دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد هفدهم، شماره دوم، ۱۳۸۹
www.gau.ac.ir/journals

مطالعه ساختار کروموزومی ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH)

سوده خنامانی‌فلاحتی‌پور[1]، *حسین شاهسوندحسنی[2]، امین باقی‌زاده[3] و سپیده قطب‌زاده‌کرمانی[4]

[1]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، [2]استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان، [3]استادیار مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان، [4]کارشناس گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۹

چکیده

به‌منظور حذف صفات نامطلوب غله جدید تریتی‌پایرم ($AABBE^bE^b$، ۲n=٦x=٤٢) تلاقی‌های گسترده‌ای بین لاین‌های این غله (پایه مادری) و ارقام گندم نان ایرانی (پایه پدری) انجام و از خودگشنی نتاج F_1 در نسل دوم تعداد ۱۸۱۰ بذر احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه ($D_{(0-14)}$، $AABBE^b_{(0-14)}$، F_2=۲n=٦x=٤٢) تولید شد. تعادل کروموزومی و شاخص همولوژی در ۱۱ گیاه احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) با دورگه‌سازی DNA ژنومی علف شور ساحل (E^bE^b، ۲n=۲x=١٤) بررسی شد و نتایج نشان داد که بدون استفاده از DNA رقم بهاره چینی (AABBDD، ۲n=٦x=٤٢) به‌عنوان DNA مسدودکننده تمایز کروموزوم‌های E^b از A، B و D امکان‌پذیر نبود. ضمن این‌که افزودن مرحله دورگه‌سازی اولیه با DNA مسدودکننده به‌عنوان پروب طبق دستورالعمل دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH)، امکان تمایز کروموزوم‌های E^b به‌صورت منفرد و جفت حلقوی و میله‌ای فراهم گردید. شمارش کروموزوم‌های E^b در گیاهان F_2 امکان گزینش ژنوتیپ‌هایی از تریتی‌پایرم با تعداد متفاوت کروموزوم‌های E^b و D دارای صفات مطلوب زراعی به‌نام تریتی‌پایرم ثانویه با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل (GISH) به‌عنوان نشانگر کمکی سیتوژنتیکی در گزینش وجود دارد.

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

* مسئول مکاتبه: hossein212001@yahoo.com

مقدمه

در طول هزاران سال گیاهان خویشاوندان وحشی گندم در معرض گرما، خشکی، سرما، شوری، غرقاب، انواع آفات و بیماری‌ها بوده‌اند. گونه‌هایی که تا امروز باقی‌مانده و به این تنش‌ها مقاومت نشان داده‌اند، دارای اساس ژنتیکی بسیار پایداری هستند. تلاقی‌های بی‌شماری در میان گونه‌های مختلف اتفاق افتاده تا گندم‌های اولیه پدید آمده است. انسان در هزاران سال قبل شروع به کشت و انتخاب از میان آن‌ها کرده است و در طی فرآیند اهلی شدن توانایی آن برای تولید بیش‌تر و دانه‌های درشت‌تر تثبیت گردیده است، اما بخش مفیدی از پتانسیل ژنتیکی مقاومت در اجدادش را از دست داده است (آقایی و همکاران، ۲۰۰۵). به‌منظور اصلاح گندم و انتقال صفات مطلوبی مانند مقاومت به انواع بیماری‌ها، آفات و همچنین مقاومت در برابر انواع تنش‌های محیطی از جمله شوری، خشکی، غرقاب، سرما و گرما تلاقی‌های بسیاری بین گندم و خویشاوندان وحشی آن مانند گونه‌های جو، آجیلوپس و تینوپایرم انجام گرفته است (فرخ و همکاران، ۱۹۹۳). جنس وحشی تینوپایرم از تیره گندمیان یکی از منابع غنی از ژن‌های مفید در اصلاح گندم به‌شمار می‌رود که شامل حدود ۲۰ گونه با سطوح پلوئیدی مختلف از دیپلوئید تا دکاپلوئید می‌باشد. این گونه‌ها دارای ژنوم E^b یا ترکیبی از ژنوم‌های E^b و E^e هستند. بسیاری از گونه‌های تینوپایرم مقاومت قابل‌ملاحظه‌ای را در برابر انواع بیماری‌ها مانند ویروس پیچیدگی زرد جو، زنگ ساقه و برگ، ویروس موزائیک گندم و سفیدک پودری نشان داده‌اند. بسیاری از گونه‌های تینوپایرم به تنش‌های سرما، خشکی و سطوح بالای نمک مقاوم می‌باشند. گونه تینوپایرم جانسی فرمی دارای ژن مقاومت به قارچ فوزاریوم گرامینیوم است بنابراین از آن برای انتقال این ژن به گندم استفاده شده است (النسکوگ استام و مرکر، ۲۰۰۲). اومیلان و همکاران (۱۹۹۱) آمفی‌پلوئید به‌دست آمده از تلاقی گندم بهاره چینی با گونه لوفوپیروم الانگیتوم، همچنین لاین‌های گندم بهاره چینی دارای جفت کروموزوم جایگزین از گونه لوفوپیروم الانگیتوم را تولید کرده و سطح تحمل به شوری آن‌ها را در مزرعه بررسی و نشان دادند که تحمل به شوری آمفی‌پلوئیدها از گندم بهاره چینی بیش‌تر بود، اما لاین‌های گندم دارای جفت کروموزوم جایگزین $۳E^b$ افزایش بیش‌تری در تحمل به شوری نشان دادند (اومیلان و همکاران، ۱۹۹۱). شناسایی کروماتین وحشی در دورگ‌های بین‌گونه‌ای و بین‌جنسی با استفاده از DNA تکراری اختصاصی گونه‌های گندم، چاودار و جو موکای و گیل (۱۹۹۱) و همچنین با استفاده از DNA ژنومی گونه وحشی به‌عنوان کاوش‌گر با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل بررسی شده است (شواتزر و همکاران، ۱۹۸۹). در این روش DNA ژنومی گونه وحشی به‌عنوان DNA کاوش‌گر نشان‌دار می‌گردد. به‌منظور

