

شناسایی سیتوتیپ‌های گندم نیا *Aegilops crassa* از ایران و تعیین صفات ریختی متمایز کننده آنها

مجتبی رنجبر^{۱*}، محمدرضا نقوی^۲، عباسعلی زالی^۳، محمد جعفر آقایی^۴ و عیسی ظریفی^۵
۱، ۲، ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴، ۵. استادیار و محقق مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش ژنتیک
(تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱ - تاریخ تصویب: ۸۸/۷/۸)

چکیده

به منظور شناسایی سطح پلوئیدی جمعیت‌های آزیلوپس کراسا (*A. crassa*) بومی ایران، ۶۷ نمونه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران با دو روش فلوسایتومتری و سیتوژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس مقایسه نسبت شدت فلورسنس نمونه‌های آزیلوپس کراسا با آزیلوپس تانوشی (به عنوان شاهد) دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید در نمونه‌های بومی ایران شناسایی شد. مطالعات سیتوژنتیکی با نتایج فلوسیتومتری وجود دو سیتوتیپ در آزیلوپس کراساهای بومی ایران را تایید نمود. سیتوتیپ تتراپلوئید دامنه‌ای از طول کروموزوم از $۱۳/۸۸ \pm ۰/۶۵$ میکرومتر (بلندترین کروموزوم) تا $۸/۷۵ \pm ۰/۴۳$ میکرومتر (کوتاه‌ترین کروموزوم) با متوسط طول کروموزوم $۱۱/۲۱ \pm ۰/۲۰$ میکرومتر و طول کل ژنوم $۱۵۶/۸۸$ میکرومتر بود. تیپ کروموزوم‌ها در سیتوتیپ تتراپلوئید به جز کروموزوم‌های شماره ۴، ۸ و ۱۳ از نوع متاستریک بوده و این ۳ کروموزوم از نوع ساب متاستریک بودند، که اندازه نسبت بازوی کروموزوم آنها به ترتیب $۱/۷۰ \pm ۰/۱۰$ ، $۲/۱۶ \pm ۰/۱۷$ و $۱/۸۴ \pm ۰/۱۲$ میکرومتر بوده است. سیتوتیپ هگزاپلوئید که طول کروموزوم‌های آن از $۱۲/۹۵ \pm ۰/۵۶$ میکرومتر (بلندترین کروموزوم) تا $۷/۵۳ \pm ۰/۳۴$ میکرومتر (کوتاه‌ترین کروموزوم) تغییر می‌کرد. متوسط طول کروموزوم در این سیتوتیپ $۱۰/۳۵ \pm ۰/۲۳$ میکرومتر و طول کل ژنوم $۲۱۷/۳۹$ میکرومتر بود. تیپ کروموزوم‌های این سیتوتیپ عمدتاً از نوع متاستریک بود ولی کروموزوم شماره ۳ به صورت ساب متاستریک با اندازه نسبت بازوی کروموزوم $۱/۷۶ \pm ۰/۰۲$ میکرومتر بود و سه جفت ماهواره بر روی کروموزوم‌های شماره ۳، ۶ و ۱۰ وجود داشت، که اندازه آنها به ترتیب $۱/۰۹$ ، $۲/۰۹$ و $۱/۵۴$ میکرومتر بود. نتایج آزمون مقایسه سیتوتیپ‌ها از نظر صفات مورفولوژیکی نشان داد که صفات ارتفاع، طول برگ پرچم، رنگ گلوم و کرک گلوم دارای تفاوت معنی‌داری در دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید می‌باشند و بنابراین از این صفات می‌توان برای شناسایی این دو نوع سیتوتیپ استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آزیلوپس کراسا، سیتوتیپ، فلوسایتومتری، ماهواره.

