



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

سعید میرزایی<sup>۱</sup>، حسین شاهسوند حسنی<sup>۲</sup>، نجمه رمشی<sup>۳</sup>، مرجان قاسم خانی<sup>۴</sup>، مسعود احمدی افزادی<sup>\*</sup>

<sup>۱</sup> استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم، تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان.  
<sup>۲</sup> دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.  
<sup>۳</sup> دانش آموخته مقطع کارشناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان.  
<sup>۴</sup> 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 می باشد که نام ایران را با داشتن بیشترین ارقام تجاری دنیا به عنوان مهمترین منبع ژرم پلاسما این گیاه مطرح نموده است. با این وجود تعداد مطالعات کروموزومی روی این محصول محدود و گزارشات موجود حاکی از تناقضاتی در تعداد کروموزومها می باشد. در این تحقیق گونه های پسته موجود در ایران شامل ارقام اهلی و گونه های غیر اهلی خنجوک و بنه با استفاده از روش های کلاسیک رنگ آمیزی کروموزوم و روش دورگ سازی ژنومی در محل مورد مطالعه قرار گرفتند. دو روش استو-آهن هماتوکسیلین و فولجن برای رنگ آمیزی کروموزومها به کار گرفته شد. بر اساس نتایج، رنگ آمیزی با فولجن، روش مناسب تری برای رنگ آمیزی کروموزومهای پسته در مقایسه با روش دیگر بود. تعداد کروموزومها در ارقام اوحدی، اکبری، احمدآقایی، نیش کلاغی و خنجری دامغان ۱۵ جفت ( $2n=30$ ) در حالیکه ارقام ایتالیایی و قزوینی، وارپته وحشی سرخس و گونه های خنجوک و بنه دارای ۱۴ جفت کروموزوم ( $2n=28$ ) بودند. در آزمایش دورگ سازی ژنومی در محل، تابش فلورسنتی که دال بر هیبریداسیون پروب های ژنومی خنجوک و بنه با نمونه های کروموزومی ارقام اهلی باشد، مشاهده نگردید. عدم مشاهده هیبریداسیون قابل ردیابی می تواند ناشی از مشتق شدن این کروموزومها از رده های مختلف باشد.

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

## مقدمه

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 نواریندی کروموزومی 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<sup>۱</sup>) 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 کروموزومی 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 ایتترفازی 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<sup>۲</sup>) روشی دیگر به منظور بررسی کروموزوم‌ها می‌باشد. دورگه سازی ژنومی در محل روش تغییر یافته فیش می‌باشد که امکان شناسایی

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 (Esmailipur, 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

<sup>۱</sup>- Fluorescent In Situ Hybridization

<sup>۲</sup>- Genome In Situ Hybridization

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  $2n = 30$ ،  $2n = 24$  و  $2n = 28$  گزارش کرده است. با توجه به محدود بودن مطالعات کروموزومی و وجود تناقض‌هایی در مورد تعداد کروموزوم‌ها، بررسی مجدد گونه‌های پسته در این خصوص ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق گونه‌های مهم پسته موجود در ایران شامل *P. atlantica*، *P. khinjuk* و *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 دورگ 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<sup>۱</sup> و فولجن<sup>۲</sup>) و بهینه

کروموزوم‌های 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 اتوتراپلوئید *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  $2n=30$ ،  $2n=28$  و  $2n=24$  بیان گردید. در مطالعه‌ای دیگر توسط Ila et al. (2003) تعداد  $2n=30$  کروموزوم برای چهار گونه *P. atlantica*، *P. vera* و *P. terebinthus*، *P. eurycarpa* گزارش گردید. مطالعه Fasihi Harandi (1996)

<sup>۱</sup>-Aceto-Iron Haematoxylin

<sup>۲</sup>- Feulgen

سازی روش دورگ سازی ژنومی در محل انجام پذیرفت.

