به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۲ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۲۲۷-۲۴۰

تولید آمفی‌پلوئیدهای مصنوعی از تلاقی برخی ارقام گندم نان با آجیلوپس تریانسیالیس (*Aegilops triuncialis* L.)

ندا فتحی[۱]، قادر میرزاقادری[۲]*، هدیه بدخشان[۳]، علی‌اکبر مظفری[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج- ایران
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج- ایران
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج- ایران
۴. استادیار گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج- ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۱۲/۲۵

چکیده

آجیلوپس تریانسیالیس ($2n=4x=28; C^tC^tU^tU^t$) یکی از گونه‌های تتراپلوئید جنس آجیلوپس و از منابع باارزش ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. در این پژوهش، ارقام گندم نان ($2n=6x=42; AABBDD$) 'امید'، 'نوید'، 'زرین'، 'پیشگام' و 'MV-17' با گونهٔ آجیلوپس تریانسیالیس تلاقی داده شد و هیبریدهای F_1 و F_2 (حاصل از خودباروری F_1) بررسی سیتوژنتیکی و مورفولوژیکی شدند. تفاوت معناداری بین تلاقی‌پذیری ارقام مختلف گندم (با میانگین تلاقی‌پذیری ۴۶/۲۴ درصد) مشاهده شد. هیبریدهای F_1 طبق انتظار ۳۵ کروموزوم ($n=5x=35; ABDU^tC^t$) داشتند. فراوانی تشکیل بذرهای F_2 حدود ۳/۵۴ درصد در گلچه بود. تعداد کروموزوم‌ها در نمونه‌ای از بذرهای F_2 از ۴۰ تا ۷۰ متغیر بود، بنابراین در بین آن‌ها آمفی‌پلوئید ($2n=10x=70; AABBDDU^tU^tC^tC^t$) خودبه‌خودی مشاهده شد. همچنین القای پلی‌پلوئیدی با کلشی‌سین موفقیت‌آمیز بود و یکی از بذرهای F_1 تیمارشده بذرهای ۷۰ کروموزومی تولید کرد. در بررسی متافاز I میوزی در هیبریدهای F_1 به‌طور متوسط تعداد ۲۱ یونی‌والنت و ۷ بی‌والنت مشاهده شد. از نظر رسیدگی هیبریدهای نسل اول ۳۰ روز دیررس‌تر از والدین خود بودند. فراوانی بذرهای BC_1F_1 حاصل از تلاقی برگشتی هیبریدهای نسل اول (♀) با والد گندم (♂)، نسبت به بذرهای F_2 کمتر و حدود ۱/۲۷ درصد بود. در این پژوهش، آمفی‌پلوئیدهای مصنوعی خودبه‌خودی و القایی از تلاقی ارقام گندم نان با آجیلوپس تریانسیالیس به‌دست آمد که می‌تواند به‌منزلهٔ پلی در برنامه‌های به‌نژادی گندم به کار رود.

کلیدواژه‌ها: آمفی‌پلوئید، پلی‌پلوئیدی، تکامل، هیبریداسیون بین‌گونه‌ای.

* نویسنده مسئول Email: gh.mirzaghaderi@uok.ac.ir

مقدمه

ایران یکی از مناطق اصلی تنوع و تکامل غلات به‌ویژه گندم است (۳۶). در ایران تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلفی ازجمله تنش خشکی (۲۴) و آفات و بیماری‌ها (۱۰) عملکرد گندم را تهدید می‌کند و به‌کرات سبب افت عملکرد آن می‌شود. به‌نژادی برای مقاومت به این تنش‌ها از اهمیت ویژه‌ای برای دستیابی به عملکرد پایدار برخوردار است. اگرچه می‌توان از طریق تلاقی با سایر ارقام ویژگی‌های مختلف گندم را بهبود بخشید، ازآنجاکه تنوع کمی در بین ارقام گندم وجود دارد، پیشرفت‌های حاصل از تلاقی بین ارقام عملاً محدود است. این امر توجه به‌نژادگران را از دیرباز به بهره‌برداری از خزانه‌های ژنی سطوح مختلف معطوف کرد، به‌طوری‌که این منابع باارزش را در برنامه‌های به‌نژادی گندم استفاده کرده‌اند. ازآنجاکه خویشاوندان وحشی گندم تنوع ژنتیکی بالایی دارند و انواع ژن‌های مفید در طول تکامل طبیعی در آن‌ها تجمع یافته است، برای به‌نژادی گندم بسیار مفیدند (۱۱، ۱۴ و ۳۲).

روش به‌نژادی کلاسیک گندم از طریق تلاقی با گونه‌های وحشی گرچه جزء روش‌های قدیمی به‌نژادی است و از بین گونه‌های زراعی، بیشترین تلاقی بین گونه‌ای و بین جنسی در گندم انجام گرفته است، با این وجود، بهره‌برداری از گونه‌های خویشاوند هنوز یکی از روش‌های مؤثر بهبود ژنتیکی گندم در دنیاست و ژنوتیپ‌های فراوانی از این طریق به دست آمده است (۸ و ۱۲). ازجملهٔ این گونه‌های خویشاوند می‌توان به علف هرز مهاجم آجیلوپس تریانسیالیس *Aegilops triuncialis* L; 2n=4x=28; ($C^tC^tU^tU^t$) در جنس آجیلوپس اشاره کرد که ژن‌های مفیدی برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها دارد (۱۰، ۲۰ و ۲۸).

آجیلوپس تریانسیالیس (*Ae. triuncialis*; 2n=4x=28, $U^tU^tC^tC^t$) پراکندگی وسیعی در جهان دارد. این گونه از تلاقی ۲ گونهٔ آجیلوپس آمبولاتا (*Ae. umbellulata*; 2n=2x=14, UU) و آجیلوپس کاوداتا (*Ae. caudate*; 2n=2x=14, CC) به وجود آمده است (۲، ۳ و ۱۵). آجیلوپس تریانسیالیس ۲ زیرگونه دارد که ژنوم یکسان ولی سیتوپلاسم متفاوتی دارند. در زیرگونهٔ تریانسیالیس، آجیلوپس آمبولاتا والد مادری و در زیرگونهٔ دیگر یعنی پرسیکا، آجیلوپس کاوداتا والد مادری بوده است (۲۲، ۳۳ و ۳۴).

در اولین قدم برای بهره‌برداری از گونه‌های خویشاوند وحشی برای به‌نژادی کلاسیک گندم نان، به‌طور معمول آمفی‌پلوئیدهای مصنوعی از تلاقی گونهٔ مورد نظر با گندم نان تهیه شده و به عنوان پلی در تلاقی‌های آتی استفاده می‌شوند. هدف پژوهش حاضر، تولید آمفی‌پلوئیدهای مصنوعی خودبه‌خودی و القایی از طریق تلاقی چند رقم گندم نان ایرانی با گونهٔ آجیلوپس تریانسیالیس، مطالعهٔ میزان باروری هیبریدهای F_1 و بررسی تغییرات تعداد کروموزوم‌ها در هیبریدهای نسل اول و دوم و تلاقی برگشتی است.

