"مجله علوم زراعی ایران"
جلد سیزدهم، شماره ٤ زمستان ۱۳۹۰

شناسایی کروموزوم‌های ژنوم E^b در نتاج F_3 ژنوتیپ‌های جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه با روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل

Characterization of E^b genome chromosomes in F_3 progenies of new potential secondary Tritipyrum introgressed genotypes by genomic DNA in situ hybridization technique

زهره پورفریدونی[۱]، حسین شاهسوند حسنی[۲] و امین باقی زاده[۳]

چکیده

پورفریدونی، ز.، ح. شاهسوند حسنی و ا. باقی زاده. ۱۳۹۰. شناسایی کروموزوم‌های ژنوم E^b در نتاج F_3 ژنوتیپ‌های جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه با روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل. **مجله علوم زراعی ایران. ۱۳(٤): ۷٤۲-۷۳۰.**

تریتی‌پایرم اولیه یک غله آمفی پلوئید آلوهگزاپلوئید مصنوعی جدید است که از تلاقی والدین مادری گندم دوروم و والد پدری تینوپایرم بسارابیکوم (*Thinopyrum bessarabicum*) تولید شده است. اگرچه لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم متحمل به تنش شوری هستند، ولی دارای برخی صفات نامطلوب زراعی مانند شکنندگی محور سنبله و دیررسی هستند. برای رفع این معایب اقدام به تولید نسل سوم گیاهان جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه از طریق تلاقی لاین تریتی‌پایرم اولیه (St/b) و لاین ترکیبی اولیه (Ka/b)(Cr/b) تریتی‌پایرم ($AABBE^bE^b$, 2n=6x=42)، به ترتیب با دو رقم گندم نان اصلاح شده امید و نوید(*Triticum aestivum*:AABBDD, 2n=6x=42) گردید که در نتاج F_3 احتمال جایگزینی برخی کروموزوم‌های ژنوم D گندم با کروموزوم‌های E^b تریتی‌پایرم وجود دارد. علیرغم اینکه شباهت ژنتیکی زیاد بین دو ژنوم S^t و E^b وجود دارد، ولی شباهت ژنتیکی ژنوم S^t نسبت به ژنوم E^b با ژنوم‌های A، B و D گندم نان کمتر است. شناسایی کروموزوم‌های ژنوم E^b در نمونه‌های کروموزومی میتوز ژنوتیپ‌های احتمالی جدید تریتی‌پایرم ثانویه شامل نسل سوم نتاج (Omid×St/b) و [Navid×(Ka/b)(Cr/b)] با روش دو رگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل و با کاوشگر ژنومی نشانمند شده S^t با biotin-11-dutp انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از کاوشگر دی.ان.ای ژنومی گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا (*Pseudoroegneria stipifolia*) بجای کاوشگر دی.ان.ای ژنومی گونه تینوپایرم بسارابیکوم (E^b)، همپوشانی دورگ گیری بین کروموزوم‌های ژنوم E^b با ژنوم‌های A،B و D را کاهش می‌دهد و تمایز بین کروموزوم‌های ژنوم E^b با کروموزوم‌های A، B و D را افزایش می‌دهد، بنابراین علیرغم شباهت ژنتیکی زیاد بین دو ژنوم E^b و S^t، برای شناسایی بهتر کروموزوم‌های ژنوم E^b در نتاج احتمالی جدید تریتی‌پایرم ثانویه در نسل سوم، استفاده از کاوشگر ژنومی S^t توصیه می‌شود، زیرا شباهت ژنتیکی ژنوم S^t نسبت به ژنوم E^b از ژنوم‌های A،B و D بسیار کمتر است. در نمونه‌های کروموزومی میتوز نتاج نسل سوم تلاقی‌های [امید × (St/b)] و [نوید × (Ka/b)(Cr/b)] تعداد یک تا شش کروموزوم E^b قابل تشخیص بود که نشان می‌دهد تولید ژنوتیپ‌های جدید تریتی‌پایرم ثانویه با احتمال جایگزین شدن کروموزوم‌های خاصی از ژنوم E^b با کروموزوم‌های ویژه‌ای از ژنوم D وجود دارد. بنابراین روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل (GISH) می‌تواند به عنوان یک روش گزینش قدرتمند در مهندسی کروموزوم نتاج بین جنسی تریتی‌پایرم ثانویه برای انتخاب ژنوتیپ‌های مطلوب هگزاپلوئید با ساختار مناسبی از کروزوم‌های A،B و D و E^b بعنوان لاین‌های کروموزومی جایگزین یا نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تریتی پایرم، تینوپایرم بسارابیکوم، دورگ گیری دی. ان.ای ژنومی در محل و سودوجینریا استیپی‌فولیا.

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان و دانشگاه شیراز و همکار مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: hossein212001@yahoo.com)

۳- استادیار بخش بیوتکنولوژی مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان – ماهان

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گندم از غلات مهم و اصلی‌ترین ماده غذایی در بسیاری از کشورها است و عملکرد آن به عوامل مختلفی از جمله شرایط آب و هوایی و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی بستگی دارد. تولید سالیانه گندم دنیا در سال ۲۰۱۰، معادل ۶۷۹ میلیون تن بوده است (FAO, 2010). بر اساس اطلاعات منتشر شده توسط مرکز بین المللی تحقیقات گندم و ذرت (CIMMYT) هشت تا ۱۰ درصد از زمین‌های زیر کشت گندم در هند، پاکستان، ایران، مصر و لیبی و مکزیک تحت تأثیر شوری هستند (Mujeeb-Kazi and Diaz de leon, 2002). بنابراین افزایش تحمل به شوری در گندم ضروری به نظر می‌رسد (Colmer *et al.*, 2006; Tuna *et al.*, 2008). اگر چه گندم بطور نسبی به شوری متحمل است، اما قابلیت کشت در همه مناطق را ندارد. پتانسیل تنوع ژنتیک تحمل به شوری در ارقام اصلاح شده و بومی خانواده گندم در ایران و سایر نقاط دنیا و امکان اصلاح ارقام متحمل به این تنش نیز گزارش شده است (Shahsavand Hassani and Caligari, 2005). تحمل به شوری صفتی کمّی است و ژن‌های زیادی آن را کنترل می‌کنند، بنابراین دورگ‌گیری ارقام اصلاح شده با خویشاوندان وحشی بویژه تلاقی‌های دور، امکان انتقال این صفت پیچیده را فراهم می‌کند (Flowers and Flowers, 2005). وجود ژن‌های مفید و تنوع ژنتیکی بالا درگونه‌های وحشی برای انواع صفات مقاومت به تنش‌های محیطی و سازگاری وسیع گونه‌های وحشی و خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی به شرایط آب و هوایی مختلف، حاکی از نقش ویژه آن‌ها در اصلاح ارقام زراعی موجود است (Jiang *et al.*, 1994).

