بررسی مطالعات سیتوژنتیک مولکولی در شناسایی کروموزوم‌های گونه‌های مختلف رز به همراه کاربرد پروب ۴۵S

سعید دقیقی*[۱]، حسن بیات [۱]، هما حبیبی [۳]
[۱] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند
[۳] کارشناس ارشد علوم باغبانی، دانشگاه بیرجند
*نویسنده مسئول: sdaghighi@birjand.ac.ir

چکیده

رز از جمله گیاهان زینتی مهم در سراسر جهان به‌حساب می‌آید. بیشتر رزها منشأ هیبریدی پیچیده‌ای دارند. سیتوژنتیک کلاسیک تا شروع سال ۱۹۷۰ فقط تکنیک آنالیز کروموزومی بود. اخیراً با پیشرفت تکنیک‌های سیتوژنتیک مثل FISH[۱] و GISH[۲] ، حوزه کاربرد آن‌ها به‌طور گسترده‌ای بهبود یافته و دامنه‌ای از آنالیز کاریوتیپ تا محل‌یابی ژن می‌باشد.در این تحقیق، مریستم شاخه و ریشه ۵ رقم مختلف رز (*Rosa. foetida, Rosa. La france, Rosa. soleil d'or, Rosa. chinensis old Blush, Rosa. wichuraiana* جهت آماده‌سازی کرموزوم‌های مناسب برای تکنیک GISH و FISH جمع‌آوری شدند. مریستم‌های ساقه و ریشه به ترتیب با کلشی‌سین ۰,۱٪ و ۰,۰۵ ٪ تیمار شدند . سپس در فیکساتور اتانول ۷۰درجه و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۱:۳ به مدت شش ساعت نگهداری شد.هضم آنزیمی توسط پکتولیاز و سلولاز به ترتیب به مدت سه و دو ساعت انجام شد . سوسپانسیون سلولی حاصل از مریستم ساقه همراه با ۳ اتانول: ۱ گلاسیال‌استیک‌اسید و سوسپانسیون سلولی مریستم ریشه همراه با یک قطره استیک‌اسید ۴۵٪ روی لام قرار گرفتند و کروموزوم‌ها توسط DAPI رنگ شدند. پروب ۴۵S مورد استفاده در این آزمایش از ژنوم سویا جدا شد. با استفاده از تکنیک FISH یک جفت NOR[۳] در هر رقم قابل‌رؤیت بود ولی با استفاده از تکنیک GISH نتیجه‌ای حاصل نشد. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که گونه‌های *R. soleil d'or* و *R. foetida* تتراپلوئید (۲n=۴x=۲۸)، گونه‌های *R. wichuraiana* و *R. chinensis Old. Blush* دیپلوئید (۲n=۲x=۱۴) و رقم *R. La france* یک تریپلوئید (۲n=۳x=۲۱) است.

کلمات کلیدی: **هیبریداسیون، پلی‌پلوئیدی، FISH، GISH، ۴۵S rDNA**

مقدمه

رز با نام علمی *Rosa sp.* متعلق به خانواده Rosaceae و شامل ۱۵۰ گونه و ۱۰۰۰ رقم می‌باشد و بیشتر آن‌ها منشأ هیبریدی پیچیده‌ای دارند (Fernandez-Romero et al. 2001) در جنس رز پلی‌پلوئیدی مکرراً رخ داده و منبعی از تنوع را برای آن ایجاد کرده است (Joly et al. 2006). تعداد کرموزوم‌های پایه در این جنس n=۷ است و پولپلوئیدها دامنه‌ای از ۲n=۲x=۱۴ تا ۲n=۱۰x=۷۰ می‌باشند (H. Jian et al. 2010). تا شروع سال ۱۹۷۰، سیتوژنتیک کلاسیک شامل آنالیز کروموزوم بر اساس مورفولوژی آن بود، مانند طول بازو کروموزوم، محل فرورفتگی‌های ثانویه، موقعیت سانترومر و تعداد کروموزوم‌ها (Silva et al. 2013). اخیراً با پیشرفت روش‌های سیتوژنتیک مدرن مثل GISH و FISH حوزه کاربرد آن به‌طور گسترده‌ای بهبود یافته و دامنه‌ای از آنالیز کاریوتیپ تا محل‌یابی ژن می‌باشد (Younis et al. 2015). روش GISH ابزاری قدرتمند برای افتراق کروموزوم‌ها از ژنوم‌های والدینی مختلف در گونه‌های آلوپلوئیدی، هیبریدهای درون گونه‌ای و

