تولید ژنوتیپ‌های تریتی پایرم ثانویه و مطالعه آنیو پلوئیدی و همیولوژی کروموزومی در نتاج F_1 و F_2 با روش‌های مهندسی کروموزوم

سوده خنامانی فلاحتی‌پور[۱]، حسین شاهسوند حسنی[۲]، امین باقی‌زاده[۳]، قاسم کریم‌زاده[۴] و ثریا پورتبریزی[۵]

چکیده

تریتی پایرم اولیه آمفی پلوئید جدید بین گونه های دو جنس گندم دوروم (پایه مادری) و علف شور ساحل (پایه پدری) است که اگرچه پتانسیل معرفی به‌عنوان یک گندم زراعی جدید را دارد ولی دارای ناپایداری جزئی کروموزوم، دیررسی، شکنندگی محور سنبله و پنجه‌زنی مستمر می‌باشد که امکان اصلاح آن از طریق تلاقی لاین‌های اولیه با ارقام اصلاح شده گندم نان ایرانی و گزینش ژنوتیپ‌های ثانویه در نسل‌های تفرق و تلاقی برگشتی برای حذف این صفات نامطلوب وجود دارد. در این مطالعه ۳۹۳ تلاقی بین ارقام اصلاح شده ایرانی گندم نان با لاین‌های اولیه تریتی پایرم انجام و توده مبدا بین گونه‌ای (F_1) شامل ۲۷۴ گیاه ایجاد و از خود گشنی آن‌ها، ۱۹۶۸ گیاه F_2 در دو سال زراعی ۸۳ تا ۸۵ تولید گردید. وضعیت یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی در ۳۱ گیاه از نتاج F_1: $2n=6x=42$, $AABBE^bD$ و ۶۰ بوته نتاج F_2: $2n=6x=42$, $AABB_{(0-14)}E^b_{(0-14)}D$ با روش‌های مرسوم سیتولوژی بررسی شد. نتایج نشان‌داد میزان آنیوپلوئیدی در نتاج F_2 بین ۳۲ تا ۴۴ کروموزوم متغیر و گیاهان F_1 عموماً ۴۲ کروموزومی بودند. بنابراین درصد آنیوپلوئیدی در نتاج F_2 بیش از گیاهان نسل F_1 بود. مطالعه همیولوژی کروموزومی در ۲۱ بوته تریتی پایرم اولیه (F_0)، ۲۸ گیاه F_1 و ۶ بوته F_2 نشان‌داد که شاخص همیولوژی در لاین‌های اولیه تریتی پایرم بیشتر از نتاج F_2 بود ولی اختلالات شدید کروموزومی این شاخص را در گیاهان F_1 نسبت به F_0 و F_2 کاهش داد به‌طوری‌که تعداد کروموزوم‌های منفرد در نتاج F_1 بسیار بیشتر از نتاج F_2 و لاین‌های اولیه تریتی پایرم (F_0) بود.

کلمات کلیدی: تریتی پایرم اولیه، توده مبدا بین گونه‌ای، آنیوپلوئیدی و شاخص همیولوژی

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲ و ۵. به ترتیب استادیار و کارشناس گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۳. استادیار مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان
۴. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گندم مجموعاً ۱۵ تا ۱۸ درصد مصرف غذایی مردم جهان را تشکیل و منبع غذایی اصلی در بیشتر کشورها است. شوری خاک یکی از عوامل کاهش دهنده تولید گندم در جهان می‌باشد. در قاره آسیا بعد از شوروی سابق، چین، هند و پاکستان بیشترین گسترش خاک‌های شور مربوط به ایران است (آقایی و همکاران، ۱۳۸۴). مساحت زمین‌های شور و قابل بهره برداری در ایران حدود ۴ میلیون هکتار برآورد شده است (آراسته، ۱۳۷۴). اگرچه عملیات زراعی و مدیریت آبیاری مناسب برای رفع مشکل شوری ضروری است اما به دلیل شور شدن تدریجی خاک و پایین بودن کیفیت آب آبیاری نیاز به اصلاح گیاهان زراعی با تحمل بیشتر به نمک وجود دارد (آقایی و همکاران، ۱۳۸۴). مقاومت به شوری یک صفت با کنترل ژنتیکی پیچیده است و ژن‌های زیادی در بروز آن دخالت دارند. بنابراین نمی‌توان این صفت را با روش‌های انتقال ژن به گندم انتقال داد اما از طریق دورگ گیری بین گندم و خویشاوندان وحشی آن می‌توان به‌طور هم‌زمان تعداد زیادی ژن به گندم منتقل کرد (فلاورز، ۲۰۰۴). از گونه‌های هالوفیت خویشاوند وحشی گندم برای انتقال صفت مقاوم به شوری به گندم می‌توان به گونه علف شور ساحل[1] اشاره کرد که یک علف وحشی چند ساله است و در سواحل شنی دریای کریمه رشد می‌کند (گورهام، ۱۹۸۵). اهمیت این گونه به‌دلیل مقاومت بالای آن به شوری ۳۵۰ مول بر متر مکعب نمک طعام است. تینوپایرم بسارابیکوم احتمالاً گونه دهنده ژنوم E^b/J به بسیاری از گندمیان پلی‌پلوئید علفی از قبیل تینوپایرم پنتیکوم[2] و تینوپایرم اینترمدیوم[3] است که از منابع ژرم‌پلاسم ارزشمند در اصلاح گندم به‌شمار می‌روند. شناخت ساختار ژنوم E^b و ارتباطات فیلوژنتیکی آن با دیگر ژنوم‌های وابسته، باعث تسهیل در انتقال ژن‌های مفید به گندم شده است (زانگ و همکاران، ۲۰۰۲). لاین‌های اولیه تریتی پایرم هگزاپلوئید غله جدید مقاوم به شوری می‌باشند که از تلاقی گندم دوروم[4] به عنوان پایه مادری با گونه علف شور ساحل به‌عنوان پایه پدری ایجاد شده‌اند (کینگ و همکاران، ۱۹۹۷) و پتانسیل تبدیل شدن به یک غله جدید و مقاوم به شوری را دارا می‌باشند (حسنی و همکاران، ۲۰۰۰). مطالعه مورفولوژی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه در گلخانه و مزرعه به جز ارتفاع گیاه و مورفولوژی سنبله عمدتاً شبیه گندم می‌باشد. اصلاح این آمفی پلوئید با انتخاب بین ژنوم‌های A، B، D و E^b امکان دارد. میانگین باروری در نسل‌های ابتدایی تریتی‌پایرم ۲۸/۸ تا ۵۱/۲ درصد گزارش شده است (کینگ و همکاران، ۱۹۹۷). اگرچه این باروری کمتر از گندم زراعی است ولی برای تولید نتاج و ادامه تلاقی‌ها کافی می‌باشد (النسکوگ استام و همکاران، ۲۰۰۲). سازگاری لاین‌های مختلف تریتی‌پایرم با شرایط اقلیمی ایران مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج، گویای افزایش ۸۰ درصدی باروری این غله می‌باشد. شباهت مورفولوژیکی بسیار زیاد تریتی‌پایرم به گندم و وجود تنوع قابل توجه در لاین‌های این غله برای صفات زراعی مانند ظهور خوشه، باروری و میزان پروتئین، گویای پتانسیل لازم آن برای اصلاح می‌باشد (شاهسوند حسنی و همکاران، ۱۳۷۹). تریتی‌پایرم در مقایسه با سایر آمفی‌پلوئیدهای مصنوعی به‌ویژه در تیره غلات و عمر نسبتاً کوتاه پیدایش آن می‌تواند همانند تریتیکاله در جهان به‌ویژه اروپا، با انجام آزمایشات سازگاری اولیه، توسعه پیدا کند (حسنی و همکاران، ۲۰۰۰). عدم باروری کامل این غله مربوط به ناپایداری جزئی کروموزومی در تقسیم میوز است که با تداوم زراعت این غله در حال کاهش می‌باشد. نتایج آزمایشات سیتوژنتیکی در لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم در دهه گذشته حاکی از افزایش ثبات کروموزومی آن‌ها به عدد کروموزومی ۴۲ همانند گندم می‌باشد (شاهسوند حسنی و همکاران، ۱۳۸۱و۱۳۸۴). در مطالعات مهندسی کروموزوم در موجودات زنده متافاز میتوز مناسب‌ترین مرحله در تعیین عدد کروموزومی یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی است. زیرا اولاً کروموزوم‌ها در این مرحله به حداکثر انقباض خود رسیده‌اند. ثانیاًکروموزوم‌ها به‌طور کامل در قسمت استوایی سلول قرار گرفته‌اند. ثالثاً کروموزوم‌ها دارای بیش‌ترین خاصیت رنگ‌پذیری هستند و رابعاً کروموزوم‌ها به‌صورت تک لایه‌ای پخش شده و قابل شمارش و تجزیه و تحلیل‌های سیتوژنتیکی می‌باشند

