

## 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<sup>۱</sup>، حسین شاهسوند حسنی<sup>۲</sup> و امین باقی زاده<sup>۳</sup>

#### 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(۴): ۷۳۰-۷۴۲.

تریتی‌پایرم اولیه یک غله آمفی پلوفیل آلوهگزاپلوفیل مصنوعی جدید است که از تلاقی والدین مادری گندم دوروم و والد پدری تینوبایرم بسارایکوم (*Thinopyrum bessarabicum*) تولید شده است. اگرچه لابن‌های اولیه تریتی‌پایرم متحمل به تنفس 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 لابن تریتی‌پایرم اولیه (St/b) و لابن ترکیبی اولیه (Ka/b) (Cr/b) (AABBE<sup>b</sup>E<sup>b</sup>, 2n=6x=42)، به تریتی 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 و B و D گندم نان کمتر است. شناسایی کروموزوم‌های ژنوم  $E^b$  در نمونه‌های کروموزومی میتوz ژنوتیپ‌های احتمالی جدید تریتی‌پایرم ثانویه شامل نسل سوم نتاج (Omid×St/b) و [Navid×(Ka/b)(Cr/b)] با روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل و با کاوشگر ژنومی نشاندند شده  $S^t$  با biotin-11-dutp انجام شد. نتایج نشان داد که استفاده از کاوشگر دی.ان.ای ژنومی گونه تینوبایرم بسارایکوم (E<sup>b</sup>)، همبوشانی دورگ گیری بین کروموزوم‌های ژنوم  $E^b$  با ژنومهای A و D را کاهش می‌دهد و تمایز بین کروموزوم‌های ژنوم  $E^b$  با کروموزوم‌های A 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 و B و D بسیار کمتر است. در نمونه‌های کروموزومی میتوz نتاج نسل سوم تلاقي‌های [Amid × [Noide  $\times$  (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 هگزاپلوفیل با ساختار مناسبی از کروموزوم‌های A و DB و E<sup>b</sup> بعنوان لابن‌های کروموزومی جایگزین یا نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تریتی‌پایرم، تینوبایرم بسارایکوم، دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل و سودوجینزیا استیپی‌فولیا.

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

- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان
- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان و دانشگاه شیراز و همکار مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفت و علوم محیطی کرمان. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح بیانات ایران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: hossein212001@yahoo.com)
- استادیار بخش بیوتکنولوژی مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفت و علوم محیطی کرمان - ماهان

## مقدمه

دریای سیاه رشد می کند (King *et al.*, 1997). اگرچه این گیاه در شوری ۳۵۰ میلی مولار زنده می ماند، ولی رشد آن در شوری بیشتر از ۲۵۰ میلی مولار نمک کم می شود (Colmer *et al.*, 2006). این گیاه صفات مطلوب بسیاری دارد و دارای صفات ژنتیکی مناسبی برای بهبود تحمل به تنش های محیطی بویژه شوری در گندم است و می توان آن را به راحتی با گندم تلاقي داد (Fedak and Han, 2005). غله جدید تریتی پایرم سومین آمفی پلوئید مصنوعی است که برخی ژنو تیپ های اولیه آن در سال ۱۹۸۵ توسط Forster and Miller, (1985) فورسترو میلر (Forster and Miller, 1985) از تلاقی گندم نان و گونه *Tinopyrum bessarabicum* 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) (Shahsavand Hassani *et al.*, 2008) (Shahsavand Hassani *et al.*, 2008) با ارزیابی لاین های اولیه تریتی پایرم در شرایط تنفس شوری نشان دادند که تریتی پایرم غله ای متحمل به شوری است.