[1] Fluorescence in situ hybridization
[2] Genomic in situ hybridization
[3] Nucleolar Organizing Region

فرزندان بک‌کراس است و همچنین برای ترسیم بازآرایی کروموزوم‌های درون ژنومی استفاده می‌شود (Ali et al. 2004). FISH نیز ابزار قدرتمندی را برای مطالعه روابط فیلوژنتیک در میان گونه‌ها در یک جنس، شناسایی ژن‌های اگزوژن و کروموزوم‌های همولوگ، ساخت نقشه‌های فیزیکی و بررسی ساختار و ناهنجاری‌های کروموزوم فراهم می‌کند (Ding et al. 2016). همچنین این روش برای شناسایی مکان‌های ژن‌های پرتکرار مثل ژن‌های rRNA، که ترسیم‌شان از طریق روش‌های دیگر مشکل است، ارزشمند است (Leitch et al. 1992). تکنیک FISH و GISH در حال حاضر یک مدل معتبر برای آنالیز کروموزوم‌های فردی، قطعات کروموزومی، یا ژنوم گیاهان هیبرید طبیعی و مصنوعی است که آن را به قابل اعتمادترین تکنیک برای مطالعه آلوپلوئیدها تبدیل کرده است زیرا بیشتر گیاهان پرورشی از طریق هیبریداسیون و پدیده پلی‌پلوئیدی توسعه یافته‌اند(Younis et al. 2015).

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه سیتوژنتیک مولکولی در مرکز تحقیقات فرانسه INHP در سال ۵- ۱۳۹۴انجام شد. شناسایی کروموزوم از نقاطی از گیاه که دارای تقسیمات میتوزی بالایی است، مانند مریستم ساقه و ریشه ، انجام می‌شود. مزیت استفاده از مریستم ریشه نسبت به ساقه در این است که در همه فصول سال وجود دارد اما دسترسی به آن راحت نیست ولی با توجه به اینکه گیاهان مورد برررسی در این مطالعه در گلدان کشت شده بودند، دسترسی به مریستم ریشه آن‌ها راحت بود و مزیت مریستم ساقه نیز در این است که قابل دسترس‌تر بوده اما در همه فصول سال موجود نمی‌باشد. از مریستم ریشه و ساقه ۵ رقم *R. foetida*، *R. wichuraiana*، *R. La france*، *R. CH. Old. Blush* و *R. soleil* d'or کشت شده در گلدان، در این آزمایش استفاده شد.

آماده‌سازی کروموزوم از مریستم ساقه و مریستم ریشه

آماده‌سازی کروموزوم از طریق مریستم ساقه بر اساس مقاله (Fernandez-Romero et al. 2001)انجام شد. حدود ۱ تا ۲ سانتی‌متر از مریستم‌های ریشه با محلول کلشی‌سین ۰٫۰۵٪ به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق و شرایط تاریکی تحت تیمار قرار گرفتند. سپس در محلول تثبیت کننده Carnoy I و در دمای ۴- نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بافر سدیم سیترات ۰٫۰۱ مولار (pH ۴٫۶) قرار گرفتند. هضم آنزیمی نمونه‌ها توسط سلولاز ۱٪ "Onozoka R-10" (Serva) و پکتیناز ۲۰٪ (SIGMA) و سلولاز ۱٪ (Calbiochem) در دمای ۳۷C° در آون به مدت ۲ ساعت صورت گرفت. نمونه‌ها همراه با یک قطره از استیک‌اسید ۴۵٪ روی لام قرار گرفتند و یک لامل بر روی لام‌ها قرار گرفت و با فشار کم، له شدند و سپس فریز شدند. لامل‌ها حذف شدند و نمونه‌ها بعد از تثبیت در Carnoy I ، در اتانول مطلق دهیدراته شده و در معرض هوا خشک شدند و در مرحله کنتراست مورد ارزیابی قرار گرفتند و بهترین لام‌ها در یخ تا زمان استفاده نگهداری شدند (Hasterokl et al. 2002).