جلوگیری از دورگه‌سازی DNA کاوش‌گر با DNA غیرهدف به‌ویژه در گونه وحشی دارای کروموزوم همولوگ با گونه زراعی، قبل از دورگه‌سازی DNA کاوش‌گر با DNA هدف، توالی‌های مشترک در DNA هدف با DNA مسدودکننده گونه زراعی دورگه‌سازی می‌گردد (موتوکریشنان و همکاران، ۱۹۸٤). کاربرد روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل در گیاهان در مقایسه با پستانداران آهسته به پیش می‌رود زیرا تهیه نمونه‌های کروموزوم‌های گیاهی با تعداد زیاد سلول در مرحله متافاز بدون دیواره سلولی و بقایای سیتوپلاسمی مشکل‌تر است و از دورگه‌سازی قطعات DNA کاوش‌گر با DNA مسدودکننده در کروموزوم‌ها ممانعت به‌عمل می‌آورد (تور و همکارن، ۲۰۰۲). بیش از دو دهه است که تکنیک دورگه‌سازی DNA در محل، در گونه‌های گیاهی استفاده و به‌طور عمده کاربرد آن، تعیین محل توالی‌های تکراری بر روی کروموزوم‌ها و شناسایی کروموزوم‌های وارد شده از اجداد گونه‌های وحشی به گیاهان زراعی بوده است (لاپیتان و همکاران، ۱۹۸۹). سختی آماده‌سازی نمونه‌های کروموزومی خوب، نبود کلون‌های بزرگ برای نشانگرهای مولکولی مثل چندشکلی در قطعات DNA برش خورده و نداشتن توانایی دورگه‌سازی DNA در محل در نقشه‌یابی کروموزوم‌های خاص، کاربرد تکنیک در نقشه‌یابی ژنومی در گیاهان را کاهش داده است (تور و همکاران، ۲۰۰۲). در اولین کاربرد تکنیک دورگه‌سازی DNA در محل بر روی کروموزوم‌های گیاهی توسط ریبورون و گیل (۱۹۸۵)، DNA تکراری چاودار به‌عنوان کاوش‌گر برای شناسایی کروموزوم‌های چاودار در دورگ‌های گندم- چاودار استفاده شد (لاپیتان و همکاران، ۱۹۸٦). با استفاده از DNA اختصاصی گونه چاودار به‌عنوان کاوش‌گر، کروماتین چاودار را در لاین‌های گندم دارای کروموزوم مبادله شده از چاودار تشخیص دادند. هم‌زمان با لاپیتان و همکاران، ریبورون و گیل (۱۹۸۵) هم توانستند کروموزوم‌های ژنوم D را در گندم معمولی مشاهده کنند. لی و همکاران (۱۹۸۹) دورگ‌های گندم- چاودار و همچنین لاین‌های گندم دارای کروموزوم‌های جایگزین شده را با تکنیک دورگه‌سازی DNA در محل بررسی کردند. موراماتسو (۱۹۹۰)، چن و همکاران (۱۹۹۸) و براسیلیرو ویدال و همکاران (۲۰۰۳ و ۲۰۰۵) از دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل به‌منظور شناسایی ساختار ژنومی گونه دکاپلوئید تینوپایرم پنتیکوم استفاده کردند. جوهر (۱۹۹۱) و جوهر و پیترسون (۲۰۰٦) از روش دورگه‌سازی DNA در محل برای بررسی همیولوژی بین کروموزوم‌های گندم دوروم و گونه وحشی تینوپایرم بسارابیکم استفاده کردند، آن‌ها با این روش همیولوژی کروموزومی را در زمان حضور و یا حضور نداشتن ژن ph_1 مورد مقایسه قرار دادند. فراری و همکاران (۲۰۰۵) با کمک این روش و استفاده از DNA ژنومی گندم به‌عنوان DNA مسدودکننده و DNA ژنومی چاودار به‌عنوان کاوش‌گر ساختار