مواد و روش‌ها

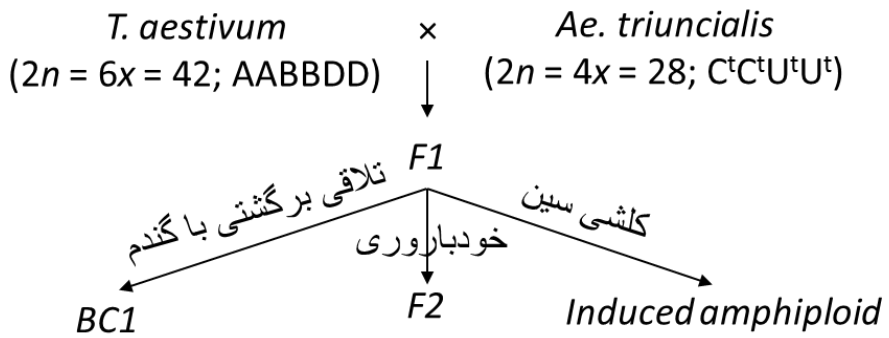
مواد گیاهی و تلاقی‌ها

۵ رقم مختلف گندم نان شامل 'امید'، 'نوید'، 'زرین'، 'پیشگام' و 'MV-17' (از بانک بذر دانشگاه رازی)، با یک اکوتیپ آجیلوپس تریانسیالیس (جمع‌آوری شده از استان کردستان) در بهار سال ۱۳۹۲تلاقی داده شدند. برای این منظور، ارقام گندم و گونهٔ آجیلوپس تریانسیالیس در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار کشت شدند. در زمان مناسب گل‌های خوشه‌ها اخته و پاکت‌گذاری و پس از گرده‌افشانی با گردهٔ آجیلوپس تریانسیالیس و مجدداً پاکت‌گذاری شدند. دو هفته بعد از گرده‌افشانی، اقدام به

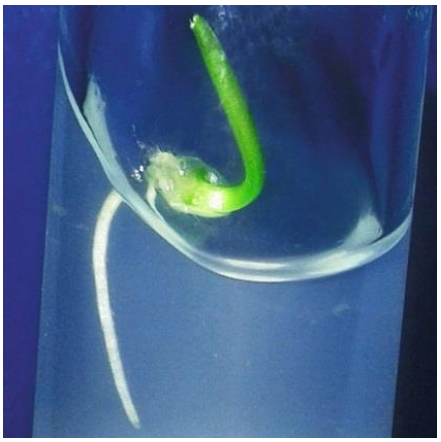
نجات تعداد ۱۰ جنین از هر تلاقی از طریق کشت بافت شد. سایر جنین‌ها تا رسیدگی کامل بذر بر روی بوته باقی ماندند. بذرهای رسیده F_1 حاصل از هر بوته به‌طور مجزا برداشت شد و تعداد خوشه، تعداد گلچه و تعداد بذرهای حاصل برای هر کدام از ارقام یادداشت شد. تلاقی‌پذیری هر رقم به‌صورت نسبت تعداد بذر تشکیل‌شده در گلچهٔ گرده‌افشانی شده محاسبه شد (شکل۱).

نجات جنین

نجات جنین براساس روش شارما (۲۹) انجام شد. به این ترتیب که ۱۴ روز بعد از تلاقی، خوشه‌های مربوط جدا شدند و پس از شمارش تعداد گلچه و تعداد بذرهای تشکیل‌شده برای هر رقم، بذرهای نارس به آزمایشگاه منتقل شدند. بذرهای نارس به‌مدت ۳ دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس ۲۰ دقیقه در وایتکس ۱ درصد قرار گرفتند. سپس ۳ مرتبه با آب مقطر شسته شدند. در مرحلهٔ بعد، جنین بذرها در شرایط استریل جدا و به لوله‌های حاوی محیط کشت جامد MS منتقل شدند. لوله‌های آزمایش با فویل آلومینیومی پوشیده شدند و به دمای ۵ درجهٔ سانتی‌گراد و بعد از گذشت ۵ روز به اتاقک رشد انتقال داده شدند (شکل۲). گیاهچه‌ها به گلدان‌های حاوی خاک به گلخانه و در مرحلهٔ سه‌برگی (در پاییز) به مزرعه انتقال داده شدند.



شکل۱. نمودار نحوهٔ انجام تلاقی‌ها، خودباروری و تلاقی برگشتی برای تولید بذرهای نسل اول، دوم و تلاقی‌برگشتی



شکل۲. کشت جنین نارس حاصل از تلاقی گندم نان (رقم 'زرین') با آجیلوپس تریانسیالیس در محیط کشت $MS^{\frac{1}{2}}$

القای دابل هاپلوئیدی

پس از برداشت بذرهای F_1، تعداد ۱۰ عدد از بذرهای هیبرید هر رقم در ۲ قسمت مساوی در ۲ عدد پتری‌دیش بر روی کاغذ جوانه‌زنی خیس کشت شدند. بعد از ظهور و رشد گیاهچه در حدود ۳ تا ۴ سانتی‌متر، محلول کلشی‌سین ۰/۵ درصد به یکی از پتری‌دیش‌های هر رقم اضافه شدند و به‌مدت ۴ تا ۵ ساعت زیر نور شدید قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌های تیمارشده ۴ بار هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شسته شدند و به همراه گیاهان تیمارنشده (شاهد) به‌مدت یک ماه در گلدان کشت و در پاییز به مزرعه منتقل شدند.

مطالعات میوز

تعداد ۳ سنبله از هر نوع F_1 در مرحلهٔ متافاز I میوز، جدا شدند و در محلول اتانول، استیک‌اسید و کلروفرم به‌ترتیب به نسبت‌های ۱:۳:۶ به‌مدت ۳ ساعت تثبیت شدند. بساک‌ها با استواورسئین رنگ‌آمیزی و له‌کردن آن‌ها بر روی لام به کمک استیک اسید ۴۵ درصد انجام شد. از حداقل ۱۰ سلول در هر نوع تلاقی در مرحلهٔ متافاز I میوز در زیر میکروسکوپ عکس‌برداری شد.

تولید بذرهای F_2 و تلاقی برگشتی (BC_1)

تعداد ۹، ۲۸، ۴۷، ۲۷ و ۳۸ عدد بذر هیبرید F_1 به‌ترتیب برای ارقام 'MV-17'، 'امید'، 'پیشگام'، 'زرین' و 'نوید' به‌طور مجزا داخل سینی نشا، در پاییز ۱۳۹۲کشت شدند و در مرحلهٔ ۲ تا ۳ برگی به مزرعه منتقل شدند. تعدادی از خوشه‌ها در بهار ۱۳۹۳ قبل از گرده‌افشانی اخته و پاکت‌گذاری شدند و ۲ روز بعد با والد مادری (گندم) تلاقی برگشتی داده و مجدداً پاکت‌گذاری شدند. بقیهٔ خوشه‌ها برای تولید بذرهای نسل دوم (F_2) به همان صورت باقی ماندند. بعد از رسیدگی کامل خوشه‌ها، بذرهای هر ژنوتیپ به‌طور مجزا برداشت شدند (شکل ۱). از آزمون نیکویی برازش χ^2 برای مقایسهٔ ارقام مختلف از نظر تعداد بذرهای F_1 و F_2 تشکیل شده در نرم‌افزار Minitab استفاده شد.

