Archive of SID

" نهال و بذر"
جلد ۱۹، شماره ۳، آذر ۱۳۸۲

القای جفت کروموزوم‌های خویشاوند در تلاقی‌های بین گونه‌ای گندم با استفاده از ژن Ph^I *

Inducing Homoeologous Chromosome Pairing in Interspecific Hybridization in Wheat Using the Ph^I Gene

مصطفی آقائی‌سربرزه و اچ. اس. دالی وال

دانشگاه کشاورزی پنجاب، هندوستان

تاریخ دریافت: ۱۳۸۰/۱۰/۱

چکیده

آقائی سربرزه، م.، و دالی وال، اچ. اس. ۱۳۸۲. القای جفت کروموزوم‌های خویشاوند در تلاقی‌های بین گونه‌ای گندم با استفاده از ژن Ph^I. نهال و بذر ۱۹: ۳۰۹-۲۹۵.

یکی از موانع موجود در تلاقی‌های بین گونه‌ای و بین‌جنسی، محدودیت جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند و در نتیجه عدم نوترکیبی بین آن‌ها است. در این حالت انتقال ژن‌های مفید از این گونه‌ها به گونه‌های زراعی میسر نیست. در بررسی حاضر، کارائی ژن Ph^I که از گونهٔ *Aegilops Speltoides* به گندم هگزاپلوئید منتقل شده است در القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند (Homoeologous) مورد مطالعه قرار گرفت. گندم هگزاپلوئید رقم Chinese Spring (CS) و لاین ایزوژن آن که حامل ژن Ph^I بود [(Ph^I) CS] با سه نمونه (UUSS) *Ae. Kotschyii*، یک نمونه چاودار (*Secale cereale*, RR)، سه آمفی پلوئید شامل دو نمونه *Triticum durum-Ae. Caudata* (AABBCC) و یک نمونه *T. durum- Ae. Umbellulata* (AABBUU) تلاقی داده شدند. میزان جفت شدن کروموزوم‌ها و فراوانی کیاسما در مرحلهٔ متافاز I تقسیم میوز در این تلاقی‌ها مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسهٔ آماری نتایج با استفاده از آزمون t- استیودنت و آزمون مربع کای، کاهش معنی داری در تعداد یونی و النت‌ها و افزایش جفت شدن کروموزم‌ها به صورت بی‌والنت و یا مولتی والنت در تلاقی‌های شامل لاین ایزوژن (Ph^I) CS در مقایسه با تلاقی‌های شامل رقم CS نشان داد. گونه‌های وحشی از نظر میزان القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند با هم اختلاف کمی داشتند. نتایج این بررسی کارائی ژن Ph^I را در القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند نشان داد، و بدین ترتیب می‌تواند در برنامه‌های انتقال ژن‌های مطلوب از گونه‌های وحشی به گونه‌های زراعی گندم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گندم، گونه‌های خویشاوند، کروموزوم‌های خویشاوند، جفت شدن کروموزوم‌ها، ژن Ph^I

---

* قسمتی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه‌های وحشی و خویشاوند گندم منابع ژنتیکی مهمی برای ژن‌های مفید می‌باشند که می‌توانند در برنامه‌های اصلاح گندم مورد بهره‌برداری قرار گیرند. استفاده از این گونه‌ها در برنامه‌های دورگ‌گیری بین گونه‌ای و بین‌جنسی به منظور انتقال ژن‌های مفید می‌تواند سهم بسزائی در افزایش تنوع ژنتیکی و غنی‌سازی مخزن ژنی (Gene pool) گندم داشته باشد. تا کنون صفات مهم زیادی از گونه‌های خویشاوند به گندم منتقل شده‌اند (Knott and Dvorak, 1976؛ Sharma and Gill, 1983؛ Gale and Miller, 1987؛ Jiang *et al.*, 1994؛ Friebe *et al.*, 1996). با این وجود تعداد بسیار کمی از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند. انتقال توأم ژن‌های نامطلوب (Linkage drag) از یک سو و جایگزینی کروماتین بیگانه با تجانس کم به‌جای بخشی از کروماتین گندم و در نتیجه ناتوانی کروماتین بیگانه در جبران اثر کروماتین از دست رفتهٔ گندم (Non-compensating effect) ازسوی دیگر، می‌توانند دلایل قابل ذکری در این خصوص باشند (Gill, 1993; Jiang *et al.*, 1994). بنابراین در برنامه‌های دورگ‌گیری بین گونه‌ای (Interspecific hybridization) گندم تلاش عمده باید جهت انتخاب بوته‌هائی که حداقل مواد ژنتیکی وحشی را دارند صورت پذیرد.

گندم گیاهی هگزاپلوئید است که دارای سه ژنوم خویشاوند A، B و D می‌باشد. منشاء ژنوم A و D گندم به ترتیب از گونه‌های وحشی *Triticum urartu* (Chapman *et al.*, 1976؛ Dvorak *et al.*, 1988, 1993) و *Aegilops squarrassa* می‌باشد (Kihara, 1944؛ Mcfadden and Sears, 1946؛ Dvorak *et al.*, 1998). گونهٔ دهندهٔ ژنوم B هنوز مشخص نیست، اما اظهار شده است که گونهٔ *Ae. speltoides* و یا گونهٔ مشابه آن که قرابت نزدیکی به ژنوم B گونهٔ *Ae. speltoides* داشته است دهندهٔ این ژنوم به گندم می‌باشد (Sarkar and Stebbins, 1956؛ Daud and Gustafson, 1996؛ Maestra and Naranjo, 1998). کروموزوم‌های متعلق به این سه ژنوم قرابت ژنتیکی بسیار زیادی با هم دارند و دارای ساختار و اطلاعات ژنتیکی مشابهی هستند. وجود اطلاعات ژنتیکی بسیار مشابه سبب شده است که کروموزوم‌های متعلق به این ژنوم‌ها را کروموزوم‌های همیولوگ یا خویشاوند (Homoeologous chromosome) بنامند. نکتهٔ قابل توجهی که در خصوص گونه‌های گیاهی متعلق به قبیلهٔ Triticeae وجود دارد این است که قرابت ژنتیکی بین ژنوم‌های گندم و

www.SID.ir

Archive of SID

ژنوم سایر گونه‌های وحشی و خویشاوند نیز وجود دارد.

