مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه سیتوژنتیک و بهینه سازی روش دورگ سازی ژنومی در محل در جنس پسته (*Pistacia* spp.)

سعید میرزایی[۱]، حسین شاهسوند حسنی[۲]، نجمه رمشی[۳]، مرجان قاسم خانی[٤]، مسعود احمدی افزادی*[٤]

[۱] استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان.

[۲] دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

[۳] دانش‌آموخته مقطع کارشناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان.

[٤] دانشجوی دکترا، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه کشاورزی سوئد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۰۱

چکیده

پسته (*Pistacia vera*) یکی از مهمترین محصولات باغی شناخته شده ایران در دنیا می‌باشد که نام ایران را با داشتن بیشترین ارقام تجاری دنیا به عنوان مهمترین منبع ژرم پلاسم این گیاه مطرح نموده است. با این وجود تعداد مطالعات کروموزومی روی این محصول محدود و گزارشات موجود حاکی از تناقضاتی در تعداد کروموزوم‌ها می‌باشد. در این تحقیق گونه‌های پسته موجود در ایران شامل ارقام اهلی و گونه‌های غیر اهلی خنجوک و بنه با استفاده از روش‌های کلاسیک رنگ‌آمیزی کروموزوم و روش دورگ سازی ژنومی در محل مورد مطالعه قرار گرفتند. دو روش استو-آهن هماتوکسیلین و فولجن برای رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها به کار گرفته شد. بر اساس نتایج، رنگ‌آمیزی با فولجن، روش مناسب‌تری برای رنگ‌آمیزی کروموزوم‌های پسته در مقایسه با روش دیگر بود. تعداد کروموزم‌ها در ارقام اوحدی، اکبری، احمدآقایی، نیش کلاغی و خنجری دامغان ۱۵ جفت (۲n=۳۰) در حالیکه ارقام ایتالیایی و قزوینی، واریته وحشی سرخس و گونه‌های خنجوک و بنه دارای ١٤ جفت کروموزوم (۲n=۲۸) بودند. در آزمایش دورگ سازی ژنومی در محل، تابش فلورسنتی که دال بر هیبریداسیون پروب‌های ژنومی خنجوک و بنه با نمونه‌های کروموزومی ارقام اهلی باشد، مشاهده نگردید. عدم مشاهده هیبریداسیون قابل ردیابی می‌تواند ناشی از مشتق شدن این کروموزوم‌ها از رده‌های مختلف باشد.

واژه های کلیدی: *پسته، کروموزوم، استو-آهن هماتوکسیلین، فولجن، دورگ سازی در محل.*

* نویسنده مسئول: مسعود احمدی افزادی تلفن: ۰۹۱۳۱٤۳۵۹۳۷ E-mail: masoud.ahmadi.afzadi@slu.se

مقدمه

پسته (*Pistacia vera*) به عنوان یکی از مهمترین محصولات باغبانی، با دارا بودن خصوصیات مناسب کشت در مناطق کویری (تحمل و ایستادگی در شرایط نامساعد محیطی مانند شوری آب و خاک، کم آبی و دمای بالا) جایگاهی ممتاز در اقتصاد کشور دارد به طوریکه در بین صادرات غیر نفتی مقام دوم و در بین محصولات کشاورزی مقام اول را به خود اختصاص داده است. میزان ارزآوری این محصول ارزشمند، سالانه حدود یک میلیارد و دویست میلیون دلار می‌باشد که این میزان ارز، نقش مهمی را در اقتصاد کشور ایفا می‌کند (Esmaeilipur, 2005).

از نظر گیاهشناسی جنس پسته بر اساس شکل میوه و خصوصیات برگ به ۱۱ گونه تقسیم شده است (Zohary, 1952). در بین این گونه‌ها، تاکنون سه گونه *P. vera* (ارقام اهلی پسته)، *P. atlantica* subsp. *mutica* (بنه) و *P. khinjuk* (کسور یا خنجوک) در ایران شناخته شده‌اند. *P. vera* تنها گونه خوراکی جنس پسته می‌باشد و همچنین در بیش از ۹۹ درصد از باغ‌ها به عنوان پایه استفاده می‌شود. دو گونه دیگر به عنوان گونه‌های وحشی موجود در ایران، بیشتر در نقاط کوهستانی و دامنه‌ها وجود دارند (Padulosi *et al.*, 1998).

کروموزوم‌های سلول‌های موجود زنده حاوی اطلاعات ژنتیکی بوده که از طریق وراثت به نتاج منتقل می‌شوند. جهت مطالعه روند تکاملی در گونه‌های نزدیک، می‌توان کروموزوم‌ها را بررسی نمود. روش‌های متعددی جهت مطالعه کروموزوم‌ها در گیاهان وجود دارد و امروزه انواع روش‌های رنگ‌آمیزی و نواربندی کروموزمی و هیبریداسیون در محل جهت مطالعات سیتولوژیکی در علوم زیستی، اصلاح نباتات، اصلاح دام و مهندسی ژنتیک به کار گرفته می‌شوند (Singh, 2003). روش دورگه سازی تابشی در محل (FISH[1]) یک تکنولوژی ژنتیک سلولی-مولکولی نسبتاً جدید است که با استفاده از مواد فلورسنت، پروب‌های DNA، برچسب‌گذاری شده و با کشف یا تایید ژن یا بی‌نظمی‌های کروموزمی که عموماً قابل تحلیل‌تر از روش‌های سیتولوژی معمول است، به کار برده می‌شود و یا برای نمونه‌هایی که تحلیل سیتولوژی رایج برای آنها کاربرد ندارد، می‌تواند استفاده شود. این تکنیک در سلول‌های متافازی و اینترفازی به راحتی قابل استفاده است و در سلول‌های متافازی، برای آزمایش‌های ویژه و فراتر از نتایج سیتوژنتیکی معمول یا برای شناسایی حذف یا اضافه شدن کروموزومی استفاده می‌شود (Arzani, 1996).