1. *Thynopirum bessarabicum* (2n=2x=14, E^bE^b)
2. *Thinopyrum ponticum* (2n=10x=70)
3. *Thinopyrum intermedium* (2n=6x=42)
4. *Triticum durum* (2n=4x=28)

Archive of SID
www.SID.ir

(سینگ و همکاران، ۱۹۹۳). مطالعه آنیوپلوئیدی و همیولوژی کروموزومی از طریق تهیه نمونه‌های کروموزومی میتوز و میوز از روش‌های مرسومی است که در دو دهه گذشته در مطالعات متعددی در خانواده غلات به‌ویژه گندم استفاده شده است (سوآرز و همکاران، ۱۹۸۸). هدف از این مطالعه امکان اصلاح صفات زراعی و حذف برخی صفات نامطلوب لاین‌های اولیه تریتی پایرم از طریق تلاقی بین آن‌ها با ارقام اصلاح شده گندم نان می‌باشد که بدین منظور، تلاقی‌های متعددی بین لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه و گندم‌های هگزاپلوئید ایرانی انجام و جمعیت‌های گیاهی F_1 (۲۳۹ بوته) و F_2 (۱۹۹۴ گیاه) ایجاد شدند. وضعیت آنیوپلوئیدی در تعدادی از گیاهان F_1، F_2 و هم‌چنین همیولوژی کروموزومی در تعدادی از گیاهان توده‌های F_1، F_2 و والدین F_1 با روش‌های معمول مهندسی کروموزوم مانند فوشین بازی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این بررسی تعداد هشت لاین تریتی‌پایرم اولیه ($AABBE^bE^b$) شامل Cr/b، Ka/b، La/b، Ma/b، St/b، (Cr/b) ×(Ka/b) و شش رقم اصلاح شده گندم نان ایرانی (AABBDD) شامل سفید خوشه، روشن، امید، کویر، فلات و بهاره بافت استفاده شد.

روش‌ها

الف: در یک برنامه دورگ گیری در دو سال زراعی ۸۳ تا ۸۵ تعداد ۳۹۳ تلاقی بین لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه (پایه مادری) و ارقام گندم نان (پایه پدری) در مزرعه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام و تعداد ۲۷۴ بذر دورگ به‌دست آمد (جدول۱). از خودگشنی بوته‌های نتاج تلاقی‌های دارای بذر F_1، تعداد ۱۹۶۸ بذر F_2 تولید گردید (جدول۲).

