

## تولید و مطالعه باروری هیبریدهای بین‌گونه‌ای گندم نان × آجیلوپس جنیکولاتا (*Aegilops geniculata* Roth)

زینت عبدالملکی<sup>۱</sup>، قادر میرزاقدری<sup>۲\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

۲. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴

### چکیده

*Aegilops geniculata* گونه‌ای تتراپلوئید با فرمول ژنومی  $M^8M^8U^8U^8$  دارای صفات مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده بوده که از طریق تلاقی قابل انتقال به گندم است. در این تحقیق سه رقم گندم نان 'نوید'، 'امید' و 'زرین' با دو ژنوتیپ ۳۸۶ و ۳۸۷ گونه *Ae. geniculata* تلاقی داده شدند. تلاقی‌پذیری هیبریدهای حاصل (نسل  $F_1$ ) از ۱۱/۹۳ درصد (در هیبریدهای زرین × *Ae. geniculata* '387') تا ۴۸/۲۵ درصد (در هیبریدهای نوید × *Ae. geniculata* '386') متغیر بود. تعدادی از گیاهچه‌های هیبرید با کلشی‌سین تیمار شدند که همگی بذر تولید کردند و با هیبریدهای تیمار نشده با کلشی‌سین مورد مقایسه قرار گرفتند. هیبریدهای تیمار نشده با کلشی‌سین غیر از هیبرید زرین × *Ae. geniculata* نیز بذر  $F_2$  (آمی‌پلوئید) تولید کردند. الگوی جفت‌شدگی کروموزوم‌ها در متافاز I میوز گیاهان  $F_1$  عمدتاً یونی‌والنت و به‌ندرت بی‌والنت‌های میله‌ای بودند. تعداد کروموزوم‌ها در سلول‌های متافازی نوک ریشه نمونه‌ای از بذور  $F_2$  از ۴۵ تا ۶۵ متغیر بود. روش دورگه‌سازی فلورسنت در محل با کاوشگرهای  $(GAA)_{10}$  و  $pTa535-1$  توانست کروموزوم‌های گندم و *Ae. geniculata* را در بذور  $F_2$  شناسایی کند.

کلیدواژگان: آمی‌پلوئید، باروری، تلاقی بین‌گونه‌ای، دورگه‌سازی فلورسنت در محل (FISH)

## مقدمه

کوموسا<sup>۳</sup> به وجود آمده است لذا تتراپلوئید و دارای فرمول ژنومی  $U^8U^8M^8M^8$  می‌باشد. این گونه پراکنش وسیعی داشته و بومی مدیترانه، شرق میانه و بخش‌های جنوبی روسیه و اوکراین است (Wang *et al.*, 2015). از میان جنس‌های آجیلوپس گونه *Ae. geniculata* دارای صفات زراعی مفید مانند توانایی سازگاری خوب به وضعیت‌های اقلیمی مختلف به‌ویژه خشکی بوده (Molnár *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2008)، محتوای پروتئین، آهن و روی بالایی در دانه داشته و دارای رشد سریع است (Rawat *et al.*, 2009). از این گونه برای انتقال مقاومت به تنش‌های مختلف زنده و غیرزنده به گندم استفاده شده است (Zaharieva *et al.*, 2001b). صفاتی چون مقاومت به سفیدک پودری، مقاومت به زنگ زرد و زیر واحد گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-Gc) (Wang *et al.*, 2015) و ژن مقاوم به زنگ ساقه *Sr53* مشتق شده از بازوی بلند کروموزوم 5Mg (Liu *et al.*, 2011) و یک عامل گامت‌کش (*Gc*) روی کروموزوم 4Mg در *Ae. geniculata* شناسایی و گزارش شده است (Kynast *et al.*, 2000). هدف این تحقیق، ایجاد هیبریدها و آمفی‌پلوئیدهای بین‌گونه‌ای از تلاقی گونه‌ی *Ae. geniculata* با ارقام مختلف گندم نان و مطالعه باروری در آنها است.

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی و تولید هیبریدها

در این بررسی سه رقم مختلف گندم نان به نام‌های امید، زرین و نوید در قالب یک طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار به همراه دو نمونه *Ae. geniculata* '386' و '387' در پاییز سال ۱۳۹۳ کشت شدند. در بهار، بعد از خوشه‌دهی و در مرحله مناسب، سنبله‌ها اخته و پاکت‌گذاری شدند و در زمان پرورش شدن مادگی (کلاله کرک‌دار آماده پذیرش گرده) با استفاده از گرده *Ae. geniculata* گرده‌افشانی انجام شد.

گندم مهم‌ترین گیاه زراعی است که روند افزایش عملکرد آن به پای روند افزایش جمعیت نمی‌رسد به گونه‌ای که افزایش ۱/۱ درصدی تولید سالانه گندم در جهان کفاف نیاز جمعیت با رشد سالانه ۱/۷ درصد را تا سال ۲۰۵۰ نخواهد کرد (Rosegrant and Agcaoili, 2010). تنش‌هایی مانند آفات، بیماری‌ها، خشکی، گرما و شوری عملکرد گندم را به طور قابل ملاحظه‌ای محدود کرده‌اند (Zaharieva *et al.*, 2001a). اقتصادی‌ترین روش جهت کاهش خسارت تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گندم به‌کارگیری ژنوم گونه‌های خویشاوند مقاوم است (Kuraparthi *et al.*, 2007). این امر از طریق تلاقی گندم با گونه‌های خویشاوند امکان‌پذیر است (Jauhar and Chibbar, 1999). اولین قدم در این راستا تولید هیبریدهای بین جنسی و بین‌گونه‌ای<sup>۱</sup> است (Schneider *et al.*, 2008). هیبریدهای بین‌گونه‌ای به‌عنوان پلی در انتقال ژن‌های مفید از گونه‌های وحشی به گیاهان زراعی عمل می‌کنند (Benavente *et al.*, 2001). گونه‌های جنس آجیلوپس رابطه خویشاوندی نزدیک با جنس تریتیکوم دارند و منابع مهمی برای بهبود ژنتیکی گندم هستند و ژن‌های مفید این جنس می‌توانند از طریق تلاقی بین‌گونه‌ای به ژنوم گندم وارد شوند (Schneider *et al.*, 2008). تعداد زیادی از گونه‌های گندم و آجیلوپس پلی‌پلوئید بوده و طی تلاقی طبیعی در طبیعت و به وسیله امتزاج گامت‌های کاهش‌نیافته به وجود آمده‌اند. هم‌چنین تعداد زیادی از هیبریدهای تریتیکوم-آجیلوپس و آجیلوپس-تریتیکوم به‌صورت مصنوعی تولید شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ozkan and Feldman, 2001). در جنس آجیلوپس یازده گونه دیپلوئید، ده گونه تتراپلوئید و دو گونه هگزاپلوئید وجود دارند که ژنوم این گونه‌ها متنوع بوده و شامل D، S، U، C، N و M و یا ترکیبی از آنها است (Van-Slageren, 1994). به دلیل خویشاوندی نزدیک بین گندم و گونه‌های آجیلوپس، تلاقی بین این دو جنس اغلب به‌طور طبیعی امکان‌پذیر است.

*Aegilops geniculata* یکی از گونه‌های خودبارور و یک‌ساله در جنس آجیلوپس است (Bandou *et al.*, 2009) که از تلاقی گونه‌های دیپلوئید آجیلوپس آمبلولا<sup>۲</sup> و آجیلوپس

<sup>۱</sup> Interspecific<sup>۲</sup> *Ae. umbellulata* Zhuk. ( $2n = 2x = 14$ ; UU)<sup>۳</sup> *Ae. comosa* Sm. in Sibth et Sm. ( $2n = 2x = 14$ ; MM)

### بررسی میوز در گیاهان F<sub>1</sub>

خوشه‌های مناسب در مرحله‌ای که سلول‌های مادر گرده در حال تقسیم میوز هستند، جمع‌آوری و بلافاصله داخل محلول تثبیت‌کننده کارنوی ۱ (ترکیب اتانول و اسید استیک به نسبت سه به یک حجمی) حداقل به مدت یک روز قرار گرفتند. بساک‌های تثبیت‌شده جداسازی شده و روی لام حاوی چند قطره رنگ کارمن قرار داده شدند و به روش له کردن، از آن‌ها اسلاید تهیه و اسلایدها به وسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند.