کروموزومی لاین تریسپیرو دون رنه را مشخص کردند این لاین از چندین سال خودگشن کردن تریسپیرو (AABBDRJ، ۲n=٦x=٤٩) به‌دست آمده و دارای پتانسیل بالایی در زمینه مقاومت به بیماری‌ها، سرما و خشکی است. چِن و همکاران (۱۹۹۸) و کیشی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل ساختار ژنومی گونه تینوپایرم اینترمدیوم را بررسی کرده‌اند. دانگ و همکاران (۲۰۰٤) در بین لاین‌های دارای قطعات کروموزومی اضافه شده از گونه تینوپایرم اینترمدیوم در ژنوم گندم، چندین لاین دارای خصوصیات مقاومت به ویروس کوتولگی زرد جو، زنگ، خشکی و درصد بالای پروتئین از گونه تینوپایرم اینترمدیوم را مشاهده کردند. لاین‌های دارای کروموزوم‌های وحشی اضافه، به‌طور عموم با انتقال ژن یا ژن‌های مفید از خویشاوندان وحشی به گیاهان زراعی، ابزار پرارزش و مؤثری در به‌کارگیری ژرم‌پلاسم نسل‌ها به حساب می‌آیند. از لاین‌های دارای کروموزوم‌های اضافی به‌منظور مکان‌یابی ژن یا ژن‌های مفید بر روی کروموزوم‌های اختصاصی، ساختن کتابخانه DNA از یک کروموزوم خاص، جداسازی توالی‌های DNA اختصاصی، نقشه‌یابی کروموزوم‌ها، مطالعه ساختار و ترکیب ژنتیکی کروموزوم‌ها، انتخاب نشانگرهای DNA مربوط به یک کروموزوم خاص و همچنین در سال‌های اخیر به‌منظور مطالعات ساختار هسته و تکثیر توالی‌های DNA اختصاصی استفاده شده است (ژانک و همکاران، ۲۰۰۲). لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم از تلاقی ارقام اصلاح شده از گونه گندم دوروم به‌عنوان پایه مادری و گونه علف شور ساحل (E^bE^b، ۲n=۲x=١٤) به‌عنوان پایه پدری به‌وجود آمده‌اند و علاوه‌بر قابلیت رشد و نمو همانند گندم، دارای مقاومت به شوری بالایی می‌باشند ولی باروری آن‌ها ۸۵ درصد، سنبله‌چه‌ها در زمان رسیدن و قبل از برداشت ریزش نموده و در خرمن‌کوبی دانه به‌راحتی از پوسته خود جدا نمی‌شود (حسنی، ۱۹۹۸). هدف از مطالعه حاضر، ۱- رفع صفات نامطلوب لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم از طریق تلاقی این لاین‌ها با ارقام گندم نان ایرانی، ۲- خوگشنی نتاج F_1 به‌دست آمده از این تلاقی‌ها و به‌دست آوردن نتاج ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه (F_2)، ۳- بررسی ساختار کروموزومی و نحوه جفت شدن کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B، D و E^b در ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه ($AABBDE^b$، ۲n=٤۲: F_2) با کمک نشانگر ژنومی به‌دست آمده از علف شور ساحل با روش دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل و ٤- تطبیق نتایج مطالعات سیتوژنتیکی با نتایج صفات مورفولوژیکی و زراعی در مزرعه به‌منظور گزینش ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم ثانویه ($AABBDE^b$، ۲n=٦x=٤۲) با صفات زراعی مطلوب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بساک از گل‌چه‌های بوته‌های نتاج F_2 (جدول ۱) تهیه و در محلول کارنوی I[1] تثبت و در فریزر ۲٤- درجه سانتی‌گراد تا تهیه اسلاید کروموزومی میوز نگهداری شدند.

مواد ژنتیکی:

DNA ژنومی گیاه علف شور ساحل: با نوکلئوتید فلئورسین ۱۲-dUTP[2] از شرکت فرمنتاز آلمان نشان‌دار گردید.

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

روش‌ها

تهیه نمونه کروموزومی میوز: بساک‌های گیاهان دورگ F_2 از فریزر خارج و محلول کارنوی I آن‌ها تخلیه و به‌مدت ۸-٦ دقیقه در بن‌ماری ٦۰ درجه سانتی‌گراد با محلول اسید هیدروکلریک نرمال هضم و بلافاصله دو بار با آب مقطر آب‌کشی شدند. هر بساک در یک قطره اسید استیک ٤٥ درصد بر روی اسلاید قرار و با نوک تیغ اسکالپل تیز یک طرف بساک برش و با فشار دادن آن محتوای بساک خارج و بقایای بساک از لام حذف و لامل روی آن قرار و نمونه در زیر میکروسکوپ نوری بررسی و با مشاهده تعداد کافی سلول در مرحله متافاز اول، لام به‌مدت ۳ دقیقه در تانک نیتروژن مایع فرو برده شد تا سلول‌های مادر گرده روی لام تثبیت گردند. سپس لامل با یک تیغ تیز از روی لام برداشته و لام به‌مدت ۱۰ دقیقه در الکل مطلق قرار و پس از خروج از الکل، در دمای آزمایشگاه قرار تا کاملاً خشک گردید و تا انجام دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل در ۲٤- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

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

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

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

جدول ۱- بذور دورگ (F_2) به‌دست آمده از تلاقی لاین‌های تریتی‌پایرم اولیه (پایه مادری) و ارقام اصلاح شده گندم نان (پایه پدری).