مقدمه

پلی‌پلوئید می‌باشد (Van Slegeren, 1994). تمامی گونه‌های دیپلوئید دارای ژنوم متمایز می‌باشند و به

جنس آزیلوپس شامل ۱۱ گونه دیپلوئید و ۱۲ گونه

جاده‌ها رشد می‌کند (Van Slegeren, 1994). در آنالیز دورگ‌گیری بین گونه‌ای پیشنهاد شده که یکی از ژنوم‌های آزیلوپس کراسا تتراپلوئید از ژنوم D آزیلوپس تائوشی مشتق گردیده و سپس در طی گونه‌زایی مشمول تغییرات اساسی گردیده است (Badeava et al., 2002). همچنین فرضیه ای وجود دارد که ژنوم دیگر آن یعنی ژنوم M از آزیلوپس کموسا^۲ بدست آمده است (Kihara (Kihara & Tanaka, 1970; Kimber & Feldman, 1987). در بررسی‌های DNA کلروپلاست و میتوکندری نشان داده شده است که سیتوتیپ‌های هگزاپلوئید و تتراپلوئید آزیلوپس کراسا دارای نوع سیتوپلاسم D₂ بوده که با همه پلاسمون‌های گونه‌های دیپلوئید شناخته شده متفاوت می‌باشد. هر چند پیشنهاد شده است که D₂ را ممکن است از ژنوم سیتوپلاسمی آزیلوپس تائوشی گرفته باشد (Tsunewaki, 1993). همچنین مشخص شده است که دو ژنوم موجود در آزیلوپس کراسای تتراپلوئید اساساً تغییر یافته است (Zhang & Dvorak, 1992; Tsunewaki, 1993).

در یکسری مطالعات دیگر با بررسی ۱۹ نمونه آزیلوپس کراسا از چند کشور مشخص شده دو جابجایی دو طرفه در نمونه‌های تتراپلوئید رخ داده است. هر چند در بعضی از نمونه‌های ایران جابه جایی انجام نشده است (Badeava et al, 1998). نواربندی نوع C^۳ و الگوی دورگ‌گیری در محل^۴ (ISH) در کروموزوم ژنوم X و D تتراپلوئید متفاوت از همه گونه‌های آزیلوپس کراسا هگزاپلوئید نشان داده شد (Badeava et al., 1998). بطوریکه این تغییرات بعلاوه بازترتیبی که در این نمونه‌ها در طی گونه زایی اتفاق افتاده می‌باشد. نواربندی نوع C و الگوی هیبریداسیون در محل در ژنوم D₂ هگزاپلوئید خیلی شبیه کروموزوم ژنوم D آزیلوپس تائوشی می‌باشد (Friebe et al., 1992; Badeava et al., 1998). همچنین این محققان در ادامه بیان کردند که آزیلوپس کراسا تتراپلوئید دارای دو جفت ماهواره در کروموزوم‌های (H و M) بوده و کروموزوم H بیشتر متاستریک و کروموزوم M ساب متاستریک می‌باشد،

آسانی از طریق خصوصیات مورفولوژیکی قابل تشخیص می‌باشند. در مقابل مرز مورفولوژیکی بین گونه‌های آزیلوپس پلی‌پلوئید نا مشخص و تعداد زیادی از آنها دارای فرم‌های حدواسط می‌باشند (Zohary, 1966). با توجه به نقش اساسی پلی‌پلوئیدی در تکامل گونه‌های تریتیکوم و آزیلوپس که در اوایل قرن بیستم شناسایی شده است (Sax, 1922)، کیهارا گزارشات متعددی را درباره تکامل ژنتیکی و ارتباط ژنتیکی بین این گونه‌ها نوشته است (Kihara & Tanaka, 1970). تحقیقات در مورد منشا آزیلوپس های پلی‌پلوئید نشان داد که ژنوم بعضی از گونه‌ها بسیار شبیه ژنوم دیپلوئیدهای اجدادی است. در حالیکه برخی ژنها در بعضی از گونه‌ها تغییر یافته‌اند، در ادامه تحقیقات کیهارا پیشنهاد کرد که یکسری گونه‌های از بین رفته، دهنده این ژنوم‌های تغییر یافته به این گونه‌های پلی‌پلوئید بوده یا این ژنها در طی تکامل به صورت معنی‌داری بازترتیبی^۱ مجدد یافته‌اند (Kihara, 1963).