### الفای دابل‌هاپلوئیدی در بذرها F<sub>1</sub>

بذرها هیبرید در داخل ۱۰ عدد پتری‌دیش حاوی کاغذ جوانه‌زنی کشت شدند و بعد از تشکیل گیاهچه به طول ۲ تا ۳ سانتی‌متر، به نصف پتری‌دیش‌ها، ۵ میلی‌لیتر (در هر پتری‌دیش) محلول کلشی‌سین ۵ میلی‌مولار در دمای اتاق و در روشنایی افزوده شد. گیاهچه به مدت ۴ ساعت با کلشی‌سین تیمار و سپس به مدت ۵ دقیقه با آب شیر شسته شده و به همراه گیاهچه‌های شاهد در نهایت در گلدان‌های جداگانه کشت شدند. گیاهچه‌ها بعد از دو هفته در پاییز به مزرعه منتقل شدند تا اثر کلشی‌سین بر روی باروری هیبریدهای حاصل در بهار از با مشاهده میزان بذردهی بررسی شود.

### فعالیت دانه‌گرده در هیبریدهای F<sub>1</sub>

برای بررسی فعال‌بودن دانه‌های گرده در گیاهان F<sub>1</sub> حاصل از تلاقی گندم‌های نان با *Ae. geniculata*، در زمانی که خوشه‌ها به‌طور کامل ظاهر و پرچم‌ها از گلچه بیرون آمدند، پرچم‌های رسیده و زردرنگ به کمک پنس جدا و به‌طور جداگانه داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی محلول تثبیت‌کننده کارنوی I (اتانول و اسید استیک به نسبت سه به یک) تثبیت شدند. هر پرچم بر روی یک اسلاید شیشه‌ای قرار داده شد و دانه‌های گرده با استفاده از ۷ میکرولیتر رنگ الکساندر (۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۰/۹۶، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مالاکایت گرین، ۵۰ میلی‌لیتر آب

مقطر، ۲۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ فوشین اسیدی، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول Orange G ۰/۱ که در آب مقطر تهیه شده است، ۳۰۰ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال) رنگ‌آمیزی و لامل اعمال شد (Peterson *et al.*, 2010). اسلایدها با میکروسکوپ نوری بررسی شده و نسبت دانه‌های گرده رنگ‌پذیر و توپر (دانه‌های گرده فعال) محاسبه گردید.

### تلاقی پذیری

تعداد بذرها تشکیل شده به ازای تعداد گلچه‌های اخته و تلاقی داده‌شده به‌عنوان تلاقی‌پذیری در هر کدام از خوشه‌ها اندازه‌گیری شد.

### تهیه اسلایدهای کروموزومی

بذرها آمفی‌پلوئید در پتری‌دیش در تاریکی و دمای اتاق کشت شده و وقتی که طول ریشه‌ها به یک تا ۱/۵ سانتی‌متر رسید، بریده شده و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در یخ درون یخچال قرار داده شدند. ریشه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در اسید استیک ۹۰ درصد سرد (روی یخ) تثبیت شدند و سپس از ریشه‌های تثبیت‌شده، به روش هضم آنزیمی اسلاید تهیه شد. به این ترتیب که از هر ژنوتیپ دو ریشه به مدت ۲۰ دقیقه در آب مقطر درون تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری واقع روی یخ شسته شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه به بافر سترات ۱× (اسید سیتریک ۰/۱ مولار و سترات سدیم ۰/۱<sup>۴</sup> مولار دارای ۴/۶، pH ۴/۳) درون تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری بر روی یخ منتقل شد. مریستم‌ها جدا شده و در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی (۷ میلی‌گرم سلولاز<sup>۴</sup>، ۱۰ میلی‌گرم سایتوهلیکاز<sup>۵</sup> و ۱۰ میلی‌گرم پکتولیاژ<sup>۶</sup> در ۱۰ میلی‌لیتر بافر سترات 1×) به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از هضم، آنزیم حذف شد و مریستم‌ها دو بار، هر بار به مدت ۱۰ دقیقه درون بافر سترات 1× و سپس به مدت ۵ دقیقه با اتانول ۹۶ درصد به آرامی شسته شدند. برای تهیه‌ی سوسپانسیون

<sup>1</sup> Squashing

<sup>2</sup> Malachite green oxalate salt

<sup>3</sup> Acid Fuchsin

<sup>4</sup> Tri-Natriumcitrat-5,5-hydrate (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 5.5 H<sub>2</sub>O)

<sup>5</sup> Cellulase, Merck 219466

<sup>6</sup> Cytohelicase, Sigma C8274

<sup>7</sup> Pectolyase, Sigma P3026

غلظت یک میکروگرم در میکرولیتر محلول  $1 \times TE$  و یک میکرولیتر از هر کدام از کاوشگرهای  $(GAA)_{10}$  و pTa535-1 به عنوان محلول دورگه‌سازی با هم ترکیب و روی محدوده‌ی سلول‌ها در سطح هر اسلاید که از قبل تهیه شده بودند، اضافه شد و لامل روی هر آن‌ها قرار داده شد. جهت جلوگیری از تبخیر محلول دورگه‌سازی در طی واسرشت‌سازی و دورگه‌سازی دور لامل با چسب قطره‌ای بسته شد. برای واسرشته شدن DNA کروموزومی، اسلاید به مدت دو دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار گرفت. در مرحله بعد به منظور هیبرید شدن کاوشگر با DNA کروموزوم‌ها، اسلایدها به درون محفظه مرطوب و تاریک منتقل شده و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس چسب اطراف لامل با پنس برداشته شد و اسلاید در محلول  $2 \times SSC$  با دمای اتاق قرار گرفت تا لامل جدا شود. اسلاید در محلول  $2 \times SSC$  با دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه شسته شد و سپس با سری‌های اتانول ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت پنج دقیقه آبیگری و در دمای اتاق خشک گردید.

### تصویربرداری

جهت تصویربرداری، مقدار هفت میکرولیتر محلول آنتی‌فید<sup>۱</sup> حاوی رنگ دپی<sup>۲</sup> در محدوده‌ی سلولی قرار گرفته و لامل گذاشته شد. اسلایدها با میکروسکوپ الیپس BX51 فلورسنت مجهز به دوربین DP72 و با طول موج‌های مناسب بررسی و از سلول‌های مناسب عکس‌برداری به عمل آمد. کاوشگر نشان‌دار شده با TAMRA با استفاده از فیلتر مناسب در میکروسکوپ فلورسنت، در اثر تابش نور با طول موج ۵۵۵ نانومتر به رنگ قرمز و FAM در اثر تابش نور با طول موج ۴۹۴ نانومتر به رنگ سبز دیده می‌شود. عکس‌های گرفته شده از رنگ زمینه دپی و نشانگرها با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ (Adobe Photoshop 2015) با یکدیگر ادغام شدند.

پروتوپلاست‌ها از مریستم‌ها، اتانول حذف و ۶۰ میکرولیتر محلول اسید استیک و متانول (به ترتیب به نسبت ۸ به ۲) به تیوب اضافه شد. مریستم‌ها به کمک سوزن خرد شدند تا سوسپانسیون یکنواختی از سلول‌ها به دست آید. اسلایدهای شسته شده با اتانول درون محفظه مرطوب با رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد قرار داده شده و مقدار ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری روی هر اسلاید چکانیده شد. اسلایدها بعد از خشک شدن، توسط میکروسکوپ بررسی شدند تا از وجود سلول‌های متافازی مناسب دارای کروموزوم‌های پخش‌شده اطمینان حاصل شود. اسلایدهای مناسب در اتانول ۹۶ درصد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام FISH نگهداری شدند.

