



مجله پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد هفدهم، شماره دوم، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

مطالعه ساختار کروموزومی ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه (F_۲) با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH)

سوده خنامانی‌فلاحی‌پور^۱، * حسین شاهسون‌دحسینی^۲، امین باقی‌زاده^۳
و سپیده قطب‌زاده‌کرمانی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان، استادیار مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان،
^۲ کارشناس گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان
تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۹

چکیده

به‌منظور حذف صفات نامطلوب غله جدید تریتی‌پایرم (AABBE^bE^b, 2n=6x=42) تلاقی‌های گسترده‌ای بین لاین‌های این غله (پایه مادری) و ارقام گندم نان ایرانی (پایه پدری) انجام و از خودگشتی نتاج F_۱ در نسل دوم تعداد ۱۸۱۰ بذر احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (D^(۰-۱۴), AABBE^b, 2n=6x=42) تولید شد. تعادل کروموزومی و شاخص همولوژی در ۱۱ گیاه احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (F_۲) با دورگه‌سازی DNA ژنومی علف شور ساحل (E^bE^b, 2n=2x=14) بررسی شد و نتایج نشان داد که بدون استفاده از DNA رقم بهاره چینی (AABBDD, 2n=6x=42) به‌عنوان DNA مسدودکننده تمایز کروموزوم‌های E^b از A، B و D امکان‌پذیر نبود. ضمن این‌که افزودن مرحله دورگه‌سازی اولیه با DNA مسدودکننده به‌عنوان پروب طبق دستورالعمل دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH)، امکان تمایز کروموزوم‌های E^b به‌صورت منفرد و جفت حلقوی و میله‌ای فراهم گردید. شمارش کروموزوم‌های E^b در گیاهان F_۲ امکان گزینش ژنوتیپ‌هایی از تریتی‌پایرم با تعداد متفاوت کروموزوم‌های E^b و D دارای صفات مطلوب زراعی به‌نام تریتی‌پایرم ثانویه با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH) به‌عنوان نشانگر کمکی سیتوژنتیکی در گزینش وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH)، تریتی‌پایرم ثانویه، علف شور ساحل

* مسئول مکاتبه: hossein212001@yahoo.com

مقدمه

در طول هزاران سال گیاهان خویشاوندان وحشی گندم در معرض گرما، خشکی، سرما، شوری، غرقاب، انواع آفات و بیماری‌ها بوده‌اند. گونه‌هایی که تا امروز باقی مانده و به این تنش‌ها مقاومت نشان داده‌اند، دارای اساس ژنتیکی بسیار پایداری هستند. تلاقی‌های بی‌شماری در میان گونه‌های مختلف اتفاق افتاده تا گندم‌های اولیه پدید آمده است. انسان در هزاران سال قبل شروع به کشت و انتخاب از میان آن‌ها کرده است و در طی فرآیند اهلی شدن توانایی آن برای تولید بیش‌تر و دانه‌های درشت‌تر تثبیت گردیده است، اما بخش مفیدی از پتانسیل ژنتیکی مقاومت در اجدادش را از دست داده است (آقایی و همکاران، ۲۰۰۵). به منظور اصلاح گندم و انتقال صفات مطلوبی مانند مقاومت به انواع بیماری‌ها، آفات و همچنین مقاومت در برابر انواع تنش‌های محیطی از جمله شوری، خشکی، غرقاب، سرما و گرما تلاقی‌های بسیاری بین گندم و خویشاوندان وحشی آن مانند گونه‌های جو، آجیلوپس و تینوپایرم انجام گرفته است (فرخ و همکاران، ۱۹۹۳). جنس وحشی تینوپایرم از تیره گندمیان یکی از منابع غنی از ژن‌های مفید در اصلاح گندم به‌شمار می‌رود که شامل حدود ۲۰ گونه با سطوح پلوئیدی مختلف از دیپلوئید تا دکاپلوئید می‌باشد. این گونه‌ها دارای ژنوم E^b یا ترکیبی از ژنوم‌های E^b و E^c هستند. بسیاری از گونه‌های تینوپایرم مقاومت قابل ملاحظه‌ای را در برابر انواع بیماری‌ها مانند ویروس پیچیدگی زرد جو، زنگ ساقه و برگ، ویروس موزائیک گندم و سفیدک پودری نشان داده‌اند. بسیاری از گونه‌های تینوپایرم به تنش‌های سرما، خشکی و سطوح بالای نمک مقاوم می‌باشند. گونه تینوپایرم جانسی فرمی دارای ژن مقاومت به قارچ فوزاریوم گرامینیوم است بنابراین از آن برای انتقال این ژن به گندم استفاده شده است (النسکوگ استام و مرکر، ۲۰۰۲). اومیلان و همکاران (۱۹۹۱) آمفی پلوئید به دست آمده از تلاقی گندم بهاره چینی با گونه لوفوپیروم الانگیتوم، همچنین لاین‌های گندم بهاره چینی دارای جفت کروموزوم جایگزین از گونه لوفوپیروم الانگیتوم را تولید کرده و سطح تحمل به شوری آن‌ها را در مزرعه بررسی و نشان دادند که تحمل به شوری آمفی پلوئیدها از گندم بهاره چینی بیش‌تر بود، اما لاین‌های گندم دارای جفت کروموزوم جایگزین $3E^b$ افزایش بیش‌تری در تحمل به شوری نشان دادند (اومیلان و همکاران، ۱۹۹۱). شناسایی کروماتین وحشی در دورگ‌های بین گونه‌ای و بین جنسی با استفاده از DNA تکراری اختصاصی گونه‌های گندم، چاودار و جو موکای و گیل (۱۹۹۱) و همچنین با استفاده از DNA ژنومی گونه وحشی به‌عنوان کاوش‌گر با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل بررسی شده است (شواتزر و همکاران، ۱۹۸۹). در این روش DNA ژنومی گونه وحشی به‌عنوان DNA کاوش‌گر نشان‌دار می‌گردد. به‌منظور