به دلیل ساختار ژنتیکی تقریباً مشابه، کروموزوم‌های خویشاوند، قابلیت جفت شدن در مرحلهٔ متافاز -I تقسیم میوز و تبادل مواد ژنتیکی را دارند، به شرطی که موانع ژنتیکی وجود نداشته باشد. یکی از مهم‌ترین موانع ژنتیکی، فعالیت ژنی به نام Ph^1 (Pairing homoeologous) بر روی بازوی بلند کروموزوم 5B است (Okamoto, 1957؛ Sears and Okamoto, 1958؛ Riley and Chapman, 1958).

فعالیت این ژن مانع از جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند می‌شود بنابراین از یک سو رفتار دیپلوئیدی گونهٔ هگزاپلوئید گندم را تضمین می‌نماید و از سوی دیگر مانع از انتقال ژن از سایر گونه‌های خویشاوند که ممکن است از طریق گرده‌افشانی تصادفی در طبیعت به وقوع بپیوندد می‌شود. هرچند که فعالیت این ژن از نظر تکاملی و حفاظت از هویت گونهٔ گندم نقش تعیین کننده دارد، اما این موضوع یک عامل محدودکننده در برنامه‌های دورگ‌گیری بین گونه‌ای گندم می‌باشد. از این نظر که امکان جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند و در نتیجه تبادل مواد ژنتیکی را از بین می‌برد.

روش‌های متعددی برای خنثی کردن موقت اثر ژن Ph^1 ابداع شده است که با استفاده از آن‌ها جفت شدن کروموزوم‌های با قرابت ژنتیکی را می‌توان القا نمود. القای جفت شدن کروموزوم‌ها سبب می‌شود که قطعات کروموزومی که تشابه دارند با هم جفت شوند و تبادل کروماتین فقط بین این قطعات مشابه صورت گیرد. این امر در کاهش انتقال توأم ژن‌های نامطلوب و افزایش احتمال جایگزینی قطعات کروموزومی مشابه با اثر جبران‌کنندگی (Compensating effect) اهمیت به سزائی دارد (Dundas and Shepherd, 1996; Friebe *et al.*, 1996). از جملهٔ این روش‌ها می‌توان به مواردی از قبیل استفاده از لاین‌های گندم فاقد کروموزوم 5B و یا لاین‌های دارای ژن جهش یافتهٔ Ph^1 (مانند Ph^{1b}) اشاره نمود (Koebner and Shephered, 1985؛ Sears, 1981).

هرچند که روش‌های فوق الذکر کارائی زیادی در القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند دارند، اما به دلایلی از قبیل عقیمی بسیار زیاد لاین‌های فاقد کروموزوم 5B، نیاز به تولید پایه‌های سیتوژنتیکی زیاد برای روش Ph^{1b}، و نیز پیچیده و وقت‌گیر بودن این روش‌ها (Mukai, 1996; Sears, 1973) کاربرد محدودی دارند.

استفاده از ژن‌های با اثر اپیستاتیک (Epistatic) روی ژن Ph^1 که اثر آن‌ها ملایم‌تر می‌باشد به عنوان شیوه‌های جایگزین پیشنهاد شده است. وجود چنین ژن‌هائی در برخی از گونه های وحشی مانند *Ae. speltoides* و *Ae. motica* اثبات شده‌اند

www.SID.ir

Archive of SID

Feldman and Mello-Sampayo , 1967) ;Riley *et al.*, 1968; Dover and Riley, 1972). در گونهٔ *Ae. speltoides* ژنوتیپ‌هائی با اثر بازدارندگی زیاد، متوسط و کم مشاهده شده‌اند (Dvorak, 1972; Kimber and Athwal , 1972). چن و همکاران (Chen *et al.* , 1984) اظهار داشته‌اند که احتمالاً دو سیستم ژنی این اثر را کنترل می‌نمایند. در یک سیستم دو ژن مستقل با اثر دوگانه (Duplicate effect) و در سیستم دیگر ژن‌های متعددی با اثر جزئی که اثر ژن‌های عمده را تغییر می‌دهند، وجود دارند.

در این گونه‌های گیاهی، ژن‌هائی که اثر بازدارندگی بر روی ژن Ph^1 دارند را ژن‌های بازدارندهٔ جفت‌شدن کروموزوم‌های خویشاوند (Pairing homoeologous inhibitor: *PhI*) می‌نامند. گونه‌های حامل این ژن (ها) در انتقال مواد ژنتیکی از گونه‌های وحشی به گونه‌های زراعی گندم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Knott and Dvorak, 1981). ریلی و همکاران (Riley *et al.*, 1968) با تلاقی ژنوتیپ‌های حامل ژن Ph^1 با لاین مونوزوم مضاعف *Ae. comosa* در گندم هگزاپلوئید موفق به انتقال ژن *Yr8* از این گونه به گندم هگزاپلوئید شدند. در این حالت *Ae. speltoides* فقط به عنوان ژنوتیپ واسط مورد استفاده قرار می‌گیرد. این امر یکی از معایب روش مذکور است چون امکان انتقال توأم مواد ژنتیکی *Ae. speltoides* نیز وجود دارد.