شمارش کروموزومی

بذرهای F_1 و F_2 بر روی کاغذ صافی مرطوب در پتری‌دیش در تاریکی و در دمای اتاق قرار داده شد. ریشه‌های دارای رشد فعال به طول ۱/۵ سانتی‌متر جدا و به‌منظور پیش‌تیمار، در ظرف آب یخ به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شدند. ریشه‌ها سپس در محلول ۱:۳ اتانول و اسیداستیک به‌مدت حداقل ۲۴ ساعت تثبیت شدند. ریشه‌ها در اسیدکلریدریک، ۱ نرمال به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد هیدرولیز و سپس به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق، در محلول استواورسئین رنگ‌آمیزی شدند. از ریشه‌ها به روش له‌کردن لام تهیه شد. از نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتالی متصل به میکروسکوپ نوری عکس‌برداری به عمل آمد.

نتایج

تلاقی‌پذیری ارقام مختلف گندم

درمجموع ۱۲۰ خوشه از ارقام 'امید'، 'نوید'، 'زرین'، 'پیشگام' و 'MV-17' با آجیلوپس تریانسیالیس تلاقی داده شد. تعداد بذرهای F_1 تشکیل‌شده بر روی رقم 'MV-17' کمتر از سایر ارقام بود (جدول ۱). ارقام مختلف از نظر تلاقی‌پذیری تفاوت معناداری داشتند (χ^2=17; p-value=0.002). رقم 'نوید' بیشترین تلاقی‌پذیری (۵۵/۲۲ درصد) رقم 'MV-17' کمترین تلاقی‌پذیری (۲۴/۲۴ درصد) را داشت. میانگین درصد تلاقی‌پذیری ارقام مختلف گندم نان با آجیلوپس تریانسیالیس ۴۶/۲۴ درصد برآورد شد.

جدول ۱. نتایج تلاقی ارقام مختلف گندم نان (والد ماده) با آجیلوپس تریانسیالیس (*Ae. triuncialis*)

تلاقی‌ها	تعداد خوشهٔ گرده‌افشانی شده	تعداد گلچهٔ گرده‌افشانی شده	تعداد بذر حاصل (F_1)	نسبت بذر به گلچه (٪)
زرین× آجیلوپس تریانسیالیس	۳۰	۳۴۴	۱۵۷	۴۳/۶۵
پیشگام × آجیلوپس تریانسیالیس	۴۸	۶۸۵	۳۰۷	۴۴/۸۲
امید × آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰	۹۳	۵۰	۵۳/۷۶
نوید × آجیلوپس تریانسیالیس	۲۴	۲۹۷	۱۶۴	۵۵/۲۲
MV-17× آجیلوپس تریانسیالیس	۸	۹۹	۲۴	۲۴/۲۴
جمع	۱۲۰	۱۵۱۸	۷۰۲	
میانگین	۲۴	۳۰۳/۶	۱۴۰/۴	۴۶/۲۴

نجات جنین

ابتدا این موضوع عدم نیاز به نجات جنین برای ما روشن نبود بنابراین، اقدام به نجات تعدادی از جنین‌ها شد ولی در ادامه بعداً دیدیم که بذرهای F_1 بر روی گیاهان F_1 هم بالغ شدند، لذاعملاً به تکنیک نجات جنین برای تولید بذر F_1 نیاز نبود.

القای پلی‌پلوئیدی

برای بررسی اثر کلشی‌سین بر القای پلی‌پلوئیدی، تعداد ۵ بذر از هیبرید F_1 حاصل از هر رقم گندم (درمجموع ۲۵ بذر) با محلول کلشی‌سین ۰/۰۵ درصد تیمار شدند. از این تعداد، ۲۴ عدد از بذرهای تیمارشده به مرحلهٔ۲ تا ۳ برگی رسیدند که به زمین منتقل شدند. بقیهٔ گیاهچه‌ها از بین رفتند. از بین ۲۴ گیاهچه نیز دو بوتهٔ F_1 از ارقام 'امید' و 'MV-17' به خوشه رفتند. بقیهٔ گیاهچه‌ها به ساقه نرفتند و درنهایت از بین رفتند. برای رقم 'MV-17' هیچ‌گونه بذری تشکیل نشد اما در بوتهٔ مربوط به رقم 'امید' از تعداد ۱۵۰ پنجهٔ تشکیل‌شده، ۲۳ عدد بذر که همگی صاف (غیرچروکیده) بودند، برداشت شد.

باروری هیبریدهای F_1

درمجموع ۶۲۳ خوشه بارور شده F_1 بررسی و بذور تشکیل شده بر روی آن‌ها شمارش شد. تفاوت معناداری بین ژنوتیپ‌های مختلف F_1 از نظر تشکیل بذر F_2 وجود داشت (χ^2=296.697; P-value=0.000). بیشترین تعداد بذر F_2 تشکیل‌شده نسبت به تعداد گلچهٔ بررسی‌شده مربوط به F_1 حاصل از رقم 'امید' با ۸/۴۶ درصد و کمترین آن مربوط به F_1 حاصل از هیبرید رقم 'زرین' با مقدار ۰/۳۳ درصد بود. میانگین میزان تشکیل بذر F_2 نسبت به گلچه در هیبریدهای مختلف ۳/۵۴ درصد برآورد شد (جدول ۲).

تلاقی‌های برگشتی

تعداد ۱۰۰ خوشه از هیبریدهای F_1 هر یک با والد مادری (گندم نان) مربوط به خودتلاقی برگشتی داده شد. میزان بذرهای حاصل از تلاقی برگشتی برای هیبریدهای ارقام مختلف بسیار کم بود (جدول ۳). تفاوت معناداری بین ژنوتیپ‌های مختلف F_1 از نظر تشکیل بذر تلاقی برگشتی وجود نداشت (χ^2=8.91; P-value=0.068).با این وجود، بیشترین بذر تلاقی برگشتی تولیدشده مربوط به هیبرید F_1

حاصل از رقم 'MV-17' (با مقدار ۲/۷۵ درصد) و کمترین آن مربوط به هیبرید F_1 حاصل از رقم 'امید' (۰/۳۹ درصد) بود. میانگین تشکیل بذرهای حاصل از تلاقی برگشتی ۱/۲۷ درصد برآورد شد (جدول ۳).