**آزمایش اول:** رنگ آمیزی با استو-آهن هماتوکسیلین مطابق با روش (Aghayev, 1998) با ایجاد اندکی تغییرات انجام شد. در مراحل پیش تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ آمیزی فاکتورهای متعددی بررسی گردید. در این آزمایش اندازه های متفاوت ریشه (یک تا شش سانتی متر)، پیش تیمارهای آب یخ و آلفا برومونتالین طی مدت زمان ۵-۴ ساعت، و سه مدت زمان ۸، ۱۰ و ۱۲ دقیقه جهت هیدرولیز با محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند. به طور خلاصه، بعد از پیش تیمار، ریشه ها جهت شستشو به مدت ۳۰ دقیقه در آب مقطر سرد قرار گرفتند. سپس جهت عمل تثبیت به محلول لیوتیسیکی منتقل و به مدت ۳۶ ساعت در یخچال نگهداری شدند. بعد از قرار دادن ریشه ها در آب مقطر به مدت سه ساعت به محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال جهت هیدرولیز منتقل گردید. سپس ریشه ها به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر شستشو و متعاقباً رنگ آمیزی به مدت ۱۵ ساعت در استو-آهن هماتوکسیلین انجام شد. بعد از رنگ آمیزی مانند مراحل قبل ریشه ها 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 نمونه های کروموزومی مناسب، عکس تهیه شد (Singh, 2003).

در روش رنگ آمیزی با فولجن پیش تیمار آلفا برومونتالین و آب یخ هر کدام طی مدت زمان های ۴، ۵ و ۲۴ 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، ۱۲ و ۲۴ ساعت استفاده شد. سپس ریشه ها 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 ۶۵ درجه سانتی گراد و مدت زمان هیدرولیز ۲۸ تا ۳۲ دقیقه با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. ریشه ها پس از عمل هیدرولیز با محلول فولجن رنگ آمیزی شدند. در مطالعه حاضر غلظت ۰/۰۴، ۰/۰۵ و ۰/۰۶ گرم در ۱۰ میلی لیتر رنگ در مدت زمان ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت از نمونه ها 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 گونه های بنه و خنجوک با استفاده از Fluorescein-12-dUTP (Fermentase life science) نشاندار گردید. پس از مخلوط کردن اجزای واکنش (جدول ۱)،

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 ۳۰ 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 ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید و بعد از شستشو با آب مقطر و انتقال به دستگاه ژل‌داک در زیر نور UV از ژل عکسبرداری شد.

مخلوط واکنش در دمای ۱۵ 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=۸) به واکنش اضافه و به مدت پنج تا ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ 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 ۳ میکرولیتر از نمونه واکنش اضافه شد. مخلوط حاصل روی ژل ۱

جدول ۱- 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)	غلظت پایه	اجزای واکنش Reagent
Volume (μl)	Concentration	
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, <i>E. coli</i>
2	500 ng/μl	DNA
34.5		آب دوبار تقطیر استریل ddH <sub>2</sub> O
50		جمع Total

یک قسمت اسید استیک) به مدت ۲۴ 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 (۱X) 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 (۱X) به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند و از آنها لام تهیه و توسط میکروسکوپ پخش 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

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، ۱/۰ 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 سانتیفریوژ گردیدند. در ادامه فاز مایع رویی خالی شده و پلت رسوب یافته (کاوشگر) با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از سانتیفریوژ 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 ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید. مرحله تثبیت با قرار دادن ریشه‌ها در محلول تثبیت (سه قسمت اتانول

(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 ۴ 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 می شود که معمولاً غلظت آن ۱۰ تا ۳۰ برابر غلظت کاوشگر می باشد (Schwarzacher *et al.*, 2000). در این مطالعه زمانی که DNA خنجوک به عنوان کاوشگر استفاده می شد DNA بنه به عنوان بلاک کننده به کار می رفت و زمانی که DNA بنه به عنوان کاوشگر استفاده می شد DNA خنجوک به عنوان بلاک کننده به کار گرفته می شد. بهترین اندازه برای DNA بلاک کننده ۵۰ تا ۳۰۰ جفت باز می باشد که با اتوکلاو کردن دی ان ای بلاک کننده به مدت ۵ دقیقه حاصل شد.

