نشریه زراعت

شماره ۱۰۲، بهار ۱۳۹۳

(پژوهش و سازندگی)

شناسایی جابجایی کروموزومی 1BL/1RS در ارقام گندم نان

• **علی اصغر داداشی دوکی**، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور کرج - ایران (نویسنده مسئول)
• **عبدل مجیب قاضی**، آزمایشگاه تلاقی های دور - مرکز تحقیقات بین المللی گندم و ذرت (سیمیت) - مکزیک

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۷ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۸۶۱۱۸۹۸
E-mail: a.d.dooki@gmail.com

چکیده

بازوی کوتاه کروموزوم شماره یک چاودار (1RS) حامل ژنهای مقاومت به بیماریها و آفات می باشد. همچنین حضور بازوی 1RS موجب افزایش سازگاری، تحمل به تنش و پتانسیل عملکرد گندم نان میشود. در این مطالعه هفده ژنوتیپ گندم نان برای شناسایی جابجایی 1BL.1RS (T1BL.1RS) با روش‌های ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF)، نواربندی سی و هیبریداسیون در مکان فلورسنت (FISH) آنالیز شدند. IEF آنزیم گلوکز فسفات ایزومراز (GPI) روشی سریع و اقتصادی برای شناسایی T1BL.1RS هموزیگوس میباشد. نتایج IEF-GPI نشان داد که ارقام فلات و سبلان فاقد باندهای کاتدی کد شده توسط 1BS گندم هستند و بنابراین حامل جابجایی فوق میباشند. علاوه بر تائید وجود T1BL.1RS هموزیگوس در ارقام فلات و سبلان با روش نواربندی سی، این روش همچنین نشان داد که همه ارقام مورد مطالعه فاقد هتروزیگوسیتی برای T1BL.1RS هستند. روش FISH با استفاده از DNA چاودار بعنوان نشانگر، نتایج IEF-GPI و نواربندی سی را تائید کرد. نتایج ما نشان می دهد که ارقام فلات و سبلان دارای بازوی کروموزومی 1RS چاودار بصورت هموزیگوس میباشند و بنابراین ممکن است بعنوان منابع تنوع ژنتیکی مفید برای اصلاح گندم مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: جابجایی کروموزومی، ایزو الکتریک فوکوسینگ، نوار بندی سی، هیبریداسیون در مکان فلورسنت، گندم

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:102 pp: 12-19

Identification of 1BL.1RS chromosomal translocation in Iranian bread wheat cultivars

By: A. Dadashidooki, Biotechnology, Animal Science Research Institute. Karaj. Iran (Corresponding Author; Tel:+989128611898) Abdel Mujeeb-Kazi, The International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), Mexico.

Received: December 2008 **Accepted: March 2012**

The short arm of rye 1R chromosome (1RS) carries genes for resistance to diseases and pests. The presence of the 1RS arm also enhance adaptation, stress tolerance and yield potential of bread wheat. In the present study 17 bread wheat cultivars were screened to identify 1BL.1RS translocation (T1BL.1RS) by isoelectric focusing, C-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) methods. Isoelectric focusing of glucose phosphate isomerase (IEF-GPI) is a quick and economical method for identification of homozygous T1BL.1RS. The IEF-GPI results showed that cultivars Fallat and Sabalan don't have cathodal band encoded by 1BS arm and therefore carry T1BL.1RS. In addition to confirmation of homozygous T1BL.1RS in Fallat and Sabalan by C- banding method, this method also showed that no heterogeneity was found for 1RS translocation in plant materials. FISH using rye DNA as a probe confirmed the IEF-GPI and C-banding results. Our results showed that cultivars Fallat and Sabalan contained the 1RS chromosome arm and therefore may be considered as a useful genetic diversity resources for wheat breeding.

Key words: Chromosomal translocation, Isoelectric focusing, C- banding, Fluorescence *in situ* hybridization, Wheat

مقدمه

بازوی کوتاه کروموزوم شماره یک چاودار (1RS) علاوه بر داشتن ژنهای مقاومت به بیماریها و آفات (۲۶،۲۲،۷،۲) میتواند باعث افزایش سازگاری، تحمل به تنش آبی[۱] و پتانسیل عملکرد در گندم نان نیز شود (۲۷،۲۴،۲۳،۱۶،۱۳،۶). متاسفانه حضور بازوی 1RS در گندم میتواند موجب کاهش کیفیت خمیر و پخت نان گردد (۱۸،۱۷،۹،۸). Bartos و همکاران (۲۰۰۸) تعداد ژنهای ژنوم چاودار (*Secale cereal* L., 2n = 2x = 14, RR) و بازوی 1RS آن را بترتیب ۳۶۰۰۰ و ۲۰۰۰ عدد برآورد کردند. Sharma و همکاران (۲۰۰۹ و ۲۰۱۰) نشان دادند که ۱۵٪ انتهایی بازوی کروموزومی 1RS ممکن است حامل ژنهایی باشند که از طریق تاثیر بر مورفولوژی و آناتومی ریشه موجب سازگاری و بقاء لاینهای واجد1RS در شرایط تنش آبی گردند. اثر مثبت 1RS در افزایش ۱۱/۳ درصدی عملکرد دانه تحت شرایط رطوبت کاهش یافته توسط Villareal و همکاران (۱۹۹۸) گزارش شده بود. در جابجایی[۲] 1BL.1RS (T1BL.1RS)، با حذف بازوی کوتاه کروموزوم 1B گندم (1BS)، بازوی کروموزومی1RS چاودار به بازوی بلند کروموزوم 1B گندم (1BL) منتقل میشود. امروزه T1BL.1RS در ارقام مختلف گندم در سراسر جهان وجود دارد و ظاهرا بخشی از مخزن ژنی گندم گردید بطوریکه تنها در شمال چین ۷۰-۵۰ درصد ارقام زراعی گندم دارای این جابجایی هستند (۲۹). شناسایی و تعیین منشاء و مقدار کروماتین چاودار در زمینه ژنتیکی گندم با استفاده از روشهای مختلف بیوشیمیایی، سیتوژنتیکی و مولکولی انجام میگیرد (۳۰،۲۹،۲۱،۲۰،۱۲،۱۱،۱۰،۴). وجود T1BL.1RS در بخشی از ژرم پلاسم کشورهای مختلف جهان (۲۹،۲۸،۲۵،۲۱،۱۹،۱۵،۱۴،۱۱) بیانگر اهمیت آن در اصلاح گندم میباشد.