دورگه سازی ژنومی در محل (GISH[2]) روشی دیگر به منظور بررسی کرموزوم‌ها می‌باشد. دورگه سازی ژنومی در محل روش تغییر یافته فیش می‌باشد که امکان شناسایی

[1]- Fluorescent In Situ Hybridization
[2]- Genome In Situ Hybridization

کرموزوم‌های والدین مختلف در گیاهان هیبرید را فراهم می‌کند که این کار با نشاندار شدن کروموزوم‌های یک والد و عمل دورگه سازی روی کروموزوم‌های گیاه هیبرید امکان پذیر است. برای اولین بار DNA ژنومی *Secale africanum* نشاندار گردید و روی کروموزوم‌های هیبرید بین *S. africanum* × *Hordeu chilense* به کار برده شد و شناسایی کروموزوم‌های *S. africanum* در گیاه هیبرید موفقیت آمیز بود (Schwarzacher *et al*., 1989). در تحقیق دیگری این روش برای شناسایی کروموزوم‌ها و قطعات کروموزومی بیگانه در گندم استفاده گردید (Schwarzacher *et al*., 1992). تکنیک دورگه سازی ژنومی در محل در تعیین جد اتوتتراپلوئید *Arabidopsis arenosa* (2n=32) استفاده و بر اساس نتایج، گونه *Cardaminopsis carpatica* (2n=16) محتمل‌ترین جد دیپلوئید *Arabidopsis arenosa* معرفی شد (Hoda *et al*., 2004).

علی‌رغم اینکه مطالعات کروموزومی می‌تواند در بررسی‌های فیلوژنتیک و تاکسونومی گیاهان مفید باشد، مطالعات کروموزومی محدودی روی پسته انجام گرفته است. در اولین تحقیق توسط Zohary (1952)، تعداد کروموزوم‌های *P. vera*، *P. atlantica* و *P. lentiscus* به ترتیب ٢n=٣٠، ٢n=٢٨ و ٢n=٢٤ بیان گردید. در مطالعه‌ای دیگر توسط Ila *et al*. (2003) تعداد ٢n=٣٠ کروموزوم برای چهار گونه *P. atlantica*، *P. eurycarpa*، *P. terebinthus* و *P. vera* گزارش گردید. مطالعه Fasihi Harandi (1996) در رابطه با شمارش کروموزوم‌ها در پسته تنها مطالعه انجام شده در ایران می‌باشد که تعداد کروموزوم‌های *P. vera*، *P. khinjuk* و *P. atlantica* را به ترتیب ٢n = ٣٠، ٢n =٢٤ و ٢n = ٢٨ گزارش کرده است. با توجه به محدود بودن مطالعات کروموزومی و وجود تناقض‌هایی در مورد تعداد کروموزم‌ها، بررسی مجدد گونه‌های پسته در این خصوص ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق گونه‌های مهم پسته موجود در ایران شامل *P. khinjuk*، *P. atlantica* subsp *mutica* و *P. vera*، با استفاده از روش‌های کلاسیک رنگ‌آمیزی کروموزوم و روش دورگ سازی ژنومی در محل مورد مطالعه قرار گرفتند تا ضمن رفع تناقضات مطالعات قبلی، امکان استفاده از تکنیک دورگه سازی در محل در این گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

مواد گیاهی از موسسه تحقیقات پسته کشور واقع در رفسنجان تهیه گردید که شامل *P. vera* (اکبری، ایتالیایی، قزوینی، نیش کلاغی، احمد آقایی، خنجری دامغان، سرخس و اوحدی)، گونه وحشی خنجوک و زیر گونه بنه بودند. این تحقیق در دو آزمایش جداگانه شامل رنگ‌آمیزی و شمارش کروموزوم‌ها (با استفاده از دو رنگ استو-آهن هماتوکسیلین[1] و فولجن[2]) و بهینه

[1]-Aceto-Iron Haematoxylin
[2]- Feulgen

سازی روش دورگ سازی ژنومی در محل انجام پذیرفت.

آزمایش اول: رنگ‌آمیزی با استو-آهن هماتوکسیلین مطابق با روش Aghayev (1998) با ایجاد اندکی تغییرات انجام شد. در مراحل پیش تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی فاکتورهای متعددی بررسی گردید. در این آزمایش اندازه‌های متفاوت ریشه (یک تا شش سانتی متر)، پیش تیمارهای آب یخ و آلفا برومونفتالین طی مدت زمان ۵-٤ ساعت، و سه مدت زمان ۸، ۱۰ و ۱۲ دقیقه جهت هیدرولیز با محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال در دمای ٦۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. به طور خلاصه، بعد از پیش تیمار، ریشه‌ها جهت شستشو به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر سرد قرار گرفتند. سپس جهت عمل تثبیت به محلول لیوتیسکی منتقل و به مدت ۳٦ ساعت در یخچال نگهداری شدند. بعد از قرار دادن ریشه‌ها در آب مقطر به مدت سه ساعت به محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال جهت هیدرولیز منتقل گردید. سپس ریشه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر شستشو و متعاقباً رنگ‌آمیزی به مدت ۱۵ ساعت در استو-آهن هماتوکسیلین انجام شد. بعد از رنگ‌آمیزی مانند مراحل قبل ریشه‌ها با آب مقطر شستشو داده شده و اسلاید تهیه گردید و به وسیله میکروسکوپ مجهز به دوربین مشاهده و بررسی شدند و در نهایت از نمونه‌های کروموزومی مناسب، عکس تهیه شد (Singh, 2003).

در روش رنگ‌آمیزی با فولجن پیش تیمار آلفا برومونفتالین و آب یخ هر کدام طی مدت زمان های ٤، ۵ و ۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. جهت عمل تثبیت محلول اتانول و اسید استیک با نسبت حجمی سه به یک به مدت ۳۰ دقیقه، ۳ ساعت، ۵ ساعت، ۱۲و ۲٤ ساعت استفاده شد. سپس ریشه‌ها بعد از شستشو با آب مقطر جهت انجام هیدرولیز به محلول اسید کلریدریک یک نرمال منتقل شدند. مدت زمان هیدرولیز ۱۵ تا ۳۰ دقیقه با دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان هیدرولیز ۲۸ تا ۳۲ دقیقه با دمای ٦۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت. ریشه‌ها پس از عمل هیدرولیز با محلول فولجن رنگ‌آمیزی شدند. در مطالعه حاضر غلظت ۰/۰٤، ۰/۰۵ و ۰/۰٦ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر رنگ در مدت زمان ۱۲ ساعت و ۲٤ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت از نمونه‌ها اسلاید تهیه و با میکروسکوپ مشاهده گردید.