تینوپایرم بسارابیکوم (*Thinopyrum bessarabicum*) گیاهی علفی با رشد کند و دوام بالا، خود بارور و متحمل به شوری است که در سواحل دریای مدیترانه و دریای سیاه رشد می‌کند (King *et al.*, 1997). اگرچه این گیاه در شوری ۳۵۰ میلی مولار زنده می‌ماند، ولی رشد آن در شوری بیشتر از ۲۵۰ میلی مولار نمک کم می‌شود (Colmer *et al.*, 2006). این گیاه صفات مطلوب بسیاری دارد و دارای صفات ژنتیکی مناسبی برای بهبود تحمل به تنش‌های محیطی بویژه شوری در گندم است و می‌توان آن را به راحتی با گندم تلاقی داد (Fedak and Han, 2005). غله جدید تریتی‌پایرم سومین آمفی پلوئید مصنوعی است که برخی ژنوتیپ‌های اولیه آن در سال ۱۹۸۵ توسط فورستر و میلر (Forster and Miller, 1985) از تلاقی گندم نان و گونه تینوپایرم بسارابیکوم ایجاد شده است. نتایج تحقیقات انجام شده نشان دهنده پتانسیل بالقوه تحمل به شوری این گیاه است (Colmer *et al.*, 2006; King et al., 1997). شاهسوند حسنی و همکاران (Shahsavand Hassani *et al.*, 2008) با ارزیابی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم در شرایط تنش شوری نشان دادند که تریتی‌پایرم غله‌ای متحمل به شوری است.

لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم هگزاپلوئید ($AABBE^bE^b$, 2n=6x=42)، تحمل به شوری قابل توجهی به نمک کلرید سدیم نشان می‌دهند، اما دارای شکنندگی محور سنبله، دیررسی و اندکی ناپایداری کروموزومی در تقسیم میوز همانند تریتیکاله‌های اولیه هستند. همانگونه که با انواع روش‌های اصلاحی صفات نامطلوب زراعی تریتیکاله برطرف شده است، اصلاح تریتی‌پایرم اولیه و حذف صفات نامطوب زراعی آن نیز دور از انتظار نیست (Shahsavand Hassani *et al.*, 2003). در لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم هگزاپلوئید، ژنوم E^b نسبت به ژنومD از لحاظ پتانسیل تحمل به شوری برتری دارد. بررسی عکس العمل یکسان دو لاین هگزاپلوئید تریتی‌پایرم اولیه (Ne/b و La/b) در مقایسه با لاین تریتی‌پایرم اولیه اکتاپلوئید (Cs/b) در تیمارهای مختلف

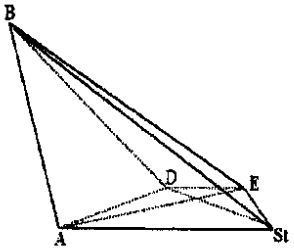
Archive of SID

www.SID.ir

شوری نشان دهنده این است که ژنوم D در تحمل به شوری تأثیری ندارد (King *et al.*, 1997). اصلاح خصوصیات نامطلوب زراعی منتسب به ژنوم E^b در لاین‌های تریتی‌پایرم هگزاپلوئید اولیه با جایگزینی برخی از کروموزوم‌های این ژنوم با تمام یا برخی از کروموزوم‌های ژنومD بمنظور تولید لاین‌های ثانویه تریتی‌پایرم امکان پذیر است (Shahsavand Hassani *et al*., 2003).

اکثر ژن‌های تحمل به شوری روی کروموزوم شماره پنج گونه تینوپایرم بسارابیکوم ($2n=2x=14$, E^bE^b) قرار دارند (Forster *et al*., 1988). گیاهان نسل اول (F_1, $2n=6x=42$, 7"A7"B7'D7'E^b) حاصل از تلاقی لاین‌های هگزاپلوئید اولیه تریتی‌پایرم با ارقام اصلاح شده گندم نان حاوی سری کامل کروموزوم‌های دو ژنوم A و B، هفت کروموزوم از ژنوم D و هفت کروموزوم از ژنوم E^b هستند. نتاج حاصل از خودباروی گیاهان نسل اول و یا تلاقی برگشتی آن‌ها با ارقام گندم، تفرق کروموزومی این گیاهان در نسل دوم و امکان پیدایش ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه، یعنی گیاهانی با ۴۲ کروموزوم (۱۴ کروموزوم از ژنومA، ۱۴ کروموزوم از ژنوم B، ۱۲ کروموزوم از ژنوم D و یک جفت کروموزوم شماره پنج ژنوم E^b) و تعداد متفاوتی از کروموزوم‌های D و E^b را بدنبال دارد، زیرا انتظار می‌رود که همولوژی کامل بین ژنوم‌های A و B وجود داشته باشد، ولی همولوژی کامل بین کروموزوم‌های دو ژنوم D و E^b وجود ندارد.

بنابراین احتمال تولید گیاهانی با تعداد متفاوت یک تا هفت کروموزوم از هر یک از دو ژنومD وE^b در هر بوته وجود دارد و به همین دلیل گیاهان نسل دوم به بعد منبع با ارزشی برای غربال و انتخاب گیاهان با ترکیبات مختلف کروموزومی دو ژنوم D و E^b به شمار می‌روند. اقدامات اولیه برای تولید لاین‌های ثانویه تریتی‌پایرم از چندین سال قبل در ایران آغاز شده است و برای گزینش ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه از روش دورگ گیری دی. ان.ای ژنومی در محل استفاده شده است (Shahsavand Hassani *et al*., 2003). اجرای این روش با استفاده از کاوشگر حاصل از دی.ان.ای گونه تینوپایرم بسارابیکوم به دلیل خویشاوندی نزدیک آن با گندم، تا حدودی مشکل است. زیرا کاوشگر همواره علاوه بر اتصال به کروموزوم‌های تینوپایرم بسارابیکوم، گرایش به دورگ شدن با کروموزوم‌های گندم را نیز داشته و تمایز و تشخیص کروموزوم‌های تینوپایرم بسارابیکوم از کروموزوم‌های گندم را در ساختمان کروموزومی ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه با مشکل مواجه می کند (Zhang *et al*., 2002). به منظور حل این مشکل، از دی. ان.ای گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا(*Pseudoroegneria stipifolia*) برای تهیه کاوشگر استفاده شد. گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا دارای خویشاوندی دورتری با گندم در مقایسه با تینوپایرم بسارابیکوم است، ولی رابطه خویشاوندی بسیار نزدیکی با گونه تینوپایرم بسارابیکوم دارد (شکل ۱)