جدول ۲. نتایج حاصل از خودباروری هیبریدهای نسل اول (F_1)

هیبریدهای F_1	تعداد خوشه	تعداد گلچه	تعداد بذر حاصل	نسبت بذر به گلچه (٪)
زرین ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۲۰	۲۴۴۶	۸	۰/۳۳
پیشگام ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۵۷	۳۱۵۴	۱۳۸	۴/۳۷
امید ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۲۰	۲۶۷۰	۲۲۶	۸/۴۶
نوید ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۲۰	۳۲۶۰	۵۶	۱/۷۲
MV-17×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰۶	۲۱۲۰	۵۶	۲/۶۴
جمع	۶۲۳	۱۳۶۵۰	۴۸۴	
میانگین	۱۲۶/۴	۲۷۳۰	۹۶/۸	۳/۵۴

جدول ۳. نتایج تلاقی برگشتی هیبریدهای نسل اول مربوط به ارقام مختلف با والد مادری (گندم)

هیبریدهای F_1	تعداد خوشه گرده‌افشانی شده	تعداد گلچه گرده‌افشانی شده	تعداد بذر حاصل (BC_1)	نسبت بذر به گلچه (٪)
زرین ×آجیلوپس تریانسیالیس	۲۹	۵۵۴	۸	۱/۴۴
پیشگام ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۶	۳۴۰	۶	۱/۷۶
امید ×آجیلوپس تریانسیالیس	۲۳	۵۱۴	۲	۰/۳۹
نوید ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۹	۴۶۰	۴	۰/۸۷
MV-17×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۲	۲۵۴	۷	۲/۷۵
جمع	۹۹	۲۱۲۲	۲۷	
میانگین	۱۹/۸	۴۲۴/۴	۵/۴	۱/۲۷

بررسی‌های مورفولوژیکی

تفاوت‌های مورفولوژیکی معناداری در میان هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم و آجیلوپس تریانسیالیس با والدین آن‌ها مشاهده شد (جدول ۴). بوته‌های هیبرید F_1 از نظر صفات تعداد سنبلچه در خوشه، طول و عرض برگ پرچم و ارتفاع بوتهٔ بینابین والدین خود بودند اما تعداد پنجهٔ زیادی (به‌طور متوسط ۴۲/۲۵ عدد) تولید کردند که احتمالاً این صفت را از آجیلوپس تریانسیالیس به ارث برده‌اند (جدول ۴). مورفولوژی خوشهٔ هیبریدها بینابین والدین خود بودند(شکل۳) و بذرهای F_1 نسبتاً چروکیده بودند، اما بذرهای F_2 از بذرهای چروکیده و بذرهای صاف تشکیل شده بودند. هیبریدهای نسل اول گلوم و گلومل سخت‌تری نسبت به گندم داشتند(شکل۴).

شکل۳. مورفولوژی بذر و خوشه در گندم 'نوید'، آجیلوپس تریانسیالیس و هیبریدهای حاصل از تلاقی آن‌ها

A) آجیلوپس تریانسیالیس (سمت راست)، نسل اول هیبریدها (وسط) و گندم نوید (سمت چپ)؛ **B)** بذرهای والدین و هیبریدهای نسل اول و دوم.

شکل۴. مورفولوژی بذرهای F_2 به‌ترتیب از چپ به راست مربوط به رقم‌های گندم 'MV-17'، 'نوید'، 'امید'، 'پیشگام' و 'زرین'

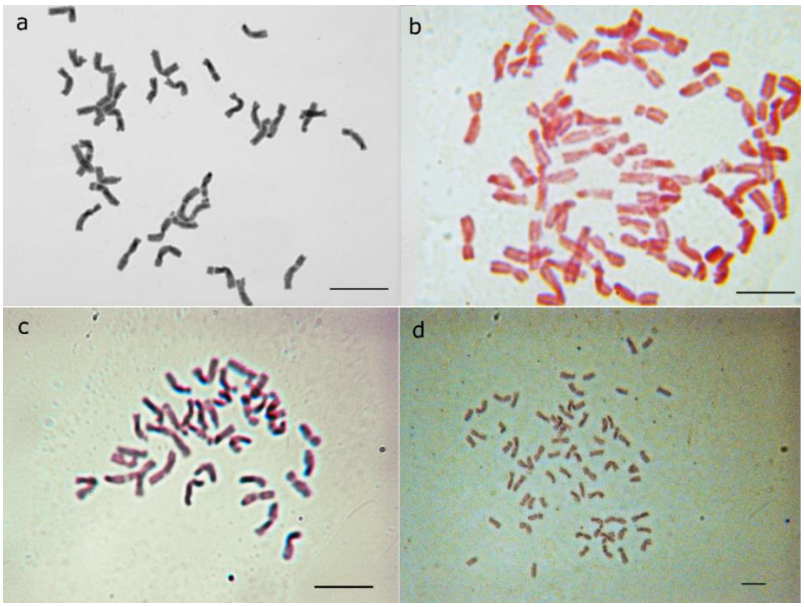
جدول ۴. برخی صفات ریختاری ارقام گندم نان، گونهٔ آجیلوپس تریانسیالیس و F_1 حاصل از تلاقی آن‌ها

ژنوتیپ‌ها	تعداد بوته	تعداد پنجه در گیاه	تعداد سنبلچه در خوشه	عرض برگ پرچم (cm)	طول برگ پرچم (cm)	ارتفاع بوته (cm)
آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰	۲۷/۲۵	۴/۲۵	۰/۶۳	۶/۸۰	۶۸/۴۸
گندم نان (رقم MV-17)	۱۰	۶/۶۳	۲۱/۳۸	۱/۸۹	۲۱/۷۴	۸۵/۲۱
گندم نان (رقم امید)	۱۰	۷/۶۳	۲۰/۰۰	۱/۵۱	۲۰/۰۸	۱۲۷/۸۹
گندم نان (رقم نوید)	۱۰	۶/۸۸	۲۰/۱۳	۱/۹۱	۲۲/۸۹	۹۶/۱۰
گندم نان (رقم زرین)	۱۰	۱۱/۶۳	۲۱/۲۵	۲/۰۱	۲۳/۲۸	۹۲/۰۶
گندم نان (رقم پیشگام)	۱۰	۶/۸۸	۲۲/۰۰	۱/۹۰	۲۴/۹۶	۷۵/۵۵
MV-17×آجیلوپس تریانسیالیس	۶	۴۲/۲۵	۱۰/۷۵	۰/۸۵	۱۲/۲۸	۶۸/۰۳
امید ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰	۴۰/۵۰	۱۱/۷۵	۱/۰۰	۱۲/۶۸	۹۸/۰۵
نوید ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰	۷۵/۲۵	۱۷/۰۰	۱/۲۵	۲۱/۴۵	۹۰/۵۸
زرین ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰	۲۰/۷۵	۱۰/۵۰	۱/۰۰	۱۲/۱۸	۷۰/۴۵
پیشگام ×آجیلوپس تریانسیالیس	۱۰	۳۲/۵۰	۱۰/۷۵	۰/۹۸	۱۲/۵۰	۸۵/۷۸
میانگین		۲۵/۲۹	۱۵/۴۳	۱/۳۶	۱۷/۳۵	۸۷/۱۱
$LSD_{0.05}$		۷/۶۷	۲/۰۲	۰/۲۰۴	۵/۸۰	۲۰/۱۷

شمارش کروموزومی

بذر هیبریدهای نسل اول و دوم (F_1 و F_2) از نظر تعداد کروموزوم بررسی شدند و طبق انتظار هیبریدهای F_1 تعداد n=5x=35، کروموزوم داشتند. ۴ عدد بذرهای هیبرید نسل دوم (مربوط به رقم 'امید') که از القای کلشی‌سین به دست آمد نیز بررسی شده و همگی 2n=10x=70، کروموزوم داشتند(شکل ۵).