### کاوشگرهای مورد استفاده

در این تحقیق از دو الیگونوکلئوتید  $(GAA)_{10}$  و pTa535-1 به عنوان کاوشگر استفاده شد. الیگونوکلئوتید  $(GAA)_{10}$  در انتهای ۵' توسط FAM و توالی pTa535-1 در انتهای ۵' توسط TAMRA<sup>۲</sup> نشان‌دار شده بودند. این کاوشگرها به صورت لیوفیلیزه از شرکت فزاپژوه دریافت و تا غلظت ۵ پیکومول در میکرولیتر با محلول  $1 \times TE$  رقیق شدند.

### دورگه‌سازی

جهت تثبیت کروموزوم‌ها روی سطح اسلاید، اسلایدها به مدت ۱۰ دقیقه درون محلول پارافرمالدئید ۴ درصد (۷/۴ pH) قرار داده شدند. سپس دو بار هر بار به مدت ۵ دقیقه درون محلول  $2 \times SSC$  (۱۷/۵۳) گرم کلرید سدیم و ۱۰/۷۲ گرم تری‌سدیم سیترات در یک لیتر آب) شسته شدند و در سری‌های اتانول ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد هر کدام به مدت سه دقیقه آبیگری و در نهایت در دمای اتاق خشک شدند. مقدار ۱۸ میکرولیتر محلول DS20 (۲ گرم دکستران سولفات، ۵ میلی‌لیتر فرمامید، یک میلی‌لیتر محلول  $20 \times SSC$ ، ۰/۱۵ میلی‌لیتر SDS ۱۰٪ و ۳/۸۵ میلی‌لیتر آب مقطر که به کمک ورتکس در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد حل شده بود)، ۰/۵ میکرولیتر DNA ماهی سالمون<sup>۳</sup> (با

<sup>1</sup> 6-carboxyfluorescein

<sup>2</sup> 6-carboxytetramethylrhodamin

<sup>3</sup> Salmon sperm DNA solution

<sup>2</sup> Antifade solution

<sup>3</sup> 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)

<sup>6</sup> Excitation

## نتایج و بحث

## تلاقی پذیری

در مجموع ۱۲۱ خوشه از سه رقم گندم با دو ژنوتیپ ۳۸۶ و ۳۸۷ *Ae. geniculata* تلاقی داده شد و ۵۵۴ بذر به دست آمد که نتایج آن به تفکیک در جدول ۱ آمده است. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی اختلاف معنی‌داری را در میزان تلاقی‌پذیری بین تلاقی‌های مختلف

نشان داد. میانگین کل دانه نسبت به گلچه‌ی گرده‌افشانی شده (تلاقی‌پذیری) ۲۹/۶۴ درصد بود. بیش‌ترین تلاقی-پذیری با ۴۸/۲۵ درصد مربوط به تلاقی نوید با ژنوتیپ *Ae. geniculata* '386' و کم‌ترین تلاقی‌پذیری با ۱۱/۹۳ درصد مربوط به تلاقی زرین با ژنوتیپ *Ae. geniculata* '387' بود (جدول ۱). بذرهاى F<sub>1</sub> با وجود ظاهری چروکیده با درصد جوانه‌زنی ۱۰۰ درصد سالم و زنده بودند.

جدول ۱- نتایج تلاقی ارقام مختلف گندم نان (والد ماده) با دو ژنوتیپ *Ae. geniculata*

تلاقی‌پذیری*	تعداد بذر F <sub>1</sub> حاصل	تعداد گلچه گرده‌افشانی شده	تعداد خوشه تلاقی داده شده	تلاقی‌ها
٪۴۴/۴۸ <sup>ab</sup>	۱۲۹	۲۹۰	۱۹	گندم نوید × <i>Ae. geniculata</i> '387'
٪۴۸/۲۵ <sup>a</sup>	۱۵۲	۳۱۵	۲۰	گندم نوید × <i>Ae. geniculata</i> '386'
٪۲۶/۱ <sup>abc</sup>	۸۹	۳۴۱	۲۲	گندم امید × <i>Ae. geniculata</i> '387'
٪۲۶ <sup>abc</sup>	۷۶	۲۹۰	۲۰	گندم امید × <i>Ae. geniculata</i> '386'
٪۱۱/۹۳ <sup>c</sup>	۳۹	۳۲۷	۲۱	گندم زرین × <i>Ae. geniculata</i> '387'
٪۲۱/۰۳ <sup>bc</sup>	۶۹	۳۲۸	۱۹	گندم زرین × <i>Ae. geniculata</i> '386'
-	۵۵۴	۱۸۱۹	۱۲۱	جمع
٪۲۹/۶۴	۹۲/۳۳	۳۰۳/۱۶	۲۰/۱۶	میانگین

جدول ۲- فراوانی بذر حاصل از خود گرده‌افشانی در هیبریدهای مختلف (نسل دوم)

مقایسه‌ی هیبریدهای تیمار شده با کلشی‌سین با شاهد (تیمار نشده با کلشی‌سین)

هیبریدها	تعداد پنجه بررسی شده (تعداد بوته)		تعداد گلچه		درصد دانه‌ی گرده‌ی فعال		تعداد بذر F <sub>2</sub> حاصل		نسبت بذر به گلچه	
	تیمار شده*	تیمار نشده	تیمار شده	تیمار نشده	تیمار شده	تیمار نشده	تیمار شده	تیمار نشده		
گندم نوید × <i>Ae. geniculata</i> '387'	۵)۷۶	(۱۴)۲۴۸	۴۸۴	۲۳۰۴	-	۰/۴۴	۱۶	۳۶	۳/۳۰	۱/۵۶
گندم نوید × <i>Ae. geniculata</i> '386'	۵)۲۴۷	(۱۲)۴۳۷	۱۸۸۹	۲۹۲۶	-	۰/۱۲	۴۴	۵۷	۲/۳۲	۱/۹۴
گندم امید × <i>Ae. geniculata</i> '387'	۵)۶	(۱۵)۱۲۵	۴۴۴	۸۰۶	-	۰/۸۵	۴	۳	۰/۹۰	۰/۳۷
گندم امید × <i>Ae. geniculata</i> '386'	(۴)۱۰	(۱۶)۴۷۸	۶۵	۲۷۱۰	-	۱/۴۴	۲	۷۰	۳/۰۷	۲/۵۸
گندم زرین × <i>Ae. geniculata</i> '387'	-	(۵)۲۱	-	۱۲۴	-	۲/۳۵	-	۰	-	۰
گندم زرین × <i>Ae. geniculata</i> '386'	-	(۸)۲۳	-	۱۵۴	-	۰/۷۵	-	۰	-	۰
جمع	(۱۹)۳۳۹	(۷۰)۱۳۳۲	۲۸۸۲	۹۰۲۴	-	۵/۹۵	۶۶	۱۶۶	۹/۵۹	۶/۴۵
میانگین	(۵)۸۴/۷۵	(۱۱/۶۶)۲۲۲	۷۲۰/۵	۱۵۰۴	-	۰/۹۹	۱۶/۵	۲۷/۶۶	۲/۲۹	۱/۰۷

اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده تعداد بوته می‌باشد.