آزمایش دوم: DNA به روش CTAB مطابق با تغییرات استفاده شده در تحقیق Mirzaei *et al.* (2006) استخراج گردید. جهت نشاندار کردن کاوشگر از روش ترمیم شکاف با دو حالت نشانگرهای مستقیم و غیر مستقیم استفاده گردید (Schwarzacher *et al.*, 2000). در روش استفاده از نشانگر مستقیم DNA ژنومی استخراج شده از گونه‌های بنه و خنجوک با استفاده از Fluorescein-12-dUTP (Fermentase life science) نشاندار گردید. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش (جدول ۱)،

مخلوط واکنش در دمای ١٥ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت نگهداری گردید. سپس به منظور غیر فعال کردن آنزیم و توقف واکنش دو میکرولیتر از محلول EDTA نیم مولار (pH=٨) به واکنش اضافه و به مدت پنج تا ١٠ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در روش استفاده از نشانگر غیر مستقیم DNA ژنومی گونه‌های بنه و خنجوک با استفاده از کیت ترمیم شکاف (Roche, Germany) طبق دستورالعمل کیت نشاندار گردید.

پس از انجام واکنش ترمیم شکاف دو میکرولیتر بافر بارگذاری به ٣ میکرولیتر از نمونه واکنش اضافه شد. مخلوط حاصل روی ژل ١ درصد آگارز بارگذاری گردید. در روش مستقیم جهت مشاهده باند فلورسنت، قبل از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ژل‌داک از ژل عکسبرداری گردید. پس از آن ژل به مدت ٣٠ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد و بعد از دو مرتبه شستشو ژل با آب مقطر به دستگاه ژل‌داک منتقل و از آن تصویر گرفته شد. در روش غیر مستقیم از آنجائیکه هنوز هیچ ترکیب فلورسنتی در کاوشگر نمی‌باشد ابتدا توسط اتیدیوم بروماید به مدت ٣٠ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و بعد از شستشو با آب مقطر و انتقال به دستگاه ژل‌داک در زیر نور UV از ژل عکسبرداری شد.

جدول ١- مواد و بافرهای مورد استفاده در نشان دار کردن کاوشگر به روش مستقیم.

Table 1- Compounds and their concentrations for direct labeling of probe.

مقدار در واکنش (میکرولیتر) Volume (µl)	غلظت پایه Concentration	اجزای واکنش Reagent
5	10 X	بافر واکنش Reaction buffer
2.5		مخلوط نوکلئوتیدی dNTPs
2	1 mM	Fluorescein-12-dUTP
2	0.002 u/µl	DNase I
2	10 u/µl	DNA polymerase I, *E. coli*
2	500 ng/µl	DNA
34.5		آب دوبار تقطیر استریل ddH_2O
50		جمع Total

بعد از نشاندار شدن کاوشگر، DNA نشاندار شده برای حذف نوکلئوتیدهای آزاد، آنزیم‌ها و نمک‌ها با اتانول رسوب داده شد و سپس کاوشگر در حجم کمی از آب دوبار تقطیر استریل حل گردید. جهت رسوب کاوشگر، ۰/۱ حجم واکنش از استات سدیم سه مولار (۵/۲ = pH) و سه برابر حجم واکنش، اتانول خالص (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) به نمونه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها جهت رسوب کاوشگر به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در ادامه فاز مایع رویی خالی شده و پلت رسوب یافته (کاوشگر) با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از سانتریفیوژ در مجاورت هوا خشک گردید. در نهایت پلت در ۲۰ میکرولیتر (روش غیر مستقیم) یا ۵۰ میکرولیتر (روش مستقیم) آب دو بار تقطیر استریل حل و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (Schwarzacher *et al*., 2000).

تهیه نمونه‌های کروموزومی

بذر رقم‌های مورد استفاده به مدت ۷ تا ۱۰ روز تا حصول ریشه‌هایی با طول ۳ تا ۵ سانتی متر کشت داده شدند. ریشه‌های جدا شده از بذر هر رقم جداگانه در بطری‌های حاوی آب مقطر سرد قرار داده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در یخچال نگهداری گردید. مرحله تثبیت با قرار دادن ریشه‌ها در محلول تثبیت (سه قسمت اتانول یک قسمت اسید استیک) به مدت ۲٤ ساعت انجام گردید. از آنجائیکه برای آزمایشات هیبریداسیون در محل با کاوشگرهای فلورسنتی هیدرولیز با اسید کلریدریک مناسب نمی‌باشد از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز جهت نرم نمودن بافت‌ها و تهیه نمونه‌های عاری از سیتوپلاسم استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها پس از مرحله تثبیت به مدت پنج تا ده دقیقه در بافر آنزیم (1X) قرار گرفتند (Thomas *et al*., 2004). سپس نمونه‌ها به محلول آنزیمی ۲ درصد سلولاز (w/v) و ۲۰ درصد پکتیناز (w/v) منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. مدت زمان ۲۰ دقیقه بعد از بررسی‌های متعدد بهترین زمان جهت هضم آنزیمی شناخته شد. پس از آن نمونه‌ها مجدداً در بافر آنزیم (1X) به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند و از آنها لام تهیه و توسط میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی و لام‌های با وضعیت پخش مناسب کروموزومی انتخاب گردیدند. اسلایدهای منتخب به مدت ۳۰ ثانیه در ازت مایع غوطه‌ور شدند و بلافاصله لامل با استفاده از یک تیغ و با زاویه مناسب حذف گردید. لام‌ها در جار حاوی الکل خالص به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس در دمای اتاق خشک شدند. به لام‌های مورد بررسی، ۲۰۰ میکرولیتر RNase A (100 µg/ml) اضافه گردید و توسط لامل پلاستیکی، محدوده حاوی سلول‌های ریشه پوشانده و لام‌ها درون محفظه مرطوب در دمای