شکل۱- ارتباط ژنومی میان پنج ژنوم اصلی طایفه گندمیان

Fig.1. Genomic relationships among five basic genomes of triticeae tribe

www.SID.ir

و می‌تواند بعنوان یک کاوشگر جدید برای شناسایی کروموزوم‌های آن‌ها در روش دورگ گیری دی. ان.ای ژنومی در محل به کار گرفته شود (Chen *et al*., 1998; Liu *et a*l., 2007; Zhang *et al*., 2002).

در این تحقیق با کاربرد کاوشگر ژنومی سودوجینریا استیپی‌فولیا (S^tS^t ,2n=2x=14)، وجود تعداد کروموزوم‌های E^b در ساختار کروموزومی چهار گیاه (۲۰ سلول متافاز میتوزی) از نسل سوم ژنوتیپ جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی رقم گندم نان امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b و چهار گیاه (۲۷ سلول متافاز میتوزی) از نسل سوم ژنوتیپ جدید و ممکن تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی رقم گندم نان نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه (Ka/b)(Cr/b) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل بذر و گیاهان نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید تریتی‌پایرم ثانویه (F_3: NPSTIGs : AABB(1-7)D(1-7)E^b) حاصل از تلاقی گندم نان (رقم امید) با تریتی‌پایرم اولیه (لاین St/b)، بذر و گیاهان نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید تریتی‌پایرم ثانویه (F_3: NPSTIGs : AABB(1-7)D(1-7)E^b) حاصل از تلاقی گندم نان (رقم نوید) با تریتی‌پایرم اولیه [لاین ترکیبی(Ka/b)(Cr/b)] بود. علاوه بر مواد گیاهی مذکور از بذرهای تهیه شده گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا (2n=2x=14, SS) از مرکز تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی آلمان (IPK) و گندم بهاره چینی (CS: 2n=6x=42, AABBDD) استفاده شد.

تهیه اسلاید کروموزومی میتوز

بذرهای ژنوتیپ‌های جدید و ممکن ثانویه تریتی‌پایرم حاصل از تلاقی گندم نان (رقم امید) و تریتی‌پایرم اولیه (St/b) و همچنین حاصل از تلاقی گندم نان (رقم نوید) با تریتی‌پایرم اولیه[لاین ترکیبی (Ka/b)(Cr/b)] در ظروف پتری کشت شدند و ریشه‌چه‌های یک و نیم سانتی‌متری آن‌ها با اسکالپل جدا و ۲۴ ساعت در آب مقطر چهار درجه سانتی‌گراد و سپس ۲۴ ساعت در محلول کارنوی I قرار داده شدند. سپس ریشه‌چه‌ها در یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد روی اسلاید قرار داده شده و با چند ضربه ملایم روی لامل بطور یکنواخت روی اسلاید پخش شدند. اسلایدهای حاوی یک لایه از سلول‌های مریستم نوک ریشه‌چه‌ها در زیر میکروسکوپ فازکنتراست بررسی و اسلایدهای حاوی نمونه‌های کروموزومی واضح، بویژه حاوی تعداد مناسب از سلول‌های متافاز، در نیتروژن مایع منجمد شده و بلافاصله لامل با اسکالپل برداشته و اسلایدها تا زمان انجام دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل، در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج دی. ان.ای ژنومی

دی.ان.ای ژنومی از برگ گیاهان گونه‌های گندم (رقم بهاره چینی (CS:2n=6x=42,AABBDD))، سودوجینریا استیپی‌فولیا (S^tS^t ,2n=2x=14) براساس روش تغییر یافته دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al*., 1983) استخراج شد.

۰/۱ گرم از نمونه‌های برگی در نیتروژن مایع سائیده شده و ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به آن اضافه و در میکروتیوب ریخته و به آرامی بهم زده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۶۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم پنج مولار به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پانصد میکرولیتر محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل به میکروتیوب اضافه و با آرامی بهم زده و ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول روشن به لوله جدید انتقال و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس به مدت ۳۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه با دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و سپس قسمت فوقانی محلول به آرامی دور ریخته شد. رسوب

Archive of SID

www.SID.ir

بجا مانده با اتانول ۷۰ درصد شستشو و ۱۵۰ میکرولیتر محلول **TE** به آن اضافه و غلظت دی.ان.ای در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Carry 50, USA) تعیین و تا زمان استفاده در تهیه کاوشگر در ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه کاوشگر ژنومی سودوجینریا استیپی‌فولیا با روش شکاف و ترجمه (Nick Translation)

به منظور تهیه کاوشگر ژنومی از گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا، پنج میکرولیتر بافر دی.ان.ای پلی مراز با غلظت پایه (۱۰X)، دو میکرولیتر محلول سه نوکلئوتید غیر نشاندار شامل dCTP، dGTP و dATP (یک میلی مولار)، نیم میکرولیتر نوکلئوتید dTTP (یک میلی مولار)، دو میکرولیتر نوکلئوتید dUTP نشاندار شده با بیوتین (Biotin-11-dUTP)، سه میکرولیتر آنزیم دی.ان.ای پلی‌مراز، دو میکرولیتر آنزیم دی اکسی ریبونوکلئاز، یک میکرولیتر از دی.ان.ای ژنومی گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا دارای ۵۰ نانوگرم دی.ان.ای ژنومی از این گونه و ۳۴ میکرولیتر آب مقطر استریل در لوله یک و نیم میلی لیتری با هم مخلوط و به مدت دو ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای متوقف کردن واکنش، یک میکرولیتر از محلول EDTA نیم مولار به میکروتیوب اضافه شد. از این محلول بعنوان کاوشگر در آزمایشات دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل استفاده گردید.

