

«پژوهشگر کرامی»

صفحاتی را که مشاهده می فرمائید، گزیده ای محدود از یک سند پژوهشی طولانی است که شامل:



برای مشاهده فهرست دیجیتال پایان نامه ها / رساله های می توانید به آدرس ذیل مراجعه کنید:

<http://lib.uok.ac.ir:8080>

در صورت به وجود آمدن هرگونه مشکل و پرسش در زمینه دسترسی، تهیه و استفاده از منابع الکترونیکی و دیجیتال به بخش پایان نامه ها و منابع دیجیتال کتابخانه مرکزی و مرکز اسناد مراجعه نموده و تماس بگیرید!

شماره تماس ۰۸۷-۳۳۶۲۴۰۰۶



دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه تولید و ژنتیک گیاهی

رساله دکتری رشته بیوتکنولوژی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

مطالعه توزیع توالی‌های DNA تکراری برخی گونه‌های جنس *Nigella* با استفاده از
توالی‌یابی نسل جدید و FISH

پژوهشگر:

فاطمه اروجی

استاد راهنما:

دکتر قادر میرزاقداری

اساتید مشاور:

Dr. Yi-Tzu Kuo

Dr. Jörg Fuchs

تیر ۱۴۰۲

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ





دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه تولید و ژنتیک گیاهی

رساله دکتری رشته بیوتکنولوژی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

مطالعه توزیع توالی‌های DNA تکراری برخی گونه‌های جنس *Nigella* با استفاده از
توالی‌یابی نسل جدید و FISH

پژوهشگر:

فاطمه اروجی

استاد راهنما:

دکتر قادر میرزاقدری

اساتید مشاور:

Dr. Yi-Tzu Kuo

Dr. Jörg Fuchs

تیر ۱۴۰۲



دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

رساله دکتری رشته بیوتکنولوژی گرایش بیوتکنولوژی کشاورزی

عنوان:

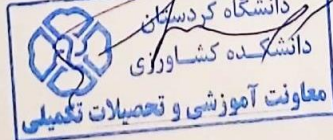
مطالعه توزیع توالی‌های DNA تکراری جنس *Nigella* با استفاده از توالی‌یابی
نسل جدید و FISH

پژوهشگر
فاطمه اروجی

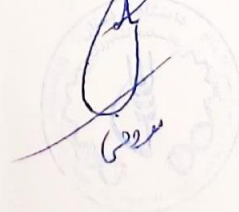
در تاریخ ۱۴۰۲/۰۴/۱۱ توسط کمیته‌ی تخصصی و هیات داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با درجه عالی به تصویب رسید.

هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبۀ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر قادر میرزا قادری	استاد	
۲- استاد مشاور	Dr. Jörg Fuchs	استادیار	
۳- استاد مشاور	Dr. Yi-Tzu Kuo	استادیار	
۴- داور داخلی	دکتر اسعد معروفی	دانشیار	
۵- داور خارجی	دکتر علی محمد بنایی مقدم	استادیار	
۶- داور خارجی	دکتر راحله کریمی آشتیانی	استادیار	

مهر و امضای معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه کشاورزی



مهر و امضاء مدیر گروه



چکیده

نایجلا تیره کوچکی از خانواده Ranunculaceae است که در دریای اژه و از نواحی غربی-ایرانی-تورانی منشأ گرفته و پراکنده شده است. مقایسه توالی‌های تکراری در *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica* با استفاده از توالی‌یابی ژنومی Illumina با پوشش کم و به دنبال آن کاربوتایپ و نقشه‌برداری FISH از هفت گونه جنس نایجلا توسط کاوشگر توالی‌های تکراری شناسایی شده و کاوشگرهای DNA ریبوزومی (rDNA) انجام شد. همچنین توالی کامل ژنوم کلروپلاست هر سه گونه سرهم‌بندی و مقایسه گردید. توالی‌های تکراری (با تعداد کپی بالا و متوسط) به ترتیب ۵۷/۵۲، ۵۹/۰۱ و ۶۴/۷۳ درصد از ژنوم‌های *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica* را تشکیل می‌دهند. تقریباً نیمی از ژنوم سه گونه، رتروترانسپوزون‌ها (ترانسپوزون‌های کلاس I) هستند، در حالی که ترانسپوزون‌های DNA (ترانسپوزون‌های کلاس II) تنها حدود ۲ درصد از ژنوم‌ها را تشکیل داده‌اند. گونه‌های نایجلای بررسی شده دارای ژنوم بزرگی در حدود ۷/۴ تا ۱۲/۴ Gbp/1C هستند. یکی از دلایل طولانی بودن چرخه سلولی که توسط EDU بررسی شد، بزرگ بودن ژنوم در این جنس است. تنها دو توالی تکراری ماهواره‌ای در *N. sativa*، یک مورد در *N. damascena* و چهار مورد در *N. bucharica* شناسایی شدند که غالباً (peri)centromeric بودند و حدود ۱٪ از هر ژنوم را تشکیل دادند. تنوع زیادی در تعداد و موقعیت جایگاه‌های ۴۵S rDNA در میان گونه‌های نایجلا مشاهده شد. جالب توجه است، در *N. hispanica*، هر کروموزوم حداقل یک جایگاه ۴۵S rDNA را نشان داد که یکی از آن‌ها هم‌زیگوت بود. همچنین در *N. sativa* با استفاده از Ag-NOR مشخص شد که دو جفت از سه جفت جایگاه S ۴۵rDNA فعال هستند. براساس تعداد کروموزوم، اندازه ژنوم و سیگنال‌های بدست آمده از کاوشگرهای ماهواره‌ای (peri)centromeric، سه گروه کاربوتیپ مشاهده شد: دو گروه با $2n = 2x = 12$ و فرمول کاربوتیپ $2t + 10m$ (شامل *N. sativa*، *N. arvensis*، *N. hispanica* به‌عنوان گروه اول و *N. damascena* و *N. orientalis* به‌عنوان گروه دوم) و گروه دورتر با $2n = 2x = 14$ و فرمول کاربوتایپ $4t + 2st + 8m$ (شامل *N. integrifolia* و *N. bucharica*). این گروه‌های کاربوتیپ با آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های ITS و *rbcL* تطابق داشتند. نتیجه می‌گیریم که تنوع در توالی‌های (peri)centromeric، تعداد و محل قرارگیری rDNA‌ها روی کروموزوم و همچنین تعداد کروموزوم (دیسپلویدی) در تکامل جنس نایجلا نقش دارند.

کلمات کلیدی: توالی‌های تکراری، تکامل کاربوتیپ، جنس *Nigella*، توالی ماهواره‌ای

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
مقدمه.....	۱
اهداف.....	۴
فصل اول: بررسی منابع	۵
۱-۱- نایجلا.....	۶
۱-۲- برآورد سایز ژنوم با استفاده از فلوسایتومتری.....	۷
۱-۳- توالی‌های تکراری.....	۸
۱-۳-۱- توالی‌های ماهواره‌ای و ریزماهواره‌ای.....	۸
۲-۳-۱- عناصر قابل انتقال.....	۹
۱-۴- مروری بر مطالعات انجام شده در ارتباط با توزیع توالی‌های DNA تکراری.....	۱۰
۱-۵- توالی کلروپلاست.....	۱۲
۱-۶- CRISPR-FISH.....	۱۳
۱-۷- بررسی هیستون‌ها به روش رنگ‌آمیزی ایمنولوژیک.....	۱۴
۱-۸- بررسی چرخه سلولی با استفاده از روش EDU.....	۱۵
فصل دوم: مواد و روش‌ها	۱۷
۲-۱- مواد گیاهی و بررسی محل پراکنش گونه‌های مورد مطالعه.....	۱۸
۲-۲- ضدعفونی و کشت بذر.....	۱۸
۲-۳- اندازه‌گیری سایز ژنوم.....	۱۹
۲-۴- استخراج DNA ژنومی به منظور توالی‌یابی.....	۲۰
۲-۵- توالی‌یابی DNA.....	۲۰
۲-۶- شناسایی توالی‌های تکراری ژنوم مبتنی بر نمودار.....	۲۱
۲-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.....	۲۲
۲-۸- الکتروفورز محصولات PCR و مشاهده ژل.....	۲۴
۲-۹- آماده‌سازی کاوشگر.....	۲۴
۲-۱۰- پیش‌تیمار و تثبیت ریشه‌ها.....	۲۵
۲-۱۱- تهیه اسلایدهای کروموزومی.....	۲۶
۲-۱۱-۱- بافر سیترات سدیم 1x.....	۲۶
۲-۱۱-۲- محلول آنزیمی.....	۲۶
۲-۱۱-۳- محلول تثبیت.....	۲۶
۲-۱۱-۴- تهیه سوسپانسیون سلولی.....	۲۷
۲-۱۱-۵- پخش پروتوپلاست‌ها.....	۲۷
۲-۱۲- محلول‌های مورد نیاز در آزمایش FISH.....	۲۷
۲-۱۲-۱- بافر 10x PBS.....	۲۷
۲-۱۲-۲- محلول پارافرمالدهید.....	۲۸

۲۸۲-۱۲-۳- محلول 2xSSC
۲۸۲-۱۲-۴- بافر فسفات سدیم
۲۸۲-۱۲-۵- بافر هیبریداسیون
۲۸۲-۱۲-۶- محلول دکستران سولفات ۲۰ درصد
۲۸۲-۱۲-۷- محلول هیبریداسیون
۲۸۲-۱۳- هیبریداسیون فلورسنت در محل (FISH)
۲۸۲-۱۳-۱- تثبیت اسلایدها
۲۹۲-۱۳-۲- افزودن محلول هیبریداسیون
۲۹۲-۱۳-۳- واسرشت سازی و هیبریداسیون
۲۹۲-۱۳-۴- رنگ آمیزی کروموزوم ها و تصویربرداری
۳۰۲-۱۴- آنالیزهای فیلوژنتیکی
۳۰۲-۱۵- مقایسه توالی کلروپلاست ها
۳۰۲-۱۵-۱- سرهم بندی ژنوم کلروپلاست و حاشیه نویسی
۳۰۲-۱۵-۲- تجزیه و تحلیل توالی های تکراری کلروپلاست
۳۰۲-۱۵-۳- مقایسه ژنوم های کلروپلاست
۳۱۲-۱۵-۴- بررسی میزان استفاده از کدون ها
۳۲۲-۱۶- CRISPR-FISH
۳۲۲-۱۶-۱- تکثیر و نگهداری پروتیین dCas9
۳۲۲-۱۶-۲- تخلیص پروتیین
۳۳۲-۱۶-۳- تهیه ریبونوکلوپروتئین (RNP: Cas9+sgRNA)
۳۳۲-۱۶-۱-۳- آماده سازی crRNA (توالی Ns-Sat1) و tracrRNA
۳۳۲-۱۶-۲-۳- تشکیل sgRNA
۳۴۲-۱۶-۳-۳- ساخت کمپلکس RNP
۳۴۲-۱۶-۴- آماده سازی نمونه برای CRISPR-FISH (نمونه های برگ یا ریشه تثبیت شده با فرمالدئید)
۳۵۲-۱۶-۵- CRISPR-FISH بر روی نمونه های تثبیت شده با فرمالدئید
۳۵۲-۱۶-۶- CRISPR-FISH بر روی نمونه های تثبیت شده با محلول ۱:۳ اتانول- اسید استیک
۳۵۲-۱۷- برچسب گذاری EDU
۳۶۲-۱۸- رنگ آمیزی ایمنولوژیک
۳۷۲-۱۹- نواربندی Ag-NOR
۳۷۲-۲۰- بررسی میکروسکوپی دانه گرده
۳۸ فصل سوم: نتایج
۳۹۳-۱- جنس نایجلا دارای گیاهانی با ژنوم نسبتاً بزرگ
۳۹۳-۲- بررسی محل پراکنش و اشتراک مکانی گونه های مورد مطالعه
۳۹۳-۳- دو کاریوتیپ مختلف در جنس نایجلا
۴۱۳-۴- تفاوت تعداد جایگاه های rDNA بین گونه های نایجلا
۴۳۳-۵- آنالیز فیلوژنتیک مولکولی توالی های ITS و rbcL