جلوگیری از دورگه‌سازی DNA کاوش‌گر با DNA غیرهدف به‌ویژه در گونه وحشی دارای کروموزوم همولوگ با گونه زراعی، قبل از دورگه‌سازی DNA کاوش‌گر با DNA هدف، توالی‌های مشترک در DNA هدف با DNA مسدودکننده گونه زراعی دورگه‌سازی می‌گردد (موتوکریستان و همکاران، ۱۹۸۴). کاربرد روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل در گیاهان در مقایسه با پستانداران آهسته به پیش می‌رود زیرا تهیه نمونه‌های کروموزوم‌های گیاهی با تعداد زیاد سلول در مرحله متافاز بدون دیواره سلولی و بقایای سیتوپلاسمی مشکل‌تر است و از دورگه‌سازی قطعات DNA کاوش‌گر با DNA مسدودکننده در کروموزوم‌ها ممانعت به‌عمل می‌آورد (تور و همکاران، ۲۰۰۲). بیش از دو دهه است که تکنیک دورگه‌سازی DNA در محل، در گونه‌های گیاهی استفاده و به‌طور عمده کاربرد آن، تعیین محل توالی‌های تکراری بر روی کروموزوم‌ها و شناسایی کروموزوم‌های وارد شده از اجداد گونه‌های وحشی به گیاهان زراعی بوده است (لایپتان و همکاران، ۱۹۸۹). سختی آماده‌سازی نمونه‌های کروموزومی خوب، نبود کلون‌های بزرگ برای نشانگرهای مولکولی مثل چندشکلی در قطعات DNA برش خورده و نداشتن توانایی دورگه‌سازی DNA در محل در نقشه‌یابی کروموزوم‌های خاص، کاربرد تکنیک در نقشه‌یابی ژنومی در گیاهان را کاهش داده است (تور و همکاران، ۲۰۰۲). در اولین کاربرد تکنیک دورگه‌سازی DNA در محل بر روی کروموزوم‌های گیاهی توسط ریورون و گیل (۱۹۸۵)، DNA تکراری چاودار به‌عنوان کاوش‌گر برای شناسایی کروموزوم‌های چاودار در دورگ‌های گندم-چاودار استفاده شد (لایپتان و همکاران، ۱۹۸۶). با استفاده از DNA اختصاصی گونه چاودار به‌عنوان کاوش‌گر، کروماتین چاودار را در لاین‌های گندم دارای کروموزوم مبادله شده از چاودار تشخیص دادند. هم‌زمان با لایپتان و همکاران، ریورون و گیل (۱۹۸۵) هم توانستند کروموزوم‌های ژنوم D را در گندم معمولی مشاهده کنند. لی و همکاران (۱۹۸۹) دورگ‌های گندم-چاودار و همچنین لاین‌های گندم دارای کروموزوم‌های جایگزین شده را با تکنیک دورگه‌سازی DNA در محل بررسی کردند. موراماتسو (۱۹۹۰)، چن و همکاران (۱۹۹۸) و براسیلیرو ویدال و همکاران (۲۰۰۳) و (۲۰۰۵) از دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل به‌منظور شناسایی ساختار ژنومی گونه دکاپلوئید تینوپایرم بنتیکوم استفاده کردند. جوهر (۱۹۹۱) و جوهر و پیترسون (۲۰۰۶) از روش دورگه‌سازی DNA در محل برای بررسی همیولوژی بین کروموزوم‌های گندم دوروم و گونه وحشی تینوپایرم بسارایکم استفاده کردند، آن‌ها با این روش همیولوژی کروموزومی را در زمان حضور و یا حضور نداشتن ژن ph_1 مورد مقایسه قرار دادند. فراری و همکاران (۲۰۰۵) با کمک این روش و استفاده از DNA ژنومی گندم به‌عنوان DNA مسدودکننده و DNA ژنومی چاودار به‌عنوان کاوش‌گر ساختار

کروموزومی لاین تریسپیرو دون رنه را مشخص کردند این لاین از چندین سال خودگشن کردن تریسپیرو (AABBDRJ، $2n=6x=49$) به دست آمده و دارای پتانسیل بالایی در زمینه مقاومت به بیماری‌ها، سرما و خشکی است. چن و همکاران (۱۹۹۸) و کیشی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل ساختار ژنومی گونه تینوپایرم ایترومدیوم را بررسی کرده‌اند. دانگ و همکاران (۲۰۰۴) در بین لاین‌های دارای قطعات کروموزومی اضافه شده از گونه تینوپایرم ایترومدیوم در ژنوم گندم، چندین لاین دارای خصوصیات مقاومت به ویروس کوتولگی زرد جو، زنگ، خشکی و درصد بالای پروتئین از گونه تینوپایرم ایترومدیوم را مشاهده کردند. لاین‌های دارای کروموزوم‌های وحشی اضافه، به‌طور عموم با انتقال ژن یا ژن‌های مفید از خویشاوندان وحشی به گیاهان زراعی، ابزار پرارزش و مؤثری در به‌کارگیری ژرم‌پلاسم نسل‌ها به حساب می‌آیند. از لاین‌های دارای کروموزوم‌های اضافی به‌منظور مکان‌یابی ژن یا ژن‌های مفید بر روی کروموزوم‌های اختصاصی، ساختن کتابخانه DNA از یک کروموزوم خاص، جداسازی توالی‌های DNA اختصاصی، نقشه‌یابی کروموزوم‌ها، مطالعه ساختار و ترکیب ژنتیکی کروموزوم‌ها، انتخاب نشانگرهای DNA مربوط به یک کروموزوم خاص و همچنین در سال‌های اخیر به‌منظور مطالعات ساختار هسته و تکثیر توالی‌های DNA اختصاصی استفاده شده است (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۲). لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم از تلاقی ارقام اصلاح شده از گونه گندم دوروم به‌عنوان پایه مادری و گونه علف شور ساحل (E^bE^b ، $2n=2x=14$) به‌عنوان پایه پدری به‌وجود آمده‌اند و علاوه‌بر قابلیت رشد و نمو همانند گندم، دارای مقاومت به شوری بالایی می‌باشند ولی باروری آن‌ها ۸۵ درصد، سنبله‌چه‌ها در زمان رسیدن و قبل از برداشت ریزش نموده و در خرمن‌کوبی دانه به‌راحتی از پوسته خود جدا نمی‌شود (حسینی، ۱۹۹۸). هدف از مطالعه حاضر، ۱- رفع صفات نامطلوب لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم از طریق تلاقی این لاین‌ها با ارقام گندم نان ایرانی، ۲- خوگشنی نتاج F_1 به‌دست آمده از این تلاقی‌ها و به‌دست آوردن نتاج ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه (F_2)، ۳- بررسی ساختار کروموزومی و نحوه جفت شدن کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B، D و E^b در ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه (F_2 : $2n=42$ ، AABBDE^b) با کمک نشانگر ژنومی به‌دست آمده از علف شور ساحل با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل و ۴- تطبیق نتایج مطالعات سیتوژنتیکی با نتایج صفات مورفولوژیکی و زراعی در مزرعه به‌منظور گزینش ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه ($2n=6x=42$ ، AABBDE^b) با صفات زراعی مطلوب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بساک از گل‌چه‌های بوته‌های نتاج F_2 (جدول ۱) تهیه و در محلول کارنوی I^۱ تثبیت و در فریزر ۲۴- درجه سانتی‌گراد تا تهیه اسلاید کروموزومی میوز نگهداری شدند.