\*: تیمار شده با محلول کلشی‌سین

باروری هیبریدهای F<sub>2</sub>

باروری هیبریدهای F<sub>1</sub> (در اثر خود گرده‌افشانی) در دامنه بین ۱۱/۹۳ درصد برای *Zarin* × *Ae. geniculata* '387' تا ۴۸/۲۵ درصد برای *Navid* × *Ae. geniculata* '387' و با میانگین ۲۹/۶۴ درصد بود (جدول ۲). اختلاف معنی‌داری بین بذرهاى تولیدشده توسط هیبریدهای مختلف F<sub>1</sub> مشاهده شد ( $\chi^2 = 23$ ; P-value < 0.001). بیش‌ترین بذر هیبرید F<sub>2</sub> تولیدشده مربوط به هیبرید *Navid* × *Ae.*

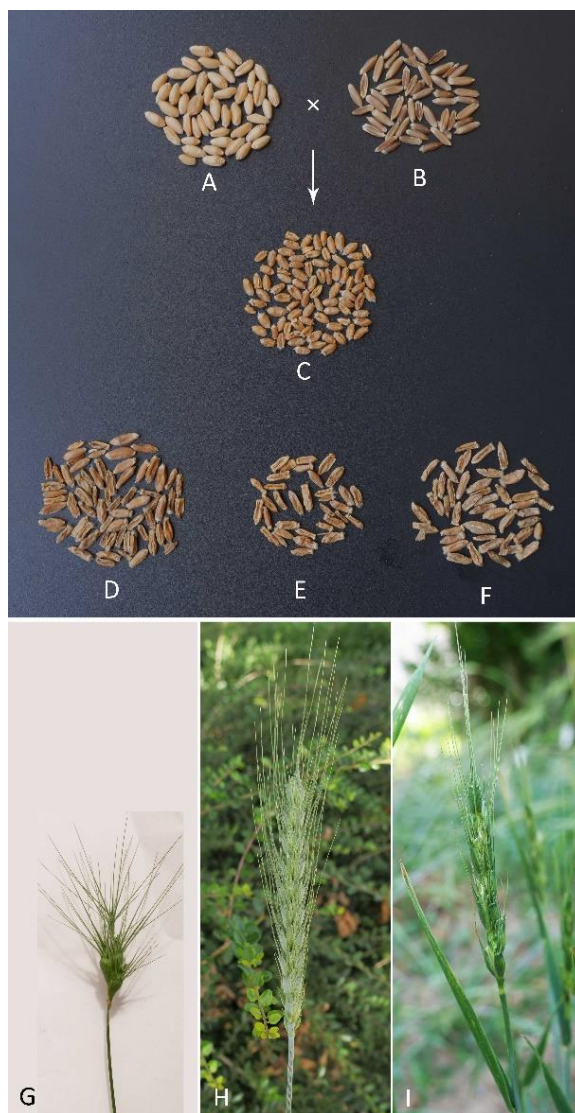
'386' *geniculata*، درحالی‌که هیبرید *Zarin* × *Ae.* *geniculata* عقیم بود و هیچ بذری تولید نکرد. درصد جوانه‌زنی بذور F<sub>2</sub> در حدود ۸۷٪ بود.

## القای پلی‌پلوئیدی

به‌منظور دو برابر کردن کروموزوم‌ها، تعداد ۱۹ گیاهچه F<sub>1</sub> (۵ بذر از هر چهار تلاقی) با کلشی‌سین ۵ میلی‌مولار تیمار شدند و سپس به گلدان و بعد در مرحله‌ی ۲ الی ۳ برگی

نشان داد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین القای پلی‌پلوئید با محلول کلشی‌سین و القای پلی‌پلوئیدی به‌واسطه گامت‌های کاهش‌نیافته (عدم لقای کلشی‌سین) وجود نداشت (جدول ۲).

به مزرعه انتقال یافتند. از ۳۳۹ خوشه‌ی بررسی‌شده ۶۶ بذر به دست آمد. بیش‌ترین بذر تولیدشده مربوط به هیبرید حاصل از تلاقی رقم نوید در '386' *Ae. geniculata* با تعداد ۴۴ بذر و کم‌ترین آن مربوط به هیبرید رقم امید در ژنوتیپ F<sub>2</sub> ۳۸۶ با دو بذر بود. بررسی نسبت بذردهی در گیاهان



شکل ۱- بذور گیاهان والدی گندم نوید (A) و '387' *Ae. geniculata* (B)، بذور F<sub>1</sub> حاصل از تلاقی نوید و '387' *Ae. geniculata* (C) و بذور F<sub>2</sub> حاصل از خودباروری هیبرید گندم نوید و '386' *Ae. geniculata* (D)، بذور F<sub>2</sub> حاصل از خودباروری هیبرید گندم نوید و '387' *Ae. geniculata* (E) و بذور F<sub>2</sub> حاصل از خودباروری هیبرید گندم امید و '386' *Ae. geniculata* (F)، خوشه '387' *Ae. geniculata* (G)، خوشه گندم نوید (H)، خوشه هیبرید حاصل از گندم نوید و '387' *Ae. geniculata* (I)

بودند و دو نوع صاف و چروکیده داشتند اما نسبت به بذورهای والدی درشت‌تر بودند (شکل ۱. D-F). ارتفاع بوته‌های F<sub>1</sub> و F<sub>2</sub> در حد واسط والدین بودند (شکل ۱. G-

### شکل ظاهری هیبریدها

بذورهای هیبرید ظاهری ریز و چروکیده تا کاملاً صاف داشتند (شکل ۱. C) و بذورهای هیبرید نسل دوم درشت‌تر

در حالت عدم تیمار با کلشی سین نسبت به سایر هیبریدها دانه گرده فعال بیشتری تولید کردند. بیش‌ترین میزان نسبت دانه گرده فعال مربوط به هیبرید گندم نوید × *Ae. geniculata* '387' بود. این در حالی است که در بین هیبریدهای مختلف از نظر تعداد بذر تشکیل‌شده اختلاف معنی‌دار وجود نداشت.

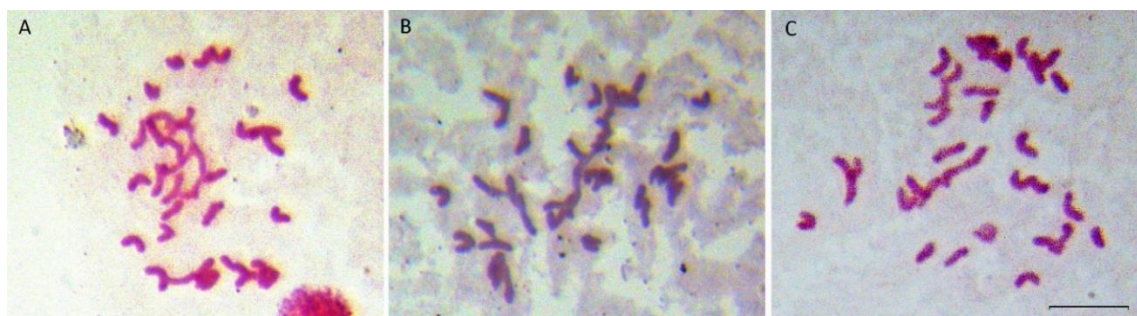
### بررسی‌های میوزی

سلول‌های مادر گرده بررسی‌شده در دو هیبرید  $F_1$  مربوط به گندم امید در '*Ae. geniculata* '386' و گندم نوید × *Ae. geniculata* '387' نشان داد که تعداد ۳۵ کروموزوم در هیبریدهای مربوطه اکثراً به‌صورت یونی‌والنت و در برخی موارد به‌صورت بی‌والنت‌های میله‌ای وجود دارند (شکل ۲).

I). وجود ساقه‌های پرزدار و دارای رگه‌های ارغوانی روی ساقه، گوشوارک‌های ارغوانی و گلوم بسیار سخت از ویژگی‌های دیگر هیبریدها بود.