۴۶	۳-۶- تکرارهای غالب در جنس نایجلا.....
۴۹	۳-۶-۱- تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای.....
۵۰	۳-۷- ماهواره‌های (پری)سانترومیک در نایجلا.....
۵۷	۳-۸- ساختار ژنوم کلروپلاست در سه گونه نایجلا.....
۶۱	۳-۸-۱- تجزیه و تحلیل توالی تکراری ساده (SSR) در ژنوم کلروپلاست.....
۶۲	۳-۸-۲- تنوع ژنوم کلروپلاست نایجلا.....
۶۴	۳-۸-۳- تغییرات ناحیه IR کلروپلاست در سه گونه نایجلا.....
۶۶	۳-۸-۴- فراوانی استفاده از کدون‌های مختلف کد کننده آمینواسیدها و محل‌های ویرایش RNA.....
۶۷	۳-۹- نتایج CRISPR-FISH.....
۶۸	۳-۱۰- رنگ‌آمیزی ایمنولوژیک با آنتی‌بادی H3K27me2.....
۶۹	۳-۱۱- بررسی طول مدت چرخه میتوز و زمان شروع هر مرحله از چرخه سلولی با استفاده از EDU.....
۷۱	۳-۱۲- نتایج حاصل از آزمایش Ag-NOR.....
۷۲	۳-۱۳- مقایسه مورفولوژی دانه گرده.....
۷۴	فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۷۵	۴-۱- بحث.....
۷۵	۴-۱-۱- روابط فیلوژنتیک و ساختار کاریوتیپ.....
۷۵	۴-۱-۲- بازآرایی‌های ژنومی.....
۷۵	۴-۱-۳- مورفولوژی.....
۷۵	۴-۱-۴- الگوی متفاوت rDNA.....
۷۶	۴-۱-۵- تعداد متفاوت rDNA.....
۷۶	۴-۱-۶- رتروترانسپوزون‌ها و اندازه ژنوم.....
۷۷	۴-۱-۷- استفاده از توالی‌های تکراری به‌عنوان کاوشگر.....
۷۷	۴-۱-۸- هم‌ردیفی و تشابه توالی‌های تکراری.....
۷۷	۴-۱-۹- فیلوژنی مولکولی.....
۷۸	۴-۱-۱۰- مقایسه ژنوم کلروپلاست سه گونه از نایجلا.....
۷۸	۴-۱-۱۱- CRISPR-FISH.....
۷۹	۴-۱-۱۲- نقش H3K27me2 و شناسایی NORها.....
۷۹	۴-۱-۱۳- N. sativa گونه‌ای با میتوز طولانی.....
۸۰	۴-۱-۱۴- تفاوت در مورفولوژی دانه گرده.....
۸۰	۴-۲- نتیجه‌گیری کلی.....
۸۰	۴-۳- پیشنهادات.....
۸۱	منابع
۹۳	پیوست‌ها

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲: شماره دسترسی و نام علمی گونه‌های بررسی شده در این تحقیق.....	۱۸
جدول ۲-۲: آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر توالی‌های ITS و rbcL.....	۲۲
جدول ۳-۲: آغازگرهای استفاده شده به عنوان کاوشگر در FISH.....	۲۳
جدول ۴-۲: شرایط واکنش PCR.....	۲۳
جدول ۱-۳: ترکیب خوشه‌ای تکرارهای ماهواره‌ای و LTRها در سه ژنوم نایجلا تکرار می‌شوند.....	۴۷
جدول ۲-۳: انواع و نسبت‌های توالی‌های تکراری در <i>N. sativa</i> ، <i>N. damascena</i> و <i>N. bucharica</i> . نوع و درصد فراوانی توالی‌های تکراری در ژنوم سه گونه توسط RepeatExplorer2 مشخص شدند.....	۴۸
جدول ۳-۳: توالی‌های تکراری مورد استفاده به عنوان کاوشگر در آزمایشات FISH. این کاوشگرها روی کروموزوم‌های <i>N. sativa</i> ، <i>N. damascena</i> و <i>N. bucharica</i> استفاده شدند.....	۵۱
جدول ۴-۳: آغازگرها و کاوشگرهای مورد استفاده در آزمایشات PCR و FISH. موقعیت آغازگرها با رنگ قرمز روی توالی مونومرها مشخص شده است.....	۵۲
جدول ۵-۳: ترکیب پایه و محتوای GC در ژنوم کلروپلاست <i>Nigella spp.</i>	۶۰
جدول ۶-۳: ترکیب ژن در سه ژنوم کامل کلروپلاست <i>N. damascena</i> ، <i>N. sativa</i> و <i>N. bucharica</i>	۶۱
جدول ۷-۳: مقایسه انواع و تعداد توالی‌های تکراری ساده (SSR) به دست آمده در ژنوم کلروپلاست ۳ گونه <i>N. sativa</i> ، <i>N. damascena</i> و <i>N. bucharica</i>	۶۲
جدول ۸-۳: مقایسه درصد فراوانی و میزان استفاده از کدون‌های کد کننده آمینواسیدها در سه ژنوم کلروپلاست گونه‌های <i>N. sativa</i> ، <i>N. damascena</i> و <i>N. bucharica</i>	۶۶
جدول ۹-۳: نتایج آزمایش EDU روی سلول‌های اینترفازی گونه <i>N. sativa</i> . سه الگو توسط EDU در چهار بازه زمانی جهت بازیابی چرخه سلولی شناسایی شد. تعداد سلول‌ها و درصد هر یک از الگوها در زمان‌های مورد آزمایش در جدول زیر ذکر شده‌اند.....	۷۰
جدول ۱۰-۳: نتایج آزمایش EDU روی گستره‌های کروموزومی گونه <i>N. sativa</i> . سه الگو توسط EDU در چهار بازه زمانی جهت بازیابی چرخه سلولی شناسایی شد. تعداد سلول‌ها و درصد هر یک از الگوها در زمان‌های مورد آزمایش در جدول زیر ذکر شده‌اند.....	۷۱

فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۷	شکل ۱-۱: مراحل انجام فلوسایتومتری به منظور اندازه‌گیری سایز ژنوم. سه مرحله اصلی شامل؛ آماده‌سازی سوسپانسیون از نمونه بافت گیاهی در بافر مخصوص، رنگ‌آمیزی هسته‌ها با رنگ فلوروسنت اختصاصی DNA و عبور هسته‌ها از دستگاه فلوسایتومتری است. تخمین محتوای DNA با مقایسه نتایج نمونه و استاندارد مرجع انجام می‌گیرد (Bourge et al., 2018).....
۱۰	شکل ۲-۱: طبقه‌بندی توالی‌های تکراری در ژنوم یوکاریوتی (Kapitonov and Jurka, 2008).....
۱۲	شکل ۳-۱: ترتیب مراحل کلی انجام پژوهش (Novák et al., 2013). استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل جدید جهت شناسایی و ساخت کاوشگر به منظور انجام آزمایش FISH.....
۱۴	شکل ۴-۱: شکل شماتیک از اجزا تشکیل دهنده CRISPR/Cas9. تشکیل کمپلکس RNP با سرهم‌بندی gRNA و پروتئین Cas9، که در این آزمایش از پروتئین dCas9 بدون خاصیت اندونوکلازی استفاده شده است.....
۱۶	شکل ۵-۱: شکل شماتیک از مکانیسم عمل EDU و نحوه قرارگیری آن در ساختمان DNA. واکنش کلیک در حضور کاتالیزور مس انجام گرفته و مولکول آزید که یک فلوفور است با EDU واکنش می‌دهد و امکان تشخیص EDU در ساختمان DNA را فراهم می‌نماید.....
۱۶	شکل ۶-۱: شکل شماتیک از نحوه ضخیم شدن کروموزوم‌ها در طول پروفاز. دو مکانیسم تاخوردن کروموزوم و ضخیم شدن تدریجی کروموزوم با روش EDU مقایسه شدند. نقاط قرمز رنگ کانون‌های نشانه‌گذاری شده توسط EDU را نشان می‌دهند (Kuznetsova et al., 2017b).....
۱۸	شکل ۱-۲: مورفولوژی گل و بذر گونه‌های مورد مطالعه.....
۱۹	شکل ۲-۲: شرایط کشت گونه‌های نایجلا در آزمایشگاه، مزرعه و گلخانه.....
۲۲	شکل ۳-۲: نمایش مراحل آزمایش از توالی‌یابی تا بررسی‌های بیوانفورماتیکی. کیفیت داده‌های توالی‌یابی ابتدا توسط ابزار FastQC بررسی و سپس شناسایی توالی‌های تکراری توسط ابزار TAREAN و تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توسط ابزار RepeatExplorer انجام گرفت.....
۲۴	شکل ۴-۲: نمایش مراحل آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.....
۲۵	شکل ۵-۲: نمایش مراحل تکثیر توالی‌های تکراری شناسایی شده و تهیه کاوشگر های FISH با کمک کیت شکاف ترجمه به صورت شماتیک.....
۲۶	شکل ۶-۲: نمایش مراحل پیش‌تیمار ریشه‌های یک تا دو سانتی‌متری جنس نایجلا با گاز نیتروژن اکساید و تثبیت آن‌ها در اسید استیک ۹۰ درصد و اتانول ۷۰ درصد.....
۲۹	شکل ۷-۲: نمایش مراحل انجام آزمایش FISH.....
۳۱	شکل ۸-۲: نمایش ترتیب مراحل کلی سرهم‌بندی، حاشیه‌نویسی و مقایسه توالی کلروپلاست (Kahraman and Lucas, 2019).....
۳۲	شکل ۹-۲: شکل شماتیک از مراحل تکثیر پروتئین dCas9 در باکتری E. coli. با افزودن IPTG بیان پروتئین افزایش می‌یابد.....
۳۴	شکل ۱۰-۲: مراحل تهیه اسلاید از هسته‌های اینترفازی بافت برگ سیاهدانه با استفاده از سیتوسپین.....
۳۹	شکل ۱-۳: نقشه پراکنش جهانی گونه‌های مورد مطالعه جنس نایجلا. مناطق جغرافیایی گزارش شده از هر گونه جمع‌آوری و توسط نرم‌افزار R روی نقشه نمایش داده شده‌اند. هر گونه با رنگ مشخصی قابل مشاهده است. دو گونه N. bucharica و N. integrifolia اشتراک مکانی با دیگر گونه‌های مورد مطالعه نداشتند.....