FISH و GISH

پروب ۴۵S استفاده شده از ژنوم سویا جدا شده بود و در پلاسمید pGMr1 قرار گرفتند. پروب‌ها توسط nick translation با دیگوکسیژنین-dUTP-11 نشان‌دار شدند و با آنتی داکسیژنین-FITC نمایان شدند (Cabrera et al. 1999).

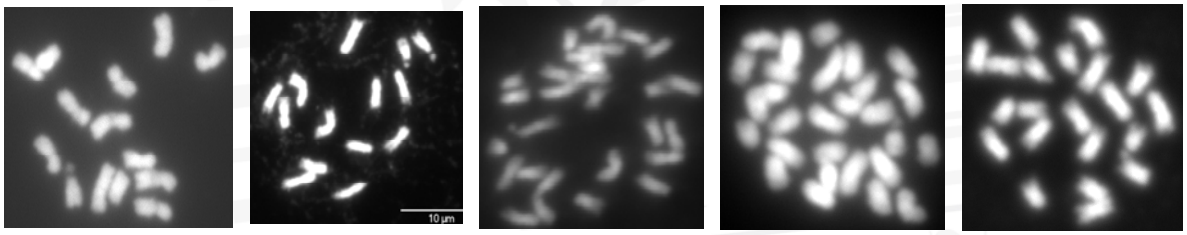
قبل از هیبریداسیون، کروموزوم‌ها با RNase (۱۰۰µg/ml در ۲×SSC) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷C° تیمار شدند و سپس لام‌ها دو مرتبه در ۲×SSC به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق و ۲×SSC به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷C° شسته شدند و متعاقباً با محلول pepsin (۵µg/ml در ۰/۰۱ M HCl) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷C° تیمار شدند. لام‌ها سپس دو مرتبه در ۱×PBS به مدت ۵ دقیقه شسته شدند، پس از تثبیت در فرم‌آلدئید در PBS به مدت ۱۰ دقیقه، در ۱×PBS به مدت ۵ دقیقه شسته شدند و در اتانول ۷۰٪ و ۱۰۰٪ هر کدام به مدت ۳ دقیقه دهیدراته شدند و سپس در معرض هوا خشک شدند. کل DNA ژنومی استخراج شده از برگ‌های جوان به‌وسیله nick-translation با دیگوکسیژنین-11-dUTP (Boehringer Mannheim) نشان‌دار شدند. مخلوط هیبریداسیون شامل ۵۰٪ فرمامید، ۱۰٪ سولفات دکسترانت، ۲×SSC، ۱۰ng از DNA ژنومی نشان‌دار شده با دیگوکسیژنین، ۰/۱ ng از DNA اسپرم ماهی سالمون، µg

۰/۱۴ مخمر tRNA و µg ۰/۰۰۵ گلیکوژن بود. هیبریداسیون در محل و شستشوی پس از هیبریداسیون همان‌طور که قبلاً توسط Cabrera و همکاران (1999) شرح داده شد، انجام شد. برای مشخص کردن DNA ژنومی نشان‌دار شده با دیگوکسیژنین، آنتی دیگوکسیژنین- FITC در PBS استفاده شد و کروموزوم‌ها با DAPI رنگ شدند (González et al. 1999).