تعداد کروموزوم‌ها در بذرهای F_2 حاصل از خودباروری بوته‌های F_1، از ۴۰ تا ۷۰ متغیر بود (جدول ۵). همان‌گونه که در جدول ۵ اشاره شده است، اغلب بذرهای ۷۰ کروموزومی صاف بودند.



شکل۵. گسترهٔ متافازی میتوزی در سلول مریستمی نوک ریشه

a) یک هیبریدها نسل اول (F_1) حاصل از تلاقی گندم 'زرین' با گونهٔ آجیلوپس تریانسیالیس با ۳۵ کروموزوم و b) یکی از بذرهای F_2 حاصل از F_1 رقم 'امید' تیمارشده با کلشی‌سین با ۷۰ کروموزوم. گسترهٔ متافازی میتوزی سلول‌های نوک ریشه در دو بذر F_2 خودبه‌خودی که دارای ۴۰ (حاصل از رقم 'نوید' c) و ۷۰ (حاصل از رقم 'پیشگام'، d) کروموزوم بودند (طول خط مقیاس ۱۰µm).

جدول ۵. تعداد کروموزوم‌ها در سلول‌های سوماتیکی بذرهای F2

هیبریدهای F_2	تعداد کروموزوم‌ها و مورفولوژی بذر
MV17×*Ae.t.* (F_2)	(S)۴۵ – (S)۴۶ – (F)۴۱ – (F)۴۵ – (F)۴۰
Navid×*Ae.t.* (F_2)	(F)۴۲ – (F)۴۰ – (F)۴۴ – (S)۴۶
Omid×*Ae.t.* (F_2)	(S)۵۲ – (S)۴۹ – (F)۴۱ – (F)۵۴ – (F)۷۰ – (F)۷۰ – (S)۴۴ – (F)۵۰ – (F)۴۷
Pishgam×*Ae.t.* (F_2)	(S)۴۷– (F)۷۰– (F)۷۰– (F)۷۰– (S)۴۸– (F)۴۶– (S)۴۶– (F)۷۰
Zarin×*Ae.t.* (F_2)	(S)۶۱

S: بذر چروکیده، F: بذر صاف

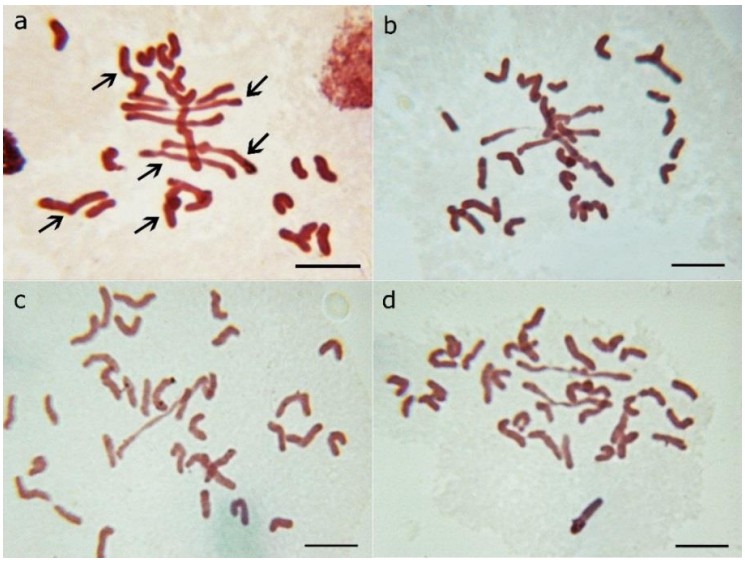
بررسی‌های میوزی

بررسی متافاز I میوز در خوشهٔ هیبریدهای نسل اول تعداد n= 5x=21I +7II کروموزوم را نشان داد که تأییدکنندهٔ صحت انجام تلاقی‌ها بود. بدین‌منظور، از F_1 هر رقم یک نمونه بررسی و مشاهده شد (شکل ۶). در میوز هیبریدهای F_1 کروموزوم‌ها هومولگ ندارند. به همین دلیل اغلب به صورت یونی‌والنت هستند، گرچه در برخی موارد بی‌والنت‌های میله‌ای با فراوانی کم از اتصال یک طرفه کروموزوم‌های هومولگ مشاهده شد. به‌طور متوسط، ۲۱ یونی‌والنت و ۷ بی‌والنت‌میله‌ای در سلول‌های مادری گرده هیبریدهای F_1 مشاهده شد(شکل ۶).

بحث

در این پژوهش، نسل‌های F_1 و F_2 و تلاقی‌برگشتی (BC_1F_1) از تلاقی گندم نان با آجیلوپس تریانسیالیس (۱۰)، با هدف رسیدن به آمفی‌پلوئیدهای مصنوعی تولید شد. به‌طور معمول، آمفی‌پلوئیدهای حاصل از هیبریدهای بین گونه‌ای بر اثر ترکیب گامت‌های کاهش‌نیافته به‌وجود می‌آیند (۲۶). اولین مرحله در تولید آمفی‌دیپلوئید، تلاقی بین دو گونه و ایجاد هیبریدهای دابل‌هاپلوئید از آن‌هاست. در هیبریدهای F_1 هر کروموزوم‌ها فاقد هومولگ هستند (۱۹). بنابراین، کروموزوم‌ها در متافاز I میوز در هیبریدهای F_1 اغلب به‌صورت یونی‌والنت مشاهده می‌شوند (۴، ۱۷ و ۲۵).

تلاقی‌پذیری ارقام مختلف گندم نان با آجیلوپس تریانسیالیس متفاوت بود. به‌طور مشابه در تلاقی گندم بهاره- چینی و آجیلوپس کاسچی میزان تلاقی‌پذیری نمونه‌های مختلف گندم بهاره- چینی با آجیلوپس کاسچی متفاوت بود (۲۷). ژن‌های *Kr* که بر روی کروموزوم‌های گروه ۵ گندم بهاره- چینی (5A، 5B و 5D) قرار گرفته‌اند، تلاقی‌پذیری را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (۹). به همین دلیل، وجود ژن *Kr* یکی از مشکلات عمده در به‌کارگیری بذرهای هیبرید در تلاقی‌های بین گونه‌ای در گندم است (۲۳). نتاج حاصل از تلاقی گندم بهاره- چینی با چاودار نیز نقش ژن‌های Kr_1 و Kr_2 را در تلاقی‌پذیری گندم نشان داده‌اند. همچنین این ژن‌ها بر روی تلاقی‌پذیری گندم و جو با شدت کمتری نسبت به چاودار تأثیر می‌گذارند (۱).