شکل ۳-۲: فیلوژنی و ایدیوگرام هفت گونه از جنس نایجلا. درخت فیلوژنی با روش حداکثر درست‌نمایی در نایجلا با ۵۰۰ تکرار بوت استرپ از توالی‌های ITS1- Δ /ITS-ITS2 و rbcL به دست آمده که در آن *A. carmichaelii* به عنوان یک برون‌گروه استفاده شده‌است. مکان توالی‌های ماهواره‌ای شناسایی شده در این تحقیق و همچنین مکان آرایه‌های ۴۵S و ۵S بر روی کروموزوم‌ها مشخص شده‌اند. مقادیر DNA ژنومی تخمین زده شده در سمت راست و پارامترهای کاریوتیپی در زیر ایدیوگرام هر گونه نشان داده شده‌است. ستاره در *N. hispanica* نشان دهنده جایگاه همی‌زیگوت است. Chr.: کروموزوم؛ A1: شاخص عدم تقارن داخل کروموزومی؛ A2: شاخص عدم تقارن بین کروموزومی؛ Levan: توصیف مورفولوژی کروموزوم بر اساس روش (Levan, 1964) میباشد و AR: نسبت بازو (بازوی بلند به بازوی کوتاه) را نشان می‌دهد..... ۴۰

شکل ۳-۳: توزیع جایگاه‌های rDNA گونه‌های نایجلا مورد مطالعه. نقشه‌برداری FISH با کاوشگرهای rDNA ۴۵S (سبز) و ۵S rDNA (قرمز) روی کروموزوم‌های متافاز میتوزی (*N. sativa* (A), *N. orientalis* (B), *N. integrifolia* (C), *N. bucharica* (D), *N. damascena* (E), *N. arvensis* (F) و *N. hispanica* (G)) رنگ‌آمیزی زمینه‌ای کروموزوم‌ها با DAPI انجام شد. فلش‌ها سیگنال‌های ضعیف ۴۵S rDNA و ستاره‌ها کروموزوم‌های همولوگ با جایگاه همی‌زیگوت را نشان می‌دهند. خط مقیاس ۱۰ میکرومتر است..... ۴۲

شکل ۳-۴: هم‌ردیفی مونومرهای توالی ITS همه گونه‌های مورد مطالعه. طول این توالی از ۷۳۲ تا ۷۵۹ جفت باز در بین گونه‌های مورد مطالعه متغیر بود..... ۴۴

شکل ۳-۵: هم‌ردیفی مونومرهای توالی rbcL همه گونه‌های مورد مطالعه. طول این توالی از ۸۷۱ تا ۱۴۲۸ جفت باز در بین گونه‌های مورد مطالعه متغیر بود..... ۴۵

شکل ۳-۶: تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالی‌های تکراری ژنوم در بین سه گونه نایجلا. (A) نمودار نواری *N. sativa*, *N. bucharica* و *N. damascena* که اندازه (تعداد خوانش‌ها) خوشه‌های خاص هر گونه را نشان می‌دهد. (B) اندازه مستطیل‌ها متناسب با تعداد خوانش‌ها در یک خوشه برای هر گونه است. خوشه‌ها با استفاده از خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی مرتب شده‌اند و مستطیل‌ها بر اساس حاشیه‌نویسی خوشه‌ای آن‌ها رنگ‌آمیزی شدند. (C) اندازه مستطیل‌ها در (B) براساس اندازه ژنوم گونه‌های مورد تجزیه و تحلیل نرمال شده‌است. کدهای گونه: *N. damascena*; NS, *N. sativa*; Nb, *N. bucharica*..... ۴۹

شکل ۳-۷: توالی ماهواره‌ای تکثیر شده توسط PCR بر روی ژل الکتروفورز به شکل رگه و کلاستر مربوط به آن در نتایج Tarean به شکل کروی توپر. چاهک سمت چپ مارکر می‌باشد..... ۵۱

شکل ۳-۸: هم‌ردیفی مونومرهای توالی تکراری سانترومری با ۱۷۸ جفت باز، غنی از AT (۶۸ درصد برای *Ns-Sat1*) در *N. sativa* (*Ns-Sat1* و *Ns-Sat2*) و در *N. damascena* (*Nd-Sat1*)..... ۵۴

شکل ۳-۹: توزیع کروموزومی تکرارهای شناسایی شده با کپی بالا در نایجلا. نتایج FISH با استفاده از تکرارهای ماهواره‌ای شناسایی شده و کاوشگرهای حاصل از توالی تلومری نوع آراییدوپسیس (TTTAGGG)_n بر روی کروموزوم‌های متافاز میتوزی (*N. sativa* (A,B,I), *N. damascena* (C), *N. arvensis* (D), *N. hispanica* (E), *N. orientalis* (F) و *N. bucharica* (G,H)) توالی تکراری *Ns-CL6* (قرمز) در سرتاسر ژنوم (A) پراکنده شده‌است، در حالی که توالی‌های ماهواره‌ای عمدتاً (پری)سانترومری بودند. نوار مقیاس ۱۰ میکرومتر است..... ۵۶

شکل ۳-۱۰: نقشه ژنی کلروپلاست *N. damascena* به دست آمده از نرم‌افزار تحت وب OGDRAW. ژن‌های مشروح بر اساس دسته‌های عملکردی رنگ شده‌اند. ژن‌های قرار گرفته در خارج از دایره بیرونی در جهت عقربه‌های ساعت رونویسی شدند. ژن‌های قرار گرفته در داخل دایره در خلاف جهت عقربه‌های ساعت رونویسی شدند. خاکستری تیره در دایره داخلی نشان دهنده محتوای GC است در حالی که خاکستری روشن مربوط به محتوای AT است..... ۵۸

شکل ۳-۱۱: نقشه ژنی کلروپلاست *N. sativa* به دست آمده از نرم افزار تحت وب OGDRAW. ژن های مشروح بر اساس دسته های عملکردی رنگ شده اند. ژن های قرار گرفته در خارج از دایره بیرونی در جهت عقربه های ساعت رونویسی شدند. ژن های قرار گرفته در داخل دایره در خلاف جهت عقربه های ساعت رونویسی شدند. خاکستری تیره در دایره داخلی نشان دهنده محتوای GC است در حالی که خاکستری روشن مربوط به محتوای AT است.....۵۹

شکل ۳-۱۲: نقشه ژنی کلروپلاست *N. bucharica* به دست آمده از نرم افزار تحت وب OGDRAW. ژن های مشروح بر اساس دسته های عملکردی رنگ شده اند. ژن های قرار گرفته در خارج از دایره بیرونی در جهت عقربه های ساعت رونویسی شدند. ژن های قرار گرفته در داخل دایره در خلاف جهت عقربه های ساعت رونویسی شدند. خاکستری تیره در دایره داخلی نشان دهنده محتوای GC است در حالی که خاکستری روشن مربوط به محتوای AT است.....۶۰

شکل ۳-۱۳: مقایسه تغییرات و پلی مورفیسم در ژنوم کلروپلاست سه گونه *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica* با استفاده از برنامه هم ردیفی *Nd.mVISTA* مخفف *N. damascena* و به عنوان ژنوم مرجع در بالا قرار دارد. *Ns* مخفف *N. sativa* و *Nb* و *N. bucharica* می باشد.....۶۳

شکل ۳-۱۴: مقایسه مرزهای بین مناطق بزرگ تک کپی (LSC)، کوچک تک کپی (SSC) و تکرارهای معکوس (IR) در سه ژنوم کلروپلاست نایجلا. میزان تغییرات مشاهده شده در ژنوم کلروپلاست *N. sativa* نسبت به دو گونه دیگر (*N. bucharica* و *N. damascena*) بیشتر است.....۶۵

شکل ۳-۱۵: نتایج آزمایش CRISPR-FISH بر روی کروموزوم های متافازی *N. sativa*. توالی *Ns-sat1* با رنگ قرمز در نواحی سانترومیری همه کروموزوم ها مشخص شده است. طول خط مقیاس = ۵ میکرومتر.....۶۸

شکل ۳-۱۶: آزمایش رنگ آمیزی ایمنی با استفاده از آنتی بادی *H3K27me2*. سیگنال های مشاهده شده با رنگ قرمز در نواحی تلومیری کروموزوم ها مشخص شده است. طول خط مقیاس = ۵ میکرومتر.....۶۹

شکل ۳-۱۷: نتایج آزمایش EDU روی سلول های اینترفازی گونه *N. sativa*. سه الگو توسط EDU شناسایی شد که به رنگ قرمز بر روی سلول ها قابل مشاهده است. *Pattern 1* (الگوی اول) که کل سلول به رنگ قرمز درآمد، *Pattern 2* (الگوی دوم) که با نقاط پراکنده سلول برجسب گذاری شده است و *Pattern 3* (الگوی سوم) که به صورت نقاط سانترومیری فشرده قابل مشاهده است. تلفیق DAPI و EDU (به رنگ صورتی) در ردیف Merge قرار دارد. طول خط مقیاس = ۵ میکرومتر.....۷۰

شکل ۳-۱۸: نتایج آزمایش EDU روی گستره های کروموزومی گونه *N. sativa*. سه الگو توسط EDU شناسایی شد که به رنگ قرمز بر روی کروموزوم ها قابل مشاهده است. *Pattern 1* (الگوی اول) که کل کروموزوم ها به رنگ قرمز درآمد، *Pattern 2* (الگوی دوم) با نقاط پراکنده سرتاسر کروموزوم ها برجسب گذاری شده اند و *Pattern 3* (الگوی سوم) که به صورت نقاط سانترومیری فشرده قابل مشاهده هستند. تلفیق DAPI و EDU (به رنگ صورتی) در ردیف Merge قرار دارد. طول خط مقیاس = ۵ میکرومتر.....۷۱

شکل ۳-۱۹: NOR های فعال روی کروموزوم های متافازی گونه *N. sativa* (فلش). طول خط مقیاس = ۵ میکرومتر.....۷۲

شکل ۳-۲۰: NOR ها به صورت دایره های تیره و توپر درون سلول های اینترفازی گونه *N. sativa*. طول خط مقیاس = ۵ میکرومتر.....۷۲

شکل ۳-۲۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی از دانه گرده شش گونه از جنس نایجلا. نوار مقیاس در *N. sativa* (Ns)، *N. integrifolia* (Ni) و *N. bucharica* (Nb) ۱ میکرومتر است و در گونه های *N. arvensis* (Na)، *N. damascena* (Nd) و *N. hispanica* (Nh) ۲ میکرومتر می باشد.....۷۳