جدول۱: دورگ گیری بین لاین‌های اولیه ترتی‌پایرم (ارقام مادری) و ارقام اصلاح شده گندم نان ایرانی (پایه پدری) در دو سال زراعی ۸۳ تا ۸۵

سال زراعی ۸۴-۸۳			سال زراعی ۸۵-۸۴		
لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه	ارقام اصلاح شده گندم	تعداد بذر دورگ F_1	لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه	ارقام اصلاح شده گندم	تعداد بذر دورگ F_1
Cr/b	سفید خوشه	۲	Cr/b	امید	۲۵
Cr/b	روشن	۳	Cr/b	فلات	۰
Cr/b	امید	۲	Ka/b	امید	۱۳
Ka/b	کویر	۶	Ka/b	فلات	۰
Ka/b	امید	۱۰	La/b	امید	۰
La/b	بهاره بافت	۵	La/b	فلات	۰
La/b	سفید خوشه	۵	Ma/b	امید	۲۱
La/b	امید	۵	Ma/b	فلات	۴
Ma/b	سفید خوشه	۱۵	St/b	امید	۴۵
Ma/b	امید	۸	St/b	فلات	۲۵
Ma/b	روشن	۱	(La(4B/4D)b	فلات	۱
St/b	امید	۳۰	(La(4B/4D)b	امید	۳
St/b	سفید خوشه	۳	Ka/b×Cr/b F_3	امید	۴
St/b	روشن	۵	St/b×Cr/b F_4	امید	۵
(Ka/b)×(Cr/b)	سفید خوشه	۱۱	St/b×Cr/b F_4	فلات	۱۱
(Ka/b) × (Cr/b)	روشن	۳			
(Ka/b) × (Cr/b)	امید	۱			
(Ka/b) × (Cr/b)	بهاره بافت	۲			
جمع کل		۱۱۷			۱۵۷

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲: تعداد بذور F_2 حاصل از خودگشنی گیاهان نسل F_1 در سال زراعی ۸۶-۸۵

انواع نتاج F_1	تعداد بذور F_2
سفید خوشه ×Ma/b	۱۴۷
امید× La/b	۳۰
امید × St/b	۱۰۱۷
*(Ka/b×Cr/b F_2 × نوید (F_2)	۱۱۰
* (Ka/b×Cr/b F_3 × نوید (F_2)	۱۰۴
* (Ka/b×Cr/b F_5 × نوید (F_2)	۱۱۰
* (St/b×Cr/b F_3 × نوید (F_2)	۱۱۰
* (Az/b × نوید (F_2)	۱۱۰
* (La/b × نوید (F_2)	۱۲۰
* (Ma/b × Cr/b F_2 × نوید (F_2)	۱۱۰
جمع کل	۱۹۶۸

*: این بذرها از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز تهیه شده‌اند.

ب: بررسی وضعیت یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه و نتاج نسل‌های F_1 و F_2 با روش‌های معمول سیتولوژی در نمونه سلول‌های مریستم ریشه

۳۱ بذر F_1 و ۶۰ بذر F_2 به صورت مجزا در پتری های استریل کاشته شده و پس از جوانه زدن ریشه چه های ۱/۵-۱ سانتی متری هر بذر در میکروتیوب جداگانه حاوی آب مقطر استریل قرار و به مدت ۲۴ ساعت با آب یخ تیمار شد. سپس آب مقطر با محلول کارنوی[۲] I[۳]جایگزین و تا زمان استفاده در ۲۴- نگهداری شدند. تهیه نمونه کروموزومی از مریستم ریشه با روش شوآرتزر و همکاران (۱۹۸۹) و شاهسوند حسنی (۱۹۹۸) با رنگ آمیزی محلول فوشین بازی ۰/۴ درصد انجام گرفت. اسلاید های حاوی نمونه های میتوز نسل های F_1 و F_2 در زیر میکروسکوپ نوری معمولی با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ مشاهده و تهیه عکس از سلول های حاوی کروموزوم ها در تقسیم میتوز (شکل ۱: a تا f، j و l) با دوربین سونی[۲] مدل سیبرشات[۳] انجام شد.

ج: مطالعه همیولوژی کروموزومی در لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه (F_0) و نتاج F_1 و F_2 با روش‌های معمول سیتولوژی در نمونه‌های سلول مادر گرده

بررسی همیولوژی کروموزومی بر روی سلول های مادر میکروسپور بساک ۷ بوته گندم بهاره چینی، ۲۱ بوته لاین تریتی پایرم اولیه، ۲۸ بوته نسل F_1 و ۶ بوته نسل F_2 با تهیه نمونه کروموزومی میوز طبق روش هاتچینسون و همکاران(۱۹۸۰) و شاهسوند حسنی (۱۹۹۸) تهیه گردید. در این روش بساک های مناسب به ترتیب با محلول‌های کارنوی I و اسید هیدروکلریک یک نرمال تیمار و نهایتاً به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۰/۴ درصد فوشین رنگ آمیزی شدند. اسلایدهای تهیه شده از این بساک ها در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ مشاهده و از نمونه های سلول ها در مراحل مختلف تقسیم میوز بویژه متافاز اول با دوربین سونی مدل سیبرشات عکس گرفته شد (شکل ۱: g تا i). تعداد کروموزوم های منفرد و جفت کروموزوم های حلقوی و میله ای در گندم بهاره چینی، لاین های اولیه تریتی پایرم و بوته های دو رگ F_1 و ژنوتیپ های F_2 شمارش گردید. در هر یک از نمونه های مورد مطالعه شاخص همیولوژی[۴] با استفاده از رابطه $\frac{(0.5\times B)+(1\times A)}{21}$ محاسبه گردید.