۳۷°C به مدت ٤٥ دقیقه داخل بن ماری قرار داده شدند. سپس پوشش پلاستیکی لام‌ها با احتیاط برداشته و شستشوی لام‌ها دو تا سه مرتبه در جار حاوی 2X SSC صورت پذیرفت. پس از آن لام‌ها در جار حاوی اسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس لام‌ها خارج و مایع اضافی حذف و فوراً ۲۰۰ میکرولیتر محلول پپسین µg/ml ۱۰ روی محدوده مشخص لام‌ها اضافه شد. محدوده سلول‌ها با لامل پلاستیکی پوشانده و لام‌ها درون محفظه مرطوب منتقل و داخل بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. سپس لامل پلاستیکی روی لام‌ها حذف و لام‌ها به مدت ۱ دقیقه در جار حاوی آب مقطر استریل جهت توقف واکنش قرار گرفتند. در ادامه لام‌ها ۲ مرتبه در جار حاوی 2X SSC هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو و سپس در تثبیت کننده پارافرم‌آلدئید چهار درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. در ادامه شستشوی لام‌ها ۳ مرتبه در جار حاوی 2X SSC و هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. سپس لام‌ها در اتانول ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و هر بار به مدت ۳ دقیقه آبگیری و در دمای اتاق خشک شدند. در این مرحله لام‌ها توسط میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی و لام‌های با کیفیت مناسب کروموزومی انتخاب شدند. در ادامه لام‌ها به مدت دو دقیقه در جار حاوی فرم آمید ۷۰ درصد در 2X SSC در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و بلافاصله محلول داخل جار خالی و با اتانول ۷۰ درصد (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) به مدت پنج دقیقه، اتانول ۹۵ درصد (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) و اتانول ۱۰۰ درصد (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) به مدت سه دقیقه جایگزین شد. در نهایت لام‌ها در دمای اتاق خشک گردیده و آماده واکنش هیبریداسیون شدند.

واکنش هیبریداسیون

تهیه محلول هیبریداسیون برای ٤ لام مطابق با جدول ۲ انجام گردید. محلول هیبریداسیون برای هر دو حالت تهیه کاوشگر یکسان و فقط مقادیر آب و کاوشگر بر حسب غلظت کاوشگر متفاوت بود. غلظت کاوشگر در حالت مستقیم ۲۰ و در حالت غیر مستقیم ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر بود. در آزمایشات هیبریداسیون در محل به منظور افزایش دقت و هیبرید شدن صحیح کاوشگر به محل خاص خود از DNA بلاک کننده استفاده می‌شود که معمولاً غلظت آن ۱۰ تا ۳۰ برابر غلظت کاوشگر می‌باشد (Schwarzacher *et al*., 2000). در این مطالعه زمانی که DNA خنجوک به عنوان کاوشگر استفاده می‌شد DNA بنه به عنوان بلاک کننده به کار می‌رفت و زمانی که DNA بنه به عنوان کاوشگر استفاده می‌شد DNA خنجوک به عنوان بلاک کننده به کار گرفته می‌شد. بهترین اندازه برای DNA بلاک کننده ۵۰ تا ۳۰۰ جفت باز می‌باشد که با اتوکلاو کردن دی ان ای بلاک کننده به مدت ۵ دقیقه حاصل شد.

جدول ۲- غلظت مواد و بافرهای مورد استفاده در مخلوط هیبریداسیون **برای ٤ لام.**

Table 2- Reagents and buffers concentration in hybridization reaction for 4 lams.

اجزای واکنش Reagent	غلظت پایه Stock concentration	غلظت نهایی Final concentration	مقدار برای چهار لام (µl) Volume for 4 lams (µl)
آب دوبار تقطیر استریل ddH_2O			10 (15)
فرم آمید Formaldehyde	100 %	50 %	60
SSC	20 X	1.5 X	9
دکستران سولفات Dextran Sulfate	50 %	10 %	24
DNA سالمون تست Salmon test DNA	10 µg/µl	167 ng/µl	2
DNA بلاک کننده Blocking DNA	500 ng/µl	3.5 µg	7
کاوشگر Probe	20 (50) ng/µl	160 (150) ng	8 (3)
جمع Total			120

محلول هیبریداسیون مطابق جدول ۲ با حجم نهایی ۱۲۰ میکرولیتر برای ٤ لام آماده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۷۰°C نگهداری شد و پس از آن بر روی یخ قرار گرفت. ۳۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده به هر لام اضافه و روی آن با لامل پلاستیکی پوشانده شد. لام‌ها به محفظه مرطوب منتقل و داخل بن ماری در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند تا در صورتی که اگر عمل واسرشت‌سازی در مراحل قبل (قرار دادن لام‌ها در فرم آمید ۷۰ درصد و جوشاندن محلول هیبریداسیون) به خوبی انجام نشده باشد، تکمیل گردد. سپس لام‌های مورد بررسی تا رسیدن به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد سرد شدند و به مدت ١٦ تا ۲۰ ساعت در این دما، داخل محفظه مرطوب و داخل بن ماری نگهداری شدند. جهت برداشتن لامل پلاستیکی، ابتدا لام‌ها داخل جار حاوی 2X SSC با دمای ٤۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه قرار گرفته و لامل حذف شد. پس از آن لام‌ها دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه

داخل بافر 2X SSC با دمای ٤٢ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از خالی کردن این محلول، لام‌ها داخل محلول فرم‌آمید ٥٠ درصد در 2X SSC به مدت ٥ دقیقه در دمای ٤٢ درجه سانتیگراد منتقل و پس از آن لام‌ها به مدت ٥ دقیقه در محلول 0.1 X SSC در دمای ٤٢ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از خالی کردن این محلول، لام‌ها به محلول 2 X SSC منتقل و ٢ مرتبه و هر بار ٣ دقیقه در دمای ٤٢ درجه سانتیگراد داخل بن ماری قرار گرفتند. در نهایت لام‌ها در داخل جار از بن ماری خارج به مدت ٥ تا ١٥ دقیقه در دمای اتاق سرد شدند.

کلیه مراحل انجام شده جهت تهیه کاوشگر با روش مستقیم و غیر مستقیم تاکنون یکسان بود. ادامه روش برای تهیه کاوشگر به روش مستقیم و غیر مستقیم به صورت زیر می‌باشد.