مواد ژنتیکی:

DNA ژنومی گیاه علف شور ساحل: با نوکلئوتید فلئورسین dUTP-^{۱۲} از شرکت فرمتاز آلمان نشان‌دار گردید.

DNA ژنومی گندم رقم بهاره چینی (نشان‌گر ژنومی غیرنشان‌دار): جهت مسدود کردن نواحی غیرهدف بر روی کروموزوم‌های گیاهان دورگ F_2 به‌کار رفت.

روش‌ها

تهیه نمونه کروموزومی میوز: بساک‌های گیاهان دورگ F_2 از فریزر خارج و محلول کارنوی I آن‌ها تخلیه و به‌مدت ۸-۶ دقیقه در بین‌ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد با محلول اسید هیدروکلریک نرمال هضم و بلافاصله دو بار با آب مقطر آب‌کشی شدند. هر بساک در یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد بر روی اسلاید قرار و با نوک تیغ اسکالپل تیز یک طرف بساک برش و با فشار دادن آن محتوای بساک خارج و بقایای بساک از لام حذف و لامل روی آن قرار و نمونه در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و با مشاهده تعداد کافی سلول در مرحله متافاز اول، لام به‌مدت ۳ دقیقه در تانک نیتروژن مایع فرو برده شد تا سلول‌های مادر گرده روی لام تثبیت گردند. سپس لامل با یک تیغ تیز از روی لام برداشته و لام به‌مدت ۱۰ دقیقه در الکل مطلق قرار و پس از خروج از الکل، در دمای آزمایشگاه قرار تا کاملاً خشک گردید و تا انجام دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل در ۲۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA از برگ‌های جوان علف شور ساحل و گندم رقم بهاره چینی بر طبق روش کوماتسودا (۱۹۹۸) با تغییرات جزئی انجام شد.

۱- محلول ۳ به ۱ الکل اتانول و اسید استیک گلاسیال

2- Fluorescein-12-dUTP: 1- Fluorescein -6-carboxaminocaproyl-[5-{3-aminoallyl}-2'- deoxyuridine-5'-triphosphate]

جدول ۱- بذور دورگ (F_۲) به دست آمده از تلاقی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه (پایه مادری) و ارقام اصلاح شده گندم نان (پایه پدری).

| تعداد بذور F _۲ | انواع نتاج F _۱ |
|---------------------------|-------------------------------------|
| ۱۱۰ | نوید × F _۲ (Ka/b) (Cr/b) |
| ۱۰۴ | نوید × F _۲ (Ka/b) (Cr/b) |
| ۱۱۰ | نوید × F _۲ (Ka/b) (Cr/b) |
| ۱۱۰ | نوید × F _۲ (St/b) (Cr/b) |
| ۱۱۰ | نوید × (Az/b) |
| ۱۲۰ | نوید × (La/b) |
| ۱۱۰ | نوید × F _۲ (Ma/b) (Cr/b) |
| ۲۶ | امید × (La/b) |
| ۸۹۰ | امید × (St/b) |
| ۱۲۰ | سفید خوشه × (Ma/b) |
| ۱۸۱۰ | جمع کل |

تهیه نشانگر DNA ژنومی علف شور ساحل با نوکلئوتید فلئورسین **dUTP-۱۲**: تهیه نشانگر ژنومی از علف شور ساحل با واکنش شکاف و ترجمه طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز^۲ به شرح زیر انجام شد (گوبلر و هافمن، ۱۹۸۳؛ سمبروک و همکاران، ۲۰۰۱).

۱-۸ ماده شامل ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر با غلظت ۱۰ برابر برای DNA پلیمراز I^۳، یک میکرولیتر مخلوط ۳ نوکلئوتید غیرنشان‌دار^۴ با غلظت ۱ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر نوکلئوتید dTTP با غلظت ۱ میلی‌مولار^۵، ۱ میکرولیتر فلئورسین **dUTP-۱۲** با غلظت ۱ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر دی‌اکسی‌ریبونوکلئاز I با غلظت ۰/۰۲ واحد بر میکرولیتر و عاری از ریبونوکلئاز^۶، ۱/۵-۰/۵ میکرولیتر (۵-۱۵ واحد) از DNA پلیمراز I مربوط به اشرشیاکلی^۷، ۰/۵-۰/۲۵ میکروگرم تقریباً معادل ۱ میکرولیتر

- 1- Nick Translation
- 2- Fermentaz
- 3- 10X Reaction Buffer for DNA Polymerase I
- 4- Mixture of 3 dNTPs, 1mM
- 5- 2'-Deoxythymidine5'-Triphosphate, 1mM
- 6- Deoxyribonuclease I (DNase I), RNase-Free
- 7- *E. Coli*

DNA ژنومی علف شور ساحل با یکدیگر در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری مخلوط و حجم واکنش با آب مقطر ۲ بار تقطیر استریل عاری از نوکلئاز^۱ به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و بلافاصله به انکوباتور یخچال دار با دمای ۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲-۳ ساعت انتقال داده شد و سپس بلافاصله در درون ظرف دارای یخ پودر شده فرو برده شد.