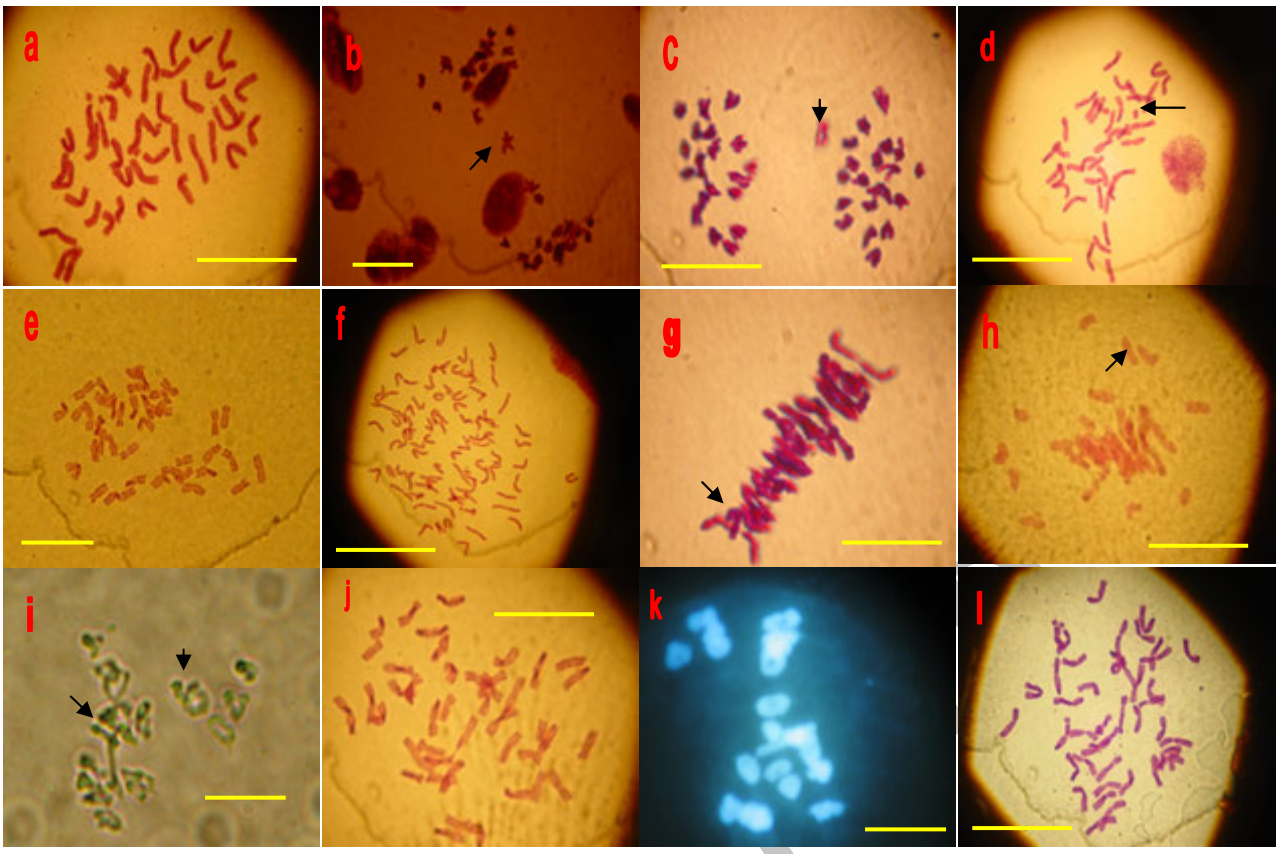
در این رابطه A برابر با تعداد جفت کروموزوم های حلقوی[۵] و B مساوی تعداد جفت کروموزوم های میله ای[۶] منظور گردید.

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

2. Sony
3. Cybershot

4. Homoeology Index
5. Ring Chromosome
6. Rod Chromosome

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱: ساختار کروموزومی سلول‌های گیاهان تریتی‌پایرم اولیه، نتاج F_1 و F_2 حاصل از تلاقی تریتی‌پایرم‌های اولیه با ارقام ایرانی گندم نان در مراحل مختلف متافاز تقسیم میتوز و میوز (طول خط مقیاس ۲۰ میکرومتر).

a) نتاج آنیوپلوئید F_2 حاصل از گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم (Ma/b)(Cr/b) با ۴۱ کروموزوم در متافاز میتوز.

b) اواسط مرحله آنافاز اول تقسیم میوز در لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b. (حرکت با تاخیر دو جفت کروموزوم همولوگ به قطبین سلول)

c) اواخر مرحله آنافاز اول تقسیم میوز در لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b. تقسیم نامتعادل کروموزوم‌های همولوگ منجر به حرکت ۲۰ جفت کروموزوم همولوگ به یک قطب سلول و ۲۲ جفت کروموزوم همولوگ دیگر به قطب مقابل شده است.

d) متافاز تقسیم میتوز در لاین F_1 تریتی‌پایرم ثانویه امید× Ma/b با ۳۷ کروموزوم و یک قطعه کروموزوم شکسته.

e) نتاج آنیوپلوئید F_2 حاصل از گندم امید با St/b با ۴۰ کروموزوم در متافاز تقسیم میتوز.

f) آندومیتوز احتمالی در بعضی از سلول‌های سوماتیکی نتاج F_2 حاصل از گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم (Ka/b)(Cr/b) با ۸۴ کروموزوم در متافاز میتوز.

g) همیولوژی کروموزومی در لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b (۱۴ جفت کروموزوم حلقوی، ۶ جفت کروموزوم میله‌ای و ۲ کروموزوم منفرد) با رنگ آمیزی فوشین در متافاز اول میوز.

h) عدم همیولوژی کروموزومی در گیاه F_1 حاصل از گندم امید با لاین تریتی‌پایرم St/b در متافاز اول میوز. (۱۲کروموزوم منفرد نمایان‌گر عدم همیولوژی کامل کروموزوم‌های گندم رقم امید و لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b است).

i) نتاج F_2 حاصل از امید با St/b (۲ کروموزوم منفرد با علامت پیکان) در مقایسه با نتاج F_1 نمایان‌گر همیولوژی بیشتر آن‌هاست

j) نتاج آنیوپلوئید F_2 حاصل از گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم (Ma/b)(Cr/b) با ۴۳ کروموزوم در متافاز میتوز.

k) همولوژی کامل کروموزومی در گندم بهاره چینی با رنگ آمیزی DAPI. در متافاز اول میوز (۲۱ جفت کروموزوم حلقوی)

l) نتاج یوپلوئید F_2 حاصل از گندم امید با لاین St/b با ۴۲ کروموزوم در متافاز میتوز

نتایج و بحث

تولید تعداد ۲۷۴ بذر F_1 از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم با ارقام گندم نان ایرانی حاکی از تلاقی پذیری و نزدیکی ژنتیکی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم با ژنوتیپ‌های گندم نان است و تولید تعداد ۱۹۶۸ بذر F_2 از خودگشنی F_1ها نیز بیان‌گر امکان تولید ژنوتیپ‌هایی با اعداد کروموزومی متنوع می‌باشد. مقایسه رفتاری رشد و نمو نتاج F_1 و F_2 نیز نشان دهنده رفتار رشدی مشابه با والدین توده مبداء بین گونه‌ای می‌باشد. شمارش کروموزوم‌های نمونه‌های میتوز در گیاهان F_1 و F_2 با