منشاء کروماتین 1RS در اغلب ارقام از چاودار پتکوس[۳] میباشد (۱۴،۲۲). یرای استفاده موثرتر از 1RS در اصلاح گندم، لازم است تنوعات جدید 1RS از منابع مختلف چاودار به جابجایی 1BL.1RS وارد گردد (۲۸،۲۲،۱۴،۱۳). با توجه به ارتباط ایران با مرکز بین المللی اصلاح گندم و ذرت (سیمیت)[۴] ، احتمالا T1BL.1RS در ژرم پلاسم گندم نان ایران نیز وجود دارد. اخیرا Mirzaghaderi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی ۳۳ رقم گندم نان ایرانی نشان دادند که ارقام اترک، دز، فلات و رسول دارای T1BL.1RS هموزیگوس هستند. برای دستیابی به اطلاعات مرتبط با تنوع ژنتیکی و توزیع T1BL.1RS در ژرم پلاسم گندم نیاز به بررسی جامع میباشد. با این وجود در این تحقیق ضمن بررسی وجود T1BL.1RS در ۱۷ ژنوتیپ گندم نان ایرانی با روشهای ایزوالکتریک فوکوسینگ آنزیم گلوکز فسفات ایزومراز[۵] (IEF-GPI)، نواربندی سی[۶] و هیبریداسیون در مکان فلورسنت[۷]

(FISH) ، کارائی روشهای فوق در شناسایی T1BL.1RS نیز بحث گردید.

مواد و روش ها

مواد گیاهی در این مطالعه ۱۷ ژنوتیپ گندم هگزاپلوئید (روشن، البرز، آتیلا، سرداری، زاگرس، کراس سرخ تخم، سبلان، فلات، بولانی، قدس، اینیاء ۶۶، ماهوتی یزد، مارون، توباری، شعله، تجن و کارچیا) بررسی شدند. ارقام بهاره چینی دارای T1BL.1RS و سری- ۸۲ فاقد T1BL.1RS بعنوان شاهد استفاده شدند. کلیه بذرها از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر کرج تهیه گردیدند.

روش سیتولوژیکی شمارش کروموزوم های متافاز میتوز همه ارقام با روشMujeeb-Kazi و Miranda (۱۹۸۵) انجام شد که مراحل آن بترتیب عبارت بودند از: جوانهدار کردن بذور، تیمار ریشهها با محلول پیش تیمار (حاوی کلشیسین ۰/۰۰۵ درصد، ۸- هیدروکسی کینولین ۰/۰۲۵ درصد و چند قطره از دی متیل سولفوکساید) به مدت ۳/۵ – ۳ ساعت در دمای اتاق، تثبیت و رنگآمیزی ریشهها با استئواورسئین ٪۲ در ۴°C بمدت سه روز، گرم کردن یکی از ریشهها در اسید استیک ٪۴۵ و گرفتن اسید اضافی با کاغذ صافی، قرار دادن ریشه روی یک لام میکروسکوپی تمیز، برش انتهای نوک ریشه و تخلیه محتویات آن در زیر استرئومیکروسکوپ، افزودن یک قطره اسید استیک ٪۴۵ روی محتویات ریشه و گذاشتن لامل، حرارت دادن ملایم، قرار دادن اسلاید بین کاغذ صافی و فشار دادن ملایم با انگشت شصت، مشاهده با میکروسکوپ نوری و دائمی کردن اسلایدهای مناسب. مراحل دائمی کردن اسلاید بترتیب عبارت بودند از: قرار دادن اسلاید در ۸۰°C- بمدت حداقل یک ساعت، برداشتن لامل با تیغ، تیمار اسلاید با الکل مطلق در ۴°C در طول شب و خشک کردن آن در دمای اتاق، تیمار با گزیلن در دمای اتاق بمدت ۳۰- ۱۵ دقیقه و خشک کردن، چسباندن لامل با چسب یوپارل[8] (۲۰،۳).