تاکنون ۳ ژنوم محوری در جنس آزیلوپس شناسایی شده است، که بر اساس آن همه گونه‌های پلی‌پلوئید به ۳ کلاستر دسته‌بندی شدند. یکی از این کلاسترها شامل ژنوم D می‌باشد که شامل یک گونه دیپلوئید و ۵ گونه پلی‌پلوئید می‌باشد (Badeava et al., 2004). یکی از این گونه‌های پلی‌پلوئید آزیلوپس کراسا می‌باشد که شامل ۲ سیتوتیپ تتراپلوئید ($2n=4x=28, D_1D_1XX$) و هگزاپلوئید ($2n=6x=42, D_1D_1XX D_2D_2$) می‌باشد. در مطالعات آنالیز جفت شدن کروموزوم‌های میوزی در دورگ‌گیری بین آزیلوپس کراسا تتراپلوئید و هگزاپلوئید نشان داده شده است که شکل هگزاپلوئید از دورگ‌گیری بین آزیلوپس کراسا تتراپلوئید و آزیلوپس تائوشی به وجود آمده است (Kimber & Zhao, 1983; Dubkovsky & Dvorak, 1995).

آزیلوپس کراسا دارای درجه بالایی از تنوع مورفولوژیکی بوده و در ناحیه وسیعی شامل (ترکیه، فلسطین، لبنان، سوریه، عراق، ایران، افغانستان، ترکمنستان و کوه‌های آلتای) پراکنش یافته و بصورت یک علف هرز در دامنه‌های سنگی و استیپ و کنار

2. *Aegilops comosa*

3. C-banding

4. In situ hybridization

1. Rearrangement

(1989) بوده که برای تخمین سطح پلوئیدی نمونه‌های آژیلوپس کراسا از مقایسه نسبت شدت فلورسنس نمونه‌های آژیلوپس کراسا با نمونه شاهد آژیلوپس تاوشی (P_2/P_1) استفاده گردید. در ابتدا چهار برگ از هر نمونه به حجم 0.5cm^2 در داخل $400\mu\text{l}$ بافر استخراج (محلول A) در دمای اتاق کاملاً خرد گردید (محلول A): عمل جداسازی هسته‌ها را از برگ انجام می‌دهد. سپس سوسپانسیون حاصل از یک صافی نایلون $40\mu\text{m}$ فیلتر شده و در ادامه با $160\mu\text{l}$ محلول DAPI (محلول B) حداقل برای مدت ۲ دقیقه مخلوط گردید (محلول B): عمل رنگ‌آمیزی هسته‌ها را انجام می‌دهد. سپس سوسپانسیون هسته‌ها با دستگاه فلوسیتومتری CA-III آنالیز شدند (Bagwell et al., 1989).

مطالعه سیتوزنتیک

به منظور مطالعات سیتوزنتیکی از مریستم‌های نوک ریشه بر روی کاغذ صافی در پتری دیش استفاده شد. برای این منظور ابتدا بذرها با محلول آب ژاول (۹:۱) به مدت ۳۰ دقیقه ضد عفونی شدند و برای به دست آوردن مریستم ریشه‌ای در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روی کاغذ صافی در پتری دیش جوانه دار شدند. مریستم‌های بدست آمده از گیاهچه‌ها، در محلول ۸-هیدروکسی کوئینولین در دمای ۴-۶ درجه سانتی‌گراد تیمار و در محلول لویتسکی (Lewitsky) تثبیت گردیدند. سپس نوک ریشه‌ها در NaOH یک نرمال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه هیدرولیز و با استو آبرون هماتوکسیلین در دمای ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت رنگ‌آمیزی شدند (Agayev, 2002; Zarifi et al., 2005).

جهت مطالعات میکروسکوپی برای از بین بردن دیواره سلول‌ها از آنزیم سیتاز استفاده شد. در یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد اسکواش نمونه میکروسکوپی تهیه گردید و با بزرگنمایی $1000\times$ ، پنج صفحه متافازی مناسب عکسبرداری گردید و برای تهیه کاریوتیپ و پارامترهای کروموزوم‌ها شامل طول بازوی کوتاه (SA)، طول بازوی بلند (LA)، نسبت بازوها (AR)، شاخص سانترومری (CI) بیانگر نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم، تیپ سانترومری براساس روش Levan et al. (1964)، ماهواره (Sat)، اختلاف درصد طول نسبی

در حالیکه در هگزاپلوئید ۳ جفت ماهواره وجود دارد که کروموزوم M و کروموزوم H را از تتراپلوئید گرفته و سومین ماهواره را از ژنوم D_2 که بر روی کروموزوم $5D_2$ قرار دارد، گرفته است (Badeava et al., 1998).