لاین های اولیه تریتی پایرم هگزاپلوئید (AABBE<sup>b</sup>E<sup>b</sup>, 2n=6x=42) تحمل به شوری قابل توجهی به نمک کلرید سدیم نشان می دهد، اما دارای شکنندگی محور سنبله، دیررسی و اندکی ناپایداری کروموزومی در تقسیم میوز همانند تریتیکاله های اولیه هستند. همانگونه که با انواع روش های اصلاحی صفات نامطلوب زراعی تریتیکاله بر طرف شده است، اصلاح تریتی پایرم اولیه و حذف صفات نامطبوب زراعی آن نیز دور از انتظار نیست (Shahsavand Hassani *et al.*, 2003). در لاین های اولیه تریتی پایرم هگزاپلوئید، ژنوم E<sup>b</sup> نسبت به ژنوم D از لحاظ پتانسیل تحمل به شوری برتری دارد. بررسی عکس العمل یکسان دو لاین هگزاپلوئید تریتی پایرم اولیه (La/b و Ne/b) در مقایسه با لاین تریتی پایرم اولیه اکتابلوئید (Cs/b) در تیمارهای مختلف

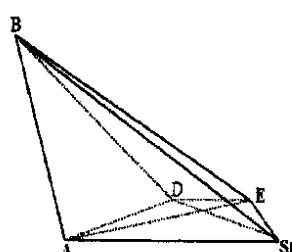
گندم از غلات مهم و اصلی ترین ماده غذایی در بسیاری از کشورها است و عملکرد آن به عوامل مختلفی از جمله شرایط آب و هوایی و مقاومت به تنش های زیستی و غیر زیستی بستگی دارد. تولید سالیانه گندم دنیا در سال ۲۰۱۰، معادل ۶۷۹ میلیون تن بوده است (FAO, 2010). بر اساس اطلاعات متشر شده توسط مرکز بین المللی تحقیقات گندم و ذرت (CIMMYT) هشت تا ۱۰ درصد از زمین های 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 می رسد (Colmer *et al.*, 2006; Tuna *et al.*, 2008). اگر چه گندم بطور نسبی به شوری متتحمل 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 متتحمل به این تنش نیز گزارش شده است (Shahsavand Hassani and Caligari, 2005). تحمل به شوری صفتی کمی است و ژن های زیادی آن را کنترل می کنند، بنابراین دور گگیری ارقام اصلاح شده با خویشاوندان وحشی بویژه تلاقي های دور، امکان انتقال این صفت پیچیده را فراهم می کند (Flowers and Flowers, 2005). وجود ژن های مفید و تنوع ژنتیکی بالا در گونه های وحشی برای انواع صفات مقاومت به تنش های محیطی و سازگاری وسیع گونه های وحشی و خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی به شرایط آب و هوایی مختلف، حاکی از نقش ویژه آن ها در اصلاح ارقام زراعی موجود است (Jiang *et al.*, 1994).

تینوپایرم بسارایکوم (*Thinopyrum bessarabicum*) گیاهی علفی با رشد کند و دوام بالا، خود بارور و متحمل به شوری است که در سواحل دریای مدیترانه و

بنابراین احتمال تولید گیاهانی با تعداد متفاوت یک تا هفت کروموزوم از هر یک از دو ژنوم D و E<sup>b</sup> در هر بوته وجود دارد و به همین دلیل گیاهان نسل دوم به بعد منع با ارزشی برای غربال و انتخاب گیاهان با ترکیبات مختلف کروموزومی دو ژنوم D و E<sup>b</sup> 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 گیمری 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، گرايش به دورگ شدن با کروموزوم‌های گندم را نيز داشته و تمایز و تشخیص کروموزوم‌های تینوپایرم بسارابیکوم از کروموزوم‌های گندم را در ساختمان کروموزومی ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه با مشکل مواجه می‌کند (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)

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

اکثر ژن‌های تحمل به شوری روی کروموزوم شماره پنج گونه تینوپایرم بسارابیکوم (Forster et al., 1988) (2n=2x=14, E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>) گیاهان نسل اول (F<sub>1</sub>, 2n=6x=42, 7<sup>a</sup>A7<sup>b</sup>B7<sup>c</sup>D7<sup>d</sup>E<sup>b</sup>) 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<sup>b</sup> 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 ژنوم A، ۱۴ کروموزوم از ژنوم B، ۱۲ کروموزوم از ژنوم D و یک جفت کروموزوم شماره پنج ژنوم E<sup>b</sup> و تعداد متفاوتی از کروموزوم‌های D و E<sup>b</sup> 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<sup>b</sup> وجود ندارد.