Archive of SID

www.SID.ir

رنگ‌آمیزی فوشین نشان داد اگرچه تعداد کروموزوم در سلول‌های میتوزی گیاهان F_1 و F_2 از ۳۳ تا ۴۴ متغیر بود اما ۶۰/۱ درصد گیاهان F_1 و ۷۰/۲۶ درصد گیاهان F_2 دارای عدد کروموزومی ۴۲ بودند (جدول‌های ۳ و ۴). میزان یوپلوئیدی در افراد F_2 نسبت به دورگ‌های F_1 ، ۱۰/۱۶ درصد افزایش نشان داد که با نتایج شاهسوند حسنی و همکاران (۱۳۸۴) مطابقت دارد آن‌ها در بررسی یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی هفت لاین اولیه تریتی‌پایرم، پنج لاین تریتیکاله و چهار رقم گندم اصلاح شده نشان دادند که عدد کروموزومی ارقام گندم هگزاپلوئید دارای بالاترین ثبات یوپلوئیدی است ولی تغییرات آنیوپلوئیدی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم (۴۵-۳۶ کروموزوم) نسبت به لاین‌های تریتیکاله (۴۵-۳۵ کروموزوم) و به‌ویژه گندم (۴۴-۳۶ کروموزوم) تفاوت معنی داری نداشت که حاکی از کاهش شدت آنیوپلوئیدی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه در این مطالعه نسبت به وضعیت آنیوپلوئیدی آن‌ها در اولین نسل پیدایش می‌باشد (شاهسوند حسنی، ۱۳۸۴).

وجود آنیوپلوئیدی (شکل۱: a، e، d و j) در تعدادی از بوته‌های F_1 و F_2، به‌دلیل ناپایداری جزئی همولوژی یا همیولوژی کروموزوم‌ها در میوز[1] و در نتیجه تولید گامت‌هایی با تعداد کمتر یا بیشتر از ۲۱ کروموزوم بود. نواقص سیتولوژیکی از مهم‌ترین عواملی هستند که باعث باروری ناقص و برخی خصوصیات زراعی نامطلوب در گیاهان آمفی پلوئید مصنوعی می‌شود (استبینز، ۱۹۵۱). یکی از علل اصلی ایجاد آنیوپلوئیدی، عدم تفکیک کروموزوم‌ها در تقسیم میوز است که سری‌های کروموزومی نامتعادل به قطبین مخالف انتقال می‌یابند، علت دیگر عدم موفقیت یک کروموزوم جفت نشده برای رسیدن به قطب میوزی است (اوجهی و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج هم‌چنین نشان داد که ژنوتیپ‌های تریتی-پایرم اولیه، نتاج F_1 و افراد F_2 حاصل از خودگشنی F_1ها تعدادی گامت n-1 تولید می‌کنند که باعث ایجاد نتاج مونوزوم و تریزوم می‌شود (شکل۱ قسمت b و c). ژنوتیپ‌های با آنیوپلوئیدی شدید تنوع فنوتیپی بالایی نیز دارند. بنابراین، تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم اولیه، نتاج F_1 و افراد F_2 حاصل از خودگشنی F_1ها به‌دلیل خصوصیات ژنتیکی نیست و آنیوپلوئیدی نیز باعث ایجاد تنوع برخی صفات حتی در ژنوتیپ‌های اولیه تریتی پایرم می‌گردد. بالاتر بودن درصد بوته‌های آنیوپلوئید در دورگ‌های F_1 و نتاج F_2 نسبت به لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه به‌دلیل قرارگرفتن کروموزوم‌های ژنوم D گندم نان در مقابل کروزوم‌های ژنوم E^b و عدم همیولوژی کامل کروموزوم-های این دو ژنوم با یکدیگر است. ناهنجاری‌های کروموزومی از قبیل وجود قطعات کروموزومی ناشی از شکسته شدن کروموزوم‌ها (شکل۱: d)، حذف قطعه‌ای از کروموزوم و دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌ها (شکل۱: f). به‌صورت موضعی در سلول‌های مریستم ریشه گیاهان دورگ F_1 و تریتی‌پایرم‌های ثانویه F_2 مشاهده شد. در نمونه‌های میتوز تهیه شده از ریشه‌چه گیاهان F_1 و F_2 عمده سلول‌ها دارای ۴۲ کروموزوم بودند (شکل۱: l). اما در تعداد کمی از بوته‌ها تقسیم میتوز به‌صورت متعادل انجام نگرفته و در اوایل متافاز متوقف شده است و مراحل آنافاز و تلوفاز صورت نگرفته و یا در سلول‌هایی، تقسیم میتوز تا مرحله آنافاز پیش رفته و قبل از مرحله تلوفاز متوقف شده است و این مسئله منجر به ایجاد سلول‌هایی با دو برابر تعداد کروموزوم‌های سلول اولیه شده است. به‌طوری‌که در این سلول‌ها تعداد ۸۴-۸۰ کروموزوم دیده شد. ایجاد بافت‌هایی جدید با تعداد کروموزوم‌های مختلف در هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم و جو گزارش شده است (کوبا و همکاران، ۱۹۹۱). در دورگ‌های F_1 تنوع زیادی در عدد کروموزومی مشاهده شد ولی در ژنوتیپ‌های نسل F_2 به‌دلیل انجام میوز متعادل‌تر نسبت به گیاهان نسل F_1 عدد کروموزومی به سمت ۴۲ رفته که ثبات بیشتری دارد.

رایبرن و همکاران (۲۰۰۲) ناپایداری کروموزوم-های میتوزی و وجود کروموزوم‌های عقب مانده، قطعات کروموزومی و پل‌های آنافازی را در برخی از ارقام گندم تحت شرایط تنش سمیت آلومینیوم در خاک‌های اسیدی یا شرایط غیر نرمال گزارش کرده‌اند. حذف کروموزومی در طی میتوز دلیل فقدان یکی از ژنوم‌های والدینی در دو رگ‌های جو معرفی شده است (فینچ و همکاران، ۱۹۸۳).