اخیراً ژن Ph^1 از *Ae. speltoides* به گندم هگزاپلوئید رقم Chinese Spring منتقل شده است (Chen *et al.*, 1994). با تلاقی مستقیم این پایه با گونه‌های وحشی از اثر بازدارندگی ژن Ph^1 می‌توان بهره‌مند شد و امکان القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند (کروموزوم‌های گونهٔ وحشی حامل ژن‌های مطلوب و کروموزوم‌های گندم) و در نهایت تبادل مواد ژنتیکی بین گونه‌ای را فراهم آورد. از مهم‌ترین مزایای این روش عدم استفاده از پایه‌های سیتوژنتیکی متعدد و نیز باروری این پایه‌ها است که در برنامه‌های انتقال ژن‌های بیگانه از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

هدف اصلی این تحقیق بررسی و مطالعهٔ تأثیر ژن Ph^1 منتقل شده به گندم Chinese Spring در القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مزرعهٔ دپارتمان بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی پنجاب هندوستان در سال‌های زراعی ۹۷- ۱۹۹۶ و ۹۸-۱۹۹۷ انجام شد. در این بررسی سه نمونه از گونهٔ وحشی *Ae. kotschyii* (UUSS)، یک نمونه چاودار (*S. cereale*, RR)، یک نمونه آمفی پلوئید *T. durum-Ae. umbellulata* و دو آمفی پلوئید *T. durum-Ae. caudata*

www.SID.ir

Archive of SID

(جدول۱) به عنوان والد نر همزمان با رقمCS و لاین ایزوژن آن CS(Ph^l) (رقم CS حامل ژن Ph^l) تلاقی داده شدند. نمونه‌هائی از سنبلهٔ گیاهان هیبرید F_1 حاصل از این تلاقی ها دراوایل مرحلهٔ تورم سنبله (Booting) از مزرعه جمع‌آوری شده و پس از اتیکت‌گذاری بلافاصله در محلول تثبیت‌کننده (شامل ٦ قسمت الکل ۹۵٪ : ۳ قسمت کلروفرم: ۱ قسمت اسید استیک خالص) قرار داده شد و به مدت ٤٨ ساعت در دمای یخچال در این محلول نگهداری شدند. نمونه‌ها به الکل ۷۰٪ منتقل شده و تا زمان مطالعه در یخچال نگهداری شدند. از سنبله‌های مورد نظر سنبلچه‌هائی که در مرحله مناسب (سنبلچه‌ها به اندازهٔ یک دانهٔ عدس) قرار داشتند انتخاب گردیدند و پرچم‌های آن‌ها را به کمک یک سوزن بیرون آورده و در روی لام قرار داده شدند. به پرچم‌ها یک قطره محلول ۲٪ استوکارمن اضافه شد و به کمک انتهای پنس کوبیده شدند تا دانه های گرده از بساک خارج شوند. پس از حذف مواد اضافی و حرارت جزئی، نحوهٔ جفت‌شدن کروموزوم‌ها در مرحلهٔ متافاز اول در سلول‌های مادر گرده (Pollen Mother Cell: PMC) به تعداد ٦٥٥-۱۵۳ عدد) با استفاده از میکروسکوپ نوری نیکون ۱۰٤ و بزرگنمائی ۱۵۰۰ مطالعه شدند. برای محاسبهٔ فراوانی کیاسما بدین صورت عمل شد که فراوانی تعداد بی‌والنت‌های میله‌ای را با دو برابر بی‌والنت‌های حلقه‌ای و تری‌والنتهای رشته‌ای(چون دو عدد کیاسما در این نوع بی‌والنت‌ها وجود دارد) و سه برابر کوادری والنت‌ها که عمدتاً رشته‌ای بودند جمع شدند. مقدار به دست آمده به عنوان فراوانی کیاسما در تلاقی مورد مطالعه در نظر گرفته شد. از آزمون t – استیودنت جهت مقایسهٔ هر دسته از گروه های کروموزومی (یونی والنت=I ، بی والنت=II ، تری والنت=III و کوادری والنت=IV) در تلاقی هر نمونه با CS و CS(Ph^l) استفاده شد. از سوی دیگر جهت مقایسهٔ کلی بین دو تلاقی هر نمونه از لحاظ جفت شدن کروموزوم‌ها از آزمون مربع کای (χ^2) استفاده شد. در این حالت میزان جفت شدن کروموزوم‌ها در تلاقی با CS به عنوان آمار مورد انتظار و میزان جفت شدن کروموزوم‌ها در تلاقی با CS(Ph^l) به‌عنوان آمار مشاهده شده در نظر گرفته شدند.

نتایج

نتایج به دست آمده از مطالعات کروموزومی و میزان جفت شدن آن‌ها در مرحلهٔ متافاز اول تقسیم میوز سلول‌های مادری دانهٔ گرده (PMC) در F_1 های حاصل از تلاقی‌های *S. cereale*، *Ae. kotschyii*، آمفی‌پلوئید *T. durum-Ae. umbellulata* و دوآمفی‌پلوئید *T. durum-Ae. caudata* با CS و CS(Ph^l) در جدول ۲ درج شده است. در شکل ۱ نیز تصاویر تعدادی از این سلول‌ها جهت مقایسه نشان داده شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعهٔ ۴۹۰ سلول دانهٔ گرده در F_1 های حاصل از تلاقی *S. cereale* × CS سطح بسیارکمی از جفت‌شدن کروموزوم‌ها را نشان داد (0.49 II+0.05III+0.011IV) با فراوانی کیاسمای ۰/۶۱ در هر PMC). در صورتی که، داده های حاصل از ۲۸۰ سلول دانهٔ گرده متعلق به F_1 های حاصل از تلاقی *S. cereale* × CS(Ph^l) افزایش معنی‌داری (تقریباً ۱۰ برابر) از جفت شدن و تشکیلات کروموزومی را نشان داد (5.18II+0.53III+0.16IV) با فراوانی کیاسمای معادل ۷/۴۷ در هر PMC). علاوه بر این فراوانی یونی والنت‌ها (I) در تلاقی اخیر معادل ۱۵/۶۲ بود که در مقایسه با حالت قبل (۲۶/۸۴) به طور بسیار معنی‌داری کمتر بود (جدول ۲ و شکل‌های 1a و 1b).