در بررسیهای سیتولوژیکی، نواربندی سی و FISH حداقل سه گیاه از هر رقم و حداقل سه سلول با کروموزومهای متافازی خوب به ازاء هر گیاه آنالیز شدند.

روش نواربندی– سی جوانهدار کردن بذور، پیش تیمار، تثبیت، رنگ-آمیزی، تهیه اسلاید و برداشتن لامل همانند روش شرح داده شده در قسمت سیتولوژی انجام شد، با این تفاوت که تثبیت و رنگآمیزی با استوکارمین ۰/۲ درصد صورت گرفت. مراحل بعدی بترتیب عبارت بودند از: دو دقیقه تیمار اسلایدها با اسید استیک ٪۴۵ در ۶۰°C، تیمار با اتانول خالص در صفر درجه سانتیگراد در طول شب، دو دقیقه تیمار با اسید کلریدریک ۰/۲ مولار در ۶۰ °C، هشت دقیقه تیمار با هیدروکسید باریوم اشباع شده در دمای اتاق، یک ساعت تیمار با سدیم سالین سیترات با غلظت مضاعف[9](۲X SSC) در ۶۰°C، انتقال مستقیم اسلایدها به محلول رنگی گیمسا ٪۶ بمدت حداقل ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، مشاهده با میکروسکوپ نوری، انتخاب اسلایدهای خوب و دائمی کردن از طریق چسباندن لامل با چسب یوپارل بدون نیاز به تیمار با الکل و گزیلن (۲۰،۱۱،۳). با توجه به استفاده مکرر از غلظتهای مختلف محلول SSC بویژه در روش FISH، بهتر است محلول ۲۰X SSC (محلول SSC که غلظت اجزاء سازنده آن بیست برابر گردید) بعنوان محلول استوک تهیه و سپس محلولهای SSC، 2X SSC و یا 4X SSC از آن ساخته شوند.

استخراج آنزیم گلوگز فسفات ایزومراز و ایزوالکتریک فوکسینگ مراحل استخراج آنزیم GPI بترتیب عبارت بودند از: پودر کردن هر بذر بطور جداگانه و انتقال آن به اپندورف، افزودن ۹۰ میکرولیتر (µl) از محلول استخراج تریس ۰/۱ مولار با pH=7.5 به هر اپندورف و ۵ دقیقه ورتکس، تکرار مرحله قبل و نگهداری آن در دمای اتاق بمدت ۲- ۰/۵ ساعت بعد از ورتکس نمودن، دو دقیقه سانتریفوژ عصاره بذر با 11500 rpm و جداسازی محلول روئی. محلول روئی حاوی آنزیم GPI است که تا زمان آنالیز در ۲۰ °C- نگهداری میشود (۳۰،۵).

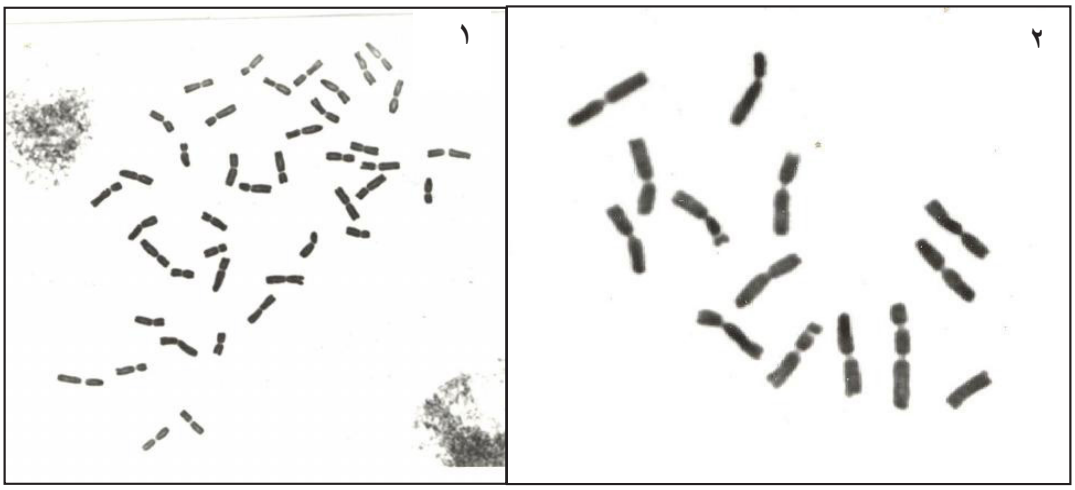
برای جداسازی ایزوزایمهای آنزیم GPIاز IEF روی ژل پولی آکریلامید نازک با طول و عرض ۱۸ × ۶ سانتیمتر دارای آمفولیت باpH=3.5-9.5 استفاده گردید. الکتروفورز با دستگاه مولتی فور انجام شد. 1M NaOH و $1M\ H_3PO_4$ بترتیب بعنوان بافرهای کاتدی و آندی استفاده شدند. جهت آماده سازی شیب pH، پیش فوکوسینگ ژل[10] با توان الکتریکی ۱۵ وات، ولتاژ ۱۷۰۰ ولت و شدت جریان ۵۰ میلی آمپر در ۵ °C بمدت ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس با ریختن ۲۰ µl از هر نمونه در چاهک، الکتروفورز با شرایط بالا بمدت حدود ۶ ساعت ادامه یافت. ژل ابتدا ۳۰ دقیقه در روشنایی و سپس یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق در محلول رنگآمیزی قرار گرفت. اساس رنگآمیزی ژل بر پایه احیاء MTT[11] و تشکیل فورمازان نامحلول است (۳۰،۵). الگوی باندهای GPI هر رقم در چهار تکرار بررسی شد.