1. Chromosome Instability

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳: میزان یوپلوئیدی و آنیو پلوئیدی در نمونه‌های میتوزی گیاهان F_1 حاصل از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم با ارقام گندم نان ایرانی با روش رنگ‌آمیزی فوشین

نتاج F_1	تعداد گیاه F_1	تعداد سلول در هر نمونه	۴۲ کروموزوم	غیر ۴۲ (۴۴-۳۳) کروموزوم	آنیوپلوئیدی ٪
روشن × St/b	۵	۲۴	۱۵	۹	۳۷/۵
امید × Cr/b	۲	۱۰	۸	۲	۲۰
امید × St/b	۶	۳۰	۲۱	۹	۳۰
کویر × Ka/b	۳	۲۴	۱۱	۱۳	۵۴/۱۶
سفید خوشه×Cr/b	۱	۱۳	۹	۴	۳۰/۷۶
سفید خوشه ×St/b	۲	۱۵	۸	۷	۴۶/۶۶
روشن × Cr/b	۳	۳۰	۱۲	۱۸	۶۰
بهاره بافت× La/b	۲	۲۰	۱۲	۸	۴۰
سفید خوشه× La/b	۱	۱۰	۷	۳	۳۰
سفید خوشه ×(Cr/b)(Ka/b)	۲	۱۲	۸	۴	۳۳/۳۳
امید × Ma/b	۴	۲۳	۱۰	۱۳	۵۶/۵۲
میانگین	۲/۸۱	۱۹/۱۸	۱۱	۸/۱۸	۳۹/۹۰

جدول۴: میزان آنیو پلوئیدی نتاج F_2 حاصل از خودگشنی نتاج F_1 در نمونه های میتوزی با رنگ آمیزی فوشین

نتاج F_2	تعداد گیاه F_2	تعداد سلول	۴۲ کروموزوم	غیر ۴۲ (۴۴-۳۳) کروموزوم	آنیوپلوئیدی ٪
نوید× (Ka/b) ×(Cr/b)	۷	۶۰	۴۱	۱۹	۳۱/۶۶
نوید× (Ma/b) ×(Cr/b)	۱۸	۹۰	۶۸	۲۲	۲۴/۴۴
امید × St/b	۳۵	۱۶۰	۱۰۷	۵۳	۳۳/۱۲
میانگین	۲۰	۱۰۳/۳	۷۲	۳۱/۳۳	۲۹/۷۴

Archive of SID

هم‌چنین در ارقام گندم و دو رگ‌های بین گونه-ای مختلف گندمیان تغییرات آنیوپلوئیدی با روش‌های مرسوم نوار بندی C و هیبریداسیون DNA فلورسنت در محل[1] گزارش شده است (زانگ و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین، در تلاقی‌های بین جنسی[2]، نتاج دو رگ حاصل تحت تاثیر اختلالات شدید کروموزومی و ژنی، ژنوم‌های والدین شرکت کننده در تلاقی قرار گرفته و منجر به ایجاد واکنش‌های مختلفی در ژنوم گیاهان دو رگ می-شود. پیدایش این ناهنجاری‌های میتوزی به ایجاد اختلال در فسفریله شدن هیستون H_3 در طی تقسیم میتوز مربوط است. مطالعه شش لاین دو رگ حاصل از تلاقی گونه تینوپایرم پنتیکوم با گندم نان که دو بار تلاقی برگشتی و پنج (BC_2F_5) تا هفت (BC_2F_7) نسل خودگشن شده بودند نشان داد که تعداد کروموزوم‌های میتوزی در این هیبریدها بسیار متغییر است. نتایج به-دست آمده از این مطالعه تغییرپذیری تعداد کروموزوم‌ها را در سلول‌های سوماتیکی تایید کرد. ایجاد پل‌های آنافازی در کروماتیدهای دی‌سانتریک، عدم