۲- برای قطع واکنش شکاف و ترجمه، مقدار ۱ میکرولیتر از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید با غلظت ۰/۵ مولار و pH = ۸ به میکروتیوب اضافه شد.

۳- طول قطعات ۲۰۰-۵۰۰ جفت بازی DNA نشان دار شده علف شور ساحل با الکتروفورز ۳ میکرولیتر از DNA نشان دار بر روی ژل آگاروز تعیین گردید.

دورگه سازی DNA ژنومی در محل روی نمونه های میوز گیاهان ژنوتیپ های نتاج F_۲: دورگه سازی DNA ژنومی در محل بر طبق روش شوآرتزر و همکاران (۱۹۸۹) و ریدر و همکاران (۱۹۹۴) و مرحله پیش دورگه سازی ژنومی DNA غیرنشان دار بر طبق روش اصلاح شده حسنی (۱۹۹۸) بر روی اسلایدهای دارای سلول های میکروسپور بوتتهای نسل F_۲ به شرح زیر انجام شد.

- ۱- هضم اسیدی با اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال به مدت ۲ دقیقه
- ۲- هضم آنزیمی با ۲ میکرولیتر از محلول پروتیناز K با غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر که با ۲۰۰ میلی لیتر از محلول بافر پروتیناز K با غلظت یک برابر محلول پایه^۲ رقیق شده بود به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی گراد
- ۳- شستشوی اسلایدها دو بار و هر بار ۲ دقیقه با محلول بافر متوقف کننده فعالیت آنزیم پروتیناز K با یک برابر غلظت محلول پایه^۳ در دمای آزمایشگاه
- ۴- شستشوی اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول نمکی سیترات سدیم^۴ با غلظت دو برابر محلول پایه

1- Water, Nuclease-Free

۲- 1X Proteinase K Buffer: ۲/۴۲ گرم تریس و ۰/۴۳۸ گرم کلرید کلسیم در ۱ لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل (pH= ۷/۵)

۳- 1X Proteinase K Stop Buffer: ۲/۴۲ گرم تریس و ۷/۴۴ گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید در ۱ لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل (pH= ۷/۵)

4- Saline Sodium Cytrate (SSC)

- ۵- حذف RNA نمونه‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم RNase با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد
- ۶- شستشوی اسلایدها به ترتیب با محلول‌های نمکی سترات سدیم با غلظت ۲ و ۰/۱ برابر محلول پایه
- ۷- تثبیت مواد گیاهی روی اسلایدها با محلول پارافمالدهید تازه به مدت ۱۰ دقیقه
- ۸- تک‌رشته‌ای کردن DNA هدف بر روی اسلاید^۱ با محلول فرمااماید ۷۰ درصد در بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد در زیر هود به مدت ۲ دقیقه
- ۹- آب‌گیری اسلایدها به ترتیب با محلول‌های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد الکل ۲۴- درجه سانتی‌گراد، دو مرتبه و هر بار به مدت ۲ دقیقه
- ۱۰- اضافه نمودن ۴۵ میکرولیتر از محلول دورگه‌سازی DNA ژنومی غیرنشان‌دار^۲ گندم بهاره چینی به هر اسلاید به منظور مسدود نمودن توالی‌های مشترک بین ژنوم E^b با ژنوم‌های A، B و D ژنوتیپ‌های بوته‌های نسل F_۲ و قرار دادن اسلایدها به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد
- ۱۱- اضافه نمودن ۴۵ میکرولیتر از محلول هیبریداسیون^۳ DNA ژنومی علف شور ساحل به منظور دورگه‌سازی با کروموزوم‌های E^b موجود در ژنوتیپ‌های بوته‌های F_۲ و قرار دادن اسلایدها به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد
- ۱۲- شستشوی شدید اسلایدها به ترتیب با محلول‌های سترات سدیم با غلظت ۲ برابر محلول پایه و سترات سدیم ۴ برابر غلظت پایه دارای توآین ۲۰^۴
- ۱۳- رنگ‌آمیزی اسلایدها با ۵۰ میکرولیتر از محلول DAPI^۵ با غلظت ۰/۱۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر و سپس مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مدل آکسیوپلن^۶
- ۱۴- تهیه عکس دیجیتالی از سلول‌های میکروسپور گیاهان F_۲ در متافاز میوز با ۴ فیلتر فلورسنت با دوربین کائون پاورشات A550 و چاپ آن‌ها

-
- 1- Denaturation
 - 2- Pre Blocking Hybridization Solution
 - 3- Hybridization Solution
 - 4- 4xSSC/Tween20
 - 5- 4',6-Diamidino-2-Phenylindolehydrochlorid
 - 6- Axioplan2