۳۷°C به مدت ۴۵ 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 پیسین  $\mu\text{g/ml}$  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 پارافرم آلدئید 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

جدول ۲- غلظت مواد و بافرهای مورد استفاده در مخلوط هیبریداسیون برای ۴ لام.

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

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

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 ۱۶ 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 ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه قرار گرفته و لامل حذف شد. پس از آن لامها دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه

محلول هیبریداسیون مطابق جدول ۲ با حجم نهایی ۱۲۰ میکرولیتر برای ۴ 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 واسرشت سازی در مراحل قبل (قرار دادن لامها



به مدت ۵ دقیقه در بافر آشکارسازی<sup>۱</sup> در دمای اتاق نگهداری و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه به بافر بلاک کننده<sup>۲</sup> در دمای اتاق منتقل شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول آشکارسازی<sup>۳</sup> به هر لام اضافه و روی آن با لامل پوشانده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، درون محفظه مرطوب داخل بن ماری نگهداری شدند. سپس لامل برداشته شده و لامها ۲-۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر آشکارسازی و در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد شستشو داده و در ادامه لامها به مدت ۵ دقیقه در بافر بلاک کننده در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از آن ۵۰ میکرولیتر از محلول Anti avidin FITC به هر لام اضافه و روی آن با لامل پوشانده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، درون محفظه مرطوب داخل بن ماری نگهداری شدند. جهت برداشتن لامل و انجام شستشو، لامها ۲-۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در بافر آشکارسازی و دمای ۴۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

در نهایت بافر آشکارسازی خالی و لامها در دمای اتاق و در داخل جار به مدت ۵ دقیقه نگهداری شدند. سپس ۴۵ 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 ۱۰ دقیقه در همان مکان قرار داده شدند. پس از آن لامها با قرار

داخل بافر 2X SSC با دمای ۴۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از خالی کردن این محلول، لامها داخل محلول فرم‌آمید ۵۰ درصد در 2X SSC به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد منتقل و پس از آن لامها به مدت ۵ دقیقه در محلول 0.1 X SSC در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از خالی کردن این محلول، لامها به محلول 2 X SSC منتقل و ۲ مرتبه و هر بار ۳ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد داخل بن ماری قرار گرفتند. در نهایت لامها در داخل جار از بن ماری خارج به مدت ۵ تا ۱۵ 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 ۴۵ 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 ۱۰ دقیقه در همان مکان قرار داده شدند. پس از آن پوشش پلاستیکی لامها حذف و در محلول بافر McIlvaine (pH=۷) به مدت ۲ 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

<sup>۱</sup>- Detection Buffer

<sup>۲</sup>- Block Buffer

<sup>۳</sup>- Detection Solution

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 ۴ تا ۵ ساعت و ۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که بهترین نتیجه با پیش تیمار آب یخ در مدت زمان ۲۴ ساعت، تثبیت بوسیله محلول اتانول:اسید استیک به نسبت سه به یک در مدت زمان ۲۴ ساعت و هیدرولیز در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ دقیقه یا دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۹ دقیقه بدست آمد. در بررسی غلظت رنگ مقدار ۰/۰۴، ۰/۰۵ و ۰/۰۶ گرم رنگ مورد بررسی قرار گرفت که مقدار ۰/۰۵ گرم و مدت زمان ۲۴ ساعت به عنوان بهترین غلظت رنگ انتخاب شد.

#### شمارش کروموزوم‌ها

پنج رقم اوحدی، اکبری، احمدآقایی، نیش کلاغی و خنجری دارای ۱۵ جفت کروموزوم ( $2n=30$ ) بودند در حالیکه ارقام ایتالیایی و قزوینی به همراه واریته وحشی سرخس که نیز متعلق به گونه *P. vera* می‌باشند، دارای ۱۴ جفت کروموزوم ( $2n=28$ ) بودند. بطور کلی تعداد کروموزوم‌ها در بیشتر ارقام مورد مطالعه گونه *P.*

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 برموناتالین 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 آلفابروموناتالین در تمامی تکرارهای مورد آزمایش نتیجه رضایت بخشی