1. Fluorescent *In Situ* Hybridization
2. Intergeneric Hybridization

www.SID.ir

فسفریلاسیون هیستون H_3 در کروماتیدهای عقب مانده، وجود ریز هسته‌ها و قطعات کروموزومی از عوامل مهم این ناهنجاری‌ها بیان شد (براسیلرو ویدال و همکاران، ۲۰۰۵). در مقایسه ساختار کروموزومی سلول‌های مادر گرده در میوز گندم بهاره چینی با لاین‌های اولیه تریتی-پایرم، نتاج F_1 و F_2 حاصل از خودگشنی گیاهان F_1، تعدادی کروموزوم منفرد در مرحله متافاز اول میوز در اکثر سلول‌های مادر دانه گرده گیاهان دورگ F_1 و F_2 مشاهده گردید. ولی در گیاهان دورگ F_1 بسیار بیشتر از افراد F_2 بود. بنابراین، می‌توان عقیمی بالای دورگ‌های F_1 در آزمایش‌های مزرعه ای را در مقایسه با گیاهان F_2 به آن نسبت داد که حاکی از ثبات کروموزومی بیشتر ژنوتیپ‌های F_2 نسبت به دو رگ‌های F_1 است. بنابراین، خودگشنی متوالی می‌تواند باعث ثبات کروموزومی بیشتر در دو رگ‌های بین جنسی و انجام میوز متعادل‌تر شود. در برخی از سلول‌های در مرحله آنافاز اول تقسیم میوز، کروموزوم‌هایی با تاخیر در حین جدا شدن و حرکت به قطبین سلول دیده شدکه تولید دانه‌های گرده با تعداد کمتر و یا بیشتر از ۲۱ کروموزوم را به‌دنبال خواهد داشت (شکل۱: b و c). کروموزوم‌های منفرد در مرحله آنافاز و زمان جدا شدن کروموزوم‌های همولوگ از یکدیگر، به رشته‌های دوک متصل نیستند. بنابراین، به-طور تصادفی به قطبین سلول رفته و باعث ایجاد گامت-هایی با تعداد بیشتر یا کمتر از ۲۱ عدد کروموزوم می-شوند، که تعادل کروموزومی و ژنی نداشته و در صد زیادی از آن‌ها عقیم می‌باشند. در بررسی سلول‌های مادر دانه گرده درگندم بهاره چینی به‌عنوان شاهد، هیچ کروموزوم منفردی در مرحله متافاز اول تقسیم میوز مشاهده نشد و کروموزوم‌ها در این مرحله به‌صورت حلقوی با یکدیگر جفت بودند (شکل۱: k). در متافاز اول میوز در لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b[1] کروموزوم‌های منفرد دیده شد (شکل۱: g) اما تعداد آن‌ها بسیار کمتر از تعداد کروموزوم‌های منفرد مشاهده شده در مرحله متافاز اول میوز درگیاهان دو رگ F_1 (شکل۱: h). و ژنوتیپ‌های F_2 (شکل۱: i) بود. بنابراین همولوژی کروموزومی مشاهده شده در متافاز اول تقسیم میوز در گندم بهاره چینی بیش از لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم و ژنوتیپ‌های F_2 بود و در دو رگ‌های F_1 کمترین مقدار دیده شد (جدول۵). از نظر مورفولوژی گیاهان F_1 و F_2 شباهت بیشتری به لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه (والد مادری) داشتند. در بعضی از بوته‌های F_2 سنبله‌هایی با قطر بزرگ‌تر از والدین مشاهده شد. معمولاً در هر سنبلچه والدین سه گلچه وجود داشت اما در این سنبله-های قطور، در هر سنبلچه ۵ تا ۸ گلچه دیده شد که فاقد بذر بودند. تعداد سنبلچه در سنبله‌های قطور هر گیاه یکسان بود. مقایسه میانگین صفات مورفولوژی گیاهان F_1 حاصل از تلاقی گندم امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b و گیاهان F_2 حاصل از خودگشنی F_1ها نشان داد اگرچه گیاهان F_2 نسبت به F_1ها کوتاه‌تر، تعداد و قطر سنبله بیشتر داشتند ولی تعداد گره، فاصله میان‌گره و تعداد سنبلچه در سنبله آن‌ها کمتر بود. مورفولوژی بوته‌های F_2 نسبت به F_1ها دارای شباهت زیادتری به والد پدری گندم نان داشت و عقیمی آن‌ها نیز کمتر بود. اگرچه بوته‌های نتاج F_2 نسبت به گندم بهاره چینی ۱۵ روز دیررس‌تر بودند ولی این مدت ظهور سنبله برای نتاج F_1 مشابه با لاین‌های تریتی‌پایرم ۲۳ روز بود. بنابراین زمان رسیدن گیاهان تریتی‌پایرم ثانویه کاهش و به زمان رسیدن والد پدری (گندم نان) نزدیک بود. اگرچه سنبله‌های بوته‌های F_1 کاملاً زرد و آماده برداشت بودند ولی در گیاهان F_2 سنبله در حال ظهور از غلاف ساقه بود. بنابراین در بعضی از گیاهان F_1، صفت چند ساله بودن علف شور ساحل در ژنوم این گیاهان دورگ F_1 حفظ شده است. ولی در گیاهان F_2 مشاهده نشد. نتایج این مطالعه نشان داد که امکان تولید ژنوتیپ‌های احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم با ارقام ایرانی گندم نان وجود دارد که می‌توان با روش هیبریداسیون DNA ژنومی در محل ترکیب کروموزومی این دورگ‌ها را بررسی و اقدام به گزینش ژنوتیپ‌هایی از تریتی‌پایرم ثانویه نمود که ضمن حفظ صفات مطلوب خود از جمله صفت مقاومت به شوری سایر خصوصیات نامطلوب لاین‌های اولیه تریتی-پایرم در آن‌ها حذف و یا کاهش یافته باشد.

1. Stewart/*Thinopyrum bessarabicum*

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۵: همولوژی کروموزومی در بوته‌های گندم بهاره چینی، لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم، نتاج F_1 حاصل از تلاقی لاین-های اولیه تریتی‌پایرم با ارقام گندم نان و ژنوتیپ‌های F_2 حاصل از خود گشنی گیاهان F_1 در متافاز میوز با رنگ آمیزی فوشین

ژنوتیپ گیاه	تعداد گیاه	تعداد سلول مادر گرده	تعداد کروموزوم در سلول‌های میکروسپور	تعداد کروموزوم			شاخص همیولوژی
				منفرد	حلقوی	میله ای	
بهاره چینی	۷	۱۵	۴۲	۰	۱۴-۲۱	۰-۷	۹۵/۶
St/b	۹	۴۵	۴۲	۰-۴ (۱/۵)	۱۰-۱۸ (۱۴/۴)	۲-۱۰ (۵/۶)	۸۲/۱
(St/b) × (Cr/b), F_4	۵	۲۵	۴۲	۰-۲ (۰/۸)	۱۵-۱۹ (۱۷/۲)	۰-۵ (۳/۲)	۸۹/۶
(Ka/b) (Cr/b), F_4	۷	۳۵	۴۲	۰-۳ (۱/۶)	۱۴-۱۸ (۱۶/۵)	۲-۶ (۳/۴)	۸۶/۹
(St/b) (Cr/b), F_4× فلات (F_1)	۴	۲۳	۳۶-۴۲	۹-۱۷ (۱۲/۳)	۹-۱۴ (۱۱/۶)	۱-۶ (۲/۸)	۶۲/۱
St/b×امید (F_1)	۱۴	۶۰	۳۶-۴۲	۵-۱۶ (۱۰/۱)	۸-۱۶ (۱۱/۵)	۰-۸ (۳/۲)	۶۲/۴
St/b×امید (F_2)	۶	۳۲	۳۸-۴۲	۰-۳ (۰/۹)	۱۱-۱۸ (۱۵/۵)	۲-۸ (۴/۴)	۸۴

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مرکز بین‌المللی علـوم و تکنولـوژی پیشرفته و علوم محیطی که در تامین هزینـه پـژوهش و دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در فـراهم نمودن امکانات مزرعه تشکر و قدر دانی می‌نماید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

آقایی، م.، قوامی، ف. و بزرگی‌پور، ر. ۱۳۸۴. مروری بر منابع تحمل به شوری در خویشاوندان وحشی گندم. فصل‌نامه ژنتیک نوین، شماره ۲، ص ۲۱-۱۲.