جدول ۱ـ گونه های وحشی، واریته‌ها وآمفی پلوئیدهای مورداستفاده در این مطالعه

Table 1. Wild species, varieties and amphiploids used in various crosses in this study

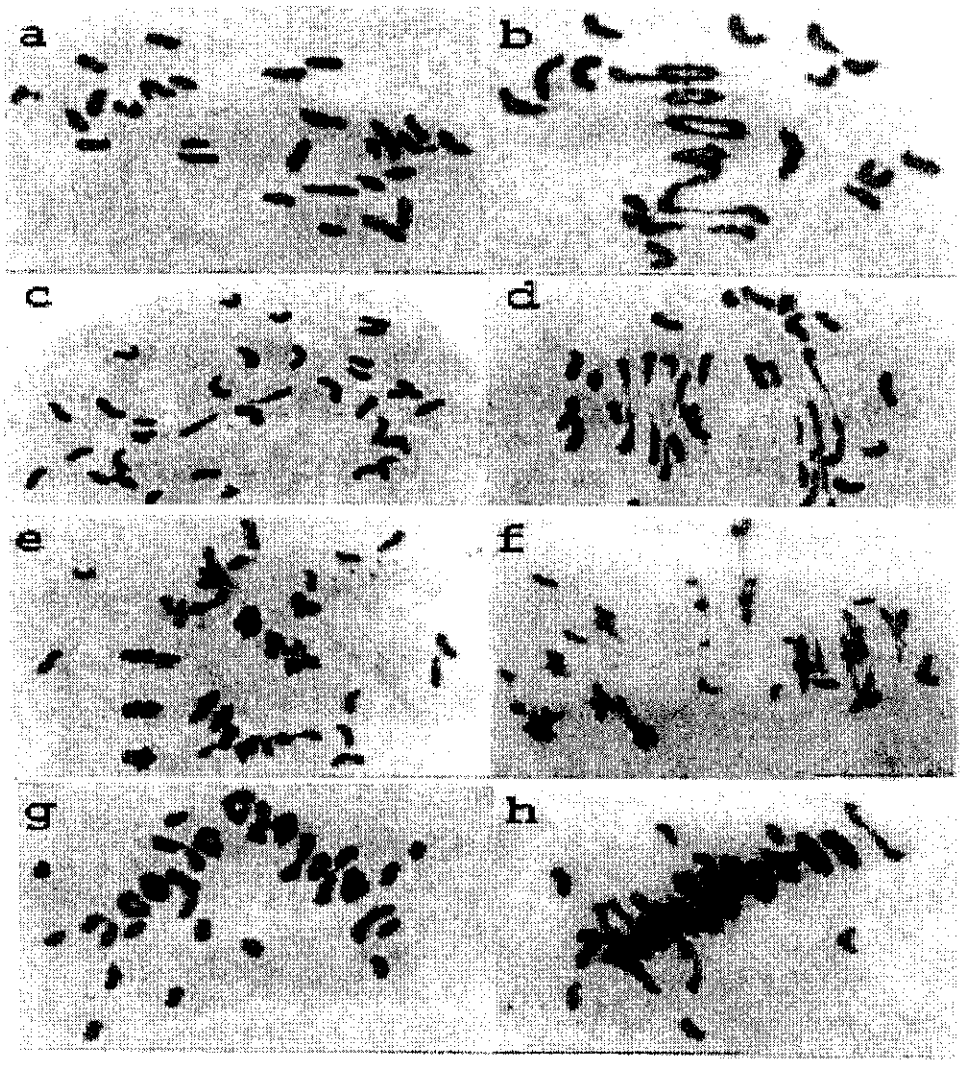
Sr. No.	Species/ Amphiploid	2n	Genomic Formula
1	*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring (CS)	42	AABBDD
2	*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring carrying Ph^l gene [CS(Ph^l)]	42	AABBDD
3	*Secale cereale*	14	RR
4	*Aegilops kotschyii* Acc. 3502	28	UUSS
5	*Aegilops kotschyii* Acc. 3573	28	UUSS
6	*Aegilops kotschyii* Acc.3790	28	UUSS
7	(*T.durum* cv. WH868 - *Ae. caudata* Acc.3556) amphiploid	42	AABBCC
8	(*Triticum durum* cv. A206 – *Ae. caudata* Acc.3556) amphiploid	42	AABBCC
9	(*Triticum durum* cv. WH890 – *Ae. umbellulata* Acc.3732) amphiploid	42	AABBUU

مقایسهٔ نتایج F_1 های حاصل از تلاقی سه نمونهٔ *Ae. Kotschyii* با CS و CS (Ph^l) در جدول ۲ درج شده و تصاویر برخی از سلول‌های PMC در این دو نوع دورگ در شکل‌های 1c و 1d نشان داده شده اند. این نتایج نیز سطح بسیار بالاتری از میزان جفت‌شدن کروموزوم‌ها را در F_1 های حاصل از CS(Ph^l)× *Ae. kotschyii* در مقایسه با CS × *Ae. kotschyii* نشان می‌دهد (جدول ۲).

تعداد کروموزوم‌های منفرد (یونی والنت) در تلاقی بین نمونهٔ شمارهٔ ۳۷۹۰ از گونهٔ

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ـ جفت وجور شدن کروموزوم‌های متافازی در F_1 حاصل از تلاقی‌های مختلف

Fig. 1. Chromosome pairing at Methaphase I in different crosses

a. *T. aestivum* cv. Chinese Spring (CS) × *S. cereale* (28 I);
b. *T. aestivum* cv. Chinese Spring carrying Ph^I gene [CS(Ph^I)] × *S. cereale* (12I+5II+2III) ;
c. CS × *Ae. kotschyii* Acc. 3790 (33I+1II) ;
d. CS(Ph^I) × *Ae. kotschyii* Acc. 3790 (19I+5II+2III) ;
e. CS × (*T. durum* cv. WH868 - *Ae. caudata* Acc.3556) amphiploid (14I+14II);
f. CS(Ph^I) × (*T. durum* cv. WH868 - *Ae. caudata* Acc. 3556) amphiploid (9I+9II+5III);
g. CS × (*T. durum* cv. WH890 – *Ae. umbellulata* Acc. 3732) amphiploid (14I+14II) ;
h. CS(Ph^I) × (*T. durum* cv. WH890 – *Ae. umbellulata* Acc. 3732) amphiploid(7I+16II+1III).

www.SID.ir

Archive of SID

Ae. kotschyii و CS (Ph^l) کاهش بسیار زیادی داشت ولی در مقابل، افزایش چشمگیری در میزان جفت شدن کروموزوم‌ها (25.21 I + 4.52 II + 0.22 III + 0.01 IV) با فراوانی کیاسمای معادل ۵/۰۷ در هر PMC) در مقایسه با F_1 های حاصل از تلاقی همین نمونه با CS نشان داد (جدول ۲ و شکل 1d).