انواع نتاج F_1	تعداد بذر F_2
نوید × F_2، (Ka/b) (Cr/b)	۱۱۰
نوید × F_3، (Ka/b) (Cr/b)	۱۰٤
نوید × F_5، (Ka/b) (Cr/b)	۱۱۰
نوید × F_3، (St/b) (Cr/b)	۱۱۰
نوید × (Az/b)	۱۱۰
نوید × (La/b)	۱۲۰
نوید × F_2، (Ma/b) (Cr/b)	۱۱۰
امید × (La/b)	۲٦
امید × (St/b)	۸۹۰
سفید خوشه × (Ma/b)	۱۲۰
جمع کل	۱۸۱۰

تهیه نشانگر DNA ژنومی علف شور ساحل بـا نوکلئوتیـد فلئورسـین dUTP-۱۲: تهیـه نـشانگر ژنومی از علف شور ساحل با واکنش شکاف و ترجمه[1] طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز[2] به شرح زیر انجام شد (گوبلر و هافمن، ۱۹۸۳؛ سمبروک و همکاران، ۲۰۰۱).

۱- ۸ ماده شامل ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر با غلظت ۱۰ برابر برای DNA پلیمراز I[3]، یک میکرولیتـر مخلوط ۳ نوکلئوتید غیرنشان‌دار[4] با غلظت ۱ میلی‌مولار، ۰/۲ میکرولیتر نوکلئوتید dTTP با غلظـت ۱ میلی‌مـولار[5]، ۱ میکرولیتـر فلئورسـین dUTP-۱۲ بـا غلظـت ۱ میلـی‌مـولار، ۱ میکرولیتـر دی‌اکـسی ریبونوکلئاز I با غلظت ۰/۰۰۲ واحد بر میکرولیتر و عاری از ریبونوکلئاز[6]، ۱/۵-۰/۵ میکرولیتر (۱۵-۵ واحد) از DNA پلیمراز I مربوط به اشرشیاکلی[7]، ۰/۵-۰/۲۵ میکروگـرم تقریبـاً معـادل ۱ میکرولیتـر

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

DNA ژنومی علف شور ساحل با یکدیگر در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری مخلوط و حجم واکنش با آب مقطر ۲ بار تقطیر استریل عاری از نوکلئاز[1] به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و بلافاصله به انکوباتور یخچال‌دار با دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳-۲ ساعت انتقال داده شد و سپس بلافاصله در درون ظرف دارای یخ پودر شده فرو برده شد.

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

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

دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل روی نمونه‌های میوز گیاهان ژنوتیپ‌های نتاج F_2: دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل بر طبق روش شوآرتزر و همکاران (۱۹۸۹) و ریدر و همکاران (۱۹۹٤) و مرحله پیش دورگه‌سازی ژنومی DNA غیرنشان‌دار بر طبق روش اصلاح شده حسنی (۱۹۹۸) بر روی اسلایدهای دارای سلول‌های میکروسپور بوته‌های نسل F_2 به‌شرح زیر انجام شد.

۱- هضم اسیدی با اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال به‌مدت ۲ دقیقه

۲- هضم آنزیمی با ۲ میکرولیتر از محلول پروتئیناز K با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر که با ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر پروتئیناز K با غلظت یک برابر محلول پایه[2] رقیق شده بود به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد

۳- شستشوی اسلایدها دو بار و هر بار ۲ دقیقه با محلول بافر متوقف‌کننده فعالیت آنزیم پروتئیناز K با یک برابر غلظت محلول پایه[3] در دمای آزمایشگاه

٤- شستشوی اسلایدها به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول نمکی سیترات سدیم[4] با غلظت دو برابر محلول پایه

1- Water, Nuclease-Free

۲- 1X Proteinase K Buffer: ۲/٤۲ گرم تریس و ۰/٤۳۸ گرم کلرید کلسیم در ۱ لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل (pH= ۷/۵)

۳- 1X Proteinase K Stop Buffer: ۲/٤۲ گرم تریس و ۷/٤٤گرم اتیلن دی آمین تترا استیک اسید در ۱ لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل (pH= ۷/۵)

4- Saline Sodium Cytrate (SSC)

۵- حذف RNA نمونه‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم RNase با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد

٦- شستشوی اسلایدها به‌ترتیب با محلول‌های نمکی سیترات سدیم با غلظت ۲ و ۰/۱ برابر محلول پایه

۷- تثبیت مواد گیاهی روی اسلایدها با محلول پارافرمالدهید تازه به‌مدت ۱۰ دقیقه

۸- تک‌رشته‌ای کردن DNA هدف بر روی اسلاید[1] با محلول فرمامایـد ۷۰ درصـد در بـن‌مـاری ۷۰ درجه سانتی‌گراد در زیر هود به‌مدت ۲ دقیقه

۹- آب‌گیری اسلایدها به‌ترتیب با محلول‌های ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد الکل ٢٤- درجه سانتی‌گـراد، دو مرتبه و هر بار به‌مدت ۲ دقیقه

۱۰- اضافه نمودن ٤٥ میکرولیتر از محلول دورگه‌سازی DNA ژنومی غیرنشان‌دار[2] گندم بهاره چینی به هر اسلاید به‌منظور مسدود نمودن توالی‌های مشترک بین ژنوم E^b با ژنوم‌های A، B و D ژنوتیپ‌های بوته‌های نسل F_2 و قرار دادن اسلایدها به‌مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم ٦٥ درجه سانتی‌گراد