شکل۶. متافاز I میوز در سلول‌های مادر گرده هیبریدهای نسل اول حاصل از تلاقی گندم نان (رقم 'پیشگام') با آجیلوپس تریانسیالیس
***در اینجا تعداد ۳۵ کروموزوم را در هر مورد نشان می‌دهد (a-d)، کروموزوم‌ها اغلب یونی‌والنت و در برخی موارد به‌صورت بی‌والنت‌های میله‌ای (که برای نمونه در شکل a با پیکان مشخص شده‌اند) مشاهده شدند (طول خط مقیاس ۱۰µm).**

در برخی موارد، در تلاقی‌های بین گونه‌ای برای تولید بذرهای هیبرید بالغ نیاز به تکنیک‌های خاصی ازجمله نجات جنین است. در این پژوهش، بذرهای بالغ در تلاقی گندم نان و آجیلوپس تریانسیالیس بدون نیاز به روش نجات جنین به وجود آمدند. به‌طور مشابه هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم نان با آجیلوپس تاوشی (۱۸) و گندم ترتیکومتور جیدوم با آجیلوپس تاوشی (۳۵) نیز بدون نیاز به تکنیک نجات جنین بذرهای بالغ تولید کردند.

یکی از روش‌های تولید آمفی‌پلوئید، دو برابر کردن کروموزوم‌های هیبرید بین گونه‌ای F_1 با استفاده از کلشی‌سین است. یکی از مثال‌های بارز در زمینهٔ القای پلی‌پلوئیدی و تولید آمفی‌پلوئید با استفاده از کلشی‌سین، غلهٔ جدید تریتیکاله است که از تلاقی گندم و چاودار به‌وجود آمده است و در به‌نژادی گندم نان به‌کار رفته است. در این پژوهش از طریق پیش‌تیمار بذرهای هیبرید F_1 حاصل از تلاقی گندم نان و آجیلوپس تریانسیالیس با استفاده از کلشی‌سین، گیاهان دابل‌هاپلوئید در نسل دوم با موفقیت تولید شد. وجود ۷۰ کروموزوم ($2n=10x=70$; $AABBDDU^tU^tC^tC^t$) در آمفی‌پلوئیدهای حاصل مشاهده و تولید موفقیت‌آمیز آمفی‌پلوئید مصنوعی تأیید شد. در تلاقی گندم نان با آجیلوپس کاسچی نیز از طریق پیش‌تیمار با کلشی‌سین، آمفی‌پلوئید مصنوعی تولید شده است (۲۷).

بذرهای F_1 به‌طور میانگین ۳۰ روز دیرتر از گندم‌ها رسیده و آمادهٔ برداشت شدند. صفت دیررسی احتمالاً از والد پدری (آجیلوپس تریانسیالیس) به هیبریدها منتقل شده است. میزان باروری هیبریدهای نسل اول و (فراوانی بذرهای F_2) در ارقام مختلف متفاوت و به‌طور متوسط ۳/۵۴ درصد بود. در مطالعات مشابه این میزان ۱/۸۲ درصد گزارش شده است بنابراین، در این پژوهش بوته‌های F_1 از باروری بیشتری برخوردار بودند (۱۹). طی بررسی مشابهی که بر روی F_1 های حاصل از تلاقی گندم بهاره- چینی و آجیلوپس تریانسیالیس صورت گرفت مشخص شد که به‌دلیل وجود ژن *Gc* بر روی کروموزوم $3C^t$ در آجیلوپس تریانسیالیس، هیبریدهای حاصل به‌طور معمول نیمه‌عقیم هستند (۳۷). هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم نان و آجیلوپس تریانسیالیس از نظر تیپ رشدی منظم بودند. به‌طورمشابه تیپ رشدی منظمی را در هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم نان و آجیلوپس تریانسیالیس گزارش شد (۶). در تلاقی گندم ترجیدوم و آجیلوپس تاوشی نیز، میزان باروری و قدرت تشکیل بذر در هیبریدها حدود ۰/۰۹- ۰/۲۹ بوده است (۳۵).

مورفولوژی خوشهٔ هیبریدهای F_1 بینابین والدینشان بودند (شکل۳) ولی تعداد پنجه و تعداد خوشه در هیبریدها زیادتر از والدینشان بود (جدول ۴) که نشان از تفکیک متجاوز دارد. همچنین در تلاقی مشابه، تعداد خوشهٔ بالایی برای هیبریدها مشاهده کردند (۱۹). قدرت پنجه‌زنی بالای هیبریدها احتمالاً به‌دلیل وجود ژنوم‌های U^t و C^t بودند. هیبریدهای F_1 همچنین همانند گندم نان (والد مادری) خوشه‌های بلند داشتند. به‌طورمشابه در هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم بهاره- چینی با آجیلوپس بیانسیالیس که کروموزوم $3M^b$ از آجیلوپس بیانسیالیس به آن‌ها منتقل شده بود، خوشهٔ مشابه والد گندم بودند و هیبریدها قدرت پنجه‌زنی بالایی داشتند (۱۶). در تلاقی گندم بهاره- چینی با آجیلوپس بیانسیالیس نیز ارتفاع خوشه در هیبریدهای حاصل اندکی کوتاه‌تر از والد گندم بودند (۸). در تلاقی گندم بهاره- چینی با آجیلوپس کاسچی نیز هیبریدها از نظر مورفولوژیکی بینابین والدین خود بودند (۲۷). خوشهٔ هیبریدها گلوم و گلومل سختی شبیه آجیلوپس تریانسیالیس داشتند (۲۷). بررسی هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم ترتیکوم تورجیدوم با آجیلوپس تاوشی (۳۵)، گندم نان با آجیلوپس کاسچی (۲۷) و گندم نان با آجیلوپس تاوشی (۱۸) نیز به همین ترتیب گلوم و گلومل سخت در هیبریدها

مشاهده شده است. هیبریدهای F_1 در این پژوهش محور سنبلهٔ شکننده داشتند. ژن شکنندگی محور سنبله احتمالاً از آجیلوپس تریانسیالیس به هیبریدها منتقل شده باشد. به‌طور مشابه در تلاقی گندم نان با آجیلوپس کاسچی و گندم نان با آجیلوپس تریانسیالیس، هیبریدها با محور سنبلهٔ شکننده بودند (۲۷). این ژن شکنندگی محور خوشه بر روی کروموزوم‌های $3U^t$ یا $3C^t$ آجیلوپس تریانسیالیس قرار گرفته است (۳۸). گوشوارک‌ها در هیبریدها به‌طور کامل ساقه را در بر گرفته بودند. در هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم نان و آجیلوپس کاسچی نیز گوشوارک‌ها از نظر مورفولوژیکی به گندم نان شباهت داشتند (۲۷).

بذر هیبریدهای نسل اول چروکیده و بذرهای هیبریدهای نسل دوم ترکیبی از دو نوع صاف و چروکیده بودند. چروکیدگی بذرهای F_1، اولین بار توسط کیهارا و لیلیان‌فیلد مشاهده شده است (۱۳). در هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم نان و آجیلوپس تاوشی نیز به‌طور مشابه در برخی موارد آندوسپرم توسعه‌نیافته و بذرهای حاصل چروکیده بودند (۱۸). درصد جوانه‌زنی بذرهای F_2 در این پژوهش ۸۱/۵۲ درصد بود. در بررسی‌های پیشین این مقدار در حدود ۸۹ درصد گزارش شده است (۱۹). درصد جوانه‌زنی برای آمفی‌پلوئیدهای حاصل از تلاقی گندم ترجیدوم و آجیلوپس تاوشی در حدود ۸۱ درصد برآورد شده است (۳۵).