بر اساس آزمون مربع کای (χ^2) میزان جفت شدن کروموزوم‌ها در F_1 های حاصل از تلاقی‌های (Ph^l) CS و آمفی‌پلوئیدهای *Ae. umbellulata* *T. durum* و *T. durum – Ae. caudata* اختلاف معنی‌داری نسبت به تلاقی‌های همین آمفی پلوئیدها با CS داشتند (جدول ۲). در حضور ژن Ph^l، فراوانی یونی والنت در هر سلول مادری دانهٔ گرده تقریباً به نصف کاهش یافته بود که به طور معنی‌داری با آنچه که در تلاقی با CS مشاهده گردید تفاوت داشت.

در هر دسته از ترکیبات کروموزومی (بی‌والنت ، تری‌والنت و کوادری والنت) افزایش معنی‌داری در F_1 های حاصل از تلاقی‌های شامل (Ph^l) CS در مقایسه با تلاقی های CS مشاهده شد. هر چند که اختلاف مشاهده شده در برخی از حالات به‌طور جداگانه معنی‌دار نبود، اما وقتی که این طبقات با هم در نظر گرفته شدند (II+III+IV) اختلاف معنی‌دار بین تلاقی‌های حاوی و فاقد Ph^l مشاهده گردید (مقدار t از ۵/۷۱ تا ۱۴/۲۳ و در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار) که به وضوح بیانگر تأثیر ژن Ph^l درالقای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند می‌باشد (جدول ۲ و شکل ۱ e-h).

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که ژن(های) Ph^l که از گونهٔ وحشی *Ae. speltoides* به گندم هگزاپلوئید رقم Chinese Spring منتقل شده است (Chen *et al.*, 1994) به طور مؤثری می‌تواند در القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند در تلاقی‌های گندم و گونه‌های وحشی خویشاوند آن استفاده شود.

کاهش معنی‌داری در فراوانی یونی والنت و افزایش قابل توجهی در میزان جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند در F_1 های حاصل از تلاقی های *S. cereale*، *Ae. kotschyii*، آمفی پلوئیدهای *T. durum-Ae.caudata* و *T. durum -Ae. umbellulata* با CS (Ph^l) در مقایسه با تلاقی این مواد با CS مشاهده گردید.

میزان جفت شدن کروموزوم‌ها در F_1 های حاصل از تلاقی چاودار و CS بسیار کم بود که با نتایج مطالعات قبلی توسط دیگر محققین (Schlegel and Weryezco, 1979؛ Romero and Lacadena, 1982؛ Miller and Riley, 1972) مطابقت دارد (جدول ۳). ژن Ph^l در القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند در بوته‌های F_1 حاصل از تلاقی *S. cereale* × CS(Ph^l) موثر بود. میزان القای

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲ـ میانگین، انحراف معیار، دامنهٔ تغییرات میزان ترکیبات کروموزومی در مرحلهٔ متافاز-I تقسیم میوز و فراوانی کیاسما در هیبرید نسل اول تلاقی‌های CS و CS(Ph^l) با *S. cereale*، *Ae. kotschyii* و آمفی‌پلوئیدها

Table 2. Mean, standard error and range of meiotic metaphase I chromosome pairing and chiasma frequency in F_1 intergeneric crosses of CS and CS(Ph^l) with *S. cereale*, *Ae. kotschyi* and amphiplods