مقدمه

نایجلا^۱ جنس کوچکی از قبیله *Nigelleae* از خانواده آلاله^۲ (جدول ۱- پیوست) (Dönmez et al., 2021؛ Zohary, 1983)، بومی اروپای جنوبی، شمال آفریقا، آسیای جنوبی، آسیای جنوب غربی و خاورمیانه است (Tutin and Raab-Straube et al., 2014؛ Zohary, 1983؛ Akeroyd, 1964) (شکل ۱-۱). تعداد ۱۸ گونه در جنس نایجلا وجود دارد که در میان آن‌ها *N. sativa* L. (سیاهدانه) محبوب‌ترین گیاه در سرتاسر جهان است که از دانه‌های آن به‌عنوان ادویه و دارو جهت پیش‌گیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود (Datta et al., 2012). فعالیت‌های بیولوژیکی آن شامل خواص ضد عفونی، ضد درد، ضد باکتریایی، تقویت‌کننده و محافظ کبد، مدر و محافظ عوامل گوارشی است، همچنین خواص درمانی‌ای مانند درمان مشکلات پوستی، ضد دیابت، ضد سرطان، ضد فشار خون، ضد التهاب، ضد هپاتوتوکسیک (موادی که باعث سمیت کبدی می‌شوند)، اسپاسمولیتیک (شل‌کننده عضلات اسکلتی) و برونکودیلاتور (درمان بیماری‌های برونشیتی) دارد (Kazmi et al., 2019). سیاهدانه حاوی آمینواسیدهای آرژینین، گلوتامیک اسید، لوسین، لایزین، متیونین، تیروزین، پرولین، ترئونین و دارای اسیدهای چرب استریک، متریک اسید (۳۰ درصد) و پامتیک اسید (۱۲/۵ درصد) است (Tembhurne et al., 2014). عناصر غالب آن نیز شامل پتاسیم، فسفر، سدیم و آهن است و همچنین حاوی کلسترول، کامپسترول، سیگماسترول و بتا سیتواسترول می‌باشد (Jabeen et al., 2012). آزمایشات نشان داده‌است که روغن سیاهدانه می‌تواند گلاسیمیک را در دیابت نوع دوم بدون هیچ عوارض جانبی برای بیمار کنترل کند (Hosseini et al., 2013). علاوه بر سیاهدانه، *N. damascena* L. و *N. arvensis* نیز گیاهان زینتی و دارویی یکساله در این جنس هستند (Shaker et al., 2012؛ Ghosh and Datta, 2006؛ Malhotra, 2012). *K. integrifolia* و *Komaroffia bucharica* متعلق به قبیله *Komaroffia* (قبیله خواهری *Nigelleae*) بوده که Zohary آن‌ها را به‌عنوان مترادف برای *N. bucharica* و *N. integrifolia* پذیرفته‌است (Zohary, 1983؛ Heiss et al., 2011؛ Dönmez et al., 2021). گونه‌های دیپلوئید، *N. sativa*، *N. damascena*، *N. arvensis*، *N. hispanica* و *N. orientalis* (۲n = 2x = ۱۲)، دارای پنج جفت کروموزوم متاسانتریک^۳ و یک جفت کروموزوم تلوسنتریک^۴ هستند، اما *N. bucharica* و *N. integrifolia* (۲n = 2x = ۱۴) دارای چهار جفت کروموزوم متاسانتریک، دو جفت ساب-متاسانتریک^۵ و یک جفت کروموزوم ساب‌تلوسنتریک^۶ هستند (Gilot-Delhalle et al., 1976). مقادیر ۱ C (DNA ژنومی) در *N. sativa* و *N. damascena* به ترتیب برابر با ۱۰/۳۹ Gbp (Bennett and Smith, 1976) و ۱۰/۲۹ Gbp (Evans et al., 1972؛ Kuznetsova et al., 2017؛ Leitch et al., 2019) گزارش شده‌اند. گونه‌های جنس نایجلا به دلیل داشتن تعداد کمی از کروموزوم‌های بزرگ رنگ‌پذیر می‌توانند به‌عنوان گیاه مدل جهت مطالعه کروموزوم‌ها و تعیین موقعیت فیزیکی ژن‌ها مورد استفاده واقع شوند، اما اطلاعات کمی در مورد ترکیب ژنوم و ویژگی‌های سیتوژنتیک گونه سیاهدانه و دیگر گونه‌های این جنس وجود دارد، درحالی‌که چنین اطلاعاتی برای درک رابطه فیلوژنتیکی در این جنس مهم است (Datta et al., 2012؛ Ghosh and Datta, 2006).

DNAهای تکراری قسمت قابل توجهی از ژنوم گیاهان را تشکیل داده‌اند و درصد توالی‌های تکرار شونده در بین ژنوم گیاهان بسیار متغیر هستند، به‌عنوان مثال از ۱۳ تا ۱۴ درصد در ژنوم کوچک گیاه *Arabidopsis thaliana* (Bennett et al., 2003) (۱۵۷ Mbp/1C) تا ۹۲ درصد در گیاه *Allium cepa* با ژنوم نسبتاً بزرگ (۱۶ Gbp/1C)

¹. *Nigella*

². Ranunculaceae

³. Metacentric chromosomes

⁴. Telocentric chromosomes

⁵. Submetacentric chromosomes

⁶. Subtelocentric chromosomes

(Fu *et al.*, 2019) گزارش شده‌اند. توالی‌های تکراری شامل هزاران یا ده‌ها هزار خانواده هستند که از نظر تعداد نسخه، طول توالی تکرارشونده و ترتیب پراکنش آن‌ها در ژنوم متفاوت‌اند (Heslop-Harrison, 2000؛ Li *et al.*, 2019a). علت اصلی وجود این میزان زیاد توالی تکراری و تنوع گسترده آن‌ها به درستی درک نشده‌است، اما فرض بر این است که این توالی‌ها در پایداری و حفظ ساختار کروموزوم و جلوگیری از اختلالات در میتوز و میوز نقش دارند (Heslop-Harrison, 2000؛ Shcherban, 2015). ترانسپوزون‌ها^۱ و DNAهای تکرارشونده پیاپی^۲ (از جمله ماهواره‌ها و DNAهای ریبوزومی) توالی‌های تکرار شونده اصلی در ژنوم‌های یوکاریوتی هستند (Mehrotra and Goyal, 2014؛ Bao *et al.*, 2015؛ Piegu *et al.*, 2015؛ Wicker *et al.*, 2017). تکرارهای پیاپی به علت توانایی آن‌ها در تنظیم صفات ارثی ژنتیکی و در نتیجه تسهیل سازگاری در طی تکامل به عنوان گره‌های تنظیمی^۳ شناخته می‌شوند (Kashi and King, 2006)، همچنین توالی DNA تکراری ترانسپوزونی ممکن است باعث ایجاد ژن‌های جدید گردند (Plohl *et al.*, 2014). این توالی‌ها در فرایندهایی مانند جفت شدن و جدا شدن صحیح کروموزوم‌ها^۴، نوترکیبی کروموزوم، فشردگی کروموزوم‌ها، ارتباط کروموزوم با دوک میتوز، جفت شدن کروماتیدهای خواهری، بازآرایی‌های کروموزومی^۵، اتصال هیستون‌ها، برهم‌کنش پروتئین‌های کروماتین، تعیین ساختار کروموزوم، تکامل کاریوتیپ، پاسخ به محرک‌های محیطی و تغییرات فیزیولوژیکی و همچنین در تنظیم بیان ژن نقش دارند که به عنوان شاخص‌های اصلی تکامل و تمایز کاریوتیپ در نظر گرفته می‌شوند از این رو، به نظر می‌رسد که توالی‌های تکراری نقش مهمی در تکامل گونه‌ها دارند (Mehrotra *et al.*, 2013؛ Silva *et al.*, 2013؛ Mehrotra and Goyal, 2014؛ Li *et al.*, 2019a). از سوی دیگر ماهواره‌ها نیز به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود در بین گونه‌ها یا حتی کروموزوم‌های یک گونه معمولاً به‌عنوان نشانگرهای مولکولی و سیتوژنتیکی در مطالعات تنوع ژنتیکی و تکامل کروموزوم‌ها استفاده می‌شوند (Elder Jr and Turner, 1995؛ Ugarković and Plohl, 2002؛ Garrido-Ramos, 2017؛ Samoluk *et al.*, 2017؛ Belyayev *et al.*, 2019). اگرچه rDNA^{۴S} (۱۸S، ۵/۸S و ۲۵S) و ۵S rDNAها به طور گسترده‌ای به‌عنوان نشانگرهای سیتولوژیک برای شناسایی کروموزوم‌ها و بررسی بازآرایی‌های کروموزومی بین گونه‌های مرتبط مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Mukai *et al.*, 1991؛ Zoldos *et al.*, 1999؛ Frello and Heslop-Harrison, 2000؛ Tagashira and Kondo, 2001؛ Datson and Murray, 2003)، اما توالی‌های ITS^۶ که بخشی از rDNA^{۴S} هستند در بین گونه‌ها نسبتاً متغیرند. علاوه بر بازآرایی‌های کروموزومی در مقیاس بزرگ، مانند وارونگی‌ها و جابه‌جایی‌ها، تنوع زیاد در تعداد کپی و توزیع تکرارهای پشت سر هم نیز می‌تواند منجر به واگرایی ژنوم و تغییرات کاریوتیپ بین گونه‌های نزدیک به هم شود (Appels *et al.*, 1980؛ Mukai *et al.*, 1991؛ Levin, 2002). به کمک توالی‌یابی نسل جدید می‌توان توالی‌های تکراری را تعیین کرده و به منظور تهیه کاوشگر و انجام مطالعات سیتوژنتیکی مورد استفاده قرار داد. کروموزوم‌ها ممکن است با برخی از کاوشگرها الگوی خاصی را نشان دهند که منجر به شناسایی و تمایز آن‌ها از یکدیگر شود (Liu *et al.*, 2019).

در این مطالعه، ما ترکیب توالی‌های تکراری در ژنوم گیاهان *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica* را با استفاده از توالی‌یابی ژنومی با پوشش کم^۷ مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار دادیم. علاوه بر این، ما کاریوتیپ‌های

1. Transposable Elements (TEs)

2. Tandem Repeats (TRs)

3. Tuning knobs

4. Chromosome movement and pairing

5. Chromosome arrangement

6. Internal transcribed spacer

7. Low coverage

هفت گونه از جنس نایجلا را با انجام آزمایش FISH¹ توسط توالی‌های تکراری ماهواره‌ای و rDNAها ترسیم کردیم. rDNA^{45S} های فعال توسط رنگ‌آمیزی Ag-NOR بررسی شدند و آزمایشات تکمیلی رنگ‌آمیزی ایمنولوژیک و EDU² به منظور بررسی تعامل بین هیستون‌ها و توالی‌های تکراری و شناخت بیشتر چرخه سلولی در این جنس انجام گرفت. نوع و الگوی تکرارهای ماهواره‌ای و تعداد کروموزوم‌ها با روابط فیلوژنتیکی به دست آمده از توالی‌های ITS و rbcL مطابقت داشت. همچنین نتایج به دست آمده از بررسی مورفولوژیکی دانه گرده در راستای تایید نتایج فیلوژنتیک بود. از سوی دیگر برای درک تکامل و تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی در جنس نایجلا و خانواده آلله که می‌تواند به استفاده دارویی از این جنس نیز کمک نماید، مهم است که نشانگرها و اطلاعات مولکولی گونه‌های جداگانه را به دست آوریم، زیرا گونه‌ها اغلب ناشناخته هستند و می‌توانند بر محصول نهایی تأثیر بگذارند، بنابراین شناسایی دقیق گونه‌ها ضروری است (Li et al., 2019b). حدود ۳۰۰۰ ژنوم کامل کلروپلاست در پایگاه داده NCBI قابل دسترسی است و با توسعه توالی‌یابی نسل جدید، تعداد ژنوم‌های کلروپلاست ثبت شده افزایش یافته است (Li et al., 2019b؛ Bautista et al., 2020؛ Giang et al., 2020)، اما تنها یک توالی کامل DNA کلروپلاست از گونه سیاهدانه دمشقی³ در بانک ژن وجود دارد. در این مطالعه، ژنوم‌های کلروپلاست سه گونه نایجلا را بر اساس داده‌های توالی‌یابی نسل جدید با پوشش کم، توسط پلتفرم Usegalaxy با استفاده از ژنوم مرجع گرفته شده از بانک ژن، به روش *de novo* سرهم‌بندی گردید و حاشیه‌نویسی ژنوم‌های کلروپلاست *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica* برای مقایسه این سه گونه انجام گرفت.