در این پژوهش شمارش کروموزومی وجود ۳۵ (n=5x=35) کروموزوم را در هیبریدهای F_1 نشان داد که دلالت بر صحت انجام تلاقی‌ها داشت. به‌علاوه پلی‌پلوئیدی توسط کلشی‌سین در یکی از بوته‌ها با موفقیت القا شد. همهٔ بذرها حاصل از این بوته صاف بودند و در ضمن شمارش کروموزومی در ۴ بذر این بوته وجود ۷۰ کروموزوم را نشان داد، درحالی‌که سایر F_1 ها بذرهایی با تعداد کروموزوم متفاوت (از ۴۰ تا ۷۰) تولید کردند. پلی‌پلوئیدی همچنین به‌صورت خودبه‌خودی در بین بذرهای F_2 (دارای ۷۰ عدد کروموزوم) مشاهده شد. نتایج مشابهی توسط دیگر پژوهشگران ارائه شد، به‌طوری‌که ۳۵ کروموزوم را در هیبریدهای F_1 و ۷۰ (2n=10x=70) کروموزوم را در بذرهای F_2 حاصل از تلاقی گندم و آجیلوپس نشان دادند (۱۹). در تلاقی گندم نان با آجیلوپس کاسچی (۲۷)و تلاقی گندم نان با آجیلوبس واریابلیس (۳۹) نیز وجود ۳۵ کروموزوم برای هیبریدهای نسل اول و ۷۰ کروموزوم برای برخی بذرهای F_2 گزارش شد. در این پژوهش، بذرهای F_2 به‌طورکلی تعداد متفاوتی کروموزوم داشتند که بسته به اندازه، صاف و چروکیده‌بودن بذر تعداد کروموزوم‌ها نیز متفاوت بود. به همین ترتیب، نتاج حاصل از تلاقی گندم و تینوپایروم نیز تعداد کروموزوم‌ها تنوع داشتند (۲۱). در مطالعات انجام‌شده بر روی هیبریدهای نسل دوم حاصل از تلاقی گندم نان با آجیلوپس کاسچی نیز تعداد کروموزوم از ۴۰ تا ۷۰ عدد متفاوت بودند (۲۷). در نتاج حاصل از تلاقی ترتیکوم تورجیدوم و آجیلوپس تاوشی نیز تعداد کروموزوم‌های متفاوتی گزارش شده است (۳۵). علت متفاوت‌بودن تعداد کروموزوم‌ها و سطوح مختلف آنیوپلوئیدی در بذرهای آمفی‌پلوئید می‌تواند به‌دلیل وجود تعداد کروموزوم‌های متفاوت در گامت‌های فعال که به‌دلیل موفقیت هاپلوئیدی والد به‌وجود می‌آیند، باشد (۷ و ۳۰). در بررسی‌های میتوزی بیشتر کروموزوهای آجیلوپس تریانسیالیس نامتقارن از نوع تلوسنتزیک و ساب‌تلوسنتریک هستند. این بیانگر عدم تقارن کاریوتیپی است، به‌عبارتی ژنوم‌های C و U نامتقارن هستند (۵).

طی بررسی‌های متافاز I میوز ۳۵ کروموزوم برای هیبریدهای نسل اول مشاهده شد که به‌صورت یونی‌والنت یا بای‌والنت میله‌ای بودند. بی‌والنت‌های میله‌ای احتمالاً حاصل از اتصال کروموزوم‌های هومولگ هستند که به‌دلیل

مشـابهت نسـبی در تـوالی DNA بـه‌وجـود آمـده‌انـد. طـی بررسی‌های مشـابه بـر روی هیبریـدهای حاصـل از گنـدم و تینوپایروم، به‌طور مشابه تعدادی یونی‌والنت و مولتی‌والنت در سـلول‌هـای مـادر دانـه‌گـردهٔ آن‌هـا مشـاهده شـد (۲۱). در هیبریدهای حاصل از تلاقی گندم بهـاره- چینـی و آجیلـوپس بیانسیالیس (۱۶)، تلاقـی گنـدم بهـاره- چینـی بـا آجیلـوپس کاسچی (۳۱) و تلاقی گنـدم ترجیـدوم و آجیلـوپس تاوشـی (۳۵) نیز در مرحلهٔ متافاز I میوز به‌طور مشـابه تعـداد زیـادی یونی‌والنت و مولتی‌والنت مشاهده شـد. در هیبریـدهای نسـل اول (F_1) تعداد بی‌والنت‌ها بیشتر از تعداد یونی‌والنت‌ها بود و به‌طور متوسط ۷ بی‌والنت میله‌ای و ۲۱ یونی‌والنـت در آن‌هـا مشاهده شد. در تلاقی گندم نان و آجیلوپس کاسچی نیز تعداد کمـی بـی‌والنـت (۱/۰- ۴/۱۷) و تعـداد بـالایی یـونی‌والنـت (۲۵/۶۹- ۳۲/۷۴) بـرای هیبریـدهای حاصـل از تلاقـی آن‌هـا گزارش شده است (۲۷). در پژوهش حاضر، آمفی‌پلوئیـدهای مصنوعی خودبه‌خودی و القایی از تلاقی ارقام گنـدم نـان بـا آجیلوپس تریانسیالیس بـه‌دسـت آمـد و هیبریـدهای F_1 و F_2 (حاصـل از خودبـاروری F_1) بررسـی سـیتوژنتیکی و مورفولوژیکی شدند. به‌طورکلی، نتایج این پژوهش مـی‌توانـد در به‌نژادی گندم مفید باشد و آمفی‌پلوئیدهای حاصل به‌منزلـهٔ پلی در برنامه‌های به‌نژادی گندم استفاده شوند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه کردستان قدردانی می‌شود.

منابع

1. Alfares W, Bouguennec A, Balfourier F, Gay G, Bergès H, Vautrin S, Sourdille P, Bernard M and Feuillet C (2009) Fine mapping and marker development for the crossability gene *SKr* on chromosome 5BS of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetics. 183: 469-481.
2. Arrigo N, Guadagnuolo R, Lappe S, Pasche S, Parisod C and Felber F (2011) Gene flow between wheat and wild relatives: empirical evidence from *Aegilops geniculata*, *Ae. neglecta* and *Ae. triuncialis*. Evolutionary Applications. 4: 685-695.
3. Badaeva E, Amosova A, Samatadze T, Zoshchuk S, Shostak N, Chikida N, Zelenin A, Raupp W, Friebe B and Gill B (2004) Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster. Plant Systematics and Evolution. 246: 45-76.
4. Bretagnolle F and Thompson J (1995) Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. New Phytologist. 129: 1-22.
5. Chennaveeraiah M (1960) Karyomorphologic and cytotaxonomic studies in *Aegilops*. Acta Hort Gothoburg. 23: 85-178.
6. Claesson L, Kotimaki M and Bothmer Rv (1990) Crossability and chromosome pairing in some interspecific *Triticum* hybrids. Hereditas. 112: 49-55.
7. Evans LE (1964) Genome construction within the *Triticeae* I. The synthesis of hexaploids (2n = 42) having chromosomes of *Agropyron* and *Aegilops* in addition to the A and B genome of *Triticum durum*. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 6: 19-28.
8. Farkas A, Molnár I, Dulai S, Rapi S, Oldal V, Cseh A, Kruppa K, Molnár-Láng M and Puertas M (2014) Increased micronutrient content (Zn, Mn) in the 3Mb (4B) wheat–*Aegilops biuncialis* substitution and 3Mb. 4BS translocation identified by GISH and FISH. Genome. 57: 61-67.
9. Fedak G and Jui PY (1982) Chromosomes of Chinese Spring wheat carrying genes for crossability with Betzes barley. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 24: 227-233.