در روش مستقیم با خارج کردن لام‌ها از جار، اجازه داده شد تا بافر اضافی آن حذف شود. سپس ٤٥ میکرولیتر از رنگ DAPI را در یک مکان تاریک روی محل قرار گرفتن سلول‌ها در هر لام ریخته و با لامل پلاستیکی پوشانده و به مدت ١٠ دقیقه در همان مکان قرار داده شدند. پس از آن پوشش پلاستیکی لام‌ها حذف و در محلول بافر Mcllvaine (pH=٧) به مدت ٢ دقیقه قرار گرفتند. بعد از خالی کردن این محلول، لامل بر روی ناحیه حاوی سلول‌ها قرار گرفت. بدین ترتیب لام‌ها برای بررسی با میکروسکوپ فلورسنت تهیه شدند. در روش غیر مستقیم لام‌ها به مدت ٥ دقیقه در بافر آشکارسازی[١] در دمای اتاق نگهداری و بلافاصله به مدت ٥ دقیقه به بافر بلاک کننده[٢] در دمای اتاق منتقل شدند. سپس ٥٠ میکرولیتر از محلول آشکارسازی[٣] به هر لام اضافه و روی آن با لامل پوشانده شد و به مدت ١ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد، درون محفظه مرطوب داخل بن ماری نگهداری شدند.

سپس لامل برداشته شده و لام‌ها ٣-٢ بار و هر بار به مدت ١٠ دقیقه در بافر آشکارسازی و در دمای ٤٢ درجه سانتیگراد شستشو داده و در ادامه لام‌ها به مدت ٥ دقیقه در بافر بلاک کننده در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از آن ٥٠ میکرولیتر از محلول Anti avidin FITC به هر لام اضافه و روی آن با لامل پوشانده و به مدت ١ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتیگراد، درون محفظه مرطوب داخل بن ماری نگهداری شدند. جهت برداشتن لامل و انجام شستشو، لام ها ٣-٢ بار و هر بار به مدت ١٠ دقیقه در بافر آشکارسازی و دمای ٤٢ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

در نهایت بافر آشکارسازی خالی و لام‌ها در دمای اتاق و در داخل جار به مدت ٥ دقیقه نگهداری شدند. سپس ٤٥ میکرولیتر از رنگ DAPI را در یک مکان تاریک بر روی محل قرار گرفتن سلول‌ها در هر لام ریخته و لامل را بر روی آن قرار داده و به مدت ١٠ دقیقه در همان مکان قرار داده شدند. پس از آن لامل‌ها با قرار

[١]- Detection Buffer
[٢]- Block Buffer
[٣]- Detection Solution

گرفتن لام‌ها در بافر آشکارسازی به مدت ۲ دقیقه حذف و شستشوی لام‌ها صورت پذیرفت. بعد از خالی کردن این محلول، لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و نهایتاً توسط لامل پوشانده و بوسیله میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

نتایج و بحث

رنگ‌آمیزی با استو-آهن هماتوکسیلین

در این روش رنگ‌آمیزی با دو پیش تیمار آب یخ و آلفا برمونفتالین نمونه‌های کروموزومی از کیفیت قابل قبولی برخوردار نبودند، زیرا هضم سلولی به خوبی انجام نشده و ریشه‌ها حالت شکنندگی پیدا کردند که در مرحله اسکواش شکنندگی و سفتی ریشه مانع از له شدن مناسب ریشه می‌شد. بررسی‌ها نشان داد که تغییرات زمانی اعمال شده، در نرم شدن بافت و هضم سلولی بی‌تأثیر بوده و رنگ‌آمیزی سلول در چنین شرایطی به خوبی انجام نخواهد گرفت.

رنگ‌آمیزی با فولجن

از آنجایی که نتایج حاصل از روش رنگ‌آمیزی با استو-آهن هماتوکسیلین به طور کلی رضایت بخش نبود روش رنگ‌آمیزی با فولجن مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی ریشه‌هایی با طول یک تا سه سانتی‌متری دارای سلول‌های متافازی بیشتری بودند و مشاهده گردید که پیش تیمار آلفابرومونفتالین در تمامی تکرارهای مورد آزمایش نتیجه رضایت بخشی حاصل نمی‌کند. دلیل این ادعا هم وجود ریشه‌هایی با ظاهری راست، سفت و خشبی بود که اضافه نمودن مدت زمان‌های پیش تیمار، تثبیت و هیدرولیز و هم چنین دما در هنگام هیدرولیز هر چند که در نرم شدن ریشه و اضمحلال سلولی موثر بود اما باعث از بین رفتن کیفیت سلول و در نهایت نابودی کروموزوم‌ها شد.

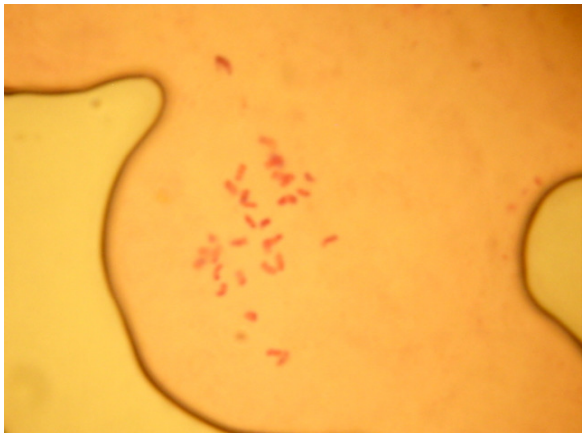
بنابراین در آزمایشی دیگر پیش تیمار آب یخ به مدت ٤ تا ٥ ساعت و ٢٤ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که بهترین نتیجه با پیش تیمار آب یخ در مدت زمان ٢٤ ساعت، تثبیت بوسیله محلول اتانول:اسید استیک به نسبت سه به یک در مدت زمان ٢٤ ساعت و هیدرولیز در دمای ٦٥ درجه سانتیگراد به مدت ٢٤ دقیقه یا دمای ٦٠ درجه سانتیگراد به مدت ٢٩ دقیقه بدست آمد. در بررسی غلظت رنگ مقدار ٠/٠٤، ٠/٠٥ و ٠/٠٦ گرم رنگ مورد بررسی قرار گرفت که مقدار ٠/٠٥ گرم و مدت زمان ٢٤ ساعت به عنوان بهترین غلظت رنگ انتخاب شد.