اهداف

- ۱) مطالعه ماهیت، مقدار و نحوه سازماندهی توالی‌های تکراری در ژنوم گیاه سیاهدانه (گونه‌های *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica*)
- ۲) نقشه‌یابی فیزیکی توالی‌های تکراری در ژنوم گونه‌های *N. sativa*، *N. damascena* و *N. bucharica*
- ۳) مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های جنس نایجلا با استفاده از روش‌های توالی‌یابی نسل جدید

¹ Fluorescence in situ hybridization

² 5_ethyl_2'_deoxyuridine

³ *N. damascena*

۴-۳- پیشنهادات

تلفیق CRISPR-FISH و رنگ‌آمیزی ایمنولوژیک جهت تعیین برهم‌کنش بین توالی‌های تکراری و پروتئین‌های ساختاری مانند H3K27me2

بررسی گونه‌های بیشتر از این جنس به منظور حل روابط فیلوژنتیک و بررسی روند تکاملی و همچنین تعیین موقعیت *N.integrifolia* و *N.bucharica*، آیا می‌توان آن‌ها را در جنسی جداگانه طبقه‌بندی کرد؟

تلاش مجدد در تلاقی بین گونه‌ای جهت بررسی تلاقی‌پذیری و هیبریدهای حاصل از تلاقی، همچنین با اهداف اصلاحی جهت تولید گیاهانی با صفات دارویی و مورفولوژی بهتر

انجام RNAseq و بررسی SSRها جهت تهیه ماکرهای مولکولی، همچنین بررسی بیان ژن‌ها در این جنس





منابع

- Albert, P., Gao, Z., Danilova, T. and Birchler, J. 2010. Diversity of chromosomal karyotypes in maize and its relatives. *Cytogenetic and genome research*, 129: 6-16.
- Alkhimova, O.G., Mazurok, N.A., Potapova, T.A., Zakian, S.M., Heslop-Harrison, J.S. and Vershinin, A.V. 2004. Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes. *Chromosoma*, 113: 42-52.
- Amiryousefi, A., Hyvönen, J. and Poczai, P. 2018. IRscope: an online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes. *Bioinformatics*, 34: 3030-3031.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Appels, R., Gerlach, W., Dennis, E., Swift, H. and Peacock, W. 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma*, 78: 293-311.
- Atamuratova, N., Mukhamatjanova, R. and Ch, B.K. 2021. Honey significance of forest lands in south Uzbekistan, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, pp. 012013.
- Bagheri, A., Akhavan Roofgar, A., Abbasi, S., Maassoumi, A.A., Rutten, T. and Blattner, F.R. 2019. Pollen morphology of *Astragalus* section *Hymenostegis* (Fabaceae) and evaluation of its systematic implications. *Grana*, 58: 328-336.
- Bao, W., Kojima, K.K. and Kohany, O. 2015. Repbase Update, a database of repetitive elements in eukaryotic genomes. *Mobile DNA*, 6: 1-6.
- Baskin, T.I., Busby, C.H., Fowke, L.C., Sammut, M. and Gubler, F. 1992. Improvements in immunostaining samples embedded in methacrylate: localization of microtubules and other antigens throughout developing organs in plants of diverse taxa. *Planta*, 187: 405-413.
- Bauer, E., Schmutzer, T., Barilar, I., Mascher, M., Gundlach, H., Martis, M.M., Twardziok, S.O., Hackauf, B., Gordillo, A. and Wilde, P. 2017. Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*, 89: 853-869.
- Bautista, M.A.C., Zheng, Y., Hu, Z., Deng, Y. and Chen, T. 2020. Comparative analysis of complete chloroplast genome sequences of wild and cultivated *Bougainvillea* (Nyctaginaceae). *Plants*, 9: 1671.
- Beier, S., Thiel, T., Münch, T., Scholz, U. and Mascher, M. 2017. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics*, 33: 2583-2585.
- Belyayev, A., Josefiová, J., Jandová, M., Kalendar, R., Krak, K. and Mandák, B. 2019. Natural history of a satellite DNA family: from the ancestral genome component to species-specific sequences, concerted and non-concerted evolution. *International journal of molecular sciences*, 20: 1201.
- Bennett, M., Leitch, I.J., James, P.H. and Johnston, J.S. 2003. Comparisons with *Caenorhabditis* (~ 100 Mb) and *Drosophila* (~ 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~ 157 Mb and thus ~ 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~ 125 Mb. *Annals of Botany*, 91: 547-557.
- Bennett, M.D. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 181: 109-135.
- Bennett, M.D. and Smith, J. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 274: 227-274.
- Berke, L., Sanchez-Perez, G.F. and Snel, B. 2012. Contribution of the epigenetic mark H3K27me3 to functional divergence after whole genome duplication in *Arabidopsis*. *Genome biology*, 13: 1-9.
- Birhanu, K., Tileye, F., Yohannes, P. and Said, M. 2015. Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L.) from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 14: 1543-1551.
- Biscotti, M.A., Olmo, E. and Heslop-Harrison, J.P. 2015. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. Springer.
- Biswas, A. and Chatterjee, A. 1971. Studies on the induction of ploidy in some species. *Bull. Bot. Soc. Beng*, 25: 19-21.
- Blackburn, E.H. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106: 661-673.

- Bourge, M., Brown, S.C. and Siljak-Yakovlev, S. 2018. Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment. *Genetics & Applications*, 2: 1-12.
- Brown, N.P., Leroy, C. and Sander, C. 1998. MView: a web-compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14: 380-381.
- Buchon, N. and Vaury, C. 2006. RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements. *Heredity*, 96: 195-202.
- Cai, J., Liu, X., Vanneste, K., Proost, S., Tsai, W.-C., Liu, K.-W., Chen, L.-J., He, Y., Xu, Q. and Bian, C. 2015. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. *Nature genetics*, 47: 65-72.
- Chand, S. and Roy, S.C. 1980. Cytological abnormalities during culture of *Nigella sativa*. *Protoplasma*, 104: 353-357.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Lognay, G., Blecker, C., Deroanne, C. and Attia, H. 2008. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 162-168.
- Chen, C., Zheng, Y., Liu, S., Zhong, Y., Wu, Y., Li, J., Xu, L.-A. and Xu, M. 2017. The complete chloroplast genome of *Cinnamomum camphora* and its comparison with related Lauraceae species. *PeerJ*, 5: e3820.
- Chen, Z.J. 2007. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58: 377-406.
- Cheng, J., Zeng, X., Ren, G. and Liu, Z. 2013. CGAP: a new comprehensive platform for the comparative analysis of chloroplast genomes. *BMC bioinformatics*, 14: 1-8.
- Chica, C., Louis, A., Roest Crolius, H., Colot, V. and Roudier, F. 2017. Comparative epigenomics in the Brassicaceae reveals two evolutionarily conserved modes of PRC2-mediated gene regulation. *Genome biology*, 18: 1-15.
- Clarkson, J.J., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Knapp, S. and Leitch, A.R. 2005. Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (Solanaceae). *New Phytologist*, 168: 241-252.
- Cohen, A.L. and Jia, S. 2014. Noncoding RNAs and the borders of heterochromatin. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5: 835-847.
- da Silva, M.J., Destro, R.F., Gazoni, T., Narimatsu, H., dos Santos, P.S.P., Haddad, C.F. and Parise-Maltempi, P.P. 2020. Great abundance of satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. *Cytogenetic and genome research*, 160: 141-147.
- Darlington, C.D. and Wylie, A.P. 1956. Chromosome atlas of flowering plants. Chromosome atlas of flowering plants.
- Datson, P.M. and Murray, B.G. 2003. The use of in situ hybridisation to investigate plant chromosome diversity. *Plant genome biodiversity and evolution*. Enfield, NH, Science Publishers Inc: 297-318.
- Datta, A.K. and Saha, A. 2003. Cytomorphological studies and seed protein characterization of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Cytologia*, 68: 51-60.
- Datta, A.K., Saha, A., Bhattacharya, A., Mandal, A., Paul, R. and Sengupta, S. 2012. Black cumin (*Nigella sativa* L.)—a review. *Journal of plant development sciences*, 4: 1-43.
- de Koning, A.J., Gu, W., Castoe, T.A., Batzer, M.A. and Pollock, D.D. 2011. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS genetics*, 7: e1002384.
- Deng, W., Shi, X., Tjian, R., Lionnet, T. and Singer, R.H. 2015. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 11870-11875.
- Dierckxsens, N., Mardulyn, P. and Smits, G. 2017. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic acids research*, 45: e18-e18.
- Do, G.S., Seo, B.B., Yamamoto, M., Suzuki, G. and Mukai, Y. 2001. Identification and chromosomal location of tandemly repeated DNA sequences in *Allium cepa*. *Genes & genetic systems*, 76: 53-60.
- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 51: 127-8; author reply 129.