10. Gill B, Sharma H, Raupp W, Browder L, Hatchett J, Harvey T, Moseman J and Waines J (1985) Evaluation of *Aegilops* species for resistance to wheat powdery mildew, wheat leaf rust, Hessian fly, and greeenbug. Plant Disease. 69: 314-316.

11. Gill B and Friebe B (2002) Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. Cytogenetics. 567.

12. Gong W, Li G, Zhou J, Li G, Liu C, Huang C, Zhao Z and Yang Z (2014) Cytogenetic and molecular markers for detecting *Aegilops uniaristata* chromosomes in a wheat background. Genome. 57: 1-9.

13. Kihara H and Lilienfeld F (1935) Weitere Untersuchungen an *Aegilops* X *Triticum* and *Aegilops* X *Aegilops*-Bastarden. Cytologia. 195-216.

14. Kilian B, Mammen K, Millet E, Sharma R, Graner A, Salamini F, Hammer K and Özkan H (2011) *Aegilops*. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Springer.Pp 1-76.

15. Kimber G and Yen Y (1989) Hybrids involving wheat relatives and autotetraploid *Triticum umbellulatum*. Genome. 32: 1-5.

16. Kimber G and Tsunewaki K (1996) Genome symbols and plasma types in the wheat group. In Proceedings of the 7th International Wheat Genetics Symposium, 13-19 July 1988. Edited by Miller TE, Koebner RMD. Cambridge, England. Institute of Plant Science Research, Cambridge Laboratory, Trumpington, England: 1209-1210.

17. L David J, Benavente E, Bres-Patry C, Dusautoir J 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.

18. Liu D, Lan X, Yang Z, Zheng Y, Wei Y and Zhou Y (2002) A unique *Aegilops tauschii* genotype needless to immature embryo culture in cross with wheat. Acta Botanica Sinica. 44: 708-713.

19. Loureiro I, Escorial C, García-Baudin J and Chueca C (2009) Spontaneous wheat-*Aegilops biuncialis*, *Ae. geniculata* and *Ae. triuncialis* amphiploid production, a potential way of gene transference. Spanish Journal of Agricultural Research. 7: 614-620.

20. Martin-Sanchez J, Gomez-Colmenarejo M, Del Moral J, Sin E, Montes M, Gonzalez-Belinchon C, Lopez-Brana I and Delibes A (2003) A new Hessian fly resistance gene (H30) transferred from the wild grass *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics. 106: 1248-1255.

21. Mirzaghaderi G, Karimzadeh G, Hassani HS, Jalali-Javaran M and Baghizadeh A (2010) Cytogenetic analysis of hybrids derived from wheat and *Tritipyrum* using conventional staining and genomic *in situ* hybridization. Biologia Plantarum. 54: 252-258.

22. Murai K and Tsunewaki K (1986) Molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops* species. IV. CtDNA variation in *Ae. triuncialis*. Heredity. 57: 335-339.

23. Prazak R (2014) The role of *Aegilops* species in the origin and improvement of common wheat. Acta Agrobotanica. 66: 7-14.

24. Rajaram S, Varughese G, Abdalla O, Pfeiffer W and Van Ginkel M (1993) Accomplishments and challenges in wheat and *triticale* breeding at

CIMMYT. In: Plant Breeding Abstracts.Pp. 131-139.

25. Ramsey J and Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics. 467-501.

26. Ramsey J and Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. Annual review of ecology and systematics. 589-639.

27. Rawat N, Tiwari VK, Neelam K, Randhawa GS, Chhuneja P, Singh K and Dhaliwal HS (2009 a) Development and characterization of *Triticum aestivum–Aegilops kotschyi* amphiploids with high grain iron and zinc contents. Plant Genetic Resources. 7: 271-280.

28. Romero M, Montes M, Sin E, Lopez-Brana I, Duce A, Martin-Sanchez J, Andres M and Delibes A (1998) A cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) resistance gene transferred from *Aegilops triuncialis* to hexaploid wheat. Theoretical and Applied Genetics. 96: 1135-1140.

29. Sharma H (1999) Embryo Rescue Following Wide Crosses. In: R. Hall (Editor),. Plant Cell Culture Protocols Methods In Molecular Biology Humana Press. Pp 293-307.

30. Sharma HC and Gill BS (1983) Current status of wide hybridization in wheat. Euphytica. 32: 17-31.

31. Tiwari VK, Rawat N, Neelam K, Kumar S, Randhawa GS and Dhaliwal HS (2010) Substitutions of 2S and 7U chromosomes of *Aegilops kotschyi* in wheat enhance grain iron and zinc concentration. Theoretical and Applied Genetics. 121: 259-269.

32. Valkoun J (2001) Wheat pre-breeding using wild progenitors. Wheat in a global environment. Springer.Pp. 699-707.

33. Vanichanon A, Blake N, Sherman J and Talbert L (2003) Multiple origins of allopolyploid *Aegilops triuncialis*. Theoretical and Applied Genetics. 106: 804-810.

34. Waines JG and Barnhart D (1992) Biosystematic research in *Aegilops* and *Triticum*. Hereditas. 116: 207-212.

35. Wang C-J, Zhang L-Q, Dai S-F, Zheng Y-L, Zhang H-G and Liu D-C (2010) Formation of unreduced gametes is impeded by homologous chromosome pairing in tetraploid *Triticum turgidum*× *Aegilops tauschii* hybrids. Euphytica. 175: 323-329.

36. Wang J, Luo MC, Chen Z, You FM, Wei Y, Zheng Y and Dvorak J (2013) *Aegilops tauschii* single nucleotide polymorphisms shed light on the origins of wheat D-genome genetic diversity and pinpoint the geographic origin of hexaploid wheat. New Phytologist. 198: 925-937.

37. Watanabe1 S, Endo1 TR and Nasuda1 S (2014) Chromosome 3B of Chinese Spring wheat is not a prerequisite for the gametocidal action of the Gc3-C1 gene. Wheat Information Service. 117: 1-3.

38. Yoshiya K, Watanabe N, Kuboyama T and Lapochkina I (2012) Genetic mapping of the gene for brittle rachis in a *Triticum aestivum*—*Aegilops triuncialis* introgression line. Genetic Resources and Crop Evolution. 59: 67-72.

39. You-wei Y, Zhang L-q, Yen Y, Zheng Y-l and Liu D-c (2010) Cytological Evidence on Meiotic Restitution in Pentaploid F1 Hybrids between Synthetic Hexaploid Wheat and *Aegilops variabilis*. Caryologia. 63:354-358.