شکل ۱- ارتباط ژنومی میان پنج ژنوم اصلی طایفه گندمیان

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

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 ریشه‌چههای 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 ریشه‌چههای در زیر میکروسکوپ فاز-کنتراست بررسی و اسلایدهای حاوی نمونه‌های کروموزومی واضح، بویژه حاوی تعداد مناسب از سلول‌های متافاز، در نیتروژن مایع منجمد شده و بالافصله 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))، سودوجینزیا استیپی‌فولیا ( $S^tS^t$ , 2n=2x=14,  $S^tS^t$ ) براساس روش تغییر یافته 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 استاتات 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 سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ و سپس قسمت فوقانی محلول به آرامی دور ریخته شد. رسوب

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 al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002 در این تحقیق با کاربرد کاوشگر ژنومی سودوجینزیا استیپی‌فولیا ( $S^tS^t$ , 2n=2x=14,  $S^tS^t$ ) وجود تعداد کروموزوم‌های E<sup>b</sup> 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<sub>3</sub>: NPSTIGs : AABB(1-7)D(1-7)E<sup>b</sup> (رقم امید) با تریتی‌پایرم اولیه (St/b)، بذر و گیاهان نسل سوم ژنوتیپ‌های جدید تریتی‌پایرم ثانویه (F<sub>3</sub>: NPSTIGs : AABB(1-7)D(1-7)E<sup>b</sup>) حاصل از تلاقی گندم نان (رقم نوید) با تریتی‌پایرم اولیه [لاین (Ka/b)(Cr/b)] بود. علاوه بر مواد گیاهی مذکور از بذرها تهیه شده گونه سودوجینزیا استیپی‌فولیا (SS, 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

بذرها 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 پتري کشت شدند و

۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس غشاء (کاغذ بلاتینیگ) 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) در تاریکی 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. اسلامیدهای 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 سانتی گراد قرار داده شدند. واسرشته سازی دی.ان.ای نمونه‌های کروموزومی هدف در اسلامیدها در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در محلول ۷۰ درصد فرمامید و آبگیری نمونه در محلول‌های ۹۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد اتانول انجام و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. سپس محلوط دورگ گیری دی.ان.ای کاوشگر در محل متشكل از محلول‌های فرمامید دیونیزه ۵۰ درصد (۲۰ میکرولیتر)، دکستران سولفات ده درصد (۱۰ میکرولیتر)، محلول نمکی XSSC (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

بعja 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 اسپکتروفوتومتر (Carry 50, USA) تعیین و تا زمان استفاده در تهیه کاوشگر در ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

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

به منظور تھیه کاوشگر ژنومی از گونه سودوجینریا استیپی‌فولیا، پنج میکرولیتر بافر دی.ان.ای پلی مراز با غلظت پایه (۱۰X)، دو میکرولیتر محلول سه نوکلئوتید dATP و dGTP و dCTP نشاندار شامل dTTP (یک میلی مولار)، نیم میکرولیتر نوکلئوتید dUTP (یک میلی مولار)، دو میکرولیتر نوکلئوتید Biotin-11-dUTP، سه میکرولیتر آنزیم دی.ان.ای پلی مراز، دو میکرولیتر آب مقطر دی.ان.ای ژنومی از این گونه و ۳۴ میکرولیتر آب مقطر استریل در لوله یک و نیم میلی لیتری با هم محلوط و به مدت دو ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد 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 فرمتاز استفاده شد. ابتدا محلول کاوشگر با استفاده از محلول نمکی XSSC ۶ به نسبت‌های ۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰ رقیق شد. سپس یک میکرولیتر از محلول‌های چهار گانه شامل کاوشگر اصلی، سه محلول کاوشگر رقیق شده و محلول نمکی XSSC ۶ (بعنوان کنترل منفی) روی غشاء (کاغذ بلاتینیگ) ریخته و ۳۰ دقیقه در دمای