- Dönmez, A.A., Aydin, Z.U. and Dönmez, E.O. 2021. Taxonomic monograph of the tribe Nigelleae (Ranunculaceae): a group including ancient medicinal plants. *Turkish Journal of Botany*, 45: 468-502.
- Dpooležel, J., Binarová, P. and Lcretti, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia plantarum*, 31: 113-120.
- Ebrahimi, A., Antonides, J.D., Pinchot, C.C., Slavicek, J.M., Flower, C.E. and Woeste, K.E. 2021. The complete chloroplast genome sequence of American elm (*Ulmus americana*) and comparative genomics of related species. *Tree Genetics & Genomes*, 17: 1-13.
- Elder Jr, J.F. and Turner, B.J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly review of biology*, 70: 297-320.
- Evans, G., Rees, H., Snell, C. and Sun, S. 1972. The relationship between nuclear DNA amount and the duration of the mitotic cycle. *Chromosomes today*, 3: 24-31.
- Ferrari, K.J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T. and Pasini, D. 2014. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Molecular cell*, 53: 49-62.
- Ferree, P.M. and Barbash, D.A. 2009. Species-specific heterochromatin prevents mitotic chromosome segregation to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *PLoS biology*, 7: e1000234.
- Fesenko, I., Khrustaleva, L. and Karlov, G. 2002. Organization of the 378-bp satellite repeat in terminal heterochromatin of *Allium fistulosum*. *Russian Journal of Genetics*, 38: 745-753.
- Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *TRENDS in Genetics*, 5: 103-107.
- Franz, P.F. and de Jong, J.H. 2002. Chromatin dynamics in plants. *Current opinion in plant biology*, 5: 560-567.
- Frello, S. and Heslop-Harrison, J. 2000. Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by in situ hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Annals of Botany*, 86: 317-322.
- Freyer, R., Hoch, B., Neckermann, K., Maier, R.M. and Kössel, H. 1993. RNA editing in maize chloroplasts is a processing step independent of splicing and cleavage to monocistronic mRNAs. *The Plant Journal*, 4: 621-629.
- Fu, J., Zhang, H., Guo, F., Ma, L., Wu, J., Yue, M., Zheng, X., Qiu, Z. and Li, L. 2019. Identification and characterization of abundant repetitive sequences in *Allium cepa*. *Scientific reports*, 9: 1-7.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A. and Schubert, I. 2006. Chromosomal histone modification patterns—from conservation to diversity. *Trends in plant science*, 11: 199-208.
- Gaiero, P., Vaio, M., Peters, S.A., Schranz, M.E., de Jong, H. and Speranza, P.R. 2019. Comparative analysis of repetitive sequences among species from the potato and the tomato clades. *Annals of Botany*, 123: 521-532.
- Garrido-Ramos, M.A. 2017. Satellite DNA: an evolving topic. *Genes*, 8: 230.
- Gerlach, W. and Bedbrook, J. 1979. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic acids research*, 7: 1869-1885.
- Gerlach, W. and Dyer, T. 1980. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic acids research*, 8: 4851-4865.
- Ghosh, A. and Datta, A.K. 2006. Karyotyping of *Nigella sativa* L.(black cumin) and *Nigella damascena* L.(love-in-a-mist) by image analyzing system. *Cytologia*, 71: 1-4.
- Giang, V.N.L., Waminal, N.E., Park, H.-S., Kim, N.-H., Jang, W., Lee, J. and Yang, T.-J. 2020. Comprehensive comparative analysis of chloroplast genomes from seven *Panax* species and development of an authentication system based on species-unique single nucleotide polymorphism markers. *Journal of ginseng research*, 44: 135-144.
- Gilot-Delhalle, J., Degraeve, N. and Moutschen, J. 1976. Cytotaxonomic investigation of the genus *Nigella* (Helleboreae) with C-banding techniques. *Caryologia*, 29: 139-154.
- Gregory, T. 2005. *The evolution of the genome* Elsevier Academic Press. San Diego CA USA.
- Greiner, S., Lehwark, P. and Bock, R. 2019. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3. 1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic acids research*, 47: W59-W64.
- Grewal, S.I. and Moazed, D. 2003. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *science*, 301: 798-802.

- Guo, X. and Han, F. 2014. Asymmetric epigenetic modification and elimination of rDNA sequences by polyploidization in wheat. *The Plant Cell*, 26: 4311-4327.
- He, Q., Cai, Z., Hu, T., Liu, H., Bao, C., Mao, W. and Jin, W. 2015. Repetitive sequence analysis and karyotyping reveals centromere-associated DNA sequences in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC plant biology*, 15: 105.
- Heiss, A.G., Kropf, M., Sontag, S. and Weber, A. 2011. Seed morphology of *Nigella* s.l. (Ranunculaceae): Identification, diagnostic traits, and their potential phylogenetic relevance. *International Journal of Plant Sciences*, 172: 267-284.
- Heiss, A.G., Stika, H.-P., De Zorzi, N. and Jursa, M. 2013. *Nigella* in the Mirror of Time A Brief Attempt to Draw a Genus' Ethnohistorical Portrait. *Offa*, 69: 147-169.
- Hemleben, V., Kovarik, A., Torres-Ruiz, R.A., Volkov, R.A. and Beridze, T. 2007. Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Systematics and Biodiversity*, 5: 277-289.
- Henikoff, S., Ahmad, K. and Malik, H.S. 2001. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *science*, 293: 1098-1102.
- Heslop-Harrison, J. 2000. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *The Plant Cell*, 12: 617-635.
- Heslop-Harrison, J. and Schwarzacher, T. 2013. Nucleosomes and centromeric DNA packaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 19974-19975.
- Heslop-Harrison, J. and Schwarzacher, T. 2011. Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal*, 66: 18-33.
- Holoch, D. and Moazed, D. 2015. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16: 71.
- Hosseini, M., Mirkarimi, S., Amini, M., Mohtashami, R., Kianbakht, S. and FALLAH, H.H. 2013. Effects of *Nigella sativa* L. seed oil in type II diabetic Patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial.
- Houben, A., Belyaev, N.D., Turner, B.M. and Schubert, I. 1996. Differential immunostaining of plant chromosomes by antibodies recognizing acetylated histone H4 variants. *Chromosome research*, 4: 191-194.
- Huang, H., Shi, C., Liu, Y., Mao, S.-Y. and Gao, L.-Z. 2014. Thirteen *Camellia* chloroplast genome sequences determined by high-throughput sequencing: genome structure and phylogenetic relationships. *BMC Evolutionary biology*, 14: 1-17.
- Ijdo, J., Wells, R., Baldini, A. and Reeders, S. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic acids research*, 19: 4780.
- Ishii, T., Schubert, V., Khosravi, S., Dreissig, S., Metje-Sprink, J., Sprink, T., Fuchs, J., Meister, A. and Houben, A. 2019. RNA-guided endonuclease-in situ labelling (RGEN-ISL). *The New Phytologist*, 222: 1652-1661.
- Jabbour, F., Du Pasquier, P.-E., Chazalviel, L., Le Guilloux, M., e Silva, N.C., Deveaux, Y., Manicacci, D., Galipot, P., Heiss, A.G. and Damerval, C. 2021. Evolution of the distribution area of the Mediterranean *Nigella damascena* and a likely multiple molecular origin of its perianth dimorphism. *Flora*, 274: 151735.
- Jabeen, R., Iftikhar, T., Mengal, T. and Khattak, M. 2012. A comparative chromosomal count and morphological karyotyping of three indigenous cultivars of Kalongi (*Nigella sativa* L.). *Pak. J. Bot*, 44: 1007-1012.
- Jiang, J., Birchler, J.A., Parrott, W.A. and Dawe, R.K. 2003. A molecular view of plant centromeres. *Trends in plant science*, 8: 570-575.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337: 816-821.
- Kahlau, S., Aspinall, S., Gray, J.C. and Bock, R. 2006. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 63: 194-207.
- Kahraman, K. and Lucas, S.J. 2019. Comparison of different annotation tools for characterization of the complete chloroplast genome of *Corylus avellana* cv Tombul. *BMC genomics*, 20: 1-12.

- Kantety, R.V., La Rota, M., Matthews, D.E. and Sorrells, M.E. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant molecular biology*, 48: 501-510.
- Kapitonov, V.V. and Jurka, J. 2008. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nature Reviews Genetics*, 9: 411-412.
- Kashi, Y. and King, D.G. 2006. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *TRENDS in Genetics*, 22: 253-259.
- Katoh, K. and Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30: 772-780.
- Kazmi, A., Khan, M.A. and Huma, A. 2019. Biotechnological approaches for production of bioactive secondary metabolites in *Nigella sativa*: an up-to-date review. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6: 172-195.
- Kelemen, C.D., Houdkova, M., Urbanova, K., Badarau, S., Gurean, D., Pamfil, D. and Kokoska, L. 2019. Chemical composition of the essential oils of aerial parts of *Aconitum*, *Anemone* and *Ranunculus* (Ranunculaceae) species from Romania. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22: 728-745.
- Khosravi, S., Ishii, T., Dreissig, S. and Houben, A. 2020. Application and prospects of CRISPR/Cas9-based methods to trace defined genomic sequences in living and fixed plant cells. *Chromosome research*, 28: 7-17.
- Kirov, I., Gilyok, M., Knyazev, A. and Fesenko, I. 2018. Pilot satellitome analysis of the model plant, *Physcomitrella patens*, revealed a transcribed and high-copy IGS related tandem repeat. *Comparative Cytogenetics*, 12: 493.
- Kirov, I.V., Kiseleva, A.V., Van Laere, K., Van Roy, N. and Khrustaleva, L.I. 2017a. Tandem repeats of *Allium fistulosum* associated with major chromosomal landmarks. *Molecular genetics and genomics*, 292: 453-464.
- Kirov, I.V., Kiseleva, A.V., Van Laere, K., Van Roy, N. and Khrustaleva, L.I. 2017b. Tandem repeats of *Allium fistulosum* associated with major chromosomal landmarks. *Molecular genetics and genomics*, 292: 453-464.
- Kodama, Y., Yoshida, M.C. and Sasaki, M. 1980. An improved silver staining technique for nucleolus organizer regions by using nylon cloth. *Japanese journal of human genetics*, 25: 229-233.
- Kökdil, G. and Yılmaz, H. 2005. Analysis of the fixed oils of the genus *Nigella* L. (Ranunculaceae) in Turkey. *Biochemical systematics and ecology*, 33: 1203-1209.
- Komuro, S., Endo, R., Shikata, K. and Kato, A. 2013. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence in situ hybridization procedure. *Genome*, 56: 131-137.
- Kong, W.Q. and Yang, J.H. 2017. The complete chloroplast genome sequence of *Morus cathayana* and *Morus multicaulis*, and comparative analysis within genus *Morus* L. *PeerJ*, 5: e3037.
- Koo, D.-H., Hong, C.P., Batley, J., Chung, Y.S., Edwards, D., Bang, J.-W., Hur, Y. and Lim, Y.P. 2011. Rapid divergence of repetitive DNAs in *Brassica* relatives. *Genomics*, 97: 173-185.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35: 1547.
- Kurtz, S., Choudhuri, J.V., Ohlebusch, E., Schleiermacher, C., Stoye, J. and Giegerich, R. 2001. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale. *Nucleic acids research*, 29: 4633-4642.
- Kuznetsova, M.A., Chaban, I.A. and Sheval, E.V. 2017a. Visualization of chromosome condensation in plants with large chromosomes. *BMC plant biology*, 17: 1-12.
- Kuznetsova, M.A., Chaban, I.A. and Sheval, E.V. 2017b. Visualization of chromosome condensation in plants with large chromosomes. *BMC plant biology*, 17: 153.
- Leitch, I., Johnston, E., Pellicer, J., Hidalgo, O. and Bennett, M. 2019. Plant DNA C-values database (release 7.1, April 2019).
- Leitch, I.J. and Leitch, A.R. 2013. *Genome size diversity and evolution in land plants*. Springer.
- Levan, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas.*, 52: 201-220.
- Levin, D.A. 2002. *The role of chromosomal change in plant evolution*. Oxford University Press, USA.
- Li, R., Ma, P.-F., Wen, J. and Yi, T.-S. 2013. Complete sequencing of five Araliaceae chloroplast genomes and the phylogenetic implications. *PLOS ONE*, 8: e78568.