۱۱- اضافه نمودن ٤٥ میکرولیتر از محلول هیبریداسیون[3] DNA ژنومی علف شـور سـاحل بـه‌منظـور دورگه سازیآن با کروموزوم‌های E^b موجود در ژنوتیپ‌های بوته‌های F_2 و قرار دادن اسلایدها به‌مـدت ۲ ساعت در حمام آب گرم ٦٥ درجه سانتی‌گراد

۱۲- شستشوی شدید اسلایدها به‌ترتیب با محلول‌های سیترات سدیم با غلظت ۲ برابر محلول پایـه و سیترات سدیم ٤ برابر غلظت پایه دارای توآین ۲۰[4]

۱۳- رنگ‌آمیزی اسلایدها با ۵۰ میکرولیتـر از محلـول DAPI[5] بـا غلظـت ۰/۱۲۵ میکروگـرم در هـر میلی‌لیتر و سپس مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ فلورسنت مدل آکسیوپلن ٦[2]

١٤- تهیه عکس دیجیتال از سلول‌های میکروسپور گیاهان F_2 در متافاز میوز با ٤ فیلتـر فلورسـنت بـا دوربین کانُن پاورشات A550 و چاپ آن‌ها

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

نتایج و بحث

در دو دهه گذشته از DNA ژنومی به‌عنوان نشانگرهای سیتوژنتیکی در شناسایی ترکیبات کروموزومی نتاج به‌دست آمده از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای و بین‌جنسی در روش دورگه‌سازی DNA در محل به‌عنوان ابزاری قدرتمند در شناسایی و تمایز ساختار کروموزومی این نتاج و در جهت گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب استفاده شده است. نتایج شمارش تعداد جفت کروموزوم‌های E^b حلقوی یا میله‌ای و کروموزوم‌های منفرد با تکنیک دورگه‌سازی DNA ژنومی در محل در سلول‌های مادر دانه گرده گیاهان دورگ به‌دست آمده از تلاقی رقم گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه F_3، (Ka/b) (Cr/b) و رقم گندم امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b (جدول ۲) نشان داد که جفت نشدن کروموزوم‌های E^b و D در تقسیم میوز منجر به ناپایداری کروموزومی در متافاز اول میوز در دورگ‌های احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) شده است (شکل ۱- ی). همه کروموزوم‌های منفرد علایم نورانی قوی ناشی از وجود نشان‌گر را نشان ندادند، بنابراین همه کروموزوم‌های منفرد مربوط به ژنوم E^b نمی‌باشند (شکل ۱- و، ز پیکان رو به راست). کروموزوم‌های ژنوم‌های A و B هم در فرآیند همولوژی کروموزوم بی‌تأثیر نمی‌باشد از طرفی شاید وجود کروموزوم‌های E^b در دورگ‌های احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) منجر به ایجاد اختلال در همولوژی و همیولوژی کروموزوم‌های ژنوم‌های A و B گندم شده است که با نتایج حسنی (۱۹۹۸) مطابقت دارد. اما در نمونه‌های کروموزومی دورگ‌های F_2 احتمالی تریتی‌پایرم ثانویه به‌دست آمده از تلاقی رقم گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه F_3، (Ka/b) (Cr/b) و رقم گندم امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b همولوژی و همیولوژی کروموزومی کامل و نواحی نورانی قوی ناشی از دورگه شدن DNA ژنومی کاوش‌گر علف شور ساحل با DNA هدف در کروموزوم‌های حلقوی (شکل ۱- ب، ج) و میله‌ای (شکل ۱- الف، ح پیکان رو به پایین) مشاهده شد و کروموزوم‌های منفرد مشاهده نگردید (شکل ۱- ط، ج). جفت شدن کروموزوم‌های E^b با یکدیگر (شکل ۱- ب، ج، ک فلش رو به پایین) و با کروموزوم‌های دیگر ژنوم‌های گندم احتمالاً کروموزوم‌های ژنوم D (شکل ۱- ز، و فلش رو به پایین) می‌تواند گویای تقسیم میوز متعادل در این ژنوتیپ‌ها باشد. البته امکان جفت شدن کروموزوم‌های ژنوم‌های A، B و D گندم با کروموزوم‌های E^b بسیار کم است چون ژن ph_1 که بر روی بازوی بلند کروموزوم 5B گندم قرار گرفته از جفت شدن کروموزوم‌های گونه‌ها و جنس‌های گیاهی ممانعت می‌کند. جوهر (۱۹۹۱) با بررسی نتاج بین لاین رقم گندم لانگدون دارای جفت کروموزوم جایگزین شده