هیبریداسیون در مکان فلورسنت (FISH) جوانه دار کردن بذور، پیش تیمار، تثبیت، رنگ آمیزی و تهیه اسلاید همانند روش شرح داده شده در قسمت سیتولوژی انجام شد، با این تفاوت که ریشه ها پس از رنگ آمیزی، با بافر سیترات ۰/۰۱ مولار شستشو و سپس با محلول آنزیمی دارای سلولاز ٪۵ ، پکتیناز ٪۲ و بافر سیترات ۰/۰۱ مولار در ۳۷ °C بمدت ۲۰ دقیقه نیز تیمار شدند. اسلایدهای دارای حداقل سه سلول متافازی خوب برای FISH انتخاب شدند که مراحل بعدی آن بترتیب عبارت بودند از: قرار دادن اسلاید در ۸۰ °C- در طول شب و سپس خارج کردن لامل با تیغ، ۱۰ دقیقه تیمار با اسید استیک ٪۴۵ در دمای اتاق جهت حذف رنگ اضافی، افزودن 100µl از محلول RNase A به هر اسلاید و ۴۵ دقیقه تیمار در ۳۷ °C جهت حذف RNA کروموزومی، ۲/۵ دقیقه تیمار با فرم آمید ٪۷۰ در ۷۰°C برای واسرشتگی[12] مولکول DNA، آبگیری اسلاید-

ها بترتیب با اتانول سرد ٪۷۰ ، ٪۹۰ و خالص در °C ۲۰- (هر دفعه ۴ دقیقه)، تیمار با µl ۴۵ از مخلوط هیبریداسیون: ابتدا ۱۰ دقیقه در °C ۸۰ و سپس در طول شب در °C ۳۷ در اتاقک مرطوب (از DNA چاودار و گندم بهاره چینی بترتیب بعنوان نشانگر و بلوک کننده به نسبت ۱ به ۱۰ در مخلوط هیبریداسیون استفاده گردید)، دو بار شستشو با محلول 2X SSC در °C ۴۰ (هر دفعه ۵ دقیقه)، ۱۰ دقیقه تیمار با فرم آمید ٪۵۰ در °C ۴۲ ، دو بار شستشو با محلول 2X SSC در °C ۴۰ (هر دفعه ۵ دقیقه)، ۵ دقیقه شستشو با محلول 2X SSC در دمای اتاق، ۵ دقیقه شستشو با بافر آشکارسازی (4X SSC دارای Tween 20 ٪۲) در دمای اتاق، افزودن µl ۱۵۰ از محلول آلبومین سرم گاوی ٪۵ و ۵ دقیقه تیمار در دمای اتاق، یک ساعت تیمار با µl ۱۵۰ از محلول آویدین فلورسنس در °C ۳۷، سه بار شستشو با بافر آشکارسازی در °C ۳۷ (هر دفعه ۶ دقیقه)، افزودن µl ۱۵۰ از سرم نرمال خرگوش ٪۵ و ۵ دقیقه تیمار در دمای اتاق، افزودن µl ۱۵۰ از محلول آنتی آویدین بیوتینیله شده و یک ساعت تیمار در °C۳۷، سه بار شستشو با بافر آشکارسازی در °C ۳۷ (هر دفعه ۶ دقیقه)، افزودن µl ۱۵۰ از محلول فلورسنت دپی[۱۳](DAPI) و ۴۰ دقیقه تیمار در دمای اتاق در تاریکی، دو دقیقه شستشو با بافر آشکارسازی در دمای اتاق، افزودن µl ۱۵۰ از محلول پروپیدیوم یدید[۱۴] (PI)و ۳۰ دقیقه تیمار در دمای اتاق در تاریکی، دو دقیقه شستشو با 2X SSC در دمای اتاق، خشک کردن اسلاید و دائمی کردن آن از طریق افزودن ۲- ۱ قطره از چسب مخصوص فلورسنس بنام وکتاشیلد[۱۵] به هر اسلاید و گذاشتن لامل روی آن (بدون نیاز به تیمار با الکل و گزیلن)، بررسی اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت و گرفتن عکس (۲۱،۲۰،۱۰). آزمایش FISH در سیمیت کشور مکزیک انجام شد.

نتایج و بحث

امروزه تعداد زیادی از ارقام گندم در سراسر جهان حامل T1BL.1RS میباشند (۲۹،۲۸،۲۵،۲۱،۱۹،۱۵،۱۴،۱۱). بنابراین شناسایی این جابجایی در ارقام گندم نان ایران از طریق بکارگیری روشهای بیوشیمیایی، سیتولوژیکی و مولکولی و استفاده از آنها در اصلاح گندم مفید بنظر میرسد. داشتن سلولهای متافازی با توزیع کروموزومی مناسب پیش شرط موفقیت در روشهای نواربندی سی و FISH میباشد. بنابراین استفاده از شمارش کروموزومهای متافاز میتوز با روشMujeeb-Kazi و Miranda (۱۹۸۵) ضمن تائید سطوح پلوئیدی ارقام مورد بررسی (شکلهای ۱و۲)، نشان داد که میتواند روشی مطمئن برای بررسیهای نواربندی سی و FISH باشد. در اسلایدهای تهیه شده با این روش میتوان حداقل ۱۰ سلول متافازی با توزیع کروموزومهای بسیار مناسب مشاهده کرد.