Sr No	Cross	2n	PMC	Chromosome Pairing						Chiasma Frequency	X^2
				I	II Rod	II Ring	II Total	III	IV		
1	CS × *S. cereale*	28	490	**26.84** ±0.094 (18-28)"	**0.47** +0.039 (0-5)	**0.02** ±0.008 (0-2)	**0.49**	**0.05** +0.011 (0-2)	**0.01** +0.04 (0-1)	**0.61**	
2	CS(Ph^l) × *S. cereale*	28	280	**15.62** ±0.193 (4-22)	**4.37** +0.107 (0-0)	**0.81** ±0.069 (0-5)	**5.18**	**0.53** −0.048 (0-4)	**0.16** ±0.026 (0-3)	**7.47**	** 69.07
|mean X1-mean X2|				11.22**	3.90**	0.79*	-	0.48*	0.15	-	
3	CS × *Ae. kotschyi* Acc	35	309	**34.30** +0.085 (28-35)	**0.32** ±0.052 (0-3)	- -	**0.32**	**0.004** ±0.003 (0-1)	- -	**0.33**	
4	CS(Ph^l) × *Ae. kotschyi* Acc 3502	35	217	**29.67** ±0.227 (21-35)	**2.53** ±0.110 (0-7)	**0.05** ±0.009 (0-1)	**2.58**	**0.04** ±0.014 (0-1)	- -	**2.71**	** 16.91
|meanX3-mean X4|				4.63**	2.21*	0.05	-	0.036	-	-	
5	CS × *Ae. kotschyi* Acc 3573	35	374	**33.72** ±0.10 (23-35)	**0.62** ±0.054 (0-5)	**0.01** ±0.005 (0-1)	**0.63**	**0.004** ±0.004 (0-1)	**0.002** ±0.005 (0-1)	**0.66**	
6	CS(Ph^l) × *Ae. kotschyi* Acc 3573	35	153	**28.43** ±0.364 (11-35)	**3.01** ±0.173 (0-2)	**0.01** ±0.006 (0-1)	**3.02**	**0.18** ±0.038 (0-2)	- -	**3.39**	** 14.94
|meanX5- meanX6|				5.29**	0.39**	0.00	-	0.18*	0.002	-	
7	CS × *Ae. kotschyi* Acc 3790	35	213	**34.08** ±0.115 (25-35)	**0.49** +0.061 (0-5)	- -	**0.49**	- -	- -	**0.49**	
8	CS(Ph^l) × *Ae. kotschyi* Acc 3790	35	209	**25.21** ±0.297 (17-35)	**4.45** +0.148 (0-9)	**0.07** ±0.018 (0-1)	**4.52**	**0.22** ±0.033 (0-2)	**0.01** ±0.006 (0-1)	**5.07**	** 28.21
|meanX7-mean X8|				8.89**	3.96**	0.07	-	0.22	0.01	-	
9	CS × Amph. [*T.durum*WH868 -*Ae. Caudata*]	42	346	**14.69** ±0.168 (9-28)"	**8.00** ±0.167 (0-15)	**5.11** ±0.139 (0-12)	**13.11**	**0.34** ±0.032 (0-3)	- -	**18.90**	
10	CS(Ph^l)×Amph.[*T.durum*WH868-*Ae. Caudata*]	42	638	**7.87** ±0.074 (3-14)	**9.52** ±0.109 (4-15)	**5.71** ±0.103 (0-12)	**15.23**	**1.13** +0.40 (0-5)	**0.01** ±0.004 (0-1)	**23.23**	* 5.39
|meanX9-mean X10|				6.82**	1.52'	0.60	-	0.79**	0.01	-	
11	CS × Amph.[*T.durum*A206 -*Ae. Caudata*]	42	283	**19.11** +0.297 (10-32)	**5.34** ±0.103 (0-16)	**5.42** ±0.141 (0-1)	**10.76**	**0.48** +0.042 (0-4)	- -	**17.14**	
12	CS(Ph^l)×Amph [*T.durum*A206 -*Ae. caudata*]	42	655	**8.41** ±0.074 (4-13)	**10.01** ±0.105 (2-17)	**5.60** ±0.90 (0-13)	**15.61**	**0.77** +0.035 (0-5)	**0.01** ±0.05 (0-2)	**22.78**	** 8.36
|meanX11-mean X12|				10.70**	4.67**	0.18	-	0.47'	0.01	-	
13	CS × Amph[*T.durum*WH890-*Ae.umbellulata*]	42	324	**14.41** ±0.087 (12-20)	**9.01** ±0.131 (4-15)	**4.65** +0.12 (0-11)	**13.66**	**0.04** +0.110 (0-1)	- -	**18.39**	
14	CS(Ph^l)×Amph[*T.durum*WH890-*Ae.umbellulata*]			**8.16** ±0.086 (4-14)	**9.67** ±0.105 (3-15)	**5.64** +0.90 (0-11)	**15.31**	**0.97** +0.039 (0-4)	**0.01** ±0.003 (0-1)	**22.92**	** 25.00
|meanX13- meanX14|				6.25**	0.66	0.99*	-	0.93**	0.01	-	

اعداد داخل پرانتز بیانگر دامنه می باشند .+، *و **، به ترتیب معنی دار درسطوح احتمال ۱۰٪، ۵٪ و ۱٪ .

Figures in parentheses indicate the range; +, * ,** significant at 0.1, 0.05 and 0.01 levels of probability, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

جفت شدن کروموزوم‌ها در F_1های حاصل از این تلاقی نیز با آنچه که در F_1 های حاصل از تلاقی های *T. aestivum* Nullisomic 5B × *S. cereale* و نیز *T. Aestivum* ph^{1b} × *S. cereale* گزارش شده‌اند قابل مقایسه است (Dhaliwal *et al.*, 1977؛ Shneider and Prilinn, 1984؛ Riley, 1960). به هر حال این نتایج به‌روشنی تاثیر ژن Ph^1 را بر افزایش سطح جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند نشان می‌دهد (شکل 1b).

در تلاقی نمونه‌های *Ae. kotschyii* و CS (Ph^1) سطح بالائی از جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند در F_1 های به دست آمده مشاهده گردید که با نتایج مطالعات سیرز (Sears, 1977) در F_1 های حاصل از تلاقی *T. aestivum* Nulli-5B× *Ae. kotschyii* مطابقت دارد.

میزان القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند توسط ژن Ph^1 در تلاقی گندم و چاودار تاحدی از آنچه که در F_1 های حاصل از تلاقی گندم و نمونه‌های آژیلوپس مشاهده شد بیشتر بود (جدول ۲). این خصوصیت را می‌توان به میزان تشابه ژنوم گونه‌هائی که با هم تلاقی داده شده‌اند نسبت داد. به عبارت دیگر چون *Ae. kotschyii* یک گونهٔ تتراپلوئید است خود نیز ممکن است دارای سیستمی مشابه سیستم Ph^1 باشد (که سبب رفتار دیپلوئیدی در این گونهٔ تتراپلوئید می‌شود) وبا سیستم Ph^1 و *Ph* تداخل می‌نماید.

در تلاقی های آمفی پلوئیدها با ساختار ژنومی AABBUU و AABBCC حاوی ژن Ph^1، افزایش معنی‌داری در فراوانی کیاسما و جفت شدن کروموزوم‌ها به صورت بی‌والنت، تری والنت و کوادری والنت و نیز کاهش قابل ملاحظه در میزان یونی والان‌ها بیانگر جفت شدن کروموزوم‌های متعلق به ژنوم‌های C و D، D و U، D، U،C و A و یا B می‌باشد. به هر حال، کروموزوم‌های درگیر در جفت شدن را با استفاده از تکنیک‌هائی مانند گیش (GISH, Genomic *in situ* hybridization) و یا فیش (FISH, Flourescens *in situ* hybridization) می‌توان دقیقاً شناسائی نمود (Le *et al.*, 1989; Mukai and Gill, 1991).