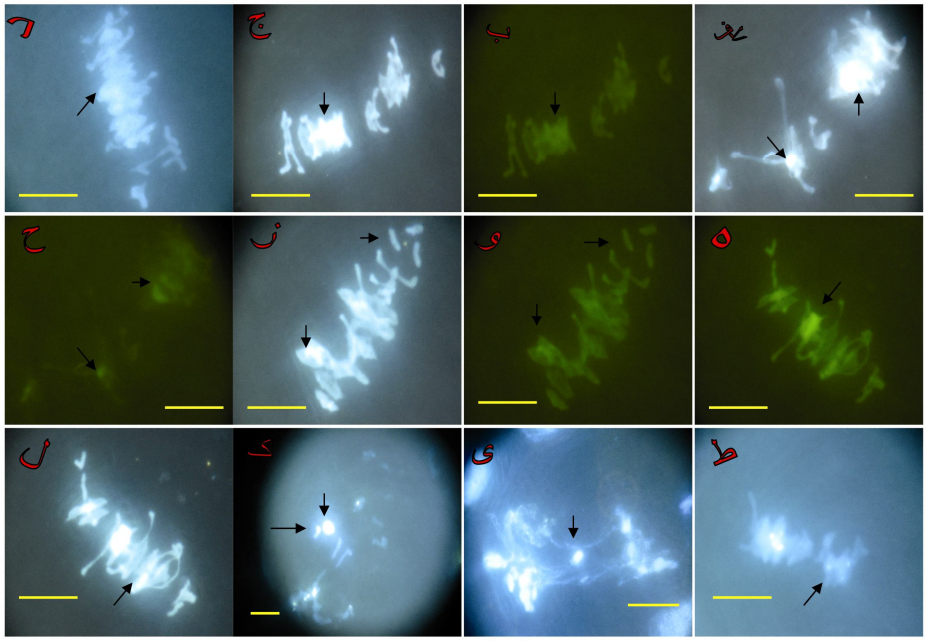
۵D به‌جای ۵B و بدون ژن ph_1 همیولوژی بالایی را بین کروموزوم‌های گندم دوروم و گونه وحشی (همیولوژی) مشاهده کردند. میزان جفت شدن کروموزوم‌های گونه وحشی و گندم دوروم در دورگ‌های بدون ژن ph_1 افزایش ۸ برابری را نسبت به دورگ‌های دارای این ژن نشان داد نتایج این مطالعه تأثیر ژن ph_1 را در جلوگیری از جفت شدن کروموزوم‌های همیولوگ تأیید کرد. اما جوهر و پیترسون (۲۰۰۶) به‌منظور انتقال صفت مقاومت به بیماری سوختگی فوزاریومی سرشاخه از گونه علف وحشی شور به گندم دوروم، اقدام به تولید دورگ‌های F_1 دارای یا بدون ژن ph_1، نتاج BC_1 و دیگر نتاج به‌دست آمده از تلاقی گندم دوروم با علف شور ساحل کرده بودند. مشخص شد که همولوژی بین کروموزوم‌های گندم دوروم و گونه وحشی در نتاج F_1 به‌دست آمده از تلاقی دو رقم تتراپلوئید و لانگدون[1] از گندم دوروم و تینوپایرم بسارابیکوم در حضور ژن ph_1، بسیار کم است. اما فعالیت ژن ph_1 گاهی اوقات تا حدی به‌وسیله ژنوتیپ والد وحشی متوقف شد بنابراین بر طبق نتایج این مطالعه در بعضی از نتاج، امکان جفت شدن کروموزوم‌های گونه وحشی و گندم دوروم وجود دارد. بنابراین احتمالاً این پژوهش نیز حضور بعضی از کروموزوم‌های E^b در ژنوم تریتی‌پایرم‌های احتمالی ثانویه (F_2) مانع از تأثیر ژن ph_1 و در نتیجه منجر به جفت شدن کروموزوم‌های ژنوم E^b با کروموزوم‌های ژنوم گندم نان شده باشد. البته امکان حذف کروموزوم ۵B و در نتیجه ژن ph_1 در بعضی از ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالی ثانویه (F_2) نیز وجود دارد. در این مطالعه تعداد کروموزوم‌های شناسایی شده از ژنوم E^b با دورگه‌سازی DNA ژنومی علف شور ساحل از ۱۰-۶ عدد و تعداد کروموزوم‌های منفرد از ٤-۰ عدد در بین ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالی ثانویه (F_2) به‌دست آمده از خودگشنی F_1 دو تلاقی رقم گندم نوید با لاین تریتی‌پایرم اولیه F_3، Ka/b × Cr/b و رقم گندم امید با لاین تریتی‌پایرم اولیه St/b متغیر بود (جدول ۲). در مرحله متافاز میوز I در سلول‌های مادر گرده یکی از ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالاً ثانویه امید × St/b (شکل ۱- ط) هیچ کروموزوم منفردی مشاهده نگردید. در این ژنوتیپ دو جفت کروموزوم حلقوی علایم نورانی قوی ناشی از اتصال کاوش‌گر ژنومی علف شور ساحل را نشان می‌دهند در نتیجه متعلق به ژنوم E^b هستند ولی بر روی بعضی از کروموزوم‌های این ژنوتیپ نقاط نورانی ضعیف‌تری مشاهده شد که نشان‌دهنده قطعات جایگزین شده از کروموزوم‌های ژنوم E^b در کروموزوم‌های ژنوم گندم رقم امید است. وجود کروموزوم‌های E^b منفرد منجر به ایجاد سه تری والنت در ژنوتیپ تریتی‌پایرم