شکل‌های ۱ و ۲ - تعداد کروموزوم های سوماتیکی. ۱- گندم نان (2n = 6x = 42, AABBDD) ،
۲- چاودار (2n = 2x = 14, RR)

برای شناسایی سریع وجود کروماتین 1RS، از روش الکتروفورزی IEF-GPI استفاده شد. Chojecki و Gale (۱۹۸۲) نشان دادند که اغلب یاندهای کاتدی زیموگرام GPI عصاره بذر گندم محصول ژن *Gpi-B1* است که روی بازوی کوتاه کروموزوم 1B گندم (1BS) قرار دارد. (در متن فوق حروف T، R، B، L و S بترتیب بیانگر جابجایی، کروموزوم چاودار، کروموزوم گندم، بازوی بزرگ و بازوی کوچک است). ظاهرا در الگوی باندهای GPI گندم نان هموزیگوس فاقد جابجایی (1BL.1BS, 1BL.1BS) و یا گندم نان دارای جابجایی هتروزیگوسی (1BL.1BS,1BL.1RS) یعنی تنها یکی از دو کروموزوم 1B دارای بازوی کروموزومی 1RS است) عموما ۱۰- ۹ باند دیده می شود اما گندم نان دارای جابجایی هموزیگوسی (1BL.1RS 1BL.1RS یعنی هر دو کروموزوم همولوگ 1B دارای بازوی کروموزومی 1RS هستند) بعلت حذف کامل بازوی 1BS گندم معمولا ۸- ۶ باند دارد

(۲۱،۳۰). بنابراین این دو باند حذف شده در انتهای کاتدی میتواند بعنوان یک نشانگر پروتئینی منفی مهم برای تمایز جابجایی هموزیگوسی از انواع هترزیگوسی یا فاقد جابجایی استفاده شود. نتایج IEF-GPI این مطالعه نشان داد که دو رقم فلات و سبلان همراه با شاهد سری- ۸۲ دارای T1BL.1RS هموزیگوس هستند (شکل ۳). بررسی دقیق الگوی باندهای GPI ارقام مورد بررسی نشان داد که هیچگونه چند شکلی در میان آنها وجود ندارد. Chojecki و Gale (۱۹۸۲) با مطالعه زیموگرام GPI در ۴۶ رقم گندم هگزاپلوئید، هیچ تنوع یا چند شکلی در فنوتیپ GPI مشاهده نکردند و اظهار داشتند که سیستم GPI بشدت حفاظت میشود. Mujeeb-Kazi و Hettle (۱۹۹۵) و همچنین William و همکاران (۱۹۹۲) از این نشانگر پروتئینی برای شناسایی ارقام دارای T1BL.1RS استفاده کردند. آنها عقیده دارند که IEF-GPI روشی سریع، دقیق و اقتصادی است و میتوان از آن برای غربالگری اولیه ژرم پلاسم گندم استفاده کرد. در روش IEF-GPI می توان در هر ژل ۴۸ نمونه را در کمتر از یک روز غربالگری کرد. از طرف دیگر روش فوق غیر تخریبی است یعنی میتوان از نیمه بذر دارای اندوسپرم (فاقد جنین) برای الکتروفورز استفاده کرد و در صورتی که نوع بذر خیلی مهم باشد، میتوان نیمه دیگر آن (واجد جنین) را جوانهدار کرده و از آن بذر تهیه نمود. همچنین در مواردی که لازم است نتایج الکتروفورز و سیتولوژی از یک بذر باشند، میتوان نیمه بذر فاقد جنین را برای الکتروفورز و ریشه-های حاصل از جوانه دار کردن نیمه دیگر بذر (قسمت جنین دار بذر) را برای سیتولوژی استفاده کرد. متاسفانه روش فوق قادر به تفکیک ارقام فاقد جابجایی از ارقام دارای جابجایی هتروزیگوسی نیست زیرا هر دو ژنوتیپ دارای حداقل یک بازوی 1BS هستند و بنابراین الگوی باندهای آنها مشابه یکدیگر میباشد. بعبارت دیگر هر دو ژنوتیپ دارای دو باند نشانگر کاتدی و در مجموع ۱۰- ۹ باند هستند. بنابراین همیشه از یک روش مکمل در کنار روش IEF-GPI استفاده میگردد مثل الکتروفورز ژل پولی آکریلامید گلیادین در محیط اسیدی یا نواربندی سی (۳۰،۲۱).