نتایج و بحث

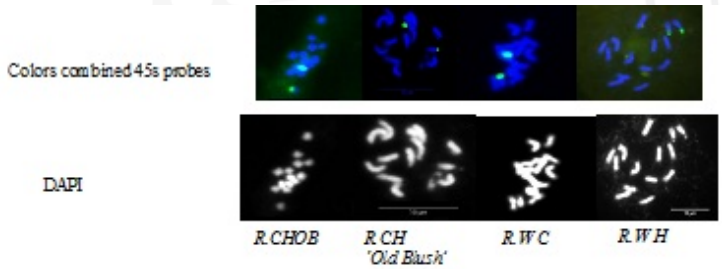
۴۵S rDNA شامل واحدهای تکرارشونده پشت سرهم از ژن‌های ۱۸S-۵,۸S-۲۶S rRNA و جداکننده‌های غیررونویسی شده است، هر واحد به‌طور معمول ۱۰kb در گیاهان طول دارد و مسئول تشکیل مناطق سازمان دهنده هسته (NOR) است (Heslop-Harrison 2000). روش FISH برای گونه‌های متعدد رز بکار برده شده‌است و این بررسی‌ها اطلاعات مفیدی را برای سیر تکاملی و روابط فیلوژنتیکی در میان گونه‌های رز فراهم کرده‌است. این مطالعات نشان داده‌است که بیشتر گونه‌های رز وحشی دیپلوئید هستند و ۲ جایگاه ۴۵S rDNA دارند و گونه‌های پلی‌پلوئیدی که از چنین دیپلوئیدهایی مشتق شده‌اند، جایگاه تکثیرشده rDNA مطابق با ژنوم تکثیرشده‌شان قابل انتظار است. اما در بعضی گیاهان تعداد مکان‌های مشاهده شده از تعداد مورد انتظار بر اساس سطح پلوئید، متفاوت است (Ding et al. 2016)

بر اساس نتایجی که در این بررسی به‌دست آمد، مشخص شد در روش FISH با استفاده از پروب ۴۵S یک جفت NOR در همه گونه‌های مورد بررسی مشاهده شد (عکس ۲) ولی استفاده از روش GISH با شکست مواجه شد. همچنین مشخص شد رقم *La France* یک تریپلوئید (۲n=۳x=۲۱) بود و گونه‌های *R.foetida* و *R.soleil d'or* تتراپلوئید(۲n=۴x=۲۸) ، همچنین گونه‌های *R.CH. Old Blush* و *R.whichuraiana* دیپلوئید (۲n=۲x=۱۴) بودند (عکس ۱). در همه مطالعات نشان داده شده که تقریباً همه گونه‌های دیپلوئید دارای یک جفت مکان ۴۵S rDNA بر روی نقاط سازمان‌دهنده هسته‌ای (NOR) هستند(Ma et al. 1997; Fernandez-Romero et al. 2001; Jian et al. 2012). اما در گونه‌های تریپلوئیدی که مورد بررسی قرار گرفته است ۳ مکان (Fernandez-Romero et al. 2001 Jian et al. 2012; Ding et al. 2016;) و ۴ مکان ۴۵S rDNA مشاهده شد و در بعضی گونه‌های تریپلوئید یک جفت ۴۵S rDNA نیز مشاهده شده است (Ding et al. 2016).



La France 3n =21 | *R.foetida* 4n = 28 | *Soleil d'Or* 4n=28 | *R.CH'OB'* *2n = 14* | *R.WH 2n =14*

عکس ۱- سطوح کروموزومی گونه‌های مختلف رز



عکس ۲- جایگاه‌های ۴۵s rDNA

منابع

Fernandez-Romero, MD, Torres, AM, Millán, T, Cubero, JI, & Cabrera, A. (2001). Physical mapping of ribosomal DNA on several species of the subgenus Rosa. *Theoretical and Applied Genetics, 103*(6-7), 835-838.

Joly, Simon, Starr, Julian R, Lewis, Walter H, & Bruneau, Anne. (2006). Polyploid and hybrid evolution in roses east of the Rocky Mountains. *American Journal of Botany, 93*(3), 412-425.

Jian, Hongying, Zhang, Hao, Tang, Kaixue, Li, Shufa, Wang, Qigang, Zhang, Ting, Qiu, Xianqin, & Yan, Huijun. (2010). Decaploidy in Rosa praelucens Byhouwer (Rosaceae) endemic to Zhongdian Plateau, Yunnan, China. *Caryologia, 63*(2), 162-167.

Silva, GS, & Souza, MM. (2013). Genomic in situ hybridization in plants. *Genet Mol Res, 12*(3), 2953-2965.