### فراوانی دانه‌ی گرده‌ی فعال

نسبت فراوانی دانه‌های گرده فعال مربوط به هر یک از شش هیبرید در جدول ۲ نشان داده شده است. نسبت دانه‌های گرده فعال هیبریدها از ۰/۰۰۱۷ (در هیبرید رقم نوید × *Ae. geniculata* '386') تا ۰/۰۱۶۷ (در هیبرید رقم امید × *Ae. geniculata* '387') متغیر بود. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها تفاوت معنی‌داری را بین فراوانی دانه‌ی گرده فعال هیبریدها نشان داد به‌طوری‌که هیبریدهای گندم امید × '*Ae. geniculata* '386' و گندم زرین × '*Ae. geniculata* '387'



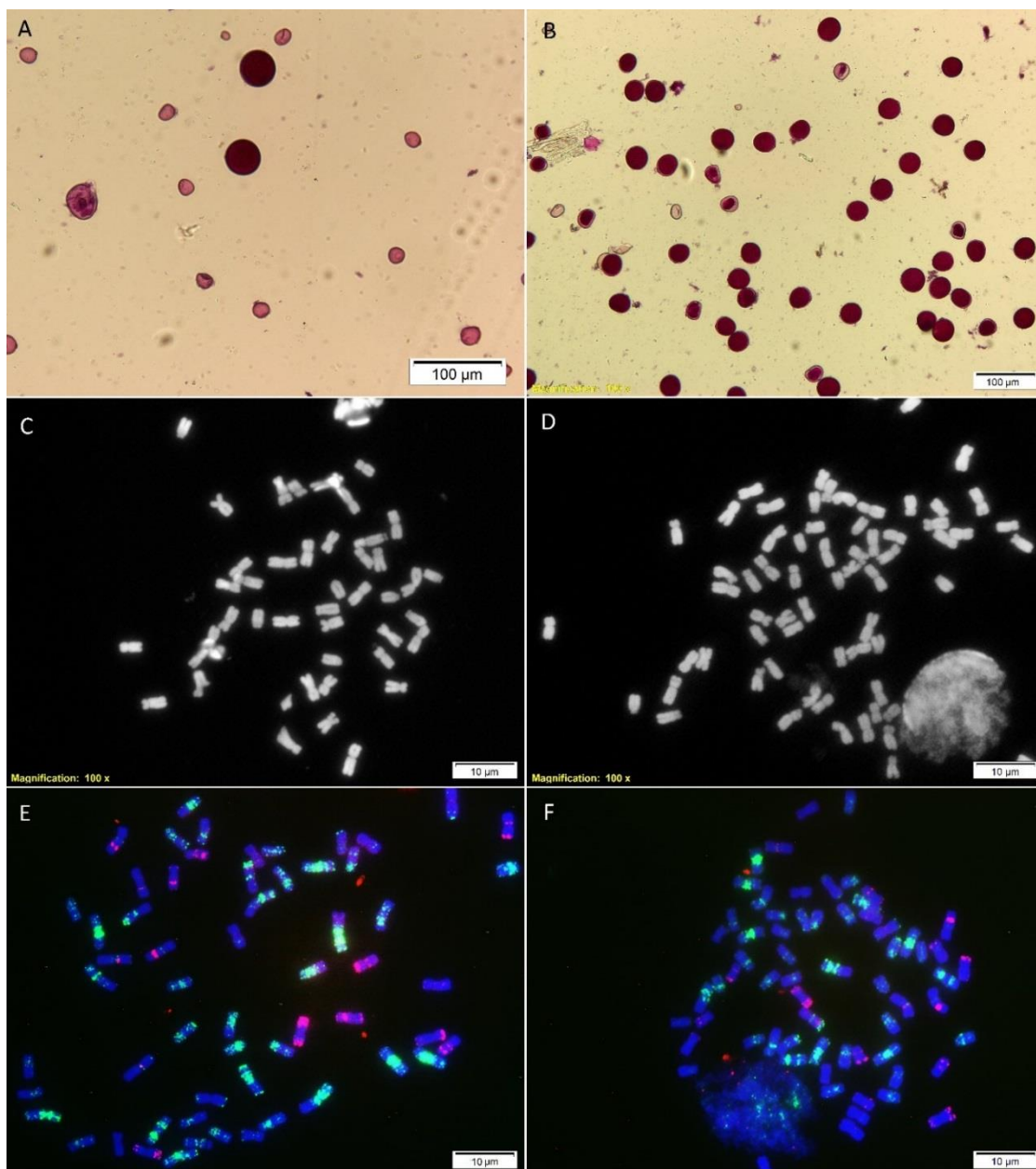
شکل ۲- A، B و C: متافاز I میوز در سلول‌های مادر میکروسپور در هیبرید نوید × '*Ae. geniculata* '387'. تعداد ۳۵ کروموزوم در هیبرید مربوطه اکثراً به‌صورت یونی‌والنت و در برخی موارد به‌صورت بی‌والنت‌های میله‌ای مشاهده شدند (طول خط مقیاس در هر سه تصویر ۱۰ μm است)

ژنوم‌های مختلف را شناسایی کرد. همچنین تعداد کروموزوم‌ها در هیبریدها مشخص شدند. بعد از فیش توسط کاوشگرهای pTa535-1 (قرمز) و (GAA)<sub>10</sub> (سبز)، کروموزوم‌های گونه *Ae. geniculata* با باندهای قرمز حاصل از کاوشگر pTa535-1 قابل تشخیص هستند و کروموزوم‌های ژنوم B گندم عمدتاً با باندهای سبز پررنگ (در مجاور سانترومرها) حاصل از توالی ریزماهواره‌ای (GAA)<sub>10</sub> نشان‌دار شدند (شکل ۳).

### بررسی‌های میتوزی

در بررسی تعداد ۱۰ سلول تصادفی از هیبرید نوید در *Ae. geniculata* '387'. تعداد کروموزوم‌های سلول‌های متافازی (مربوط به نوک ریشه) در نسل  $F_2$  بذرهای آمفی‌پلوئید از ۴۵ تا ۶۵ متغیر بودند. روش فیش روی سلول‌های متافازی آمفی‌پلوئید نوید در '*Ae. geniculata* '387' با استفاده از کاوشگرهای (GAA)<sub>10</sub> و pTa535-1، کروموزوم‌های





شکل ۳- A و B به ترتیب دانه‌های گرده در هیبرید  $F_1$  حاصل از تلاقی گندم نان رقم نوید '387' *Ae. geniculata* و دانه‌های گرده در آمفی‌پلوئید حاصل از تلاقی نوید با '387' *Ae. geniculata* با مقیاس ۱۰۰ میکرومتر. دانه‌های گرده فعال به صورت توپر و رنگ‌پذیر و دانه‌های گرده غیرفعال به صورت کم‌رنگ و کوچک‌تر نمایان می‌باشند. C و D کروموزوم‌های متافازی میتوزی در سلول مریستمی نوک ریشه بذر  $F_2$  حاصل از تلاقی ( *T. aestivum* 'Navid'  $\times$  *Ae.* ) و E و F بعد از فیش توسط کاوشگرهای pTa535-1 (قرمز) و  $(GAA)_{10}$  (سبز). طول خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر

دیگری این نسبت ۰/۳۱ درصد تخمین زده شد (Loureiro *et al.*, 2007). اما در تحقیق دیگری این نسبت کمتر (۰/۱۹ درصد) به دست آمد (Loureiro *et al.*, 2006). لوریرو و همکاران از خودگرده‌افشانی هیبرید حاصل از تلاقی *Ae. geniculata* و گندم، یک بذر از ۲۰ گیاه به دست آوردند (Loureiro *et al.*, 2007). این در حالی است که برخی محققین نیز عقیمی کامل در هیبریدهای بین *Ae.*

به جز در تلاقی بین رقم امید با دو ژنوتیپ مختلف *Ae. geniculata* که از نظر تلاقی‌پذیری باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند، در بین هیبریدهای دیگر از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. اختلاف در تلاقی‌پذیری بین ارقام مختلف گندم و ژنوتیپ‌های مختلف آجیلوپس، قابل انتظار است. متوسط تلاقی‌پذیری یا نسبت بذر به گل‌چه‌های گرده‌افشانی شده ۲۹/۶۴ درصد محاسبه شد. در تحقیق