در این مطالعه از روش نواربندی سی بعنوان روشی مکمل برای تفکیک ارقام فاقد جابجایی از ارقام دارای جابجایی هتروزیگوسی استفاده شد. وجود دو نشانگر هتروکروماتینی کاملا متمایز در انتهای تلومری 1RS چاودار (شکل ۴) و همچنین وجود نوارهای غالب در نواحی سانترومری و انتهایی کروموزوم 1BL گندم، اساس شناسایی T1BL.1RS با روش نواربندی سی میباشند (شکل ۵). روش نواربندی سی نشان داد که هیچکدام از ارقام مورد بررسی دارای جابجایی هتروزیگوسی نیستند. از طرف دیگر روش فوق وجود T1BL.1RS هموزیگوس در ارقام فلات و سبلان (شکل ۵) را تائید کرد. محققان بسیاری از روش نواربندی سی برای شناسایی T1BL.1RS استفاده می کنند (۲۲،۲۱،۱۴،۱۲،۱۱). نوار بندی سی روشی پر زحمت و وقت گیر است که نیاز به تجربه و تخصص دارد. بنابراین برای ارزیابی تعداد زیادی از ارقام بویژه ژرم پلاسم گندم مناسب نیست. در این روش میتوان در هر دو روز حدود ۱۰ اسلاید کروموزومی تهیه کرد یعنی بررسی حداکثر سه ژنوتیپ.

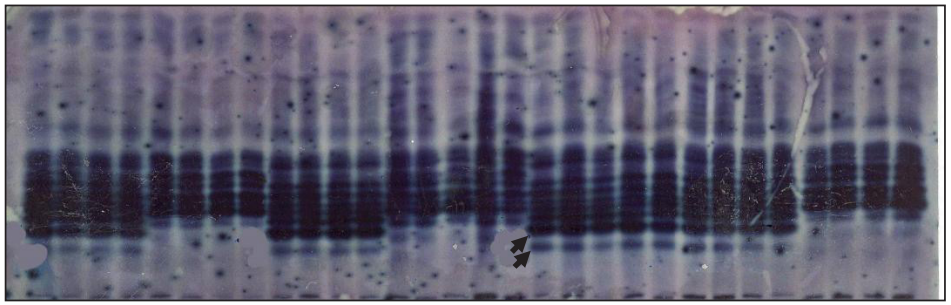
از روش FISH برای اطمینان از وجود بازوی کامل 1RS چاودار در زمینه ژنتیکی ارقام فلات و سبلان بصورت همزیگوس و همچنین عدم وجود ناهنجاریهای کروموزومی دیگر استفاده شد. نتایج FISH نشان می-دهد که بازوی 1RS بطور کامل و هموزیگوس در ارقام فلات و سبلان (شکل ۶) وجود دارد. از طرف دیگر روش FISH نشان داد که ناهنجاری-های کروموزومی یا جابجایی کروموزومی غیر از T1BL.1RS در ارقام فوق مشاهده نگردید. اغلب از روش FISH برای تائید روشهای دیگر شناسائی کروماتین 1RSچاودار استفاده میشود (۲۱،۱۵،۱۴،۱۱،۱۰،۱). این روش بسیار دقیق و حساس میباشد اما امروزه به علت اقتصادی نبودن در برنامه-های غربالگری استفاده نمیشود.

نه تنها شناسایی جابجایی 1BL.1RS در ژرم پلاسم گندم کشورهای مختلف انجام می گیرد (۲،۱۱،۱۵،۱۹،۲۱،۲۵،۲۸،۲۹) بلکه محققان بعضی از کشورها در صدد غنی سازی تنوع ژنتیکی بازوی 1RS چاودار (از طریق تولید لاینهای جدید با استفاده از منابع متنوع چاودار) هستند (۲۸،۲۲،۱۴،۱۳). ظاهرا در ایران Mirzaghaderi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی ۳۳ رقم گندم نشان دادند که ارقام اترک، دز، فلات و رسول دارای جابجایی 1BL.1RS هموزیگوس هستند. در مطالعه حاضر نیز دو رقم از ۱۷ رقم دارای جابجایی فوق هستند. بنابراین ممکن است از این ارقام بعنوان منابع ژرم پلاسم مفید برای اصلاح گندم استفاده کرد.

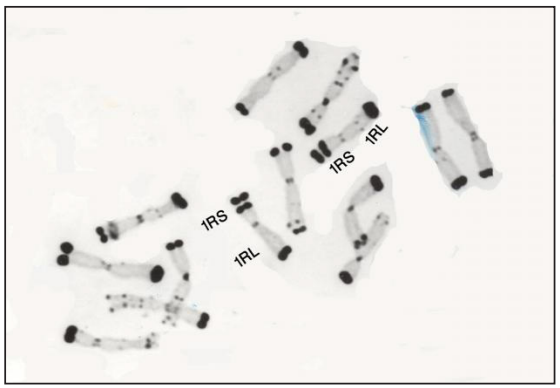
در مقایسه سه روش استفاده شده در این تحقیق میتوان گفت که هر روش دارای مزایا و معایبی است اما در مجموع بهترین روش میتواند FISH باشد اگر هزینه های آن کاهش یابد. در صورت عدم وجود نوترکیبی بین 1BS و 1RS که بسیار نادر است، روش IEF-GPI بعلت سرعت و اقتصادی بودن میتواند بهترین روش برای ارزیابی اولیه ژرم پلاسم گندم باشد. روش نواربندی سی برای تعداد نمونههای کم مناسب است و دیگر نیاز به روش مکمل ندارد. بنابراین استفاده از روش IEF-GPI برای شناسایی فراوانی و توزیع جابجایی 1BL.1RS در ژرم پلاسم گندم ایران پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

از مسئولین محترم موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج بخاطر تامین مالی این تحقیق تشکر و قدردانی میگردد.