- Li, S.-F., Guo, Y.-J., Li, J.-R., Zhang, D.-X., Wang, B.-X., Li, N., Deng, C.-L. and Gao, W.-J. 2019a. The landscape of transposable elements and satellite DNAs in the genome of a dioecious plant spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Mobile DNA*, 10: 3.
- Li, W., Zhang, C., Guo, X., Liu, Q. and Wang, K. 2019b. Complete chloroplast genome of *Camellia japonica* genome structures, comparative and phylogenetic analysis. *PLOS ONE*, 14: e0216645.
- Lisch, D. 2009. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annual review of plant biology*, 60: 43-66.
- Liu, Q., Li, X., Zhou, X., Li, M., Zhang, F., Schwarzacher, T. and Heslop-Harrison, J.S. 2019. The repetitive DNA landscape in *Avena* (Poaceae): chromosome and genome evolution defined by major repeat classes in whole-genome sequence reads. *BMC plant biology*, 19: 226.
- Liu, Y., Yuan, J., Jia, G., Ye, W., Jeffrey Chen, Z. and Song, Q. 2021. Histone H3K27 dimethylation landscapes contribute to genome stability and genetic recombination during wheat polyploidization. *The Plant Journal*, 105: 678-690.
- Lowe, T.M. and Chan, P.P. 2016. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic acids research*, 44: W54-W57.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R., Potter, S.C. and Finn, R.D. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, 47: W636-W641.
- Makałowski, W., Gotea, V., Pande, A. and Makałowska, I. 2019. Transposable elements: Classification, identification, and their use as a tool for comparative genomics. Springer.
- Malhotra, S. 2012. *Nigella*, Handbook of herbs and spices. Elsevier, pp. 391-416.
- Marçais, G. and Kingsford, C. 2011. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics*, 27: 764-770.
- Marks, G. 1975. The Giemsa-staining centromeres of *Nigella damascena*. *Journal of cell science*, 18: 19-25.
- Maumus, F. and Quesneville, H. 2016. Impact and insights from ancient repetitive elements in plant genomes. *Current opinion in plant biology*, 30: 41-46.
- Mayor, C., Brudno, M., Schwartz, J.R., Poliakov, A., Rubin, E.M., Frazer, K.A., Pachter, L.S. and Dubchak, I. 2000. VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. *Bioinformatics*, 16: 1046-1047.
- Mehrotra, S., Goel, S., Sharma, S., Raina, S.N. and Rajpal, V.R. 2013. Sequence analysis of KpnI repeat sequences to revisit the phylogeny of the Genus *Carthamus* L. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169: 1109-1125.
- Mehrotra, S. and Goyal, V. 2014. Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 12: 164-171.
- Mirzaghaderi, G., Abdolmalaki, Z., Zohouri, M., Moradi, Z. and Mason, A.S. 2017. Dynamic nucleolar activity in wheat× *Aegilops* hybrids: evidence of C-genome dominance. *Plant cell reports*, 36: 1277-1285.
- Mlinarec, J., Skuhala, A., Jurković, A., Malenica, N., McCann, J., Weiss-Schneeweiss, H., Bohanec, B. and Besendorfer, V. 2019. The repetitive DNA composition in the natural pesticide producer *Tanacetum cinerariifolium*: interindividual variation of subtelomeric tandem repeats. *Frontiers in plant science*, 10: 613.
- Mukai, Y., Endo, T. and Gill, B. 1991. Physical mapping of the 18S. 26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. *Chromosoma*, 100: 71-78.
- Nagaki, K. and Yamaji, N. 2020. Decrosslinking enables visualization of RNA-guided endonuclease–in situ labeling signals for DNA sequences in plant tissues. *Journal of experimental botany*, 71: 1792-1800.
- Naz, H. 2011. *Nigella sativa*: the miraculous herb. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol*, 44: 44-48.
- Nosov, A., Fomenkov, A., Mamaeva, A., Solovchenko, A. and Novikova, G. 2014. Extra perspectives of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine click reaction with fluorochrome azides to study cell cycle and deoxyribonucleoside metabolism. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61: 899-909.
- Novák, P., Ávila Robledillo, L., Koblížková, A., Vrbová, I., Neumann, P. and Macas, J. 2017. TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic acids research*, 45: e111-e111.

- Novák, P., Neumann, P. and Macas, J. 2010. Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC bioinformatics*, 11: 378.
- Novák, P., Neumann, P. and Macas, J. 2020. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nature Protocols*.
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J. and Macas, J. 2013. RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29: 792-793.
- Oh, S.H. and Park, C.W. 1998. Crossability of the *Aconitum jaluense* species complex (Ranunculaceae) in Korea. *Korean Journal of Biological Sciences*, 2: 435-438.
- Oliveira, R.A., Kotadia, S., Tavares, A., Mirkovic, M., Bowlin, K., Eichinger, C.S., Nasmyth, K. and Sullivan, W. 2014. Centromere-independent accumulation of cohesin at ectopic heterochromatin sites induces chromosome stretching during anaphase. *PLoS biology*, 12: e1001962.
- Paarakh, P.M. 2010. *Nigella sativa* Linn.—A comprehensive review.
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S. and Leitch, I.J. 2018. Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*, 9: 88.
- Piegu, B., Bire, S., Arensburger, P. and Bigot, Y. 2015. A survey of transposable element classification systems—a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 86: 90-109.
- Plohl, M., Meštrović, N. and Mravinac, B. 2014. Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma*, 123: 313-325.
- Potlapalli, B.P., Schubert, V., Metje-Sprink, J., Liehr, T. and Houben, A. 2020. Application of Tris-HCl allows the specific labeling of regularly prepared chromosomes by CRISPR-FISH. *Cytogenetic and genome research*, 160: 156-165.
- Qian, J., Song, J., Gao, H., Zhu, Y., Xu, J., Pang, X., Yao, H., Sun, C., Li, X.e. and Li, C. 2013. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *PLOS ONE*, 8: e57607.
- Raab-Straube, E.v., Hörandl, E. and Nardi, E. 2014. Ranunculaceae. *EuroMedPlantBase—the information resource for Euro-Mediterranean plant*
- Reinhart, B.J. and Bartel, D.P. 2002. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *science*, 297: 1831-1831.
- Robinson, A.C., Castañeda, C.A., Schlessman, J.L. and García-Moreno E, B. 2014. Structural and thermodynamic consequences of burial of an artificial ion pair in the hydrophobic interior of a protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 11685-11690.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. and Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34: 3299-3302.
- Ruprecht, C., Lohaus, R., Vanneste, K., Mutwil, M., Nikoloski, Z., Van de Peer, Y. and Persson, S. 2017. Revisiting ancestral polyploidy in plants. *Science Advances*, 3: e1603195.
- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81: 8014-8018.
- Samoluk, S.S., Robledo, G., Bertioli, D. and Seijo, J.G. 2017. Evolutionary dynamics of an at-rich satellite DNA and its contribution to karyotype differentiation in wild diploid *Arachis species*. *Molecular genetics and genomics*, 292: 283-296.
- Savita, R., Sanjeev, K., Mudassir, J.S., Santosh, K. and Chand, G.R. 2011. Cytological studies in some members of family Ranunculaceae from Western Himalayas (India). *Caryologia*, 64: 405-418.
- Shaker, S.S., Mohammadi, A. and Shahli, M.K. 2017. Cytological studies on some ecotypes of *Nigella sativa* L. in Iran. *Cytologia*, 82: 123-126.
- Sharma, S. and Raina, S. 2005. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes. *Cytogenetic and genome research*, 109: 15-26.
- Shcherban, A. 2015. Repetitive DNA sequences in plant genomes. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 5: 159-167.

- She, W., Baroux, C. and Grossniklaus, U. 2018. Cell-type specific chromatin analysis in whole-mount plant tissues by immunostaining. *Plant Chromatin Dynamics: Methods and Protocols*: 443-454.
- Shen, W., Dong, Z., Zhao, W., Ma, L., Wang, F., Li, W. and Xin, P. 2022. Complete chloroplast genome sequence of *Rosa lucieae* and its characteristics. *Horticulturae*, 8: 788.
- Shi, L., Chen, H., Jiang, M., Wang, L., Wu, X., Huang, L. and Liu, C. 2019. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer. *Nucleic acids research*, 47: W65-W73.
- Siljak-Yakovlev, S., Stevanovic, V., Tomasevic, M., Brown, S.C. and Stevanovic, B. 2008. Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: cytogeography of living fossils. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 101-112.
- Silva, D.M., Pansonato-Alves, J.C., Utsunomia, R., Daniel, S.N., Hashimoto, D.T., Oliveira, C., Porto-Foresti, F. and Foresti, F. 2013. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*, 141: 329-336.
- Skalicka, K., Lim, K., Matyasek, R., Matzke, M., Leitch, A. and Kovarik, A. 2005. Preferential elimination of repeated DNA sequences from the paternal, *Nicotiana tomentosiformis* genome donor of a synthetic, allotetraploid tobacco. *New Phytologist*, 166: 291-303.
- Skvarla, J.J. and Nowicke, J.W. 1979. The morphology of the exine in *Nigella* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 66: 162-165.
- Slotkin, R.K. and Martienssen, R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, 8: 272-285.
- Song, Q. and Chen, Z.J. 2015. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current opinion in plant biology*, 24: 101-109.
- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. *Chromosomal evolution in higher plants*.
- Stronghill, P.E., Azimi, W. and Hasenkampf, C.A. 2014. A novel method to follow meiotic progression in *Arabidopsis* using confocal microscopy and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine labeling. *Plant Methods*, 10: 1-8.
- Suntronpong, A., Singchat, W., Kruasuwan, W., Prakhongcheep, O., Sillapaprayoon, S., Muangmai, N., Somyong, S., Indanada, C., Kraichak, E. and Peyachoknagul, S. 2020. Characterization of centromeric satellite DNAs (MALREP) in the Asian swamp eel (*Monopterus albus*) suggests the possible origin of repeats from transposable elements. *Genomics*.
- Swift, H. 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 36: 643-654.
- Tagashira, N. and Kondo, K. 2001. Chromosome phylogeny of *Zamia* and *Ceratozamia* by means of Robertsonian changes detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) technique of rDNA. *Plant Systematics and Evolution*, 227: 145-155.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38: 3022-3027.
- Tembhurne, S., Feroz, S., More, B. and Sakarkar, D. 2014. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa* (kalonji) seeds. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8: 167-177.
- Tennekes, M. 2018. tmap: Thematic maps in R. *Journal of Statistical Software*, 84: 1 - 39.
- Tillich, M., Lehwark, P., Pellizzer, T., Ulbricht-Jones, E.S., Fischer, A., Bock, R. and Greiner, S. 2017. GeSeq—versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic acids research*, 45: W6-W11.
- Tutin, T. and Akeroyd, J. 1964. *Nigella* L. *Flora Europaea*, 1: 209-210.
- Ugarković, Đ. and Plohl, M. 2002. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *The EMBO journal*, 21: 5955-5959.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40: e115-e115.
- Verstrepen, K.J., Jansen, A., Lewitter, F. and Fink, G.R. 2005. Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature genetics*, 37: 986.
- Vozdova, M., Kubickova, S., Cernohorska, H., Fröhlich, J., Martínková, N. and Rubes, J. 2020. Sequence analysis and FISH mapping of four satellite DNA families among Cervidae. *Genes*, 11: 584.