شمارش کروموزوم‌ها

پنج رقم اوحدی، اکبری، احمدآقایی، نیش کلاغی و خنجری دارای ١٥ جفت کروموزوم (٢n=٣٠) بودند در حالیکه ارقام ایتالیایی و قزوینی به همراه واریته وحشی سرخس که نیز متعلق به گونه *P. vera* می‌باشند، دارای ١٤ جفت کروموزوم (٢n=٢٨) بودند. بطور کلی تعداد کروموزوم‌ها در بیشتر ارقام مورد مطالعه گونه *P.*

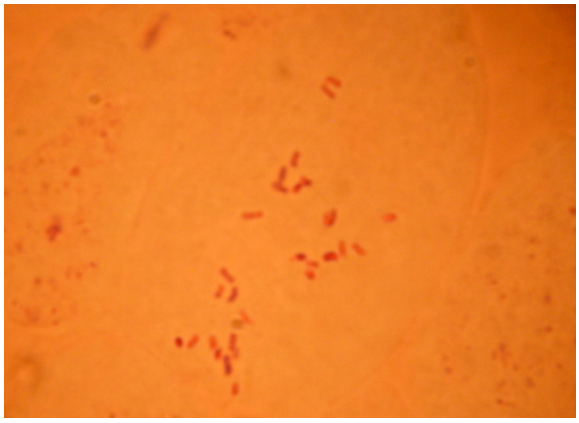
vera معادل ۲n=۳۰ بدست آمد که مطابق با گزارش‌های Zohary (1952)، Ila *et al.* (2003)، Ghaffari (2002) و Fasihi Harandi (1996) می‌باشد. گونه خنجوک دارای ١٤ جفت کروموزوم (۲n=۲۸) بود در حالیکه پیش از این Ghaffari (2002) و Fasihi Harandi (1996) تعداد کروموزوم‌های آن را ۲n=۲٤ گزارش کرده‌اند. در این مطالعه تعداد کروموزوم‌های بنه ۲n=۲۸ به دست آمد که مطابق با نتایج گزارش Zohary (1952)، Ghaffari (2002) و Fasihi Harandi (1996) می‌باشد. در حالیکه Ila *et al.* (2003) تعداد را ۲n =۳۰ گزارش نمودند.

در تحقیق حاضر تعداد کروموزوم‌های تعدادی از ارقام پسته مورد بررسی قرار گرفته است و تعداد کروموزوم‌های ارقام ایتالیایی و قزوینی و واریته وحشی سرخس را ۲n=۲۸ گزارش می‌کند. در حالیکه پیش از این Ghaffari (2002) و Fasihi Harandi (1996) تعداد کروموزوم‌های واریته سرخس را ۲n=۳۰ گزارش کرده بودند. چنین به نظر می‌رسد که دو رقم ایتالیایی و قزوینی و واریته سرخس آنیوپلوئیدهایی پایدار از گونه *P. vera* باشند. در مطالعه‌ای که توسط Mirzaei *et al.* (2006) روی خویشاوندی گونه‌های پسته موجود در ایران و تعدادی از ارقام در سطح مولکولی انجام شد رقم ایتالیایی با سرخس در یک گروه مجزا و حد فاصل بنه و ارقام اهلی قرار گرفت. علت دیگر در تفاوت‌های گزارش شده در تعداد کروموزوم‌های پسته می‌تواند ناشی از اندازه بسیار کوچک کروموزوم‌ها در جنس پسته و عدم تشخیص صحیح نمونه مورد مطالعه باشد. به طور کلی به دلیل کوچکی کروموزوم‌ها و عدم وضوح ناحیه سانترومری امکان تهیه کاریوتایپ مناسب از کروموزوم‌ها وجود ندارد. کروموزوم‌های متافازی میتوز گونه‌ها و ارقام مورد مطالعه در اشکال ۱ تا ۵ نمایش داده شده است.



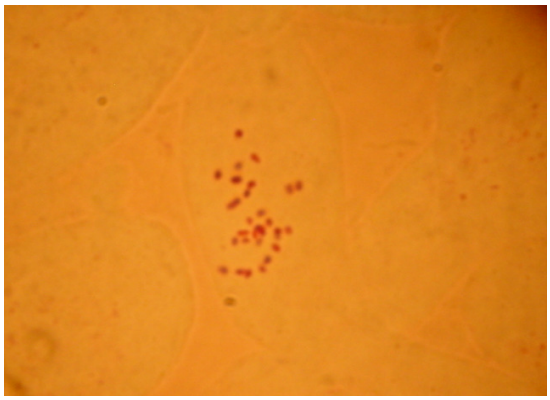
شکل۱- متافاز میتوز در رقم اکبری با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

Figure 1- Metaphase (mitosis) in 'Akbari' (100 X).



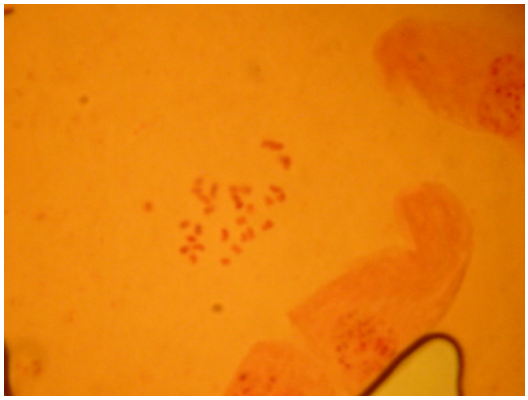
شکل۲- متافاز میتوز در رقم قزوینی با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

Figure 2- Metaphase (mitosis) in 'Ghazvini' (100 X).



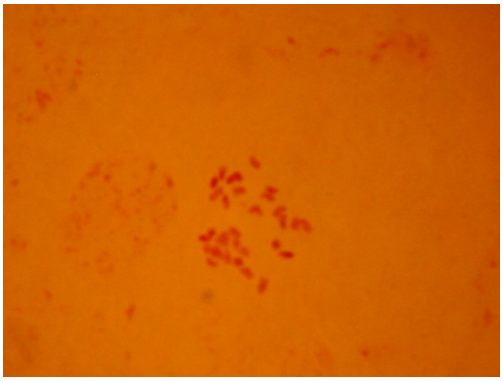
شکل۳- متافاز میتوز در رقم ایتالیایی با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

Figure 3- Metaphase (mitosis) in 'Italiaii' (100 X).



شکل ٤- متافاز میتوز در *P. atlantica* subsp. *mutica* با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

Figure 4- Metaphase (mitosis) in *P. atlantica* subsp. *mutica* (100 X).