نتایج و بحث

در دو دهه گذشته از DNA ژنومی به عنوان نشانگرهای سیتوژنتیکی در شناسایی ترکیبات کروموزومی نتاج به دست آمده از تلاقی های بین گونه ای و بین جنسی در روش دوره سازی DNA در محل به عنوان ابزاری قدرتمند در شناسایی و تمایز ساختار کروموزومی این نتاج و در جهت گزینش ژنوتیپ های مطلوب استفاده شده است. نتایج شمارش تعداد جفت کروموزوم های E^b حلقوی یا میله ای و کروموزوم های منفرد با تکنیک دوره سازی DNA ژنومی در محل در سلول های مادر دانه گرده گیاهان دورگ به دست آمده از تلاقی رقم گندم نوید با لاین تریتی پایرم اولیه F_2 (Ka/b) (Cr/b) و رقم گندم امید با لاین تریتی پایرم اولیه St/b (جدول ۲) نشان داد که جفت نشدن کروموزوم های E^b و D در تقسیم میوز منجر به ناپایداری کروموزومی در متافاز اول میوز در دورگ های احتمالی تریتی پایرم ثانویه (F_2) شده است (شکل ۱-۱). همه کروموزوم های منفرد علائم نورانی قوی ناشی از وجود نشانگر را نشان ندادند، بنابراین همه کروموزوم های منفرد مربوط به ژنوم E^b نمی باشند (شکل ۱-۱، و، ز پیکان رو به راست). کروموزوم های ژنوم های A و B هم در فرآیند همولوژی کروموزوم بی تأثیر نمی باشد از طرفی شاید وجود کروموزوم های E^b در دورگ های احتمالی تریتی پایرم ثانویه (F_2) منجر به ایجاد اختلال در همولوژی و همولوژی کروموزوم های ژنوم های A و B گندم شده است که با نتایج حسنی (۱۹۹۸) مطابقت دارد. اما در نمونه های کروموزومی دورگ های F_2 احتمالی تریتی پایرم ثانویه به دست آمده از تلاقی رقم گندم نوید با لاین تریتی پایرم اولیه F_2 (Ka/b) (Cr/b) و رقم گندم امید با لاین تریتی پایرم اولیه St/b همولوژی و همولوژی کروموزومی کامل و نواحی نورانی قوی ناشی از دوره شدن DNA ژنومی کاوشگر علف شور ساحل با DNA هدف در کروموزوم های حلقوی (شکل ۱-۱، ب، ج) و میله ای (شکل ۱-۱، الف، ح پیکان رو به پایین) مشاهده شد و کروموزوم های منفرد مشاهده نگردید (شکل ۱-۱، ط، ج). جفت شدن کروموزوم های E^b با یکدیگر (شکل ۱-۱، ب، ج، ک فلش رو به پایین) و با کروموزوم های دیگر ژنوم های گندم احتمالاً کروموزوم های ژنوم D (شکل ۱-۱، ز، و فلش رو به پایین) می تواند گویای تقسیم میوز متعادل در این ژنوتیپ ها باشد. البته امکان جفت شدن کروموزوم های ژنوم های A ، B و D گندم با کروموزوم های E^b بسیار کم است چون ژن ph_1 که بر روی بازوی بلند کروموزوم B گندم قرار گرفته از جفت شدن کروموزوم های گونه ها و جنس های گیاهی ممانعت می کند. جوهر (۱۹۹۱) با بررسی نتاج بین لاین رقم گندم لانگدون دارای جفت کروموزوم جایگزین شده

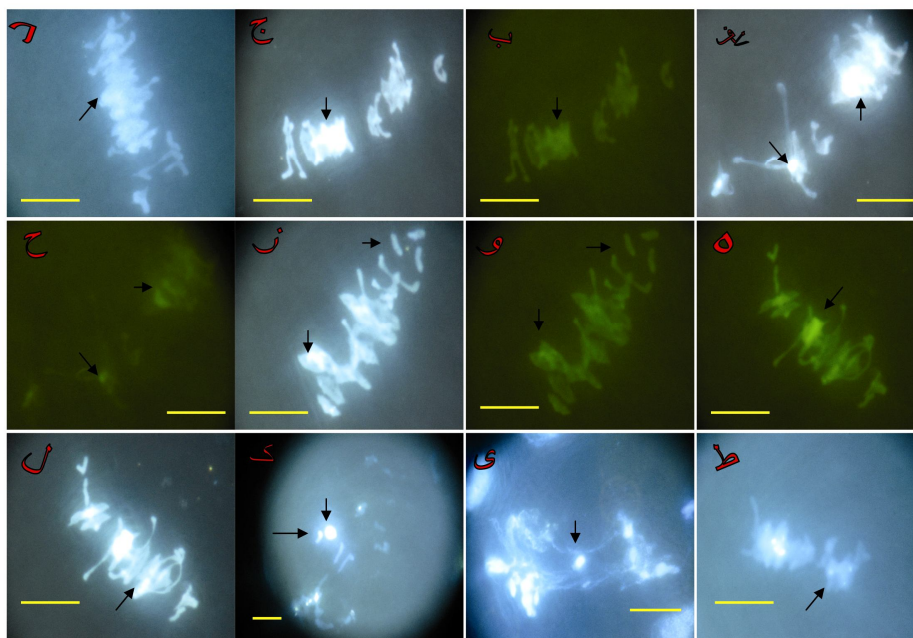
۵D به جای ۵B و بدون ژن ph_1 همپولوژی بالایی را بین کروموزوم‌های گندم دوروم و گونه وحشی (همپولوژی) مشاهده کردند. میزان جفت شدن کروموزوم‌های گونه وحشی و گندم دوروم در دورگ‌های بدون ژن ph_1 افزایش ۸ برابری را نسبت به دورگ‌های دارای این ژن نشان داد. نتایج این مطالعه تأثیر ژن ph_1 را در جلوگیری از جفت شدن کروموزوم‌های همپولوگ تأیید کرد. اما جوهر و پیترسون (۲۰۰۶) به منظور انتقال صفت مقاومت به بیماری سوختگی فوزاریومی سرشاخه از گونه علف وحشی شور به گندم دوروم، اقدام به تولید دورگ‌های F_1 دارای یا بدون ژن ph_1 ، نتاج BC_1 و دیگر نتاج به دست آمده از تلاقی گندم دوروم با علف شور ساحل کرده بودند. مشخص شد که همپولوژی بین کروموزوم‌های گندم دوروم و گونه وحشی در نتاج F_1 به دست آمده از تلاقی دو رقم تتراپلوئید و لانگدون^۱ از گندم دوروم و تینوپایرم بسارابیکوم در حضور ژن ph_1 بسیار کم است. اما فعالیت ژن ph_1 گاهی اوقات تا حدی به وسیله ژنوتیپ والد وحشی متوقف شد بنابراین بر طبق نتایج این مطالعه در بعضی از نتاج، امکان جفت شدن کروموزوم‌های گونه وحشی و گندم دوروم وجود دارد. بنابراین احتمالاً این پژوهش نیز حضور بعضی از کروموزوم‌های E^b در ژنوم تریتی‌پایرم‌های احتمالی ثانویه (F_2) مانع از تأثیر ژن ph_1 و در نتیجه منجر به جفت شدن کروموزوم‌های ژنوم E^b با کروموزوم‌های ژنوم گندم نان شده باشد. البته امکان حذف کروموزوم ۵B و در نتیجه ژن ph_1 در بعضی از ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالی ثانویه (F_2) نیز وجود دارد. در این مطالعه تعداد کروموزوم‌های شناسایی شده از ژنوم E^b با دورگه‌سازی DNA ژنومی علف شور ساحل از ۱۰-۶ عدد و تعداد کروموزوم‌های منفرد از ۴-۰ عدد در بین ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالی ثانویه (F_2) به دست آمده از خودگشنی F_1 دو تلاقی رقم گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه F_3 ، $Ka/b \times Cr/b$ و رقم گندم امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b متغیر بود (جدول ۲). در مرحله متافاز میوز I در سلول‌های مادر گرده یکی از ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالاً ثانویه امید $St/b \times$ (شکل ۱-ط) هیچ کروموزوم منفردی مشاهده نگردید. در این ژنوتیپ دو جفت کروموزوم حلقوی علایم نورانی قوی ناشی از اتصال کاوش گر ژنومی علف شور ساحل را نشان می‌دهند در نتیجه متعلق به ژنوم E^b هستند ولی بر روی بعضی از کروموزوم‌های این ژنوتیپ نقاط نورانی ضعیف‌تری مشاهده شد که نشان‌دهنده قطعات جایگزین شده از کروموزوم‌های ژنوم E^b در کروموزوم‌های ژنوم گندم رقم امید است. وجود کروموزوم‌های E^b منفرد منجر به ایجاد سه تری والنت در ژنوتیپ تریتی‌پایرم