نتایج این تحقیق به‌وضوح نشان داد که سیستم ژنی Ph^1 متعلق به گونهٔ وحشی *Ae. speltoides* شرایط لازم را برای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند از طریق خنثی‌سازی اثر ژن Ph^1 گندم مهیا می‌سازد. اگرچه القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند و انتقال ژن‌های مفید از گونه‌های خویشاوند به گندم هگزاپلوئید از طریق استفاده از ژن جهش یافتهٔ ph^{1b}، لاین نولی زوم 5B و برخی از ژنوتیپ‌های گونهٔ وحشی *Ae. speltoides* انجام شده است، اما این سیستم‌ها نیاز به پایه‌های سیتوژنتیکی ویژه و

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ـ جفت شدن کروموزوم‌ها درمرحله متافاز I تقسیم میوز درهیبریدهای نسل اول Triticea با استفاده از دست‌ورزی سیستم ژنتیکی کنترل‌کننده جفت شدن کروموزوم‌ها

Table 3. Meiotic chromosome pairing in F_1 hybrids of Triticeae with manipulation of genetic systems that control meiotic pairing

Sr. No	Cross	2n	Chromosome pairing				Reference
			I	II	III	IV-V	
1	*T. aestivum* × *Ae. Kotschyii*	35	32.8	1.03	0.05	-	Sears (1977)
2	*T. aestivum* (Nulli-5B) × *Ae. Kotschyii*	35	12.0	7.80	1.96	0.12	Sears (1977)
3	*T. aestivum* × *S. cereale*	28	27.8 27.1 26.9	0.10 0.40 0.52	- - -	- - -	Miller and Riley (1972) Romero and Lacadena (1982) Schlegel and Weryezco (1979)
4	*T. aestivum* (Nulli-5B) × *S. cereale*	27	17.3	3.36	0.88	0.08	Riley (1960)
5	*T. aestivum* (ph^1) × *S. cereale*	28	12.4	4.90	1.80	0.08	Dhaliwal *et al.* (1977)
6	*T. aestivum* (ph^1) × *S. cereale*	28	13.2	5.70	0.58	0.37	Shneider nd Prilinn (1984)

برنامه‌های دورگ‌گیری پیچیده طولانی دارند تا ژن مورد نظر به گونهٔ زراعی منتقل گردد (Riley *et al.*, 1968 ; Sears , 1973).

رایلی و همکاران (Riley *et al.*, 1968) توانستند با استفاده از قطعهٔ کروماتین *Ae. comosa* حامل ژن *Yr8* این ژن را به گندم منتقل نمایند. آن‌ها ابتدا این مضاعف گندم هگزاپلوئید (کروموزوم اضافه شده کروموزوم 2M گونهٔ *Ae. comosa* حامل ژن مقاومت به زنگ زرد بود) را ابتدا با *Ae. speltoides* تلاقی داده و سپس از بین نتاج حاصل از تلاقی برگشتی با گندم هگزاپلوئید اشکال نوترکیب را انتخاب نمودند. در این برنامهٔ انتقال ژن گونهٔ *Ae. speltoides* را فقط به‌عنوان گونهٔ واسط جهت القای جفت شدن کروموزوم‌های خویشاوند مورد استفاده قرار دادند. واضح است که علاوه بر ژن‌های خنثی کنندهٔ Ph^1 در گونهٔ *Ae. speltoides* ژن‌های نامطلوب بسیار زیادی نیز از این گونه توأماً منتقل می‌شوند که با تلاقی‌های برگشتی متعدد باید آن‌ها را حذف نمود. این موضوع علاوه بر کاهش کارآئی برنامهٔ انتقال ژن مدت زمان لازم را نیز بسیار افزایش می‌دهد.

با استفاده از سیستم ژنی Ph^1 در زمینهٔ گندم هگزاپلوئید از انتقال ژن‌های ناخواسته از گونهٔ *Ae. speltoides* به گندم جلوگیری به‌عمل می‌آید. مزیت دیگر استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از این پایهٔ سیتوژنتیکی نسبت به استفاده از پایه‌های دارای ژن جهش یافتهٔ ph^{1b} این است که نیازی به استفاده از پایه‌های آنیوپلوئید (Aneuploid) مختلف مانند پایهٔ نولی زوم 5B نیست. از این رو، این پایهٔ سیتولوژیکی می‌تواند به طور مؤثری برای انتقال تنوع ژنتیکی از گونه‌های وحشی به خزانهٔ ژنی گندم با حداقل مادهٔ ژنتیکی ناخواسته مورد استفاده قرار گیرد.

تلاقی آمفی پلوئیدهای گندم دوروم و گونه‌های خویشاوند غیر والد گندم (Non-proginitor) مانند *Ae. caudata* و *Ae. umbellulata* با گندم هگزاپلوئید دارای ژن Ph^1، انتقال ژن‌های مفید را به طور کنترل شده به کروموزوم‌های ژنوم D میسر می‌سازد. از آن‌جائی که عقیده بر این است که دستورزی ژنوم D در برنامه های انتقال ژن کمتر باعث ناپایداری ژنتیکی در گندم می‌شود، سیستم فوق‌الذکرمی‌تواند بیشتر مورد توجه قرار گیرد. علاوه بر موارد فوق، بازیافت لاین‌های بارور دارای ژن بیگانهٔ مورد نظر در تلاقی آمفی‌پلوئیدها با لاین‌های گندم مانند CS(Ph^1) نسبتاً آسان‌تر و سریع‌تر از تلاقی مستقیم این گونه‌های غیر والد با گندم می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندهٔ اول از سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی که امکان ادامهٔ تحصیل در مقطع دکتری را فراهم آورده است کمال سپاسگزاری و تشکر را دارد.

References

Chapman, V., Miller, T. E., and Reiley, R. 1976. Equivalence of the A genome of bread wheat and that of *Triticum urartu*. Genetics. Research 27: 69-76.

Chen, P. D., Tsujimoto, H., and Gill, B. S. 1994. Transfer of Ph^1 gene promoting homoeologous pairing from *Triticum speltoides* into common wheat and their utilization in alien genetic introgression . Theoretical and Applied Genetics 88: 97-101.

Daud, H. M., and Gustafson, J. P. 1996. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a B-genome progenitor of wheat (*Triticum aestivum*). Genome 39: 543-548.

Dhaliwal, H. S., Gill, B. S., and Waines, J. G. 1977. Analysis of induced homoeologous pairing in *Ph* mutant × rye hybrid. Journal of Heredity 68:206-209.