تعیین کیفیت کاوشگر ژنومی

برای تعیین میزان نشاندار شدن دی.ان.ای ژنومی گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا با روش رنگ سنجی از دستورالعمل کیت تعیین کیفیت کاوشگر شرکت فرمنتاز استفاده شد. ابتدا محلول کاوشگر با استفاده از محلول نمکی XSSC۶ به نسبت‌های ۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰ رقیق شد. سپس یک میکرولیتر از محلول‌های چهارگانه شامل کاوشگر اصلی، سه محلول کاوشگر رقیق شده و محلول نمکی XSSC۶ (بعنوان کنترل منفی) روی غشاء (کاغذ بلاتینگ) ریخته و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس غشاء (کاغذ بلاتینگ) به ترتیب با محلول‌های مسدود کننده (بلوکینگ)، آلکالین فسفاتاز استرپتاویدین و مسدود کننده (بلوکینگ) هر یک ۳۰ و ۱۵ دقیقه نیز با بافر ردیابی روی شیکر با دور متوسط شستشو داده شدند. پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در محلول سوبسترای ویژه -5-bromo-4-chloro-3-indolphosphate/nitroblue tetrazolium (NBT/BCIP) درتاریکی قرار داده شدند. به منظور متوقف کردن واکنش، غشاء چند دقیقه با آب شستشو و سپس در دمای اتاق خشک و از آن عکسبرداری شد.

دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل

دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل طبق روش شواریتزر و هریسون (Schwarzacher and Harrison, 2000) با اندک تغییراتی انجام شد. اسلایدهای از قبل تهیه شده ژنوتیپ‌های جدید تریتی‌پایرم ثانویه (NPSTIGs) از فریزر به محیط آزمایشگاه منتقل و پس از هم دما شدن با محیط، به مدت ۳۰ دقیقه در محلول آنزیم RNase (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. واسرشته سازی دی.ان.ای نمونه‌های کروموزومی هدف در اسلایدها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در محلول ۷۰ درصد فرمامید و آبگیری نمونه در محلول‌های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد اتانول انجام و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس مخلوط دورگ گیری دی.ان.ای کاوشگر در محل متشکل از محلول‌های فرمامید دیونیزه ۵۰ درصد (۲۰میکرولیتر)، دکستران سولفات ده درصد (۱۰میکرولیتر)، محلول نمکی ۲۰XSSC (پنج میکرولیتر)، محلول دی.ان.ای کاوشگر (یک میکرولیتر) و دی.ان.ای ماهی آزاد با غلظت ده میکروگرم در میکرولیتر (یک میکرولیتر) و دی.ان.ای مسدود کننده (گندم بهاره چینی) و آب مقطر دو بار استریل تا رساندن حجم به ۵۰ میکرولیتر برای هر

Archive of SID

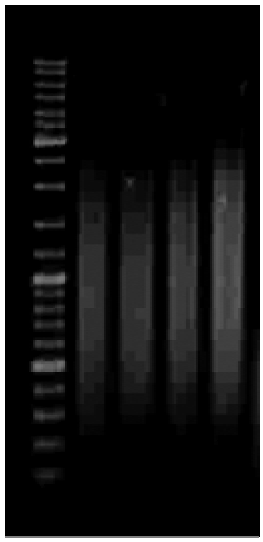
www.SID.ir

اسلاید، در یک لوله مخلوط و به مدت شش دقیقه در دمای ۱۰۰درجه سانتی‌گراد برای واسرشته سازی دی.ان.ای کاوشگر قرار داده شدند. ۴۵ میکرولیتر از محلول مخلوط دورگ گیری روی هر اسلاید ریخته شد و لامل روی آن قرار داده شد. اسلایدها در محفظه مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار و سپس در فرمامید ۵۰ درصد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شستشو و به مدت ده دقیقه در محلول سرم آلبومین گاوی (BSA 3%) قرار داده شدند. برای آشکار سازی محل‌های دو رگ گیری شده در کروموزوم‌ها، ۵۰ میکرولیتر از محلول آویدین اف.آی.تی.سی(Avidin-FITC) در سرم آلبومین گاوی (BSA3%) تا غلظت پنج میکروگرم در میلی‌لیتر رقیق شده و روی هر اسلاید ریخته شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول شستشو قرار گرفتند. به منظور تقویت نور حاصل از محل‌های دورگ‌گیری شده از محلول ضد آویدین اف.آی.تی.سی (Anti-Avidin-FITC) استفاده شد. بعد از شستشوی مجدد، ۳۰ میکرولیتر محلول دپی (DAPI) جهت تثبیت و ثبات فلورسنت روی اسلایدها ریخته و در زیر میکروسکوپ فلورسنت (Axioplan 2, Germany) مورد مشاهده قرار گرفتند و از سلول‌های حاوی کروموزوم‌های نشانگر ژنومی گونه علف شور ساحل، با دوربین CCD متصل به میکروسکوپ، ابتدا با فیلتر پنج (DAPI) و بعد با فیلتر شش (فلورسئین ایزوتیوسیانات) عکس تهیه و از لحاظ تعداد کروموزم‌های ژنوم E^b ارزیابی شدند.

نتایج و بحث

کیفیت دی.ان ای کاوشگر

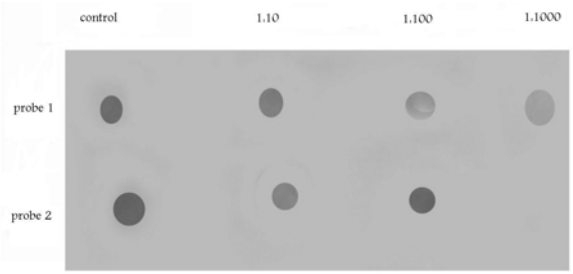
میزان جذب دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از ژنوم S^t با اسپکتروفتومتر ۱/۸ تا ۲ بدست آمد که نشان دهنده کیفیت خوب آن برای استفاده در روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل (GISH) بود. بررسی دی.ان.ای ژنومی رقم بهاره چینی بعنوان دی.ان.ای مسدود کننده توالی‌های مشترک ژنوم E^b با ژنوم‌های A،B و D با ژل آگارز نشان داد که مناسب ترین زمان برای تولید دی.ان.ای مذکور به قطعات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز، هفت دقیقه قرار دادن دی.ان.ای در اتوکلاو بود (شکل ۲). کنترل کیفیت دی.ان.ای ژنومی گونه



شکل ۲- کنترل طول ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی قطعات توالی دی.ان.ای مسدود کننده گندم بهاره چینی

Fig. 2. Confirmation of the sequence length of 200-1000 bp of Chinese spring blocking DNA

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳ - تعیین کیفیت کاوشگر (دی.ان.ای ژنومی سودوجینریا استیپی‌فولیا نشاندار شده با بیوتین)

Fig. 3. Qualification of *Pseudoroegneria stipifolia* genomic probe labelled with Biotin

سودوجینریا نشاندار شده با بیوتین بعنوان کاوشگر باروش رنگ سنجی نیز حاکی از مقدار کافی بیوتین موجود در کاوشگر جهت تقویت و مشاهده محل‌های نورانی دورگ گیری شده این دی.ان.ای با دی.ان.ای گونه علف شور ساحل (E^b) موجود در ساختار کروموزومی گیاهان نتاج نسل سوم تریتی‌پایرم ثانویه (NPSTIGs) بود (شکل ۳).