1- Langdon

احتمالاً ثانویه نوید با $(Cr/b) \times (Ka/b)$ (شکل ۱-ه، ل) شده است. یک جفت کروموزوم به همراه یک کروموزوم منفرد با علائم نورانی قوی در ژنوتیپ تریتی پایرم احتمالاً ثانویه (F_2) امید $St/b \times$ مشاهده شد (شکل ۱-ک). کروموزوم‌های منفرد مشاهده شده در مرحله متافاز I میوز در این ژنوتیپ‌ها می‌تواند باعث انجام تقسیم نامتعادل میوز و تولید گرده‌های عقیم گردد. در ژنوتیپ‌های تریتی پایرم احتمالاً ثانویه ۴۲ کروموزومی با تعداد کروموزوم‌های E^b کم‌تر از ۱۴ به احتمال زیاد کروموزوم‌های D جایگزین کروموزوم‌های E^b شده‌اند اما در بعضی از ژنوتیپ‌های کم‌تر از ۴۲ کروموزومی، تعداد کروموزوم‌های E^b نیز کم‌تر از ۱۴ عدد بود بنابراین به احتمال زیاد کروموزوم‌های E^b از تریتی پایرم حذف و کروموزومی هم از ژنوم گندم جایگزین آن‌ها نشده است. دورگه‌سازی DNA ژنومی ایزاری مناسب برای شناسایی ساختار کروموزومی انواع ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی پایرم (F_2) با کروموزوم‌های ژنوم‌های E^b , A, B و D است. به‌طورکلی نتایج نشان داد که امکان تولید ژنوتیپ‌های متفاوت در نسل F_2 با انواعی از کروموزوم‌های E^b وجود دارد بنابراین گزینش ژنوتیپ‌های احتمالاً ثانویه مطلوب به‌ویژه ژنوتیپ‌های ثانویه‌ای از تریتی پایرم [$E^b E^b$ (۱) DD (۶) BB (۷) AA (۷) E^b] که تنها E^b آن باقی و مابقی کروموزوم‌های ژنوم E^b با همیولوگ‌های خود از ژنوم D گندم جابه‌جا شده باشند وجود دارد. برای دستیابی به نتایج قطعی و سلکسیون ژنوتیپ‌هایی با این خصوصیات نیاز به مطالعه جمعیت‌های F_2 بیش‌تر در تلاقی‌های متعدد دیگری از گندم با لاین‌های اولیه تریتی پایرم کاملاً احساس می‌شود.

جدول ۲- تعداد کروموزوم‌های ژنوم علف شور ساحل (E^b) در متافاز اول میوز سلول‌های مادر گرده ($AABBE^b_{(1-14)} D_{(1-14)}$) ژنوتیپ‌های احتمالاً ثانویه تریتی پایرم (F_2) با دورگه سازی DNA ژنومی در محل.

| شاخص همولوژی | تعداد کل کروموزوم‌های E^b | تعداد کروموزوم‌های جفت | | تعداد کروموزوم‌های منفرد | تعداد سلول مادر گرده | تعداد کل کروموزوم‌های ژنوتیپ | تعداد گیاه | ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی پایرم (F_2) بعدست آمده از خودگشتی F_1 تلاقی‌ها |
|-----------------|-----------------------------------|---------------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------------|---------------|--|
| | | حلقوی | میله‌ای | | | | | |
| ۸۱/۵۴ | ۶-۱۰ (۸/۵۸) | ۳-۷ (۵/۰۸) | ۱۲-۱۸ (۱۴/۵۸) | ۰-۳ (۱/۰۸) | ۳۰ | ۳۸-۴۲ | ۶ | نوید \times (Cr/b), F_2 (Ka/b) |
| ۸۵/۷۱ | ۶-۷ (۶/۶۶) | ۲-۷ (۵/۱۵) | ۱۲-۱۹ (۱۶/۳۵) | ۰-۴ (۰/۹۵) | ۳۵ | ۳۸-۴۲ | ۵ | امید \times $St.b$ |



شکل ۱- دورگه‌سازی DNA نشان‌دار شده ژنومی با نوکلئوتید فلئورسین dUTP-۱۲ در محل (GISH) بر روی سلول‌های میوزی گیاهان دورگ تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) (طول خط مقیاس ۲۰ میکرومتر).