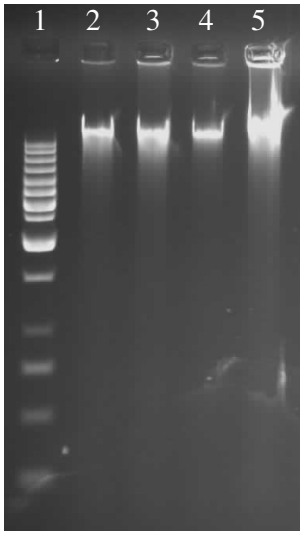
شکل۵- متافاز میتوز در *P. khinjuk* با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

Figure 5- Metaphase (mitosis) in *P. khinjuk* (100 X).

نتایج آزمایش دوم

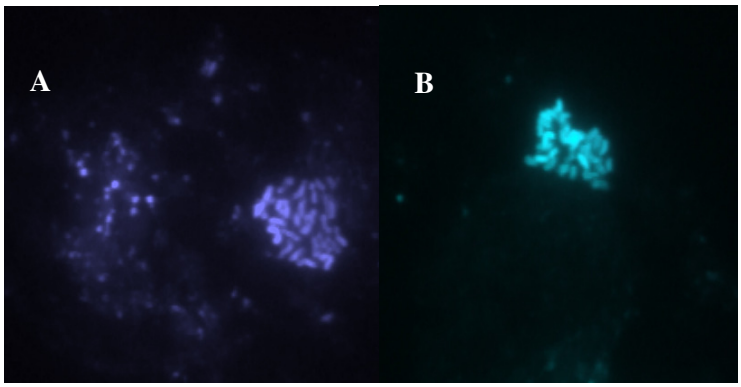
میزان DNA استخراج شده در این روش بیش از ۱۰۰ میکروگرم در یگ گرم برگ بود (شکل ٦). نشاندار کردن کاوشگر با هر دو روش مستقیم و غیر مستقیم نیز با موفقیت انجام شد. در این تحقیق ابتدا از پروب تهیه شده به روش مستقیم برای انجام واکنش GISH استفاده شد. بدین صورت که یک مرتبه DNA خنجوک به عنوان پروب نشاندار گردید و در واکنش هیبریداسیون روی نمونه‌های کروموزومی واریته وحشی سرخس و سایر ارقام مورد مطالعه استفاده شد. در این حالت DNA بنه به عنوان بلاک کننده استفاده گردید. در مرتبه دوم DNA بنه به عنوان پروب و DNA خنجوک به عنوان بلاک کننده در واکنش هیبریداسیون روی نمونه‌های کروموزومی واریته وحشی سرخس و سایر ارقام مورد مطالعه استفاده گردید. از آنجائیکه در این حالت هیچ سیگنالی مبنی بر هیبریداسیون ردیابی نگردید، این احتمال وجود دارد که سیگنال ایجاد شده توسط پروب، ضعیف بوده و امکان ردیابی آن وجود نداشته است. لذا تهیه پروب به روش غیر مستقیم مد نظر قرار گرفت (در این حالت امکان تکثیر و تقویت سیگنال وجود دارد). در این مطالعه از بیوتین استفاده شد. در این حالت بیوتین یک مرتبه توسط آویدین فلورسنت شده ردیابی می‌شد و برای تقویت سیگنال از آنتی آویدین فلورسنت شده استفاده گردید تا شدت سیگنال ایجاد شده در صورت هیبریداسیون را افزایش دهد. در این حالت نیز سیگنالی که دال بر هیبریداسیون پروب با نمونه‌های کروموزومی مورد مطالعه باشد مشاهده نگردید (اشکال ۷ و ۸). عدم مشاهده هیبریداسیون قابل ردیابی از پروب ژنومی خنجوک و بنه می‌تواند ناشی از مشتق شدن این کروموزوم‌ها از رده‌های مختلف باشد. Raina *et al.* (1998) نیز عدم مشاهده سیگنال هیبریداسیون در زمان استفاده از پروب ژنومی *Coffea liberica* بر روی *Coffea arabica* را به دلیل اشتقاق این کروموزوم‌ها از رده های مختلف نسبت دادند.

با توجه به اینکه ایران از مناطقی است که به عنوان خاستگاه احتمالی پسته محسوب می‌شود توصیه می‌شود برای مطالعات سیتوژنتیک در پسته با توجه به داشتن کروموزوم‌های بسیار کوچک از تکنیک‌های دقیق تر مانند microdissection و تهیه کتابخانه کروموزومی استفاده شود. همچنین برای تهیه کاریوتایپی مناسب و قابل قبول از پروب‌های خاص نواحی سانترومری و تلومری استفاده گردد.



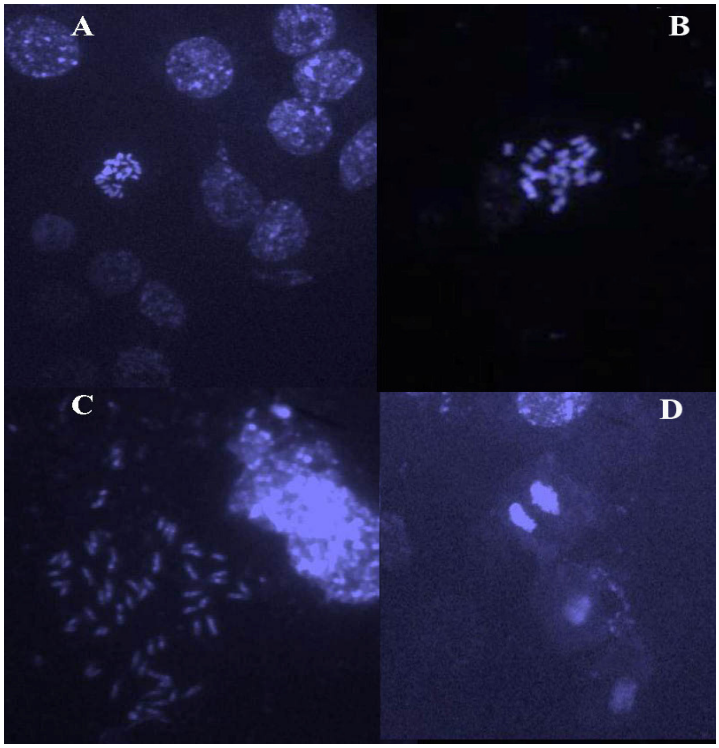
شکل ٦- DNA استخراج شده از نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد ۱- نشانگر 1Kb ۲- *P. khinjuk* ۳- *P. atlantica* subsp. *mutica* ٤- سرخس ٥- اوحدی.