Younis, Adnan, Ramzan, Fahad, Hwang, Yoon-Jung, & Lim, Ki-Byung. (2015). FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. *Plant cell reports, 34*(9), 1477-1488.

Ali, Hoda BM, Lysak, Martin A, & Schubert, Ingo. (2004). Genomic in situ hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific Arabidopsis hybrids. *Genome, 47*(5), 954-960.

Ding, X-L, Xu, T-L, Wang, J, Luo, L, Yu, C, Dong, G-M, Pan, H-T, & Zhang, Q-X. (2016). Distribution of 45S rDNA in Modern Rose Cultivars (Rosa hybrida), Rosa rugosa, and Their Interspecific Hybrids Revealed by Fluorescence in situ Hybridization. *Cytogenetic and Genome Research, 149*(3), 226-235.

Leitch, IJ, & Heslop-Harrison, JS. (1992). Physical mapping of the 18S–5.8 S–26S rRNA genes in barley by in situ hybridization. *Genome, 35*(6), 1013-1018.

Heslop-Harrison, JS. (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *The Plant Cell, 12*(5), 617-635.

Hasterokl, Robert, Langdonz, Tim, Taylor, Steve, & Jenkins, Glyn. (2002). Combinatorial labelling of DNA probes enables multicolour fluorescence in situ hybridisation in plants.

Cabrera, A, Ramirez, MC, & Martin, A. (1999). Application of C-banding and fluorescence in situ hybridization for the identification of the trisomics of Hordeum chilense. *Euphytica, 109*(2), 123-129.

González, MJ, & Cabrera, A. (1999). Identification of wheat and tritordeum chromosomes by genomic in situ hybridization using total Hordeum chilense DNA as probe. *Genome, 42*(6), 1194-1200.

Ma, Y, Islam-Faridi, MN, Crane, CF, Ji, Y, Stelly, DM, Price, HJ, & Byrne, DH. (1997). In situ hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes. *Journal of Heredity, 88*(2), 158-161.

Jian, Min, T, Ting, Z, Li, SB, Zhang, H, & Tang, KX. (2012). *Chromosome variation from sect. Chinenses (Rosa L.) through Chinese old garden roses to modern rose cultivars.* Paper presented at the International Conference on Germplasm of Ornamentals 977.

The Role of Molecular Cytogenetic Studies in Identify Chromosomes of Different Cultivar of Roses with Application of 45s Probe

Saeid Daghighi[1]*, Hassan Bayat[1], Homa Habibi[2]
[1] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran
[2] M.Sc. Horticultural Science, Birjand University
[*]*Corresponding Author: sdaghighi@birjand.ac.ir*

Abstract

Rose is considered one of the most important ornamental plants across the world. Until the beginning of the 1970s, classical cytogenetic was the only way to chromosome analysis. Recently, advancements in cytogenetic techniques such as GISH and FISH, have widely improved the scop of its applications, and range of yotype analysis to gene location.Shoot and root tips of 5 different cultivar of roses (*Rosa. foetida, Rosa. La france, Rosa. soleil d'or, Rosa. chinensis old Blush, Rosa. wichuraiana*) were collected for preparation of suitable chromosomes for GISH and FISH techniques. Shoot and root tips were treated with 0.1% and 0.05% colchicine, respectively. And by pectolyase and cellulas were enzymatically digested in 3 and 2 hour, respectively. Cellular suspensions of shoot tip were spread with 3 ethanol: 1 glacial acetic acid and cellular suspension of root tip were spread with one drop of 45% glacial acetic acid on glass slide. Choromosomes were counterstained with DAPI. 45S rDNA probe was derived from soybean. With by of FISH technique was observed one pair of NOR per genomes. But with by GISH technique not resulted. Experimental results were demonstrated *R.soleil d´or* and cultivars were tetraploid and *R.wichuraiana* and *R. chinensis* old blush cultivars were diploid and *R.La france* cultivar was triploid.

***Keywords*: *In situ* hybridization, polyploidy, FISH, GISH, 45S rDNA**