دو رگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل

درآزمایش دو رگ‌گیری دی.ان.ای ژنومی در محل، هر چه میزان شباهت توالی‌های دی.ان.ای کاوشگر با توالی‌های دی.ان.ای ژنوم‌های والدینی بیشتر باشد، امکان ایجاد محل‌های دورگ گیری شده نورانی ناخواسته بیشتر است. استفاده ازکاوشگر ژنومی E^b در بررسی ساختار کروموزومی نمونه‌های گیاهی ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی گندم نان با تریتی‌پایرم اولیه، موجب می‌شود که دورگ گیری کروموزوم‌های کاوشگر ژنومی E^b با کروموزوم‌های سایر ژنوم‌ها، غیر از ژنوم E^b اتفاق بیفتد. پایین بودن غلظت دی.ان.ای مسدود کننده محل‌های مشترک کروموزوم‌های کاوشگر با کروموزوم‌های نمونه هدف یا مسدود نشدن توالی مشترک بین کروموزوم‌های ژنوم E^b با کروموزوم‌های سایر ژنوم‌ها، تعداد محل‌های نورانی دورگ گیری شده را بیش از تعدادکروموزوم‌های کاوشگر نشان خواهد داد، بنابراین استفاده از کاوشگر ژنومی E^b بدلایل فوق برای شناسایی و حضور تعداد کروموزوم‌های این ژنوم در ساختار کروموزومی گیاهان ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه بسیار مشکل بوده و نتایج معتبری نخواهد داشت.

ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2002) با بررسی آمفی‌پلوئید بین گندم نان و گونه تینوپایرم بسارابیکوم نشان دادند که ژنوم E^b شباهت زیادی با ژنوم‌های موجود در گندم نان دارد و با کاربرد این ژنوم به عنوان کاوشگر در نمونه‌های حاوی کروموزوم‌های ژنوم‌های گندم نان، محل‌های نورانی دورگ‌گیری شده ناخواسته ایجاد می‌شود. ویلیام و مجیب قاضی (Willliam and Mujeeb-kazi, 1995) نشان دادند که بدلیل همولوژی بالای ژنوم E^b با ژنوم‌های A, B و D برای ردیابی این ژنوم در ساختار کروموزومی آمفی‌پلوئیدهای بین گندم و گونه‌های تینوپایرم و شناسایی قطعی وجود کروموزوم‌های E^b در این نمونه‌های کروموزومی، استفاده از نسبت بالای دی.ان.ای مسدود کننده توالی‌های مشابه با دی.ان.ای کاوشگر ضروری است. شاهسوند حسنی و همکاران (Shahsavand Hassani *et al.*, 2003) برای شناسایی کروموزوم‌های گونه تینوپایرم بسارابیکوم در لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم بدلیل شباهت زیاد ژنوم E^b با ژنوم‌های گندم از نسبت بالای ۵۰ برابری دی.ان.ای مسدود کننده توالی‌های مشابه نسبت به دی.ان.ای کاوشگر استفاده کردند، اما بکار بردن دی.ان.ای ژنومی گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا بدلیل

Archive of SID
www.SID.ir

شباهت ژنتیکی زیادتر به ژنوم E^b و شباهت کمتر آن به سایر ژنوم‌های گندم نان برای ردیابی کروموزوم‌های ژنوم E^b نیاز به دی.ان.ای مسدود کننده کمتری دارد و محل‌های نورانی دورگ گیری شده ناخواسته نیز بشدت کاهش می‌یابد. چن و همکاران (Chen *et al.*, 1998) کاوشگر دی.ان.ای ژنومی گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا را برای شناسایی آمفی‌پلوئیدهای حاصل از تلاقی گونه‌های گندم و تینوپایرم مورد استفاده قرار دادند. کاوشگر این ژنوم برای ردیابی کروموزوم‌های ژنوم E^b در آمفی‌پلوئیدهای گندم و تینوپایرم پونتیکوم نیز کاربرد داشته است (Fedak and Han, 2005). ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2002) کاوشگر این ژنوم را برای ردیابی و وجود کروموزوم‌های E^b در ساختار کروموزومی لاین‌های افزایشی گندم-تینوپایرم مقاوم به ویروس پیچیدگی جو به کار بردند. استفاده از کاوشگر ژنوم S^t در ردیابی و وجود کروموزوم‌های E^b در ترکیب کروموزومی لاین‌های افزایشی گندم– اینترمیدیوم مقاوم به سفیدک پودری نیز نتایج مطلوبی را به همراه داشت (Liu and Wang, 2002).

کاربرد دی.ان.ای ژنوم S^t به عنوان کاوشگر برای شناسایی کروموزوم‌های E^b در ساختار کروموزومی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه یا ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه و استفاده از نسبت پایین‌تری از DNA مسدود کننده توالی‌های مشابه (۵:۱) در این آزمایش نتایج مطلوبی را بدنبال داشت (شکل ۴). ژانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2002) نشان دادند که با کاربرد نسبت ۳:۱ از کاوشگر ژنومی گونه سودوجینریا و دی.ان.ای مسدود کننده توالی‌های مشابه دی.ان.ای هدف در نتایج دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی گونه سودوجینریا (GISH) نتیجه بخش است. همچنین استفاده از روش نشاندار کردن غیر مستقیم دی.ان.ای کاوشگر گونه سودوجینریا در این بررسی امکان تقویت علائم نورانی محل‌های دورگ گیری شده در گیاهان نتاج نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ثانویه تریتی‌پایرم را فراهم و نتایج مشاهده شده در شناسایی و وجود کروموزم‌های E^b در ترکیب کروموزومی این گیاهان بسیار رضایت بخش بود (شکل ۴).