در نسبت ۸ درصد (دانه به سنبلچه) به دست آمد که این نسبت می‌تواند تا ۲۲ درصد با ژنوتیپ‌های دیگر گندم نیز افزایش یابد (Loureiro *et al.*, 2006). اگرچه تولید آمفی‌پلوئید مستلزم تلاقی برگشتی هیبریدهای  $F_1$  با یکی از والدین است، اما تولید آمفی‌پلوئید بدون تلاقی برگشتی نیز در موارد متعددی گزارش شده است. در تحقیق حاضر با توجه به تشکیل دانه‌های گرده‌ی فعال در هیبریدهای  $F_1$  تشکیل بذور  $F_2$  قابل انتظار بود، میزان باروری بوته‌های نسل اول در کشت پاییزه ۰/۰۱۵ به دست آمد و این نسبت برای کشت بهار که تنها از دو هیبرید نوید در دو ژنوتیپ *Ae. geniculata* به دست آمد ۰/۰۰۳ بود؛ در تحقیقات قبلی بذور  $F_2$  حاصل از تلاقی بین *Ae. geniculata* و گندم در شرایط گلخانه (سه بذور از ۲۵ گیاه هیبرید) تولید شده است (Loureiro *et al.*, 2007). فراوانی بالایی از آمفی‌پلوئیدی خودبه‌خودی نیز بین گندم تورژیدوم و *Ae. geniculata* گزارش شده است (David *et al.*, 2004). جفت‌شدن بین ژنوم‌های MU از جنس آجیلوپس با ژنوم‌های AD از گندم در میوز آمفی‌پلوئید گندم × *Ae. geniculata* مشاهده شده است (David *et al.*, 2004) و این می‌تواند باروری این آمفی‌پلوئید را تأیید کند. این پلی‌پلوئیدی ممکن است از طریق مضاعف‌شدن کروموزوم‌های سوماتیکی و یا از طریق تشکیل گامت‌های کاهش‌نیافته (گامت‌های  $2n$ ) تشکیل شود (Tayalé and Parisod, 2013). تولید گامت  $2n$  طی میوز یک پدیده‌ی معمول در هیبریداسیون بین‌گونه‌ای گیاهان به حساب می‌آید (Mirzaghaderi and Fathi, 2015). این پدیده در هیبریدهایی چون گندم × *Ae. tauschii* (Zhang *et al.*, 2007) و گندم × چاودار (Silkova *et al.*, 2013) نیز گزارش شده است. بررسی‌های سیتوژنتیکی در گامتوژنز نر گیاهان  $F_1$  هیبرید گندم تورژیدوم × *Ae. tauschii* نشان داد که میوز کاهش‌نیافته مسئول باروری می‌باشد (Zhang *et al.*, 2007). بنابراین  $F_1$ ‌های هیبرید بارور در بین گندم تورژیدوم و *Ae. tauschii* بدون نجات جنین و تیمار با هورمون به دست آمد، گیاهان  $F_1$  به‌طور متوسط ۲۵ درصد بذور تولید کردند (Zhang *et al.*, 2007). متوسط فراوانی میوز کاهش‌نیافته در هیبریدهای گندم × آجیلوپس تریانسالیس ۱۰/۱ درصد و متوسط فراوانی دانه‌ی گرده‌ی فعال کاهش‌نیافته ۴/۸۴ برآورد شد، در هیبریدهای گندم × آجیلوپس سیلیندریکا هیچ میوز کاهش‌نیافته‌ای مشاهده نشد، در نتیجه فراوانی

*geniculata* × گندم را گزارش کرده‌اند (David *et al.*, 2004; Zaharieva and Monneveux, 2006). باروری در هیبرید *Ae. geniculata* و گندم برای اولین بار در سال ۱۸۳۸ در جنوب فرانسه مشاهده (Van Slageren, 1994) و آمفی‌پلوئید حاصل (*Aegilotriticum triticoides* (Req. ex Bertol.) نامیده شد. بعدها هیبریدهای  $F_1$  طبیعی در بین *Ae. geniculata* و گندم در شرایط طبیعی گزارش شد (Loureiro *et al.*, 2006; Loureiro *et al.*, 2007; Loureiro *et al.*, 2009) و بیان گردید که میزان تلاقی بین *Ae. geniculata* و گندم هنگامی که با فاصله یک متر از هم کشت شده‌اند، از ۰/۲ تا ۰/۴۵ درصد است (Loureiro *et al.*, 2006). متوسط تلاقی‌پذیری گندم و *Ae. triuncialis* نیز در حدود ۴۴/۷۳ درصد گزارش شده است (Mirzaghaderi and Fathi, 2015) و در هیبریداسیون بین *Ae. biuncialis* و گندم این نسبت ۰/۳۴ درصد بود (Loureiro *et al.*, 2007). میزان هیبریداسیون بین گونه‌های وحشی و اهلی به شرایط محیطی مثل دما و رطوبت در هنگام گلدهی و گرده‌افشانی وابسته است (Loureiro *et al.*, 2006). علاوه بر شرایط محیطی به ژنوتیپ هر والد نیز وابسته است (Wang *et al.*, 2001). به‌طور کلی کنترل تلاقی‌پذیری به صورت ژنتیکی است، در بسیاری از هیبریدها ژن *Kr* کنترل‌کننده‌ی تلاقی‌پذیری می‌باشد (Zhang *et al.*, 2007) که در صورت غالب‌بودن این ژن در گندم باعث عدم تلاقی‌پذیری در بین دو گونه می‌شود. فراوانی تلاقی بین دو گونه تنها جزئی از نسبت انتقال ژن بین‌گونه‌ای است، توانایی هیبریدها به تولید و زنده‌ماندن در طبیعت برای نسل اول از دیگر عوامل محدودکننده در اینتروگرسیون است (Loureiro *et al.*, 2007). داده‌های حاصل از ۱۰ گیاه هیبرید از هر کدام از ترکیبات گندم و *Ae. geniculata* و گندم و *Ae. biuncialis* نشان داد که هیبریدها می‌توانند مقداری باروری را با استفاده از تلاقی برگشتی با والد گندم به دست آورند، با درصد میانگین ۳/۱۷ دانه در سنبلچه برای *Ae. biuncialis* × در گندم و ۲/۸۷ دانه در سنبلچه برای *Ae. geniculata* × گندم به دست آورند (Loureiro *et al.*, 2007). بک‌کراس هیبرید  $F_1$  حاصل از تلاقی *Ae. geniculata* × گندم با والد گندم تاکنون در شرایط گلخانه به دست آمده و *Aegilotriticum speltaeforme* (Jord.) نامیده شد (Jacot *et al.*, 2004). دانه‌های بک‌کراس ( $BC_1$ ) از گیاهان هیبرید