1- Langdon

احتمالاً ثانویه نوید با (Cr/b) × (Ka/b) (شکل ۱– ه، ل) شده است. یک جفت کروموزوم به همراه یک کروموزوم منفرد با علایم نورانی قوی در ژنوتیپ تریتی‌پایرم احتمالاً ثانویه (F_2) امید × St/b مشاهده شد (شکل ۱– ک). کروموزوم‌های منفرد مشاهده شده در مرحله متافاز I میوز در این ژنوتیپ‌ها می‌تواند باعث انجام تقسیم نامتعادل میوز و تولید گرده‌های عقیم گردد. در ژنوتیپ‌های تریتی‌پایرم احتمالاً ثانویه ۴۲ کروموزومی با تعداد کروموزوم‌های E^b کم‌تر از ۱۴ به احتمال زیاد کروموزوم‌های D جایگزین کروموزوم‌های E^b شده‌اند اما در بعضی از ژنوتیپ‌های کم‌تر از ۴۲ کروموزومی، تعداد کروموزوم‌های E^b نیز کم‌تر از ۱۴ عدد بود بنابراین به احتمال زیاد کروموزوم‌های E^b از تریتی‌پایرم حذف و کروموزومی هم از ژنوم گندم جایگزین آن‌ها نشده است. دورگه‌سازی DNA ژنومی ابزاری مناسب برای شناسایی ساختار کروموزومی انواع ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی‌پایرم (F_2) با کروموزوم‌های ژنوم‌های E^b، A، B و D است. به‌طورکلی نتایج نشان داد که امکان تولید ژنوتیپ‌های متفاوت در نسل F_2 با انواعی از کروموزوم‌های E^b وجود دارد بنابراین گزینش ژنوتیپ‌های احتمالاً ثانویه مطلوب به‌ویژه ژنوتیپ‌های ثانویه‌ای از تریتی‌پایرم [$(۱''$)E^bE^b DD ($۶''$) BB ($۷''$) AA] که تنها ۵E^b آن باقی و مابقی کروموزوم‌های ژنوم E^b با همیولوگ‌های خود از ژنوم D گندم جابه‌جا شده باشند وجود دارد. برای دست‌یابی به نتایج قطعی و سلکسیون ژنوتیپ‌هایی با این خصوصیات نیاز به مطالعه جمعیت‌های F_2 بیش‌تر در تلاقی‌های متعدد دیگری از گندم با لاین‌های اولیه تریتی‌پایرم کاملاً احساس می‌شود.

جدول ۲– تعداد کروموزوم‌های ژنوم علف شور ساحل (E^b) در متافاز اول میوز سلول‌های مادر گرده ($AABBE^b_{(۰-۱۴)}$، $D_{(۰-۱۴)}$) ژنوتیپ‌های احتمالاً ثانویه تریتی‌پایرم (F_2) با دورگه سازی DNA ژنومی در محل.

ژنوتیپ‌های ثانویه تریتی‌پایرم (F_2) به‌دست آمده از خودگشنی F_1 تلاقی‌ها	تعداد گیاه	تعداد کل کروموزوم‌های ژنوتیپ	تعداد سلول مادر گرده	تعداد کروموزوم‌های منفرد	تعداد کروموزوم‌های جفت		تعداد کل کروموزوم‌های E^b	شاخص همولوژی
					حلقوی	میله‌ای		
نوید × F_3، (Cr/b) (Ka/b)	۶	۳۸–۴۲	۳۰	۰–۳ (۱/۰۸)	۱۲–۱۸ (۱۴/۵۸)	۳–۷ (۵/۰۸)	۶–۱۰ (۸/۵۸)	۸۱/۵۴
امید × St.b	۵	۳۸–۴۲	۳۵	۰–۴ (۰/۹۵)	۱۲–۱۹ (۱۶/۳۵)	۲–۷ (۵/۱۵)	۶–۷ (۶/۶۶)	۸۵/۷۱



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

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

ب- ج) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید × (Cr/b) × (Ka/b) (عکس با فیلترهای ۰۱ و ۰۹). در این تصاویر ٤ جفت کروموزوم حلقوی با علایم نورانی بسیار قوی ناشی از جفت شدن ۸ کروموزوم E^b نشان داده شده است.

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

ناشی از اتصال کاوش‌گر را نشان می‌دهد در صورتی‌که بر روی کروموزوم مقابل علایمی دیده نمی‌شود که نشان‌دهنده جفت شدن کروموزوم E^b با یکی از کروموزوم‌های ژنوم گندم است.

ه) متافاز تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید × (Cr/b) × (Ka/b) (تهیه عکس با فیلتر ۰۹). کروموزوم‌های E^b منجر به ایجاد ۳ تری‌والنت شده‌اند.

و- ز) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید × (Cr/b) × (Ka/b) (عکس با فیلترهای ۰۱ و ۰۹). ۳ کروموزوم منفرد از ژنوم گندم بدون هیچ علایم نورانی (پیکان رو به‌سمت راست) و ۲ جفت کروموزوم حلقوی با علایم نورانی در یکی از کروموزوم‌ها (پیکان رو به‌سمت پایین) مشاهده می‌شود.

ح) متافاز میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید × (Cr/b) × (Ka/b) (عکس با فیلترهای ۰۹).