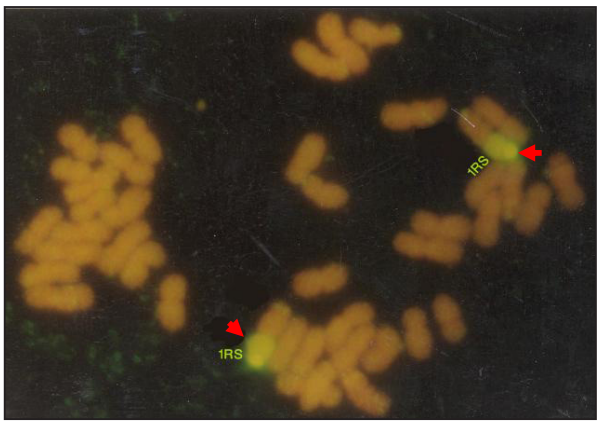


شکل ۳ - الگوی باندهای گلوکز فسفات ایزومراز عصاره بذر نمونه ها. نوارها بترتیب از چپ به راست عبارتند از: ۴- ۱ البرز، ۸- ۵ فلات، ۱۲- ۹ سرداری، ۱۷- ۱۳ سری ۸۲ (شاهد دارای جابجایی)، ۲۱- ۱۸ روشن، ۲۶- ۲۳ بهاره چینی (شاهد فاقد جابجایی) و ۳۰- ۲۷ سبلان. علامت پیکان باند های مارکری کد شده توسط بازوی کوتاه 1BS می‌باشد که در ناحیه کاتدی دو رقم فلات و سبلان دیده نمی شود.



شکل ۴ – الگوی نواربندی سی کروموزوم‌های چاودار. بازوی کوچک کروموزوم شماره یک بعلت داشتن دو ناحیه یا نوار هتروکروماتینی واضح انتهایی (نزدیک به ناحیه تلومری) براحتی قابل تشخیص می‌باشد.

شکل ۵- الگوی نواربندی سی کروموزوم‌های رقم سبلان. بازوی کوچک کروموزوم شماره یک چاودار بعلت داشتن دو ناحیه یا نوار هتروکروماتینی واضح انتهایی (نزدیک به ناحیه تلومری) براحتی قابل تشخیص است که با علامت پیکان مشخص شدند.



شکل ۶ - هیبریداسیون در مکان فلورسنت رقم سبلان (DNA چاودار بعنوان نشانگر). بازوی کوتاه کروموزوم شماره یک چاودار با فیلتر ۹ بصورت رنگ زرد مشخص است.

پاورقی ها

1. Water stress,
2. Translocation
3. Petkus rye
4. The international maize and wheat improvement center (CIMMYT)
5. Isoelectric focusing of glucose phosphate isomerase (IEF-GPI)
6. C- banding
7. Fluorescence in situ hybridization (FISH)
8. Euparal
9. 2X Sodium Saline Citrate (2X SSC)
10. Prefocusing
11. dimethylthiazolyl-diphenyltetrazolium bromide (MTT)
12. DNA denaturation
13. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)
14. Propidium iodide (PI)
15. Vectashield

منابع مورد استفاده

1- Bartos, J., Paux, E., Kofler, R., Havrankova, M., Kopecky, D., Suchankova, P., Safar, J., Simkova, H., Town, C.D., Lelley, T., Feuillet, C., and Dolezel1, J. (2008). A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. BMC Plant Biol. 8:95. DOI:10.1186/1471-2229-8-95.

2- Bennett, G.A. (1984). Resistance to powdery mildew in wheat: A review of its use in agriculture and breeding programs. Plant Pathol. 33:279-300.

3- Bennet, M.D., Gustason, G.P., and Smith, J.P. (1977). Variation in nuclear DNA in the genus Secale. Chromosoma 61:149-176.

4- Berzonsky, W.A., and Francki, M.G. (1999). Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: A review. Euphytica 108: 1–19.

5- Chojecki, A.J.S., and Gale, M.D. (1982). Genetic control of glucose phosphate isomerase in wheat and related species. Heredity 49:337-347.

6- Ehdaie, B., Whitkus, R.W., and Waines, J.G. (2003). Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon'. Crop Science 43:710–717.

7- Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A., and Gill, B.S. (1996). Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica 91:59–87.

8- Graybosch, R.A. (2001). Uneasy unions: Quality effects of rye chromatin transfers to wheat. J. Cereal Sci. 33:3-16.

9- Graybosch, R.A., Peterson, C.J., Hansen, L.E., Worrall, D., Shelton, D.R., and Lukaszewski, A. (1993). Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS, and 1AL/1RS wheat–rye translocation lines. J. Cereal Sci. 17:95–106.

10- Islam-Faridi, M.N., and Mujeeb-Kazi, A. (1995). Visualization of *Secale cereale* DNA in wheat germplasm by fluorescent *in situ* hybridization. Theor. Appl. Genet. 90:595–600.