Figure 6- Extracted DNA on agarose gel (0.8 %). 1- Ladder 1kb, 2- *P. khinjuk*, 3- *P. atlantica* subsp. *mutica*, 4- 'Sarakhs', 5- 'Ohadi'.



شکل ۷- کروموزوم‌های متافازی رقم قزوینی بعد از واکنش GISH با پروب ژنومی خنجوک (A) روش مستقیم؛ (B) روش غیر مستقیم.

Figure 7- Metaphase chromosomes of 'Ghazvini' after GISH hybridization with *P. khinjuk* probes; (A) Direct and (B) Indirect method.



شکل ٨- کروموزوم‌های متافازی واریته سرخس بعد از واکنش GISH با پروب ژنومی خنجوک (A) روش مستقیم؛ (B) روش غیر مستقیم؛ (C) کروموزوم‌های متافازی واریته سرخس بعد از واکنش GISH با پروب ژنومی بنه به روش غیر مستقیم؛ (D) آنافاز میتوز در واریته سرخس بعد از واکنش GISH.

Figure 8- Metaphase chromosomes of 'Sarakhs' after GISH hybridization with *P. khinjuk* probes; (A) Direct and (B) Indirect method; (C) Metaphase chromosomes of 'Sarakhs' after GISH hybridization with *P. atlantica* subsp. *mutica* probes with indirect method; (D) Anaphase of 'Sarakhs' after GISH hybridization.

منابع

Agayev YM (1998). Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. Proc. of the Forth Iranian Congress on Crop Production and Breeding Sciences, Aug. 25-27 1998. Isfahan University of Technology, Isfahan. pp. 1-20.

Arzani A (1996). Guide to genetic and cytogenetic Lab. Ardakan Esfahan publishers, Iran (in Persian).

Singh RJ (2003). Plant cytogenetics. Boca Raton, Fla., CRC Press.

Esmaeilipur A (2005). Characteristics and traits of some Iranian cultivars of pistachio. Pistachio Research Institute Publishers, Rafsanjan, Iran (in Persian).

Fasihi Harandi H (1996). Genetic analysis of wild and native Iranian pistachio. M.Sc. thesis. Azad University of Karaj, Iran (in Persian).

Ghaffari SM, Fasihi Harandi O (2002). Chromosome counts and assessment of two heterochromatic chromosomes in some species of *Pistacia* L. from Iran. Acta Horticulture 591: 389-393.

Hoda BMA, Lysak MA, Schubert I (2004). Genomic in situ hybridization in plant with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific Arabidopsis Hybrids. Genome 47: 954-960.

Ila HB, Kafkas S, Topaktas M (2003). Chromosome numbers of four *Pistacia* (Anacardiaceae) species. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78: 35-38.

Mirzaei S, Bahar M, Sharifnabi B (2006). A phylogenetic study of Iranian pistachio (*Pistacia vera*) based on RAPD markers. Acta Horticulture 726: 39-43.

Padulosi S, Caruso T, Barone E, Van Mele P, Kaska N (1998). IPGRI'S initiative for the promotion of better conservation and use of *Pistacia* spp. genetic resources. Acta Hortulture 470: 138-142.

Raina SN, Mukai Y, Yamamoto M (1998). In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). Theoretical and Applied Genetics 97: 1204-1209.

Schwarzacher T, Heslop-Harrison J (2000). Practical in situ hybridization. Oxford, UK, BIOS.

Schwarzacher T, Anamthawat-Jónsson K, Harrison GE, Islam AKMR, Jia JZ, King IP, Leitch AR, Miller TE, Reader SM, Rogers WJ, Shi M, Heslop-Harrison JS (1992). Genomic in situ hybridization to identify alien chromosomes and chromosome segments in wheat. Theoretical and Applied Genetics 84: 778-786.

Schwarzacher T, Leitch AR, Bennett MD, Heslop-Harrison JS (1989). In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. Annals of Botany 64: 315-324.

Thomas, H M, Morgan WG, Meredith MR, Humphreys MW, Leggett JM (1994). Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* × *Festuca pratensis* by genomic in situ hybridization. Theoretical and Applied Genetics 88: 909-913.

Zohary M (1952). A monographical study of the genus *Pistacia*. Palestine Journal of Botany, Jerusalem Series 5: 187-228.

Cytogenetic study and optimization of genome in situ hybridization (GISH) method in *Pistacia spp.*

Mirzaei S.[1], Shahsavand Hasani H.[2], Rameshi N.[3], Ghasemkhani M.[4], Ahmadi-Afzadi M.[*4]

[1]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
[2]Associated Professor of College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[3]BS graduated student, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[4]PhD student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.

Abstract

Pistachio (*Pistacia vera*) is one of the most important horticultural products in the world known by the name of Iran. Moreover, Iran has the richest germplasm of pistachio due to the origin of pistachio and the existence of large numbers of commercial pistachio cultivars. Nevertheless, few chromosomal studies in pistachio have been yet reported and they however showed contradicting results on the number of chromosomes. In the present study, different pistachio species including *P. vera,* and wild species, i.e., *Pistacia khinjuk* and *P. atlantica* subsp. *mutica* were studied by classical chromosome staining and GISH technique. In order to stain chromosomes, two methods of aceto-iron-haematoxylin and Feulgen were used. Results indicated that the best staining was achieved by Feulgen compared with another method. Chromosome numbers of 'Ohadi', 'Akbary', 'Ahmad-Aghaei', 'Nish-Kelaghi' and 'Khanjary' were 2n=30 while chromosome numbers of 'Italiaei', 'Ghazvini' and 'Sarakhs' wild variety were 2n=28. Chromosome numbers of both *P. khinjuk* and *P. atlantica* subsp. *mutica* were 2n=28. In GISH experiment, no signal of hybridization of *P. khinjuk* and *P. atlantica* subsp *mutica* genomic probes were detected on *P. vera* chromosomes. This lack of detectable hybridization sites may however indicate that these chromosomes are probably originated from different taxa.

Keywords: *Pistachio, Chromosome, Aceto-iron haematoxylin, Feulgen, GISH.*

[*] Corresponding Author: Ahmadi-Afzadi M. Tel: 09131435937 E-mail: masoud.ahmadi.afzadi@slu.se