ط) متافاز تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از امید × St/b (تهیه عکس با فیلتر ۰۱) دو جفت کروموزوم حلقوی علایم نورانی بسیار قوی نشان می‌دهند و بر روی نواحی سانترومری بعضی از کروموزوم‌های دیگر علایم نورانی بسیار ضعیف‌تری دیده می‌شود.

ی) آنافاز اول تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید × (Cr/b) × (Ka/b) (تهیه عکس با فیلتر ۰۱) یک جفت کروموزوم همولوگ E^b با علایم نوری بسیار قوی در وسط سلول دیده می‌شود.

ک) متافاز تقسیم میوز در لاین تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) امید× St/b (عکس با فیلتر ۰۱). یک جفت کروموزوم حلقوی (پیکان رو به‌سمت پایین) و یک کروموزوم منفرد (پیکان رو به‌سمت راست) علایم نورانی بسیار قوی را نشان می‌دهند.

ل) متافاز تقسیم میوز در سلول مادر گرده گیاه تریتی‌پایرم ثانویه (F_2) به‌دست آمده از نوید × (Cr/b) × (Ka/b) (تهیه عکس با فیلتر ۰۱).

سپاسگزاری

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

منابع

1.Aghaei, M.G., Ghavami, F. and Bozorgipour, R. 2005. A review on salty tolerated sources in wheat wild families. Novin Genetics, 2: 12-21. (In Persian)

2.Brasileiro-Vidal, A.C., Brammer, S., Puertas, M.J., Zanatta, A.C., Prestes, A., Moraes-Fernandes, M.I.B. and Guerra, M. 2005. Mitotic instability in wheat x *Thinopyrum ponticum* derivatives revealed by chromosome counting, nuclear DNA content and histone H_3 phosphorylation pattern. Plant Cell Reports, 24: 172-178.

3.Brasileiro-Vidal, A.C., Cuadrado, A., Brammer, S.P., Zanatta, A.C.A., Prestes, A.M., Moraes-Fernandes, M.I.B. and Guerra, M. 2003. Chromosome characterization in *Thinopyrum ponticum* (Triticeae, Poaceae) using *in situ* hybridization with different DNA sequences. Genetics and Molecular Biology, 26: 4. 505-510.

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

5.Dong, Y., Bu, X., Luan, Y., He, M. and Liu, B. 2004. Molecular characterization of a cryptic wheat-*Thinopyrum intermedium* translocation line: evidence for genomic instability in nascent allopolyploid and aneuploid lines. Genetics and Molecular Biology, 27: 2. 237-241.

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

7.Farooq, S., Iqbal, N., Shah, T.M. and Asghar, M. 1993. Intergeneric hybridization for wheat improvement. VII. Transfer of salt tolerance from *Thinopyrum scirpeum* into wheat. J. Gen. Breed. 47: 191-197.

8.Ferrari, M.R., Greizerstein, E.J., Paccapelo, H.A., Naranjo, C.A., Cuadrado, A., Jouve, N. and Poggio, L. 2005. The genomic composition of Tricepiro, a synthetic forage crop. Genome, 48: 154-159.

9.Gubler, U. and Hoffmann, B.J. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene, 25: 263-269.

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

11.Jauhar, P.P. 1991. Hybrid between durum wheat and diploid *Thinopyrum bessarabicum*. Genome, 34: 283-287.

12.Jauhar, P.P. and Peterson, T.S. 2006. Cytological analyses of hybrids and derivatives of hybrids between durum wheat and *Thinopyrum bessarabicum*, using multicolour fluorescent GISH. Plant Breeding, 125: 19-26.

13.Kishii, M., Wang, R. and Tsuijimoto, H. 2005. Gish analysis revealed new aspect of genomic constitution of *Thinopyrum intermedium*. Czech J. Gen. and Plant Breed. 41: 92-95.

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

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

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

The Study of chromosome constitution in secondary *Tritipyrum* genotypes (F_2) by genomic *in situ* hybridization technique (GISH)

S. Khanamani Falahati Pour[1], *H. Shahsavand Hassani[2], A. Baghizadeh[3] and S. Ghotbzadeh Kermani[4]

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

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

Abstract

To remove unfavorable traits of new cereal *Tritipyrum* (2n=6x=42, $AABBE^bE^b$), various crosses between primary *Tritipyrum* lines (female) with Iranian bread wheat varieties (2n=6x=42, AABBDD) was performed and a F_2 selfing population consisted of 1810 possible secondary *Tritipyrum* seeds (2n=6x=42, $AABBD_{(0-14)}$ $E^b_{(0-14)}$) were produced. The chromosome constitution and homology index of 11 plants of this F_2 progeny was assessed by genomic *in situ* hybridization (GISH). The results indicated that 1) without using Chinese spring DNA as a blocker differentiation between A, B, D and E^b chromosomes was impossible, 2) Secondly differentiation between A, B, D and E^b informs of single or pairs (rod or ring) chromosomes was improved by adding the preblocking hybridization step, using Chinese spring genomic DNA as probe, to normal GISH protocol. Third the E^b chromosome counts in F_2 plants showed the feasibility of selection of the so called secondary *Tritipyrum* genotypes (F_2) with different number of D and E^b chromosomes for favorable agronomic traits by genomic in situ hybridization as a powerful cytogenetic assisted marker selection (CAMS).

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

* Corresponding Author; Email: hossein212001@yahoo.com