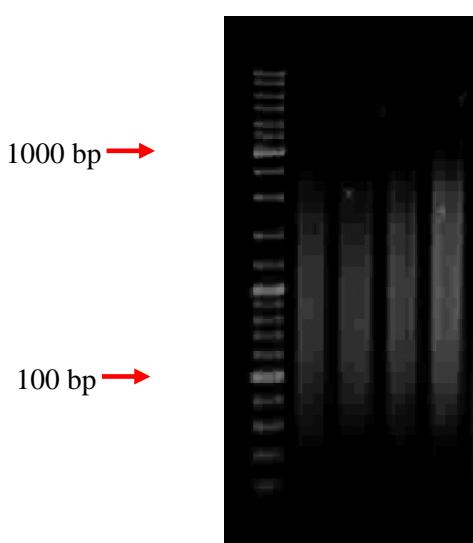
میکروسکوپ فلورسنت (Axioplan 2, Germany) مورد مشاهده قرار گرفتند و از سلول‌های حاوی کروموزوم‌های نشانگر ژنومی گونه علف شور ساحل، با دوربین CCD متصل به میکروسکوپ، ابتدا با فیلتر پنج (DAPI) و بعد با فیلتر شش (فلورسین ایزوتوپیسانات) عکس تهیه و از لحاظ تعداد کروموزوم‌های ژنوم<sup>b</sup> ارزیابی شدند.

## نتایج و بحث

### کیفیت دی.ان.ای کاوشگر

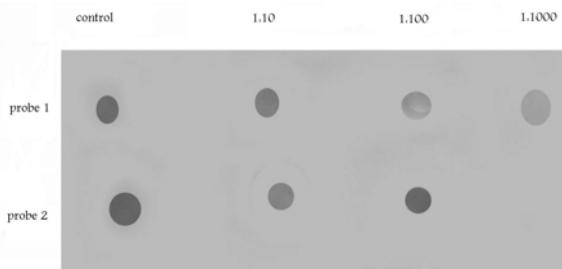
میزان جذب دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از ژنوم<sup>t</sup> با اسپکتروفوتومتر ۱/۸ تا ۲ بدست آمد که نشان دهنده کیفیت خوب آن برای استفاده در روش دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل (GISH) بود. بررسی دی.ان.ای ژنومی رقم بهاره چینی بعنوان دی.ان.ای مسدود کننده توالی‌های مشترک ژنوم<sup>E<sup>b</sup></sup> با ژنوم‌های A و B، 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

اسلايد، در یک لوله مخلوط و به مدت شش دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد برای واسرشته سازی دی.ان.ای کاوشگر قرار داده شدند. ۴۵ میکرولیتر از محلول مخلوط دورگ گیری روی هر اسلايد ریخته شد و لامل روی آن قرار داده شد. اسلايدها در محفظه مرتبط در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار و سپس در فرمamid ۵۰ درصد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد شستشو و به مدت ده دقیقه در محلول سرم آلبومین گاوى (BSA 3%) قرار داده شدند. برای آشکار سازی محل‌های دورگ گیری شده در کروموزوم‌ها، ۵۰ میکرولیتر از محلول آویدین اف.آی.تی.سی(Avidin-FITC) در سرم آلبومین گاوى (BSA3%) تا غلظت پنج میکروگرم در میلی‌لیتر ریقیق شده و روی هر اسلايد ریخته شد و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول شستشو قرار گرفتند. به منظور تقویت نور حاصل از محل‌های دورگ گیری شده از محلول ضد آویدین اف.آی.تی.سی (Anti-Avidin-FITC) استفاده شد. بعد از شستشوی مجدد، ۳۰ میکرولیتر محلول دپی (DAPI) جهت تشییت و ثبات فلورسنت روی اسلايدها ریخته و در زیر



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

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



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

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

شناختی و حضور تعداد کروموزوم‌های این ژنوم در ساختار کروموزومی گیاهان ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ترتیب پایرم ثانویه بسیار مشکل بوده و نتایج معتبری نخواهد داشت.

زانگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2002) با بررسی آمفی‌پلوئید بین گندم نان و گونه تینوپایرم بساراییکوم نشان دادند که ژنوم E<sup>b</sup> 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 دورگ گیری شده ناخواسته Willliam and ایجاد می‌شود. ویلیام و مجتب قاضی (William and Mujeeb-kazi, 1995) نشان دادند که بدلیل همولوژی بالای ژنوم E<sup>b</sup> با ژنوم‌های A, B و D برای ردیابی این ژنوم در ساختار کروموزومی آمفی‌پلوئیدهای بین گندم و گونه‌های تینوپایرم و شناختی قطعی وجود کروموزوم‌های E<sup>b</sup> 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 شناختی کروموزوم‌های گونه تینوپایرم بساراییکوم در لاین‌های اویله ترتیب پایرم بدلیل شباهت زیاد ژنوم E<sup>b</sup> 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 استیپی فولیا بدلیل

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<sup>b</sup>) موجود در ساختار کروموزومی گیاهان نتاج نسل سوم ترتیب پایرم ثانویه (NPSTIGs) بود (شکل ۳).

#### دورگ گیری دی.ان.ای ژنومی در محل

درآزمایش دورگ گیری 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 از کاوشگر ژنومی E<sup>b</sup> در بررسی ساختار کروموزومی نمونه‌های گیاهی ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ترتیب پایرم ثانویه حاصل از تلاقی گندم نان با ترتیب پایرم اولیه، موجب می‌شود که دورگ گیری کروموزوم‌های کاوشگر ژنومی E<sup>b</sup> با کروموزوم‌های سایر ژنوم‌ها، غیر از ژنوم E<sup>b</sup> 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<sup>b</sup> با کروموزوم‌های سایر ژنوم‌ها، تعداد محل‌های نورانی دورگ گیری شده را بیش از تعداد کروموزوم‌های کاوشگر نشان خواهد داد، بنابراین استفاده از کاوشگر ژنومی E<sup>b</sup> بدلایل فوق برای

ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ثانویه تریتی‌پایرم را فراهم و نتایج مشاهده شده در شناسایی وجود کروموزوم‌های  $E^b$  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 (Cr/b) با گندم نان (Rقم نوید)] با فیلترهای دپی (DAPI) و فلورسین ایزوتوپسیانات (شکل ۴) نشان داد که در فیلتر دپی تمام کروموزوم‌های نمونه تهیه شده میتوزی به رنگ آبی دیده شدند ولی در فیلتر فلورسین ایزوتوپسیانات در برخی کروموزوم‌ها محل‌های نورانی دورگ‌گیری شده به رنگ سبز مشاهده شد که حاکی از دورگ‌گیری توالی‌های مشابه دی.ان.ای کروموزوم‌های موجود در نمونه کروموزومی میتوز لاین (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 (Cr/b)(Cr/b) ترتیب با لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم St/b و (Cr/b) که بین یک تا شش کروموزوم متغیر بود (جدول ۱) 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 و همکاران (Shahsavand Hassani *et al.*, 2003) تعداد سه تا ۱۲ کروموزوم  $E^b$  را در نتاج  $F_2$  و  $F_3$  ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه حاصل از تلاقی گندم نان (ارقام مبلی و آگرона) با لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم شناسایی کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. خنامانی (Khanamani, 2007) تعداد شش تا هفت

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 دورگ‌گیری 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 وجود کروموزوم‌های  $E^b$  در ساختار کروموزومی لاین‌های افزایشی گندم–تینوپایرم مقاوم به ویروس پیچیدگی جو به کار بردن. استفاده از کاوشگر ژنوم  $S^t$  در ردیابی 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 پایین تری 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 دورگ‌گیری 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 دورگ‌گیری شده در گیاهان نتاج نسل سوم