الف) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید $(Cr/b) \times (Ka/b)$ (عکس با فیلتر ۰۱). در این تصویر ۳ جفت کروموزوم حلقوی و یک جفت کروموزوم میله‌ای با علایم نورانی بسیار قوی ناشی از جفت شدن ۸ کروموزوم E^b (پیکان رو به‌سمت بالا) نشان داده شده است. همچنین در ناحیه تلومری یکی از کروموزوم‌ها (پیکان رو به‌سمت پایین) علایم نورانی قوی مشاهده می‌شود که نمایان‌گر جفت شدن یک کروموزوم E^b با یکی از کروموزوم‌های ژنوم گندم به‌صورت میله‌ای است.

ب-ج) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید $(Cr/b) \times (Ka/b)$ (عکس با فیلترهای ۰۱ و ۰۹). در این تصاویر ۴ جفت کروموزوم حلقوی با علایم نورانی بسیار قوی ناشی از جفت شدن ۸ کروموزوم E^b نشان داده شده است.

د) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید $(Cr/b) \times (Ka/b)$ (عکس با فیلتر ۰۱) در جفت کروموزوم حلقوی نشان داده شده یک کروموزوم علایم نورانی

ناشی از اتصال کاوش گر را نشان می دهد در صورتی که بر روی کروموزوم مقابل علایمی دیده نمی شود که نشان دهنده جفت شدن کروموزوم E^b با یکی از کروموزوم های ژنوم گندم است.

ه) متافاز تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی پایرم ثانویه (F_2) به دست آمده از نوید $\times (Cr/b) \times (Ka/b)$ (تهیه عکس با فیلتر ۰۹). کروموزوم های E^b منجر به ایجاد ۳ تری والنت شده اند.

و-ز) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی پایرم ثانویه (F_2) به دست آمده از نوید $\times (Cr/b) \times (Ka/b)$ (عکس با فیلترهای ۰۱ و ۰۹). ۳ کروموزوم منفرد از ژنوم گندم بدون هیچ علایم نورانی (پیکان رو به سمت راست) و ۲ جفت کروموزوم حلقوی با علایم نورانی در یکی از کروموزوم ها (پیکان رو به سمت پایین) مشاهده می شود.

ح) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی پایرم ثانویه (F_2) به دست آمده از نوید $\times (Cr/b) \times (Ka/b)$ (عکس با فیلترهای ۰۹).

ط) متافاز تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی پایرم ثانویه (F_2) به دست آمده از امید $\times St/b$ (تهیه عکس با فیلتر ۰۱) دو جفت کروموزوم حلقوی علایم نورانی بسیار قوی نشان می دهند و بر روی نواحی سانترومیری بعضی از کروموزوم های دیگر علایم نورانی بسیار ضعیف تری دیده می شود.

ی) آنافاز اول تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی پایرم ثانویه (F_2) به دست آمده از نوید $\times (Cr/b) \times (Ka/b)$ (تهیه عکس با فیلتر ۰۱) یک جفت کروموزوم همولوگ E^b با علایم نوری بسیار قوی در وسط سلول دیده می شود.

ک) متافاز تقسیم میوز در لاین تریتی پایرم ثانویه (F_2) امید $\times St/b$ (عکس با فیلتر ۰۱). یک جفت کروموزوم حلقوی (پیکان رو به سمت پایین) و یک کروموزوم منفرد (پیکان رو به سمت راست) علایم نورانی بسیار قوی را نشان می دهند.

ل) متافاز تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی پایرم ثانویه (F_2) به دست آمده از نوید $\times (Cr/b) \times (Ka/b)$ (تهیه عکس با فیلتر ۰۱).

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی که در تامین هزینه پژوهش و دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در فراهم نمودن امکانات مزرعه سپاسگزاری می نمایم.

منابع

1. Aghaei, M.G., Ghavami, F. and Bozorgipour, R. 2005. A review on salty tolerated sources in wheat wild families. *Novin Genetics*, 2: 12-21. (In Persian)
2. Brasileiro-Vidal, A.C., Brammer, S., Puertas, M.J., Zanatta, A.C., Prestes, A., Moraes-Fernandes, M.I.B. and Guerra, M. 2005. Mitotic instability in wheat x *Thinopyrum ponticum* derivatives revealed by chromosome counting, nuclear DNA content and histone H₃ phosphorylation pattern. *Plant Cell Reports*, 24: 172-178.
3. Brasileiro-Vidal, A.C., Cuadrado, A., Brammer, S.P., Zanatta, A.C.A., Prestes, A.M., Moraes-Fernandes, M.I.B. and Guerra, M. 2003. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 4. 505-510.
4. Chen, Q., Conner, R.L., Laroche, A. and Thomas, J.B. 1998. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic *in situ* hybridization. *Genome*, 41: 580-586.
5. Dong, Y., Bu, X., Luan, Y., He, M. and Liu, B. 2004. Molecular characterization of a cryptic wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line: evidence for genomic instability in nascent allopolyploid and aneuploid lines. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 2. 237-241.
6. Ellneskog-Staam, P. and Merker, A. 2002. Chromosome composition, stability and fertility of allopolyploids between *Triticum turgidum* Var. *Carthlicum* and *Thinopyrum junceiforme*. *Hereditas*, 136: 59-65.
7. Farooq, S., Iqbal, N., Shah, T.M. and Asghar, M. 1993. Intergeneric hybridization for wheat improvement. VII. Transfer of salt tolerance from *Thinopyrum scirpeum* into wheat. *J. Gen. Breed.* 47: 191-197.
8. Ferrari, M.R., Greizerstein, E.J., Paccapelo, H.A., Naranjo, C.A., Cuadrado, A., Jouve, N. and Poggio, L. 2005. The genomic composition of Tricepiro, a synthetic forage crop. *Genome*, 48: 154-159.
9. Gubler, U. and Hoffmann, B.J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 25: 263-269.
10. Hassani, H.S. 1998. Development and cytogenetic studies of a potential new salt tolerant cereal, tritopyrum. Ph.D. Thesis, the University of Reading, UK.
11. Jauhar, P.P. 1991. Hybrid between durum wheat and diploid *Thinopyrum bessarabicum*. *Genome*, 34: 283-287.
12. Jauhar, P.P. and Peterson, T.S. 2006. Cytological analyses of hybrids and derivatives of hybrids between durum wheat and *Thinopyrum bessarabicum*, using multicolour fluorescent GISH. *Plant Breeding*, 125: 19-26.
13. Kishii, M., Wang, R. and Tsuijimoto, H. 2005. Gish analysis revealed new aspect of genomic constitution of *Thinopyrum intermedium*. *Czech J. Gen. and Plant Breed.* 41: 92-95.