Dover, G.A., and Riley, R. 1972. Prevention of pairing of homoeologous meiotic chromosomes of wheat by an activity of supernumerary chromosomes of *Aegilops*. Nature 240:159-161.

www.SID.ir

Archive of SID

Dvorak, J. 1972. Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homoeologous pairing in wheat. Canadian Journal of Genetics and Cytology 14: 371-380.

Dvorak, J., McGuire, P. E., and Cassidy, B. 1988. Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. Genome 30: 680-689.

Dvorak, J., di Telizzi, P., Zhang, H. B., and Resta, P. 1993. The evolution of polyploid wheats: Identification of the A genome donor species. Genome 36:21-31.

Dvorak, J., Luo, M. C., Yang, Z. L., and Zhang, H. B. 1998. The structure of the *Aegilopes tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics 97: 657-670.

Dundas, I. S., and Shepherd, K. W. 1996. Yield improvement of wheat with stem rust resistance gene *Sr26* by cytogenetical methods using molecular-based marker selection. In: Abst. 2nd International Crop Science Congress, 17-24 November 1996, New Dehli, India.

Feldman, M., and Mello-Sampayo, T. 1967. Suppression of homoeologous pairing in hybrid of polyploid wheat × *Triticum speltoides*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 9: 307-313.

Friebe, B., Jiang, J., Raupp, W.J., McIntosh, R.A., and Gill, B.S. 1996. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to disease and pest: Current status. Euphytica 91: 59-87.

Gale, M. D., and Miller, T. E. 1987. The introduction of alien genetic variation into wheat. pp. 173-210. In: Lupton, F. G. H.,(ed.) Wheat Breeding: Its Scientific Basis. Chapman and Hall UK.

Gill, B. S. 1993. Molecular cytogenetic analysis in wheat. Crop Science 33: 902-908.

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

Kihara, H. 1944. Discovery of the DD-analyzer, one of the ancestors of *Ttiticum vulgare*. Agriculture Horticulture 19: 13-14.

Kimber, G., and Athwal, B. S. 1972. A reassessment of the course of evolution of *Triticum vulgare*. Agriculture Horticulture 19: 13-14.

Knott, D. R., and Dvorak, J. 1976. Alien germplasm as a source of resistance to disease. Annual Review of Phytopathology 14: 211-235.

www.SID.ir

Archive of SID

Knott, D. R., and Dvorak, J. 1981. Agronomic and quality characteristics of wheat lines of leaf rust resistant derived from *Triticum speltoides*. Canadian Journal of Genetics and Cytology 23: 475-80.

Koebner, R. M. D., and Shepherd, K. W. 1985. Induction of recombination between rye chromosome 1RL and wheat chromosome. Theoretical and Applied Genetics 71: 208-215.

Le, H. T., Armstrong, K. C., and Mili, B. 1989. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. Plant Molecolar Biology Rep. 7: 150-158.

Maestra, B., and Naranjo, T. 1998. Homoeologous relationships of *Aegilops speltodes* chromosomes to bread wheat. Theoretical and Applied Genetics 97: 181-186.

McFadden, E. G., and Sears, E. R. 1946. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. Journal of Heredity 37: 81-89.

Miller, T. E., and Riley, R. 1972. Meiotic chromosome pairing in wheat - rye combinations. Genet. Iber. 24: 241-250.

Mukai, Y. 1996. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization: A new tool for genome analysis. pp. 181-192. In: Jauhar P. P., (ed.). Methods of Genome Analysis in Plants Baca Raton, New York, London, Tokyo, CRC Press.

Mukai, Y., and Gill, B. S. 1991. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. Genome 34: 448-452.

Okamoto, M. 1957. Asynaptic effect of chromosome V. Wheat Information Service. 5: 6.

Riley, R. 1960. The diploidization of polyploid wheat. Herditas 15: 407-429.

Riley, R., and Chapman, V. 1958. Genetic control of the cytogenetically diploid behaviour of hexaploid wheat. Nature 182: 713-715.

Riley, R., Chapman, V., and Johnson, R. 1968. Introduction of yellow rust resistance of *Aegilops comosa* into wheat by genetically introduced homoeologous recombination. Nature 217: 383-384.

Romero, C., and Lacadena, J. R. 1982. Effect of rye B-chromosome on pairing in *Triticum aestivum*× *Secale cereale* hybrids. Zeitschrift fur Pflanzenzucht 89: 39-46.

www.SID.ir

Archive of SID

Sarkar, P., and Stebbins, G. L. 1956. Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. American Journal of Botany 43: 297-304.

Schlegel, R., and Weryezco, E. 1979. Intergeneric chromosome pairing in different wheat-rye hybrids revealed by Giemsa banding technique and some implications on karyotype in the genus *Secale cereale*. Biol. Zentralbl. 98: 399-407.

Sears, E. R. 1973. *Agropyron*-wheat transfer induced by homoeologous pairing. pp. 191-199. In: Sears, E. R. and Sears, L. M. S., (eds.). 6-7 Aug. Missouri, Colombia. Proceedings of the 4 th International Wheat Genetics Symposium, 6-7 Aug.

Sears, E. R. 1977. An induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. Canadian Journal of Genetics and Cytology 19: 585-593.

Sears, E. R. 1981. Transfer of alien genetic material to wheat. pp. 75-89. In: Evans, L.T., and Peacoak, W. J., (eds.).Wheat Science- Today and Tomorrow. Cambridge University Press. U. K.

Sears, E. R., and Okamoto, M . 1958. Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. In: Proceedings of the 10th International Congress of Genetics. 20-27 August. Montreal, Toronto, University. of Toronto Press. 2: 258-259.

Sharma, H. C., and Gill, B. S. 1983. Current status of wide hybridization in wheat. Euphytica 32: 17-31.

Shneider, T. M., and Prilinn, O. J. 1984. The use of *Ph* mutant increasing homoeologous pairing in wheat × rye hybrids. Wheat Information Service 59: 6-8.

آدرس نگارندگان:

مصطفی آقائی‌سربرزه- معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، سرارود، کرمانشاه.

اچ. اس. دالی وال- دپارتمان بیوتکنولوژی، دانشگاه کشاورزی پنجاب، لودهیانا، هندوستان.

www.SID.ir