نتایج تجزیه محل‌های نورانی دورگ‌گیری شده دی.ان.ای ژنومی کاوشگر گونه سودوجینریا در گیاهان نتاج نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ثانویه تریتی‌پایرم حاصل از تلاقی تریتی‌پایرم اولیه [لاین (Ka/b) (Cr/b)] با گندم نان (رقم نوید) با فیلترهای دپی (DAPI) و فلورسئین ایزوتیوسیانات (شکل ۴) نشان داد که در فیلتر دپی تمام کروموزوم‌های نمونه تهیه شده میتوزی به رنگ آبی دیده شدند ولی در فیلتر فلورسئین ایزوتیوسیانات در برخی کروموزوم‌ها محل‌های نورانی دورگیری شده به رنگ سبز مشاهده شد که حاکی از دو رگ گیری توالی‌های مشابه دی.ان.ای کروموزوم‌های موجود در نمونه کروموزومی میتوز لاین (Ka/b) (Cr/b) با توالی‌های دی.ان.ای مشابه در کروموزوم‌های ژنوم کاوشگر گونه سودوجینریا (S^t) است. تعداد کروموزوم‌های E^b مشاهده شده در نمونه‌های کروموزومی میتوز گیاهان نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (NPSTIGs) حاصل از تلاقی ارقام گندم امید و نوید به ترتیب با لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم St/b و (Ka/b)(Cr/b) بین یک تا شش کروموزوم متغیر بود (جدول۱) که نشان دهنده امکان تولید ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه حاوی یک تا سه جفت کروموزوم E^b و اصلاح تریتی‌پایرم اولیه با استفاده از ژنوم گندم نان دارد. شاهسوند حسنی وهمکاران (Shahsavand Hassani *et al.*, 2003) تعداد سه تا ۱۲ کروموزوم E^b را در نتاج F_2 وF_3 ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی گندم نان (ارقام ومبلی و آگزونا) با لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم شناسایی کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. خنامانی (Khanamani, 2007) تعداد شش تا هفت

Archive of SID

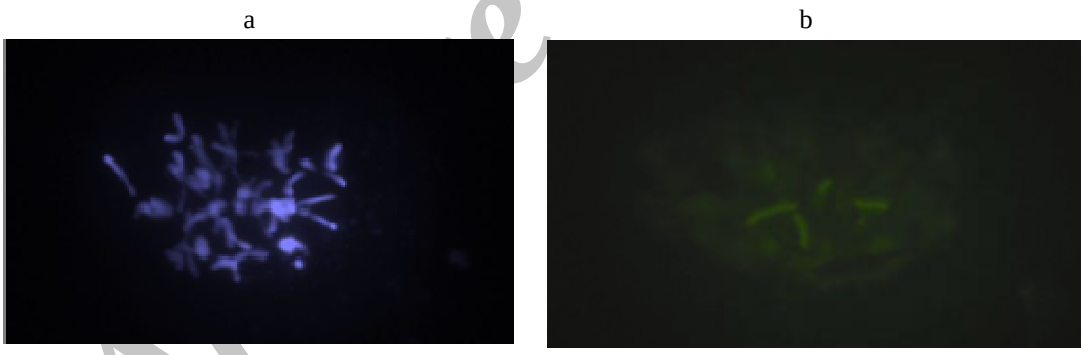
www.SID.ir

کروموزوم E^b را در ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه نتاج F_2 حاصل از تلاقی ارقام گندم امید و نوید به ترتیب با لاین اولیه تریتی‌پایرم St/b و لاین ترکیبی تریتی‌پایرم اولیه (Ka/b)(Cr/b) گزارش کردند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. میرزا قادری و همکاران (Mirzaghaderi *et al*., 2010) تعداد دو تا ده کروموزوم E^b را در نسل F_3 ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ثانویه تریتی‌پایرم شناسایی کردند که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. بطور کلی نتایج بدست آمده در این تحقیق در مقایسه با پژوهش‌های مشابه ولی در توده‌های گیاهی متفاوت در حال تفرق کروموزومی حاصل از تلاقی‌های مختلف نشان داد که امکان

جدول ۱- تعداد کروموزوم‌های شناسایی شده ژنوم E^b در ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی گندم نان ایرانی (ارقام امید و نوید) با تریتی‌پایرم اولیه [لاین‌های St/b و (Ka/b)/(Cr/b)] با استفاده از روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل (GISH)

Table1. Number of E^b chromosomes in new potential secondary tritipyrum genotypes produced by crossing the Iranian bread wheat (cvs: Omid and Navid) with primary tritipyrum lines [St/b and (Ka/b) (Cr/b)] using in situ hybridization technique

ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم tritipyrum genotypes	تعداد گیاهان No. of plants	تعداد سلول‌ها No. of cells	تعداد کروموزوم‌ها NO.of chromosomes	تعداد کروموزوم‌های E^b NO. of E^b chromosomes
Omid × St/b	4	20	32-44	1-6
Navid × (Ka/b)(Cr/b)	4	27	32-46	1-6



شکل ۴- دورگ‌گیری دی.ان.ای ژنومی در محل در مرحله متافاز میتوزی سلول‌های ژنوتیپ جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (NPSTIG) حاصل از تلاقی گندم نان (رقم نوید) با تریتی‌پایرم ترکیبی اولیه [لاین (Ka/b)(Cr/b)] با کاوشگر ژنومی گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا (نشاندار شده با بیوتین dUTP-۱۱) a. فیلتر DAPI: تمام کروموزوم‌ها به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. b. فیلتر فلورسئین ایزوتیوسیانات: تعداد ۴ کروموزوم دورگ گیری شده کاوشگر ژنومی S^t با کروموزوم‌های همیولوگ ژنوم E^b در NPSTIGs به رنگ سبز نورانی مشاهده می‌شوند (بزرگنمایی: ۴۰۰X)

Fig. 4. Genomic in situ hybridization between mitotic metaphase cells of new potential secondary tritipyrum genotype derived from crossing between Iranian bread wheat (cv: Navid) and combined primary tritipyrum [line: Ka/b)(Cr/b)] . a. DAPI filter; all chromosomes were blue. b. FITC filter: the 4 hybrid sites of S^t genome chromosomes as probe with their E^b homeolog chromosomes of NPSTIGs cells were bright green (Magnification: 400X)

www.SID.ir

اصلاح کروموزومی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم از طریق تلاقی آنها با گندم نان وجود دارد. گزینش لاین اصلاح شده گندم نان حاوی یک یا چند جفت از کروموزوم‌های E^b، در این توده‌های گیاهی با استفاده از نشانگرهای سیتوژنتیک مولکولی مانند دو رگ‌گیری دی.ان.ای ژنومی در محل امکان پذیر است و شناسایی نوع خاص این کروموزوم‌ها نیاز به استفاده از نشانگرهای مولکولی ژنوم E^b دارد.