14. Komatsuda, T. 1998. Development of STS markers closely linked to the vrs1 locus in barley, *Hordeum vulgare*. Genome, 41: 680-685.
15. Lapitan, N.L.V., Ganai, M.W. and Tanksley, S.D. 1989. Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TGRI satellite repeat. Genome, 32: 992-998.
16. Lapitan, N.L.V., Sears, R.G., Rayburn, A.L. and Gill, B.S. 1986. Detection of chromosome breakpoints by *in situ* hybridization with a biotin-labeled DNA probe. J. Hered. 77: 415-419.
17. Le, H.T., Armstrong, K.C. and Miki, B. 1989. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. Plant Mol. Biol. Rep. 7: 150-158.
18. Mukai, Y. and Gill, B.S. 1991. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. Genome, 34: 448-452.
19. Muramatsu, M. 1990. Cytogenetics of decaploid *Agropyron elongatum* (*Elytrigia elongata*) ($2n=70$). I. Frequency of decavalent formation. Genome, 33: 811-817.
20. Muthukrishnan, S., Gill, B.S., Swegle, M. and Chandra, G.R. 1984. Structural genes for α -amylases are located on barley chromosomes 1 and 6. J. biol. Chem. 259: 13637-13639.
21. Omielan, J.A., Epstein, E. and Dvorak, J. 1991. Salt tolerance and ionic relations of wheat as affected by individual chromosomes of salt-tolerant *Lophopyrum elongatum*. Genome, 34: 961-974.
22. Rayburn, A.L. and Gill, B.S. 1985. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. J. Hered. 76: 78-81.
23. Reader, S.M., Abbo, S., Purdie, K.A., King, I.P. and Miller, T.E. 1994. Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. Trends in Genetics, 8: 10. 265-266.
24. Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, the third edition, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
25. Schwarzacher, T., Leitch, A.R., Bennett, M.D. and Heslop-Harrison, J.S. 1989. *In situ* location of parental genomes in a wide hybrid. Ann. Bot. 64: 315-324.
26. Tor, M., Manning, K., King, G.J., Thompson, A.J., Jones, G.H., Seymour, G.B. and Armstrong, S.J. 2002. Genetic analysis and FISH mapping of the colourless non-ripening locus of tomato. Theor. Appl. Genet. 104: 165-170.
27. Zhang, J.Y., Li, X.M., Wang, R.R.C., Cortest, A., Rosast, V. and Mujeeb-Kazit, A. 2002. Molecular cytogenetics characterization of E^b-genome chromosomes in *Thinopyrum bessarabicum* disomic addition lines of bread wheat. Int. J. Plant Sci. 163: 1. 167-174.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 17(2), 2010
www.gau.ac.ir/journals

The Study of chromosome constitution in secondary *Tritipyrum* genotypes (F₂) by genomic *in situ* hybridization technique (GISH)

S. Khanamani Falahati Pour¹, *H. Shamsavand Hassani²,
A. Baghizadeh³ and S. Ghotbzadeh Kermani⁴

¹M.Sc. Student, Dept. of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, ²Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Bahonar University of Kerman, ³Assistant Prof., International Center for Science, High Technology and Environmental Science, Kerman, ⁴B.Sc. Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Bahonar University of Kerman

Received: 3,12,2008 ; Accepted: 26,5,2010

Abstract

To remove unfavorable traits of new cereal *Tritipyrum* ($2n=6x=42$, AABBE^bE^b), various crosses between primary *Tritipyrum* lines (female) with Iranian bread wheat varieties ($2n=6x=42$, AABBDD) was performed and a F₂ selfing population consisted of 1810 possible secondary *Tritipyrum* seeds ($2n=6x=42$, AABBD₍₀₋₁₄₎ E^b₍₀₋₁₄₎) were produced. The chromosome constitution and homology index of 11 plants of this F₂ progeny was assessed by genomic *in situ* hybridization (GISH). The results indicated that 1) without using Chinese spring DNA as a blocker differentiation between A, B, D and E^b chromosomes was impossible, 2) Secondly differentiation between A, B, D and E^b informs of single or pairs (rod or ring) chromosomes was improved by adding the preblocking hybridization step, using Chinese spring genomic DNA as probe, to normal GISH protocol. Third the E^b chromosome counts in F₂ plants showed the feasibility of selection of the so called secondary *Tritipyrum* genotypes (F₂) with different number of D and E^b chromosomes for favorable agronomic traits by genomic *in situ* hybridization as a powerful cytogenetic assisted marker selection (CAMS).

Keywords: Genomic *in situ* hybridization (GISH), Secondary *tritipyrum*, *Thinopyrum bessarabicum*

* Corresponding Author; Email: hosseini212001@yahoo.com