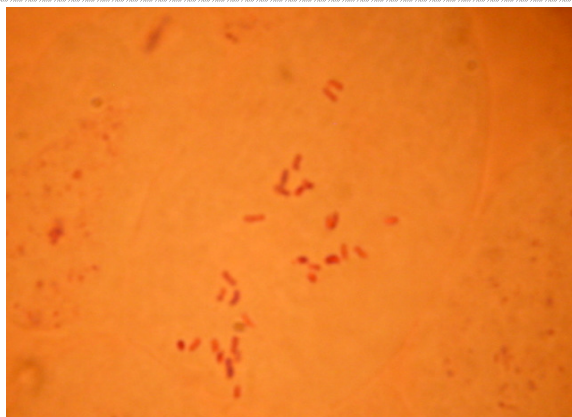
کروموزوم‌های وارپته سرخس را  $2n=30$  گزارش کرده بودند. چنین به نظر می‌رسد که دو رقم ایتالیایی و قزوینی و وارپته سرخس آنیوپلوئیدهایی پایدار از گونه *P. vera* باشند. در مطالعه‌ای که توسط *Mirzaei et al.* (2006) روی خویشاوندی گونه‌های پسته موجود در ایران و تعدادی از ارقام در سطح مولکولی انجام شد رقم ایتالیایی 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.

*vera* معادل  $2n=30$  بدست آمد که مطابق با گزارش‌های *Zohary (1952)*، *Ila et al. (2003)*، *Ghaffari (2002)* و *Fasihi Harandi (1996)* می‌باشد. گونه خنجوک دارای ۱۴ جفت کروموزوم ( $2n=28$ ) بود در حالیکه پیش از این *Ghaffari (2002)* و *Fasihi Harandi (1996)* تعداد کروموزوم‌های آن را  $2n=24$  گزارش کرده‌اند. در این مطالعه تعداد کروموزوم‌های بنه  $2n=28$  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  $2n=30$  گزارش نمودند. در تحقیق حاضر تعداد کروموزوم‌های تعدادی از ارقام پسته مورد بررسی قرار گرفته است و تعداد کروموزوم‌های ارقام ایتالیایی و قزوینی و وارپته وحشی سرخس را  $2n=28$  گزارش می‌کند. در حالیکه پیش از این *Ghaffari (2002)* و *Fasihi Harandi (1996)* تعداد



شکل ۱- متافاز میتوز در رقم اکبری با بزرگ‌نمایی  $100 \times$ .

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



شکل ۲- متافاز میتوز در رقم قزوینی با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

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



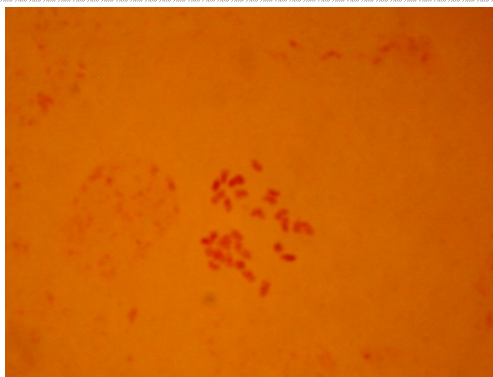
شکل ۳- متافاز میتوز در رقم ایتالیایی با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

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



شکل ۴- متافاز میتوز در *P. atlantica* subsp. *mutica* با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

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



شکل ۵- متافاز میتوز در *P. khinjuk* با بزرگ نمایی X ۱۰۰.

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

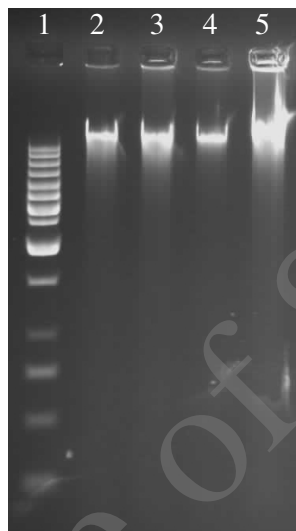
نداشته است. لذا تهیه پروب به روش غیر مستقیم مد نظر قرار گرفت (در این حالت امکان تکثیر و تقویت سیگنال وجود دارد). در این مطالعه از بیوتین استفاده شد. در این حالت بیوتین یک مرتبه توسط آویدین فلورسنت شده ردیابی می‌شد و برای تقویت سیگنال از آنتی آویدین فلورسنت شده استفاده گردید تا شدت سیگنال ایجاد شده در 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 رده‌های مختلف نسبت دادند.