آراسته، م. ۱۳۷۴. مجموعه اطلاعات کشاورزی (جلد اول)، انتشارات معاونت ترویج سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ص ۵۳-۳۰.

شاهسوند حسنی، ح. ۱۳۷۹. مراحل ساخت و تولید آمفی پلوئید جدید تریتی‌پایرم. مجموعه مقالات ششمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات بابلسر، ص ۲۲.

شاهسوند حسنی، ح. ۱۳۸۱. اولین آزمایش سازگاری لاینهای آمفی پلوئید تریتی پایروم متحمل به شوری در شرایط مزرعه. چکیده مقالات هفتمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، کرج، ص۱۸۶.

شاهسوند حسنی، ح. و امیری نژاد، م. ۱۳۸۴. مطالعه ناپایداری کروموزومی (آنیوپلوئیدی) آمفی پلوئید جدید تریتی پایروم در مقایسه با تریتیکاله و گندم نان. چکیده مقالات چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، کرمان (ماهان)، ص۵۴۶ .

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 H_3 phosphorylation pattern. Plant Cell Reports 24: 172-178.

Ellneskog-Staam, P. and Merker, A. 2002. Chromosome composition, stability and fertility of alloploids between *Triticum turgidum* Var. Carthlicum and *Thinopyrum junceiforme*. Hereditas 136: 59–65.

Finch, R. A. and Bennett, M. D. 1983. The mechanism of somatic chromosome elimination in *Hordeum*. In: Brandham PE, Bennett MD (eds) Proceedings of the 2nd Kew Chromosome Conference. Allen & Unwin, London, pp 147–154.

Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany 55: 307-319.

Gorham, J., McDonnell, E., Budrewicz, E. and Wyn Jones, R. G. 1985. Salt tolerance in the Triticeae: growth and solute accumulation in leaves of *Thinopyrum bessarabicum*. Journal of Experimental Botany 36: 1021-1031.

Hassani, H. S., Caligari, P. D. S., Reader, S. M., King, I. P. and Miller, T. E. 2000. Can tritipyrum, a new salt tolerant potential amphiploid, be a successful cereal like triticale? Journal Agriculture Science Technology 2: 177-195.

Shahsevand Hassani, H. 1998. Development and cytogenetic studies of a potential new salt tolerant cereal, tritipyrum. Ph.D.Thesis, The University of Reading, UK.

Hutchinson, J., Chapman, V. and Miller, T. E. 1980. Chromosome pairing of meiosis in hybrids between Aegilops ans Secale species: a study by *in situ* hybridization using cloned DNA. Heredity 45: 245-254.

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

Koba, T., Handa, T. and Shimada, T. 1991. Efficient production of wheat-barley hybrids and preferential elimination of barley chromosomes. Theoretical and Applied Genetics 81: 285–292.

Oudjehih, B. and Boukaboub, A. 2000. Cytogenetic study of triticale. Agricultures 9: 519-523.

Rayburn, A. L., Wetzel, J. B. and Baligar, V. C. 2002. Mitotic analysis of sticky chromosomes in aluminum tolerant and susceptible wheat lines grown in soils of differing aluminum saturation. Euphytica 127: 193–199.

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.

Singh, R. J. 1993. Plant Cytogenetics. CRC Press. USA.

Stebbins, G. L. 1951. Variation and evolution in plants. New York: Columbia University Press.

Archive of SID

www.SID.ir

Suarez, E. Y., Buck, H., Garcia, M. and Ierace, G. 1988. Phenokaryotypic instability in wheat. New York: Columbia University Press.

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.

Archive of SID

www.SID.ir

The Production of Secondary *Tritipyrum* Genotypes and Study of Aneuploidy and Homoeology in F_1 and F_2 Progenies by Chromosome Engineering Methods

Khanamani Falahati Pour[1], S., Shahsavand Hassani[2], H., Baghizadeh[3], A. Karimzadeh[4], G. and Portabrizi[5], S.

Abstract

Primary *Tritipyrum* is a new amphiploid which has been produced by crossing between *Triticum durum* (female) and *Thinopyrum bessarabicum* (male). Although it has potential to be introduced as a new crop but encounters with partial chromosome instability, late maturity, bittle rachis, low fertility and keep on producing tillers. To remove these unfavorable traits, it is possible to cross primary *Tritipyrum* lines and Iranian wheat cultivars and select the possible secondary *Tritipyrum* genotypes in selfing and back cross populations. In the present study, 393 crosses was performed between primary *Tritipyrum* lines (female) and Iranian wheat cultivars (male) during the 2004-2005. The interspecific population (F_1) with 274 plants was obtained which were selfed and the F_2 populations with 1968 plants was produced. The mitotic chromosome counting of 31 F_1 ($2n=6x=42$, $AABBDE^b$) showed 42 chromosomes, where as in 60 F_2 ($2n=6x=?$, $AABBD_{(0-14)}E^b_{(0-14)}$) it was in a range of 32-44 chromosomes and higher aneuploidy ration was observed in F_2,s than the F_1,s plants. The chromosomes pairing studies in 21, 28 and 6 plants from primary *Tritipyrum* lines (F_0), F_1 and F_2 plants were performed, respectively. The results indicated that the arm association index in F_1 plants was more than F_2. The homoeology index reduced in F_1 plants because of the existence of chromosomal abnormalities in F_1,s more than F_2,s and F_0,s plants. The single chromosomes in F_1,s were more than F_2,s and primary *Tritipyrum* lines (F_0,s).

Keywords: Primary *Tritipyrum* lines, Interspecific source population, Aneuploidy, Homoeology index.

Archive of SID

1. M.Sc. Agricultural Biotechnology, Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman

2 And 5. Associate Professor and Mc respectively, Agronomy and Plant Breed Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman

3. Associate Professor in International Center for Science, High Technology and Environmental Science, Kerman

4. Associate Professor in Plant Breed. and Biotech. Department, Faculty of Agric, Tarbiat Modares University, Tehran

www.SID.ir