- Wang, C., Liu, C., Roqueiro, D., Grimm, D., Schwab, R., Becker, C., Lanz, C. and Weigel, D. 2015. Genome-wide analysis of local chromatin packing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome research*, 25: 246-256.
- Wang, R.-J., Cheng, C.-L., Chang, C.-C., Wu, C.-L., Su, T.-M. and Chaw, S.-M. 2008. Dynamics and evolution of the inverted repeat-large single copy junctions in the chloroplast genomes of monocots. *BMC Evolutionary biology*, 8: 1-14.
- Waseem, S., Mirza, B., Ahmed, I. and Waheed, M.T. 2019. Comparative analyses of chloroplast genomes of *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*. *Biologia*: 1-11.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M. and Panaud, O. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8: 973-982.
- Wicker, T., Schulman, A.H., Tanskanen, J., Spannagl, M., Twardziok, S., Mascher, M., Springer, N.M., Li, Q., Waugh, R. and Li, C. 2017. The repetitive landscape of the 5100 Mbp barley genome. *Mobile DNA*, 8: 22.
- Xue, S., Shi, T., Luo, W., Ni, X., Iqbal, S., Ni, Z., Huang, X., Yao, D., Shen, Z. and Gao, Z. 2019a. Comparative analysis of the complete chloroplast genome among *Prunus mume*, *P. armeniaca*, and *P. salicina*. *Horticulture research*, 6: 1-13.
- Xue, S., Shi, T., Luo, W., Ni, X., Iqbal, S., Ni, Z., Huang, X., Yao, D., Shen, Z. and Gao, Z. 2019b. Comparative analysis of the complete chloroplast genome among *Prunus mume*, *P. armeniaca*, and *P. salicina*. *Horticulture research*, 6.
- Yang, Y., Guo, X., Wang, K.-l., Liu, Q.-h. and Liu, Q.-c. 2019a. Anther and ovule development in *Clematis terniflora* var. *mandshurica* (Ranunculaceae). *Flora*, 253: 67-75.
- Yang, Y., Zhou, T., Duan, D., Yang, J., Feng, L. and Zhao, G. 2016. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species. *Frontiers in plant science*, 7: 959.
- Yang, Z., Huang, Y., An, W., Zheng, X., Huang, S. and Liang, L. 2019b. Sequencing and structural analysis of the complete chloroplast genome of the medicinal plant *Lycium chinense* Mill. *Plants*, 8: 87.
- Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11: 1-16.
- Zhang, H., Koblížková, A., Wang, K., Gong, Z., Oliveira, L., Torres, G.A., Wu, Y., Zhang, W., Novák, P. and Buell, C.R. 2014. Boom-bust turnovers of megabase-sized centromeric DNA in *Solanum* species: rapid evolution of DNA sequences associated with centromeres. *The Plant Cell*, 26: 1436-1447.
- Zhang, T., Huang, S., Song, S., Zou, M., Yang, T., Wang, W., Zhou, J. and Liao, H. 2021. Identification of evolutionary relationships and DNA markers in the medicinally important genus *Fritillaria* based on chloroplast genomics. *PeerJ*, 9: e12612.
- Zheng, D., Ye, W., Song, Q., Han, F., Zhang, T. and Chen, Z.J. 2016. Histone modifications define expression bias of homoeologous genomes in allotetraploid cotton. *Plant physiology*, 172: 1760-1771.
- Zohary, M. 1966. *Flora Palaestina*, part 1. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem: 76.
- Zohary, M. 1983. The genus *Nigella* (Ranunculaceae)—a taxonomic revision. *Plant Systematics and Evolution*, 142: 71-105.
- Zoldos, V., Papes, D., Cerbah, M., Panaud, O., Besendorfer, V. and Siljak-Yakovlev, S. 1999. Molecular-cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 969-977.

مقاله ISI مستخرج از رساله (Q1):

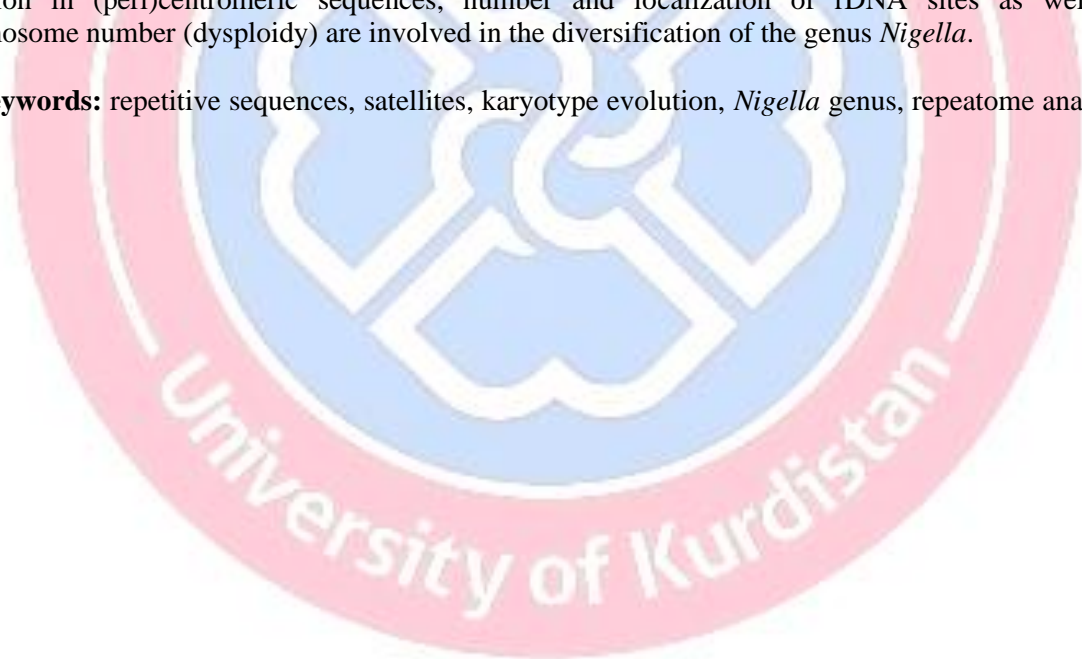
Orooji, F., Mirzaghaderi, G., Kuo, Y.-T. and Fuchs, J. (2022). Variation in the Number and Position of rDNA Loci Contributes to the Diversification and Speciation in *Nigella* (Ranunculaceae). *Frontiers in plant science*, 13: 917310. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.917310>



Abstract

Nigella is a small genus belonging to the Ranunculaceae family which is presumably originated and distributed in Aegean and the adjacent Western-Irano-Turanian region. Comparative repeat analysis of *N. sativa*, *N. damascena* and *N. bucharica* was performed using low-pass Illumina genomic reads followed by karyotyping and FISH mapping of seven *Nigella* species using the in silico identified repeats and ribosomal DNA (rDNA) probes. Also, the complete sequence of the chloroplast genome of all three species was assembled using sequencing data and compared together. High- and moderate-copy repeat sequences occupy 57.52, 59.01, and 64.73% of *N. sativa*, *N. damascena* and *N. bucharica* genomes, respectively. Roughly, half of the genomes are retrotransposons (class I transposons), while DNA transposons (class II transposons) contributed to only about 2% of the genomes. The analyzed *Nigella* species possess large genomes of about 7.4 to 12.4 Gbp/1C. One of the reasons for the longer duration of the cell cycle investigated by EDU is the large genome in this genus. Only two satellite repeats in *N. sativa*, one in *N. damascena* and four in *N. bucharica* were identified, which were mostly (peri)centromeric and represented about 1% of each genome. A high variation in number and position of 45S rDNA loci were found among *Nigella* species. Interestingly, in *N. hispanica*, each chromosome revealed at least one 45S rDNA site and one of them occurs in hemizygous condition. Also in *N. sativa* using Ag-NOR, it was determined that two pairs of three pairs of 45S rDNA sites are active. Based on the chromosome numbers, genome size and (peri)centromeric satellites, three karyotype groups were observed: Two with $2n = 2x = 12$ and a karyotype formula of $10m C 2t$ (including *N. sativa*, *N. arvensis*, *N. hispanica* as the first group and *N. damascena* and *N. orientalis* as the second group) and a more distant group with $2n = 2x = 14$ and a karyotype formula of $8m C 2st C 4t$ (including *N. integrifolia* and *N. bucharica*). These karyotype groups agreed with the phylogenetic analysis using ITS and *rbcL* sequences. We conclude that variation in (peri)centromeric sequences, number and localization of rDNA sites as well as chromosome number (dysploidy) are involved in the diversification of the genus *Nigella*.

Keywords: repetitive sequences, satellites, karyotype evolution, *Nigella* genus, repeatome analysis





University of Kurdistan
Faculty of Agriculture
Department of Plant Production and Genetics

A Thesis
Submitted to the Postgraduate Studies Office in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
PhD. In Agricultural Biotechnology

Title:
**Study of the repetitive DNA landscape the genus *Nigella* using next
generation sequencing and FISH**

By:
Fatemeh Orooji

The above thesis was evaluated and approved by the following members of the thesis committee with excellent quality on July 02, 2023.

<u>Position</u>	<u>Title and Name</u>
1. Supervisor:	Prof. Dr. Ghader Mirzaghaderi
2. Advisor:	Assist. Prof. Dr. Yi-Tzu Kuo
3. Advisor:	Assist. Prof. Dr. Jörg Fuchs
4. Internal Examiner:	Assoc. Prof. Dr. Asad Maroufi
5. External Examiner:	Assist. Prof. Dr. Ali Mohammad Banaei-Moghaddam
6. External Examiner:	Assist. Prof. Dr. Raheleh Karimi-Ashtiyani

Signature

Head of Department
Dr. Asad Maroufi



Agriculture Faculty Graduate Coordinator
Dr. Gholamreza Heidari





University of Kurdistan
Faculty of Agriculture
Department of Plant Production and Genetics

A Thesis
Submitted to the Postgraduate Studies Office in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Degree of PhD. in Agronomy and Plant Breeding, Biotechnology
importance

Title:
**Study of the repetitive DNA landscape the genus *Nigella* using next
generation sequencing and FISH**

by:
Fatemeh Orooji

Supervisor
Dr. Ghader Mirzaghaderi

Advisor(s):
Dr. Yi-Tzu Kuo
Dr. Jörg Fuchs

July 2023



**University of Kurdistan
Faculty of Agriculture
Department of Plant Production and Genetics**

A Thesis
Submitted to the Postgraduate Studies Office in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Degree of PhD. in Agronomy and Plant Breeding, Biotechnology
importance

**Title:
Study of the repetitive DNA landscape the genus *Nigella* using next
generation sequencing and FISH**

**by:
Fatemeh Orooji**

**Supervisor
Dr. Ghader Mirzaghaderi**

**Advisor(s):
Dr. Yi-Tzu Kuo
Dr. Jörg Fuchs**

July 2023