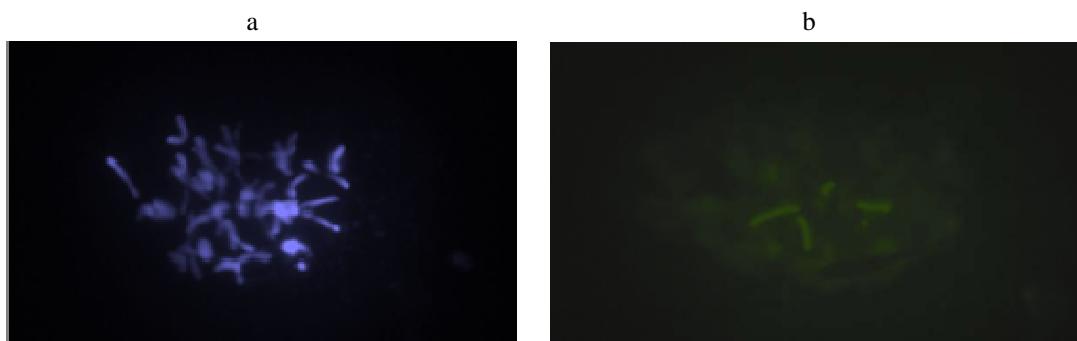
کروموزوم  $E^b$  را در نسل  $F_3$  ژنوتیپ‌های جدید و احتمالی ثانویه تریتی‌پایرم شناسایی کردند که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. بطور کلی نتایج بدست آمده در این تحقیق در مقایسه با پژوهش‌های مشابه ولی در توده‌های گیاهی متفاوت در حال تفرق کروموزومی حاصل از تلاقی‌های مختلف نشان داد که امکان

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 (Mirzaghadere et al., 2010) تعداد دو تا ده

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

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	
				تعداد کروموزوم‌های $E^b$ NO. of $E^b$ chromosomes	تعداد کروموزوم‌های $E^b$ NO. of $E^b$ chromosomes
Omid × $St/b$	4	20	32-44	1-6	1-6
Navid × $(Ka/b)(Cr/b)$	4	27	32-46	1-6	1-6



شکل ۴- دورگ گیری 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 ۱۱-dUTP) a. فیلتر DAPI: تمام کروموزوم‌ها به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. b. فیلتر فلورسین ایزوتوپیسانات: 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)

با ترکیبات متفاوت کروموزوم‌های A, B, D و E<sup>b</sup> استفاده کرد و ژنوتیپ‌هایی متفاوت در نسل‌های در حال تفرق مانند F<sub>2</sub> با تعداد متفاوتی از کروموزوم‌های E<sup>b</sup> شناسایی نمود. بدین ترتیب امکان گزینش ژنوتیپ‌های ثانویه مطلوب به ویژه ژنوتیپ‌های احتمالی ترتیبی پایirm ثانویه با ساختار کروموزومی E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>] E<sup>b</sup>E<sup>b</sup>] AA(7")BB(6")DD(1") که تنها 5E<sup>b</sup> آن باقی مانده و بقیه کروموزوم‌های 1E<sup>b</sup> تا 4E<sup>b</sup> و 7E<sup>b</sup> 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<sup>b</sup> در ژنوتیپ‌های احتمالی ترتیبی پایirm ثانویه به عنوان یک ابزار گزینش در به نژادی کروموزومی را فراهم نمود، اما تشخیص نوع خاص کروموزوم‌های حاوی صفات ویژه مانند کروموزوم 5E<sup>b</sup> حاوی صفات تحمل به تنش سوری نیازمند استفاده توام از نشانگرهای سیتوژنتیک مولکولی مانند دورگ گیری 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 به نژادگران خواهند توانست گزینش ژنوتیپ‌ها را تا دست یابی به یک رقم اصلاح شده با دقت بیشتری انجام دهند.

### تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان از دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در تامین بخشی از امکانات و بویژه مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفه و علوم محیطی ماهان برای تامین بخش عمدات از هزینه تحقیق و از آقای دکتر آندریاس بورنر مسئول بانک ژن مرکز تحقیقات ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی آلمان (IPK) برای ارسال نمونه بذر گونه سودوجینزیا استیپی فولیا تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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

### نتیجه گیری

انتظار می‌رود که در ساختار کروموزومی گیاهان نسل اول ژنوتیپ‌های احتمالی ترتیبی پایirm ثانویه (F<sub>1</sub>7"AA7"BB7D7E<sup>b</sup>, 2n=6x=42) تعداد کروموزوم از ژنوم A ۱۴ کروموزوم از ژنوم B، هفت کروموزوم از ژنوم D و هفت کروموزوم از ژنوم E<sup>b</sup> وجود داشته باشند و در نسل‌های تفرق (F<sub>2</sub> و F<sub>3</sub>، انتظار پیدایش ترکیبات مختلفی از تعداد یک تا هفت کروموزوم ژنوم D و یک تا هفت کروموزوم از ژنوم E<sup>b</sup> می‌رود. در سلول‌هایی که تعداد کل کروموزوم‌ها ۴۲ است و تعداد کروموزوم‌های E<sup>b</sup> کمتر از ۱۴ است، ممکن است که کروموزوم‌های ژنوم D جایگزین کروموزوم‌های E<sup>b</sup> 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<sup>b</sup> شده باشند (شکل ۴). در سلول‌های گیاهانی که تعداد کروموزوم‌های ژنوم E<sup>b</sup> آنها مساوی ۱۴ باشد، امکان جایگزینی هیچ کروموزومی از ژنوم E<sup>b</sup> 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 ییگانه E<sup>b</sup> در توده‌های گیاهی آمفی‌پلوئید ناقص حاصل از تلاقی‌های خارج از گونه گیاهان زراعی مانند ژنوتیپ‌های ثانویه ترتیبی پایirm

References

- 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: Vention 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](http://faostat.fao.org/statistics).
- Jiang, J., B. Fribe 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.
- Mirzaghadri, 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

tritipyrum and evaluation by its chromosomal constitution by fluorescent in situ hybridization. The 4<sup>th</sup> 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 2<sup>th</sup> 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. Giris.** 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<sup>b</sup> genome chromosome in *Thinopyrum bessarabicum* disomic line of bread wheat. *Int. J. Plant. Sci.* 163: 167-174.

## Characterization of E<sup>b</sup> genome chromosomes in F<sub>3</sub> progenies of new potential secondary Tritipyrum introgressed genotypes by genomic DNA in situ hybridization technique

Pour Feridouni, Z.<sup>1</sup>, H. Shahsavand Hassani<sup>2</sup>, A. Baghi Zadeh<sup>3</sup>

### ABSTRACT

**Pour Feridouni, Z., H. Shahsavand Hassani, A. Baghi Zadeh.** 2012. Characterization of E<sup>b</sup> genome chromosomes in F<sub>3</sub> 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<sup>b</sup>E<sup>b</sup>, 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<sup>b</sup>E<sup>b</sup>, 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<sup>b</sup> chromosomes of Tritipyramids. Identification of E<sup>b</sup> chromosomes in chromosomal mitotic preparations of new potential secondary Tritipyrum genotypes including F<sub>3</sub> 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<sup>t</sup> DNA with Biotin-11-dUTP as probe, was carried out. Results showed that using S<sup>t</sup> genomic DNA instead of genomic DNA of E<sup>b</sup> genome as probe made less S<sup>t</sup> cross hybridization with A, B, D chromosomes and high differentiation between E<sup>b</sup> chromosomes with A, B and D genomes chromosomes. This indicated that in spite of high genetic similarity between E<sup>b</sup> and S<sup>t</sup> (*Pseudoroegneria stipifolia*, S<sup>t</sup>S<sup>t</sup>, 2n=2x=14) genomes, the St genomic probe is recommended for identification of E<sup>b</sup> chromosome, because genetic similarity of S<sup>t</sup> genome with A, B and D genomes is less than E<sup>b</sup> genome with these three genomes of bread wheat. A range of 1-6 E<sup>b</sup> chromosomes in mitotic chromosomal spreads of [Omid × St/b] and [Navid × (Ka/b)(Cr/b)] F<sub>3</sub> progenies were detectable which indicated that producing new potential secondary Tritipyrum introgressed genotypes (NPSTIGs) with specific substituted E<sup>b</sup> 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<sup>b</sup>, 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