دانه‌ی گرده کاهش نیافته کم بود (Fakhri et al., 2016). در بین درصد دانه‌ی گرده‌ی فعال و نسبت دانه به گلچه همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. با وجود بالا بودن درصد دانه‌ی گرده‌ی فعال در هیبرید حاصل از گندم زرین هیچ بذری از این تلاقی به دست نیامد. متوسط دانه‌ی گرده‌ی فعال در این بررسی ۲/۹۱ و در تلاقی بین گندم و *triuicialis* *Ae.* ۴/۷ محاسبه گردید (Mirzaghaderi and Fathi, 2015). برخلاف نتیجه تحقیق حاضر همبستگی معنی‌داری بین کارایی دانه‌ی گرده و تعداد دانه‌های تشکیل‌شده در نسل F<sub>1</sub> ارقام مختلف گندم و آجیلوپس تریانسپالیس وجود داشت (Mirzaghaderi and Fathi, 2015). کلسی‌سین یکی از مواد شیمیایی مورد استفاده در القای پلی‌پلوئیدی می‌باشد. در این بررسی با پیش‌تیمار گیاهچه‌های چهار هیبرید F<sub>1</sub> با استفاده از این ماده گیاهان آمفی‌پلوئید با موفقیت تولید شدند. ظاهر درشت‌تر بوته و خوشه‌ها و هم‌چنین بذره‌های تشکیل‌شده دلیل بر آمفی‌پلوئید بودن این گیاهان بود که مطابق با بررسی امیری و همکاران از اثرات کلسی‌سین بر گیاهان، ایجاد بافت‌های درشت‌تر و سبتر و با برگ‌های پهن‌تر می‌باشد (Amiri et al., 2010). تعداد کروموزوم‌های سلول‌های متافازی نوک ریشه بذره‌های مختلف F<sub>2</sub> همگی تعداد مورد انتظار ۷۰ را نداشته و از ۴۵ تا ۶۵ متفاوت بودند. این موضوع احتمالاً به دلیل اختلال در تقسیم میوز در نسل قبل است که در آن برخی کروموزوم‌ها در متافاز I به آنافاز I میوز متوقف شده و یا با تأخیر به قطبین می‌روند. کروموزوم‌های تأخیری معمولاً در مراحل بعدی تقسیم حذف می‌شوند. در تلاقی بین *Ae. geniculata* × گندم (آجیلوپس والد مادری) یک بوته F<sub>2</sub> ۷۰ کروموزومی مورد بررسی سیتوژنتیکی قرار گرفت (Loureiro et al., 2007). در بررسی کاربوتیپ هیبریدهای نسل دوم حاصل از تلاقی گندم و چاودار، آمفی‌پلوئیدهای کاملی با ۵۶ کروموزوم مشاهده شدند که ۴۲ عدد از آن‌ها مربوط به گندم و ۱۴ کروموزوم مربوط به چاودار بود. با وجود این، یک هیبرید ۴۵ کروموزومی هم مشاهده شد که شش کروموزوم مربوط به چاودار و ۳۹ کروموزوم مربوط به گندم بود (Silkova et al., 2018).

دانه‌ی *triuicialis* از ۳۵ کروموزوم تا ۷۰ کروموزوم گزارش شده است (Mirzaghaderi and Fathi, 2015). در این تحقیق روش فیش با نشانگرهای (GAA)<sub>10</sub> و pTa535-1 کروموزوم‌های ژنوم گندم و *Ae. geniculata* را تا حدودی شناسایی کرد. در تحقیق دیگری نیز لاین‌های افزایشی و لاین‌های جایگزینی حاصل از تلاقی بین *Ae. geniculata* و گندم نان با نشانگرهای pTa713 (AAC)<sub>5</sub> و pTa71 بررسی شدند و میزان مشارکت کروموزوم‌های آجیلوپس در لاین‌های حاصل از تلاقی مشخص شد (Yi et al., 2019). در آمفی‌پلوئید بین *Ae. geniculata* × گندم، نتاج حاصل، ژنوم غیرهسته‌ای از *Ae. geniculata* به ارث رسید که این موضوع باعث دیررس شدن نتاج شد (Wu et al., 1998). در حالی که این ویژگی ارزیابی عملکرد زراعی را در آن‌ها پیچیده می‌کند، اما وجود کروموزوم 4M<sup>E</sup> القاکننده‌ی تشکیل گلچه‌های اضافی جالب و قابل توجه بود. وجود این کروموزوم، سازوکار گامت‌کشی را که عامل تولیدکننده‌ی گامت‌های حاوی کروموزوم‌های شکسته است القا کرد (Friebe et al., 1999; Kwiatak et al., 2017). به طور کلی شناسایی کروموزوم‌ها و منشأ کروموزوم‌های انتقال‌یافته به ژنوم یک گونه زراعی از یک گونه مربوط به خزانه‌ی ژنی ثالثیه‌ی آن در به‌نژادی گندم از طریق مهندسی کروموزومی دارای اهمیت می‌باشد (Yi et al., 2019).

### نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق گندم نان و *Ae. geniculata* با یکدیگر تلاقی داده شده و بذره‌های پلی‌پلوئیدها عمدتاً به روش تولید و امتزاج گامت‌های کاهش‌نیافته در هیبریدهای حاصل به وجود آمدند. کاربرد کلسی‌سین در این تحقیق روی هیبریدها در تولید گیاهان آمفی‌پلوئید اثر معنی‌داری نسبت به حالت عدم تیمار نداشت. به‌طور کلی پتانسیل گامت‌های کاهش‌نیافته در تولید خودبه‌خودی آمفی‌پلوئیدهای گندم-*Ae. geniculata* اثبات شد. آمفی‌پلوئیدهای حاصل می‌توانند به‌عنوان پلی در به‌نژادی گندم به کار گرفته شوند.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت‌های دانشگاه کردستان جهت پیشبرد پایان‌نامه کارشناسی ارشد در گرایش ژنتیک و به‌نژادی که مقاله حاضر حاصل آن است، قدردانی می‌شود.

## منابع

- Amiri, S., Kazemitabaar, S., Ranjbar, G. and Azadbakht, M. 2010. The effect of trifluralin and colchicine treatments on morphological characteristics of jimsonweed (*Datura Stramonium* L.). *Trakia Journal of Sciences*, 8: 47-61
- Bandou, H., Rodriguez-Quijano, M., Carrillo, J., Branlard, G., Zaharieva, M. and Monneveux, P. 2009. Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. *Plant Systematics and Evolution*, 277: 85-97.
- Benavente, E., Alix, K., Dusautoir, J.C., Orellana, J. and David, J. 2001. Early evolution of the chromosomal structure of *Triticum turgidum*-*Aegilops ovata* amphiploids carrying and lacking the *Ph1* gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1123-1128.
- David, J.L., Benavente, E., Bres-Patry, C., Dusautoir, J.C. and Echaide, M. 2004. Are neopolyploids a likely route for a transgene walk to the wild? The *Aegilops ovata* × *Triticum turgidum* durum case. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 503-510.
- Fakhri, Z., Mirzaghaderi, G., Ahmadian, S. and Mason, A.S. 2016. Unreduced gamete formation in wheat × *Aegilops* spp. hybrids is genotype specific and prevented by shared homologous subgenomes. *Plant Cell Reports*, 35: 1143-1154.
- Friebe, B.R., Tuleen, N.A. and Gill, B.S. 1999. Development and identification of a complete set of *Triticum aestivum*-*Aegilops geniculata* chromosome addition lines. *Genome*, 42: 374-380.
- Jacot, Y., Ammann, K., Rufener, P., Mazyad, A., Chueca, C., David, J., Gressei, J., Loureiro, H.W. and Benavente, E. 2004. and Wild Relatives, a European Union Research Programme. Introgression from genetically modified plants into wild relatives: 63.
- Jauhar, P.P. and Chibbar, R.N. 1999. Chromosome-mediated and direct gene transfers in wheat. *Genome*, 42: 570-583.
- Kuraparthi, V., Sood, S., Dhaliwal, H., Chhuneja, P. and Gill, B.S. 2007. Identification and mapping of a tiller inhibition gene (*tin3*) in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 285-294.
- Kwiatk, M.T., Wiśniewska, H., Ślusarkiewicz-Jarzina, A., Majka, J., Majka, M., Belter, J. and Pudelska, H. 2017. Gametocidal factor transferred from *Aegilops geniculata* Roth can be adapted for large-scale chromosome manipulations in cereals. *Frontiers in Plant Science*, 8: 409.
- Kynast, R., Friebe, B. and Gill, B. 2000. Fate of multicentric and ring chromosomes induced by a new gametocidal factor located on chromosome 4Mg of *Aegilops geniculata*. *Chromosome Research*, 8: 133-139.
- Liu, W., Rouse, M., Friebe, B., Jin, Y., Gill, B. and Pumphrey, M.O. 2011. Discovery and molecular mapping of a new gene conferring resistance to stem rust, *Sr53*, derived from *Aegilops geniculata* and characterization of spontaneous translocation stocks with reduced alien chromatin. *Chromosome Research*, 19: 669-682.
- Loureiro, I., Escorial, C., García-Baudin, J.M. and Chueca, C. 2009. Hybridization, fertility and herbicide resistance of hybrids between wheat and *Aegilops biuncialis*. *Agronomy for Sustainable Development*, 29: 237-245.
- Loureiro, I., Escorial, M.C., Garcia-Baudin, J.M. and Chueca, M.C. 2007. Hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and the wild species *Aegilops geniculata* and *A. biuncialis* under experimental field conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 120: 384-390.
- Loureiro, I., Escorial, M.C., García-Baudín, J.M. and Chueca, M.C. 2006. Evidence of natural hybridization between *Aegilops geniculata* and wheat under field conditions in Central Spain. *Environmental Biosafety Research*, 5: 105-109.