نتیجه گیری

انتظار می‌رود که در ساختار کروموزومی گیاهان نسل اول ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه ($F_1$7"AA7"BB7D7E^b, 2n=6x=42) تعداد ۱۴ کروموزوم از ژنوم A، ۱۴ کروموزوم از ژنوم B، هفت کروموزوم از ژنوم D و هفت کروموزوم از ژنوم E^b وجود داشته باشند و در نسل‌های تفرق (F_2 و F_3)، انتظار پیدایش ترکیبات مختلفی از تعداد یک تا هفت کروموزوم ژنوم D و یک تا هفت کروموزوم از ژنوم E^b می‌رود. در سلول‌هایی که تعداد کل کروموزوم‌ها ۴۲ است و تعداد کروموزوم‌های E^b کمتر از ۱۴ است، ممکن است که کروموزوم‌های ژنوم D جایگزین کروموزوم‌های E^b شده باشند. در این آزمایش نیز در تمام سلول‌ها، تعداد کروموزوم‌ها کمتر از هفت جفت بود، بنابراین احتمال زیادی وجود دارد که در این سلول‌ها کروموزوم‌های ژنوم D جایگزین کروموزوم‌های E^b شده باشند (شکل ۴). در سلول‌های گیاهانی که تعداد کروموزوم‌های ژنوم E^b آنها مساوی ۱۴ باشد، امکان جایگزینی هیچ کروموزومی از ژنوم E^b با کروموزوم‌های ژنوم D وجود ندارد. نتایج این تحقیق نشان داد که از روش‌های سیتوژنتیک مولکولی مانند دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل می‌توان در فرآیند گزینش ترکیبات و تنوع کروموزومی و تشخیص تعداد کروموزوم‌های بیگانه E^b در توده‌های گیاهی آمفی‌پلوئید ناقص حاصل از تلاقی‌های خارج از گونه گیاهان زراعی مانند ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی‌پایرم با ترکیبات متفاوت کروموزوم‌های A, B, D و E^b استفاده کرد و ژنوتیپ‌هایی متفاوت در نسل‌های در حال تفرق مانند F_2 با تعداد متفاوتی از کروموزوم‌های E^b شناسایی نمود. بدین ترتیب امکان گزینش ژنوتیپ‌های ثانویه مطلوب به ویژه ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه با ساختار کروموزومی [(7")AA(7")BB(6")DD(1") E^bE^b] که تنها $5E^b$ آن باقی مانده و بقیه کروموزوم‌های $1E^b$ تا $4E^b$، $6E^b$ و $7E^b$ با کروموزوم‌های همگروه خود از ژنوم D جابجا شده باشند، وجود دارد.

اگرچه در این تحقیق کاربرد روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل(GISH)، امکان تعیین تعداد کروموزوم‌های E^b در ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه به عنوان یک ابزار گزینش در به نژادی کروموزومی را فراهم نمود، اما تشخیص نوع خاص کروموزوم‌های حاوی صفات ویژه مانند کروموزوم $5E^b$ حاوی صفات تحمل به تنش شوری نیازمند استفاده توام از نشانگرهای سیتوژنتیک مولکولی مانند دورگ‌گیری دی.ان.ای ژنومی در محل (GISH) و نشانگرهای مولکولی دی.ان.ای می‌باشد. بدین ترتیب دقت تشخیص ژنوتیپ‌های برتر کروموزومی بین گونه‌ای یا جنسی افزایش یافته و به‌نژادگران خواهند توانست گزینش ژنوتیپ‌ها را تا دست‌یابی به یک رقم اصلاح شده با دقت بیشتری انجام دهند.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان از دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در تامین بخشی از امکانات و بویژه مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ماهان برای تامین بخش عمده‌ای از هزینه تحقیق و ازآقای دکتر آندریاس بورنر مسئول بانک ژن مرکز تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی آلمان (IPK) برای ارسال نمونه بذر گونه سودوجینریا استیپی فولیا تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

References منابع مورد استفاده

Chen, Q., R. L. Conner, A. Laroche and J. B. Thomas. 1998. Genome analysis of *Thinopyrum intermedium* and *Thinopyrum ponticum* using genomic in situ hybridization. Genome, 41: 580-586.

Colmer, T. D., T. J. Flowers and R. Munns. 2006. Use of wild relative to improve salt tolerance in wheat. J. Exp. Bot. 57(5): 1059-1078.

Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Vertion II. Plant. Mol. Biol. Rep. 1:19-21.

Fedak, G. and F. Han. 2005. Characterization of derivatives from wheat- thinopyrum wide crosses. Cytogen. Genome Res. 109: 360-367.

Flowers, T. J. and S. A. Flowers. 2005. Why does salinity pose such a difficult problem for breeders?. Agric. Water Manage. 78: 15-24.

Forster, B. P., T. E. Miller and C. N. Law. 1988. salt tolerance of two wheat-*Agropyron junceum* disomic addition lines. Genome, 30: 559-564.

Heslop-Harrison, J. S. 1992. Molecular cytogenetics, cytology and genomic comparisons in the Triticeae. Hereditas, 116: 93-99.

FAO. 2010. www.http://faostat.fao.org/statistics.

Jiang, J., B. Friebe and B. S. Gill. 1994. Recent advances in alien gene transfer in wheat. Euphytica,73 : 199-212.

Khanamani Falahati Pour, S. 2007. The assessment of tritipyrum and their progenies chromosome constitution by classical cytology and in situ hybridization, MS.c. thesis in biotechnology. Shahid Bahonar University. (In Persian).

King, I. P., C. N. Law, K. A. Cant, S. E. Orford, S. M. Reader and T. E. Miller. 1997. Tritipyrum, a potential new salt-tolerant cereal. Plant Breed. 116: 127-132.