11- Jahan, Q., Ter-Kuile, N., Hashmi, N., Islam, M., Vahidy, A.A., and Mujeeb-Kazi, A. (1990). The status of the 1B/1R translocation chromosome in some related wheat varieties and the 1989 candidate varieties of Pakistan. Pak. J. Bot. 22:1-10.

12- Javornik, B., Sinkovic, T., Vapa, L., Koebner, R.M.D., and Rogers, W.J., (1991). A comparison of methods for identifying and surveying the presence of 1BL .1RS translocations in bread wheat. Euphytica 54 : 45-53.

13- Kim, W., Johnson, J.W., Baenziger, P.S., Lukaszewski, A.J., and Gaines, C.S. (2004). Agronomic effect of wheat–rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources. Crop Science 44:1254–1258.

14- Ko, J.M., Seo, B.B., Suh, D.Y., Do, G.S., Park, D.S., and Kwack, Y.H. (2002). Production of a new wheat line possessing the 1BL.1RS wheat-rye translocation derived from Korean rye cultivar Paldanghomil. Theor. Appl. Genet. 104:171–176.

15- Kumar, S., Kumar, N., Balyan, H.S., and Gupta, P.K. (2003). 1BL.1RS translocation in some Indian bread wheat genotypes and strategies for its use in future wheat breeding.
Caryologia 56:23-30.

16- Kumlay, A.M., Baenziger, P.S., Gill, K.S., Shelton, D.R., Graybosch, R.A., Lukaszewski, A.J., and Wesenberg, D.M. (2003). Understanding the effect of

rye chromatin in bread wheat. Crop Science 43:1643–1651.
17- Lee, J.H., Graybosch, R.A., and Peterson, C.J. (1995). Quality and biochemical effects of a 1RS. 1BLwheat–rye translocation in wheat. Theor. Appl. Genet. 90:105–112.
18- McKendry, A.L., David N. Tague, D.N., and Kathleen, R.K. (2001). Comparative Effects of 1BL.1RS and 1AL.1RS on soft red winter wheat milling and baking quality. Crop Sci. 41: 712–720.
19- Mirzaghaderi, G., Zeinali, G., Rafiepour, M. and Karimzadeh, G. (2011). Wheat-Rye translocation in Iranian bread wheat cultivars and their ion distribution in response to salinity stress. J. Agr. Sci. Tech. 13:1163-1172.
20- Mujeeb-Kazi, A., and , Miranda, J.L. (1985). Enhanced resolution of somatic chromosome constrictions as an aid to identifying intergeneric hybrids among some triticeae. Cytologia 50: 701-709.
21- Mujeeb-Kazi, A. and Hettel, G.P. (1995). Utilising wild grass biodiversity in wheat improvement: 15 years of wide cross research at CIMMYT. CIMMYT Research Report No. 2. Mexico, DF, CIMMYT.
22- Ren, T.H., Chen, F., Yan, B.J., Zhang, H.Q., and Ren, Z.L. (2012). Genetic diversity of wheat–rye 1BL.1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources.
Euphytica (2012) 183:133–146.
23- Sharma, S., Bhat, P., Ehdaie, B., Close, T., Lukaszewski, A., and Waines, J.G. (2009). Integrated genetic map and genetic analysis of a region associated with root traits on the short arm of rye chromosome 1 in bread wheat. Theor. Appl. Genet. 119:783–793.
24- Sharma, S., DeMason, A.D., Ehdaie, B., Lukaszewski, A.J. and Waines, J.G. (2010). Dosage effect of the short arm of chromosome 1 of rye on root morphology and anatomy in bread wheat . J. Exp. Bot. 61:2623–2633.
25- Trubacheva, N.V., Rosseeva, L.P., Belan, I.A., Osadchaia, T.S., Kravtsova, L.A., Kolmakov, I.V., Blokhina, N.P., and Pershina, L.A. (2011). Characteristics of common wheat cultivars of West Siberia carrying the wheat-rye 1RS.1BL translocation. Genetika 47:18-24.
26- Tyrka, M., and Chelkowski, J. (2004). Enhancing the resistance of triticale by using genes from wheat and rye. J. Appl. Genet. 45:283–295.
27- Villareal, R.L., Banuelos, O., Mujeeb-Kazi, A., and Rajaram, S. (1998). Agronomic performance of chromosome 1B and T1BL.1RS near isolines in the spring bread wheat Seri M82. Euphytica 103:195-202.
28- Zeller, F.J., Hsams, L.K. (1984). Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. In: Sakamoto S. (ed), "Proc. 6th Int. Wheat. Genet. Symp.", pp. 161-173. Kyoto University, Japan.
29- Zhang, L., Liu, D.C., Guo, X., Yang, W.L., Sun, J.Z., Wang, D.W., Sourdille, P., and
Zhang, A. (2011). Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers. BMC Genetics 12:42. doi:10.1186/1471-2156-12-42.
30- William, M.D.H.M., Riera-Lizarazu, O., and Mujeeb-Kazi, A. (1992). A combination of protein electrophoretic techniques for the detection of 1B, 1B/1R heterozygotes in Triticum aestivum L. J. Genet. and Breed. 46:137-142.