- Mirzaghaderi, G., Abdolmalaki, Z., Zohouri, M., Moradi, Z. and Mason, A.S. 2017. Dynamic nucleolar activity in wheat× *Aegilops* hybrids: evidence of C-genome dominance. *Plant Cell Reports*, 36: 1277-1285.
- Mirzaghaderi, G. and Fathi, N. 2015. Unreduced gamete formation in wheat: *Aegilops triuncialis* interspecific hybrids leads to spontaneous complete and partial amphiploids. *Euphytica*, 206: 67-75.
- Molnár, I., Gáspár, L., Sárvári, É., Dulai, S., Hoffmann, B., Molnár-Láng, M. and Galiba, G. 2004. Physiological and morphological responses to water stress in *Aegilops biuncialis* and *Triticum aestivum* genotypes with differing tolerance to drought. *Functional Plant Biology*, 31: 1149-1159.
- Ozkan, H. and Feldman, M. 2001. Genotypic variation in tetraploid wheat affecting homoeologous pairing in hybrids with *Aegilops peregrina*. *Genome*, 44: 1000-1006.
- Peterson, R., Slovin, J.P. and Chen, C. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*, 1: e13.
- Rawat, N., Tiwari, V.K., Singh, N., Randhawa, G.S., Singh, K., Chhuneja, P. and Dhaliwal, H.S. 2009. Evaluation and utilization of *Aegilops* and wild *Triticum* species for enhancing iron and zinc content in wheat. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56: 53-64.
- Rosegrant, M. and Agcaoili, M. 2010. Global food demand, supply, and price prospects to 2010. International Food Policy Research Institute, Washington, DC USA.
- Schneider, A., Molnár, I. and Molnár-Láng, M. 2008. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica*, 163: 1-19.
- Silkova, O., Adonina, I., Krivosheina, E., Shchapova, A. and Shumny, V. 2013. Chromosome pairing in meiosis of partially fertile wheat/rye hybrids. *Plant Reproduction*, 26: 33-41.
- Silkova, O., Loginova, D., Volodina, E., Ivanova, Y.N., Bondarevich, E., Solovey, L., Sycheva, E. and Dubovets, N. 2018. Development and Characterization of Wheat-Rye Hybrids Produced by Meiotic Restitution. *Russian Journal of Genetics*, 54: 1266-1276.
- Tang, Z., Yang, Z. and Fu, S. 2014. Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119. 2, pTa-553, pTa71, CCS1, and pAWRC1 for FISH analysis. *Journal of Applied Genetics*, 55: 313-318.
- Tayalé, A. and Parisod, C. 2013. Natural pathways to polyploidy in plants and consequences for genome reorganization. *Cytogenetic and Genome Research*, 140: 79-96.
- Van-Slageren, M. 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub and Spach) Eig (*Poaceae*): a revision of all taxa closely related to wheat, excluding wild *Triticum* species, with notes on other genera in the tribe *Triticeae*, especially *Triticum*. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Van Slageren, M. 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum*. Jaub. & Spach. Eig (*Poaceae*). Wageningen Agricultural University and ICARDA.
- Wang, Y., Wang, C., Zhang, H., Li, H., Liu, X. and Ji, W. 2015. Identification and evaluation of disease resistance and HMW-GS composition of *Aegilops geniculata* Roth. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62: 1085-1093.
- Wang, Z., Zemetra, R.S., Hansen, J. and Mallory-Smith, C.A. 2001. The fertility of wheat× jointed goatgrass hybrid and its backcross progenies. *Weed Science*, 49: 340-345.
- Wu, Y., Zhang, C., Liu, C., Shuxin, R. and Yan, Z. 1998. Breeding technology of alloplasmic wheat. *Science in China Series C: Life Sciences*, 41: 449-458.

- Yi, Y., Zheng, K., Ning, S., Zhao, L., Xu, K., Hao, M., Zhang, L., Yuan, Z. and Liu, D. 2019. The karyotype of *Aegilops geniculata* and its use to identify both addition and substitution lines of wheat. *Molecular cytogenetics*, 12: 15.
- Zaharieva, M., Gaulin, E., Havaux, M., Acevedo, E. and Monneveux, P. 2001a. Drought and heat responses in the wild Wheat Relative *Aegilops geniculata* Roth. *Crop Science*, 41: 1321-1329.
- Zaharieva, M. and Monneveux, P. 2006. Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Science*, 46: 512-527.
- Zaharieva, M., Monneveux, P., Henry, M., Rivoal, R., Valkoun, J. and Nachit, M. 2001b. Evaluation of a collection of wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth and identification of potential sources for useful traits, Wheat in a Global Environment. Springer, pp. 739-746.
- Zhang, L.Q., Yen, Y., Zheng, Y.L. and Liu, D.C. 2007. Meiotic restriction in emmer wheat is controlled by one or more nuclear genes that continue to function in derived lines. *Sexual Plant Reproduction*, 20: 159-166.

## Wheat × *Aegilops geniculata* interspecific hybrids and amphiploids: Production and fertility assessment

Zinat Abdolmalaki<sup>1</sup>, Ghader Mirzaghaderi<sup>\*2</sup>

1. Ph.D. student of Biotechnology, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2\*. Associate Professor., Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: 05-01-2022

Accepted: 05-03-2022

### Abstract

Among the wild relatives of wheat, species in the genus *Aegilops* have a close relationship to wheat. *Aegilops geniculata* Roth ( $2n = 4x = 28$ ; M<sup>6</sup>M<sup>6</sup>U<sup>6</sup>U<sup>6</sup>) is an allotetraploid, tolerant to various biotic and abiotic stresses that can be introgressed into bread wheat via hybridization and backcrossing. Here, we crossed three bread wheat (*Triticum aestivum* L.,  $2n = 6x = 42$ ; AABBDD) cultivars 'Navid', 'Omid' and 'Zarin' with two *Ae. geniculata* accessions '386' and '387'. 'Zarin' × *Ae. geniculata* '387' and 'Navid' × *Ae. geniculata* '386' crosses showed the lowest (11.93%) and highest (48.25%) crossability, respectively. Polyploidy was induced by colchicine treatment in some F<sub>1</sub> seedlings and their fertility was compared to non-treated plants. Non-treated hybrid plants with the exception of Zarin' × *Ae. geniculata* hybrids also produced F<sub>2</sub> seeds. Chromosome configurations in metaphase I of meiosis were mostly univalent along with 3 to 4 rod bivalents. Chromosome numbers in the root tip cells of a sample of F<sub>2</sub> seeds ranged from 45 to 65. Fluorescence in situ hybridization (FISH) using (GAA)<sub>10</sub> and pTa535-1 as probes, could identify parental chromosomes in the resulting amphiploids.

**Keywords:** Amphiploid, fertility, interspecific hybridization, fluorescence in situ hybridization

---

\*Corresponding Author Email: gh.mirzaghaderi@uok.ac.ir