به امراض، خشکی، گرما و شوری تمرکز یافته است. گندم از سه ژنوم دیپلوئید متفاوت (A، B و D) از طایفه گندمیان که خرانه ژنی اولیه را تشکیل می‌دهند، تشکیل شده است. تنوع مؤثر در ایجاد مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده که از عوامل بازدارنده تولید گندم به شمار می‌روند، در گونه‌های خزانه ثالثیه ژنی یافت می‌شود. تینوپایرم بسارابیکوم ($2n = 2x\ 14,\ E^bE^b$) یکی از این گونه‌ها است که مقاومت به بعضی بیماری‌ها را دارا بوده و نسبت به شوری مقاومت بالایی نشان داده است. این گونه دیپلوئید با گندم دوروم (AABB) تلاقی داده شده و آلوهگزاپلوئیدی مصنوعی با نام تریتی‌پایرم

($AABBE^bE^b$) تولید شده است. مقاومت به شوری تریتی‌پایرم و همچنین توان بالقوه آن به عنوان یک غله جدید مقاوم به شوری به اثبات رسیده است. در تحقیق حاضر، لاین‌هایی از این غله جدید با برخی ارقام پرمحصول گندم نان ایرانی تلاقی داده شدند. انتخاب ارقام زراعی ایرانی به جای گندم چینی بهاره (رقمی که به علت تلاقی‌پذیری بالا و زودرسی غالباً در تلاقی‌های بین گونه‌ای و بین جنسی مورد استفاده قرار می‌گیرید) به این علت بود که احتمالاً نتاج حاصله از نظر زراعی برتر بوده و سازگاری بهتری در شرایط مزرعه خواهند داشت. این عوامل احتمال موفقیت اصلاح گندم را در برابر استرس‌های محدود کننده تولید گندم را بیشتر خواهد کرد. معمولاً روند کار در بهره‌گیری از گونه وحشی مورد نظر (که در اینجا تینوپایرم بسارابیکوم است) به این صورت است که بعد از ایجاد آمفی‌پلوئید مصنوعی (که در اینجا تریتی‌پایرم است) آن را با گندم تلاقی داده و نتاج F_1 الی F_n به دست می‌آید. در این میان نسبت به انتخاب نتاج با ترکیب کروموزومی و یا فنوتیپ مورد نظر اقدام می‌شود. گیاهان F_1 را اغلب به دلیل عقیمی بالا با گندم تلاقی برگشتی داده و باروری نسبی به نتاج F_1 برگردانده می‌شود. سپس توده‌ی در حال تفرق پس چند نسل خودگشنی به دست می‌آید. معمولاً نشانگرهای مولکولی مثل SSR و نشانگرهای سیتوژنتیکی از جمله شمارش کروموزومی، نواربندی کروموزوم‌ها و هیبریداسیون DNA ژنومی در محل برای غربال چنین توده تفرق یافته‌ای برای رسیدن به ژنوتیپ‌های مورد نظر مورد استفاده قرار می‌گیرند. گاهی نیز تحقیق را به سطح تقسیم میوز توسعه داده و همولوژی کروموزومی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. به طور کلی تحقیق حاضر سعی در پاسخ دادن به سؤالات زیر را دارد.

۱. آیا لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه با ارقام اصلاح شده گندم ایرانی قابل تلاقی هستند یا خیر؟
۲. در صورت مثبت بودن پاسخ سؤال اول میزان باروری نتاج F_1 چقدر خواهد بود؟
۳. آیا با روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل و یا دیگر روش‌های سیتوژنتیکی از جمله نواربندی و نشانگر موککولی SSR می‌توان کروموزوم‌های ژنوم E^b را از کروموزوم‌های گندم (A، B و D) تشخیص داد؟
٤. آیا برخی ژنوتیپ‌های خاص دارای کروموزوم‌های افزایشی و یا جایگزینی از ژنوم E^b با کروموزوم‌های A، B و به ویژه D، در نسل‌های F_2 یا F_3 قابل حصول است؟

بدین ترتیب با انجام این تحقیق قدم‌های اساسی و اولیه در راستای توسعه خزانه ژنتیکی گندم در ایران برداشته می‌شود و انتظار می‌رود که ادامه و پی‌گیری تحقیقات مربوط به مقاومت به

استرس‌های محیطی در چنین لاین‌های جایگزینی در آینده از نظر اصلاح گندم‌های ایرانی مثمر ثمر واقع شود و گامی فراتر از رسیدن به خودکفایی گندم در کشور برداشته شود.

در شروع این تحقیق فرض بر این بود که اولاً امکان مطالعه سازگاری و تعیین باروری لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم در ایران و همچنین تولید ژنوتیپ‌های F_1 از طریق تلاقی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم و انواع گندم نان ایرانی در ایران وجود دارد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که بتوان لاین‌های تریتی‌پایرم ثانویه را از طریق خودگشنی و یا تلاقی برگشتی ژنوتیپ‌های F_1 با ارقام گندم نان ایرانی تولید نمود و در آخر اینکه امکان شناسایی ژنوتیپ‌های بارور تریتی‌پایرم ثانویه در نسل‌های در حال تفکیک (F_2 و F_3) از طریق بررسی‌های مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی و سیتوژنتیک مولکولی وجود دارد. با در نظر گرفتن این فرض‌ها اهداف زیر در تحقیق حاضر مد نظر بودند:

۱- مطالعه ساختار کروموزومی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه

۲- تلاقی تریتی‌پایرم اولیه با ارقام گندم اصلاح شده ایرانی و خودگشنی آنها برای تولید لاین‌های تریتی‌پایرم ثانویه

۳- انتخاب گیاهان دارای ترکیبات کروموزومی مورد نظر، با باروری مناسب با استفاده از روش‌های سیتوژنتیکی، سیتوژنتیکی مولکولی و نشانگرهای مولکولی.

واضح است که تحقیق حاضر می‌تواند از بسیاری جهات کاربردهای فراوانی را در ایران داشته باشد از جمله اینکه می‌تواند به گسترش دامنه کشت و انجام تحقیقات در جنبه‌های مختلف به نژادی و به زراعی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم در ایران کمک کند. دوم اینکه استفاده از تریتی‌پایرم و نیز گندم‌های دارای کروموزم‌های جایگزین و اضافه در برنامه‌های آتی اصلاح نباتات و انجام تلاقی‌های برگشتی بیشتر با گندم‌های ایرانی وجود دارد تا بتوان در جهت رفع نقص‌هایی که احتمالاً به دلیل پیوستگی با ژن‌های نامطلوب وجود خواهد داشت، اقدام نمود. همچنین از گیاهان مذکور می‌توان برای انتقال قطعاتی از کروموزم‌ها و ایجاد لاین‌های نوترکیب در گندم معمولی استفاده نمود. در این تحقیق، مهمترین روش سیتوژنتیک مولکولی (هیبریداسیون DNA ژنومی در محل) بر روی مهمترین گیاه زراعی کشور یعنی گندم به کار رفت تا راه‌گشای انجام آن در تحقیقات سیتولوژیکی آتی در علوم گیاهی به ویژه اصلاح نباتات و نیز در پروژه‌های اصلاح هیبریدهای بین گونه‌ها و جنس‌ها و فامیل‌های گیاهی در ارتباط با مقابله با تنش‌های مختلف محیطی همچون خشکی، شوری، آفات، بیماری‌ها ونیز در شناسایی ناهنجاری‌ها و جابجائی‌های کروموزمی باشد.