Liu, S. and H. Wang. 2002. Breeding and molecular cytogenetic identification of wheat-*Thinopyrum intermedium* addition lines resistant to powdery mildew. Chinese Sci. Bull. 47: 1892-1896.

Liu, Z., D. Li and X. Zhang. 2007. Genetic relationships among five basic genomes St, A, B and D in Triticeae revealed by genomic southern and in situ hybridization. J. Integ. Plant Biol. 49: 1080-1086.

Mirzaghaderi, G., G. Karimzadeh, H. SHahsavand Hassani and M. Jalali-Javaran. 2010. Cytogenetic analysis of hybrids derived from wheat and tritipyrum using conventional staining and genomic in situ hybridization. Biologia Plantarum, 54: 252-258.

Mujeeb-Kazi, A. and J. L. Diaz de leon. 2002. Conventional and alien genetic diversity for salt tolerant wheats: focus on current status and new germplasm development. In: Ahmad R., K. A. Malik (Eds.) Prospects for Saline Agriculture. Vol :37 Pordrecht: Kluwer Academic Publishers. 69-82.

Schwarzacher, T. and P. Heslop-Harrison. 2000. Practical In Situ Hybridization. BIOS Scientific Publishers Lid., 203 page.

Shahsavand Hassani, H. and P. D. S. Caligari. 2005. The primary study of production the secondary

Archive of SID

www.SID.ir

tritipyrum and evaluation by its chromosomal constitution by fluorescent in situ hybridization. The 4th National Congress of Biotechnology, The International Center for Science, High Technology and Environmental Science, Jan. 29-30, Kerman-Mahan, Iran. (In Persian).

Shahsavand Hassani, H., P. D. Caligari and T. Miller. 2003. The chromosomal assessment of salt tolerant substituted tritipyrum using genomic fluorescent in situ hybridization. Iran. J. Biotech. 1: 169-178.

Shahsavand Hassani, H., M. Rezaei And S. Razeghi. 2008. The study of protein and quantitative of primary and combined tritipyrum lines under salt stress in hydroponic. The 2th National Congress of Cellular & Molecular Biology, The International Center for Science, High Technology and Environmental Science, Jan. 29-30, Kerman-Mahan, Iran. (In Persian).

Tuna, A., C. Kaya, D. Higgs, B. Murillo-Amador, S. Aydenmir and A. Girgis. 2008. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants. Environ. Exp. Bot. 62: 10-16.

William, M. D. H. M. and A. Mujeeb-kuzi. 1995. Biochemical and molecular diagnostics to *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes in *Triticum aestivum* gerplasm. Theor. Appl. Genet. 90: 952-956.

Zhang, J., X. Li, R. Wang, A. Cortestu and A. Mujeeb-Kazi. 2002. Molecular cytogenetic characterization of E^b genome chromosome in *Thinopyrum bessarabicum* disomic line of bread wheat. Int. J. Plant. Sci. 163: 167-174.

Archive of SID

www.SID.ir

Characterization of E^b genome chromosomes in F_3 progenies of new potential secondary Tritipyrum introgressed genotypes by genomic DNA in situ hybridization technique

Pour Feridouni, Z.[1], H. Shahsavand Hassani[2], A. Baghi Zadeh[3]

ABSTRACT

Pour Feridouni, Z., H. Shahsavand Hassani, A. Baghi Zadeh. 2012. Characterization of E^b genome chromosomes in F_3 progenies of new potential secondary Tritipyrum introgressed genotypes by genomic DNA in situ hybridization technique**.** **Iranian Journal of Crop Sciences. 13(4): 730-742. (In Persian).**

Primary Tritipyrum is a new synthetic allohexaploid amphiploid cereal which has been developed by crossing the durum wheat (*Triticum durum*, AABB, 2n=4x=28) and wild brackish grass (*Thinopyrum bessarabicum*, E^bE^b, 2n=2x=14). Although primary Tritipyrum lines are tolerant to salt stress but have few undesirable agronomic traits such as brittle rachis and late maturity. To overcome these problems, the new potential secondary introgressed Tritipyrum genotypes were developed from crossing the primary Tritipyrum (St/b) or combined primary Tritipyrum (Ka/b)(Cr/b) lines [$AABBE^bE^b$, 2n=6x=42] and bread wheat (*Triticum aestivum*:AABBDD, 2n=6x=42) cv. Omid and cv. Navid in which the various D chromosomes of bread wheat will probably be substituted with different E^b chromosomes of Tritipyrums. Identification of E^b chromosomes in chromosomal mitotic preparations of new potential secondary Tritipyrum genotypes including F_3 progenies of (Omid × St/b) and [Navid × (Ka/b)(Cr/b)] by genomic DNA in situ hybridization (GISH) technique, using indirect labeling for genomic S^t DNA with Biotin-11-dutp as probe, was carried out. Results showed that using S^t genomic DNA instead of genomic DNA of E^b genome as probe made less S^t cross hybridization with A, B, D chromosomes and high differentiation between E^b chromosomes with A, B and D genomes chromosomes. This indicated that in spite of high genetic similarity between E^b and S^t (*Pseudoroegneria stipifolia***,** S^tS^t ,2n=2x=14) genomes, the St genomic probe is recomended for identification of E^b chromosome, because genetic similarity of S^t genome with A, B and D genomes is less than E^b genome with these three genomes of bread wheat. A range of 1-6 E^b chromosomes in mitotic chromosomal spreads of [Omid × St/b] and [Navid × (Ka/b)(Cr/b)] F_3 progenies were detectable which indicated that producing new potential secondary Tritipyrum introgressed genotypes (NPSTIGs) with specific substituted E^b chromosomes with D chromosome was feasible. Therefore, GISH can be used as a powerful selection tool in chromosome engineering of intergeneric hybridization progenies of primary Tritipyrum lines and bread wheat cultivars combinations for selecting the favourable 42 chromosomal constitution genotypes of E^b, A, B and D as a new substituted or recombinant chromosome(s) lines.

Keywords: Tritipyrum, *Thinopyrum bessarabicum***,** Genomic in situ hybridization (GISH) and *Pseudoroegneria stipifolia.*

Received: October, 2010 Accepted: May, 2011

1- M.Sc. Graduated student, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2-Associate Prof., Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (Corresponding author)
(Email: hossein212001@yahoo.com)
3- Assistant Prof., International Center for Sciences and Advance Technologies and Environmental Sciences of Kerman, Kerman, Iran

Archive of SID
www.SID.ir