### نتایج آزمایش دوم

میزان DNA استخراج شده در این روش بیش از ۱۰۰ میکروگرم در یگ گرم برگ بود (شکل ۶). 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 وارپته 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 وارپته 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

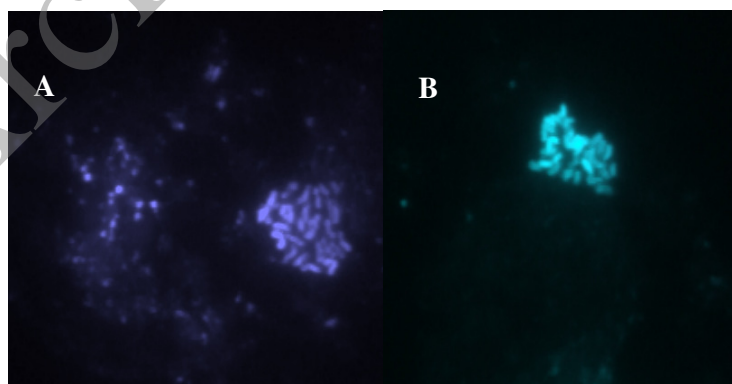
تهیه کتابخانه کروموزومی استفاده شود. همچنین برای تهیه کاربوتاییبی مناسب و قابل قبول از پروب‌های خاص نواحی سانترومری و تلومری استفاده گردد.

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



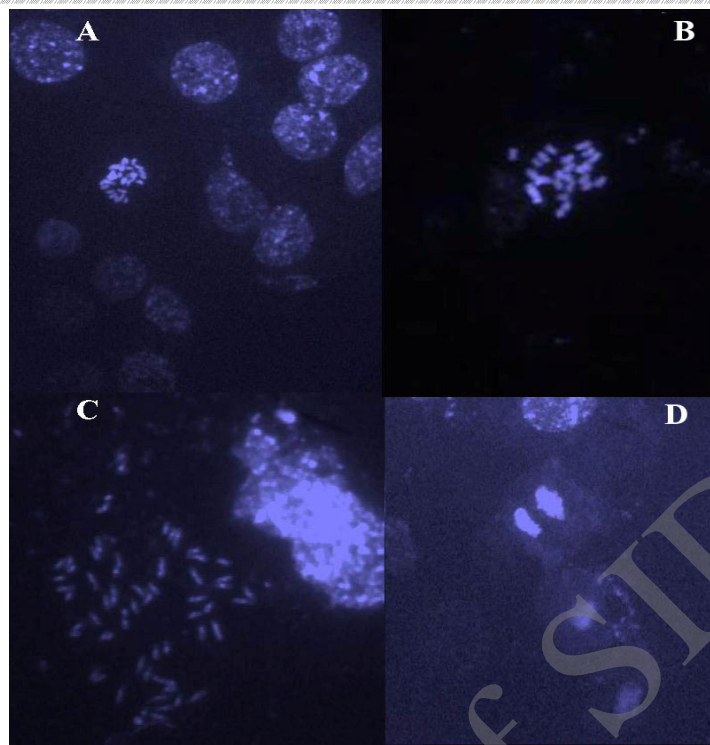
شکل ۶- DNA استخراج شده از نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد ۱- نشانگر 1Kb ۲- *P. khinjuk* ۳- *P. atlantica* subsp. *mutica* ۴- سرخس ۵- اوحدی.

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 ۸- 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.
- Esmailipur 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 Horticulture* 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.<sup>1</sup>, Shahsavand Hasani H.<sup>2</sup>, Rameshi N.<sup>3</sup>, Ghasemkhani M.<sup>4</sup>, Ahmadi-Afzadi M.<sup>\*4</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science, High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

<sup>2</sup>Associated Professor of College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

<sup>3</sup>BS graduated student, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

<sup>4</sup>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', 'Akbari', '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