Pfoser et al. (2006) با اندازه‌گیری میزان DNA هسته‌ای بوسیله دستگاه فلوسایتومتری، اضافه شدن یا از دست دادن یک کروموزوم یا بازوی کروموزومی را در تریتیکاله و لاین‌های حاصل از تلاقی بین گندم و چاودار تشخیص دادند. میزان DNA هسته‌ای این گیاهان در مقایسه با میزان DNA هسته‌ای هم خانواده آنها که یوپلوئیدی می‌باشد محاسبه شد و این بررسی نشان داد کمترین تفاوت در سطح DNA در بین گیاهان یوپلوئید و آنیو پلوئید برابر با $1/84\%$ می‌باشد. این افراد بیان کردند که از روش فلوسایتومتری به عنوان یک روش آسان و موثر برای تشخیص گیاهان آنیوپلوئید و یوپلوئید در گندم و تریتیکاله می‌توان استفاده کرد.

از آنجائی که در ایران کاری در خصوص مطالعه سیتوتیپ‌های آژیلوپس کراسای بومی ایران صورت نگرفته است، هدف از این تحقیق شناسایی این سیتوتیپ‌ها و همچنین شناسایی نشانگرهای مورفولوژیکی متمایزکننده دو نوع سیتوتیپ تتر و هگزاپلوئید این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ۶۷ نمونه آژیلوپس کراسای بومی ایران که توسط بخش ژنتیک و ذخایر توارثی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر از مناطق جغرافیایی مختلف جمع‌آوری شده بود استفاده گردید (جدول ۱).

مطالعه پلوئیدی با استفاده از روش فلوسایتومتری

برای تعیین سطح پلوئیدی آژیلوپس کراساهای بومی ایران با دستگاه فلوسایتومتری (ساخت کشور آلمان)، از گونه آژیلوپس تاوشی به عنوان شاهد با سطح پلوئیدی مشخص (دیپلوئید) استفاده شد (چون برای تعیین سطح پلوئیدی یک نمونه نامشخص باید از یک نمونه هم خانواده آن با سطح پلوئیدی مشخص استفاده کرد ما در اینجا از آژیلوپس تاوشی به عنوان شاهد استفاده کردیم). روش کار بر اساس روش Bagwell et al.

بوته‌های داخل ردیف ۵ سانتی‌متر در قالب یک طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت گردید. پانزده صفت کمی شامل تعداد سنبلچه در سنبله، عرض گره محور سنبله (میلی‌متر)، تعداد برگ زیر خوشه، طول گره محور سنبله (سانتی‌متر)، تعداد بذر در سنبلچه، عرض گلوم سنبلچه (میلی‌متر)، طول گلوم سنبلچه (سانتی‌متر)، تعداد گره در ساقه، طول برگ پرچم (سانتی‌متر)، طول سنبله (سانتی‌متر)، قطر سنبله (میلی‌متر)، قطر ساقه (میلی‌متر)، طول دانه (سانتی‌متر)، عرض دانه (میلی‌متر) و ارتفاع (سانتی‌متر) برای هر تکرار بر اساس ۵ بوته تصادفی یادداشت و میانگین ۵ بوته در تجزیه‌ها استفاده شد.

بزرگترین و کوچکترین کروموزوم (DRL)، طول نسبی کروموزوم (RL)، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A₁)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A₂)، درصد چندشکلی (TF)، فرمول کروموزومی و برای تعیین وضعیت تکاملی و مطالعه تقارن کاربوتیپی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از جدول دو طرفه کلاس تقارن (SC) روش Stebbins (1971) استفاده شد. برای ارزیابی این پارامترها از نرم‌افزار Micromeaser استفاده شد (Zarifi et al., 2005).

صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده

به منظور ارزیابی مورفولوژیکی هر نمونه آزیلوپس کراسا در یک کرت به طول و عرض یک متر و فاصله

جدول ۱- سطح پلوئیدی و محل جمع‌آوری آزیلوپس کراسا بومی ایران

شماره	سطح پلوئیدی	محل جمع‌آوری	شماره	سطح پلوئیدی	محل جمع‌آوری
۱	4x	همدان	۳۶	4x	خراسان شمالی
۲	4x	ایلام	۳۷	4x	ایلام
۳	4x	آذربایجان غربی	۳۸	4x	ایلام
۴	4x	زنجان	۳۹	4x	فارس
۵	4x	آذربایجان غربی	۴۰	4x	زنجان
۶	4x	آذربایجان غربی	۴۱	4x	آذربایجان غربی
۷	4x	قزوین	۴۲	4x	آذربایجان غربی
۸	4x	فارس	۴۳	4x	کرمانشاه
۹	4x	ایلام	۴۴	4x	قزوین
۱۰	4x	فارس	۴۵	4x	کرمانشاه
۱۱	4x	چهارمحال و بختیاری	۴۶	4x	کرمانشاه
۱۲	4x	کرمانشاه	۴۷	4x	کردستان
۱۳	4x	آذربایجان غربی	۴۸	4x	آذربایجان غربی
۱۴	4x	لرستان	۴۹	4x	آذربایجان شرقی
۱۵	4x	فارس	۵۰	4x	ایلام
۱۶	4x	آذربایجان غربی	۵۱	4x	مرکزی
۱۷	4x	کردستان	۵۲	4x	آذربایجان غربی
۱۸	4x	آذربایجان غربی	۵۳	4x	فارس
۱۹	4x	ایلام	۵۴	4x	خراسان شمالی
۲۰	4x	چهارمحال و بختیاری	۵۵	4x	کرمانشاه
۲۱	4x	ایلام	۵۶	4x	مرکزی
۲۲	4x	ایلام	۵۷	4x	خراسان شمالی
۲۳	4x	خوزستان	۵۸	4x	لرستان
۲۴	4x	زنجان	۵۹	4x	کردستان
۲۵	4x	زنجان	۶۰	4x	کرمانشاه
۲۶	4x	کردستان	۶۱	6x	خراسان رضوی
۲۷	4x	همدان	۶۲	6x	خراسان رضوی
۲۸	4x	کرمانشاه	۶۳	6x	ایلام
۲۹	4x	فارس	۶۴	6x	کرمانشاه
۳۰	4x	کرمانشاه	۶۵	6x	خراسان رضوی
۳۲	4x	کرمانشاه	۶۶	6x	خراسان رضوی
۳۴	4x	همدان	۶۷	6x	خراسان رضوی
۳۵	4x	آذربایجان غربی			

فلورسنس شاهد ۲ برابر می‌باشد. اما در شکل ۱C نمونه پیک ۲ دارای مد ۱۹۵ و شدت فلورسنس ۲۱۰-۱۸۰ است، که نسبت به مد و شدت فلورسنس شاهد ۳ برابر بوده که تأیید کننده وجود آزیلوپس کراسای هگزاپلوئید در نمونه‌های ایران می‌باشد. در این تحقیق با بررسی ۶۷ نمونه آزیلوپس کراسا بومی ایران ۶۰ نمونه سیتوتیپ تتراپلوئید (D_1D_1MM) و ۷ نمونه سیتوتیپ هگزاپلوئید ($D_1D_1MMD_2D_2$) مشخص گردید. اگرچه وجود سیتوتیپ‌های آزیلوپس کراسای تتراپلوئید قبلا در ایران گزارش شده بود (Kihara, 1957) ولی این گزارش اولین بار وجود آزیلوپس کراسای هگزاپلوئید را نیز در ایران نشان می‌دهد. از این روش به کرات در مطالعات برای تعیین سطوح پلوئیدی نمونه‌های مختلف استفاده شده است. چنانکه Yokoya et al. (2000) با بررسی سطح پلوئیدی ۳۴ نمونه گل رز با روش فلوسایتومتری، سطوح پلوئیدی مختلفی را در این ۳۴ نمونه گزارش نمودند. پس با توجه به تحقیقات انجام شده حاضر و قبلی به طور فراوان دستگاه فلو سیتومتری یک دستگاه دقیق و راحت برای تعیین سطح پلوئیدی آزیلوپس کراسا بوده و همچنین حداقل صدمه را به گیاه مورد بررسی وارد می‌کند. چون یک تکه برگ کوچک برای اندازه‌گیری سطح پلوئیدی کافی می‌باشد.

مطالعه سیتوزنتیکی

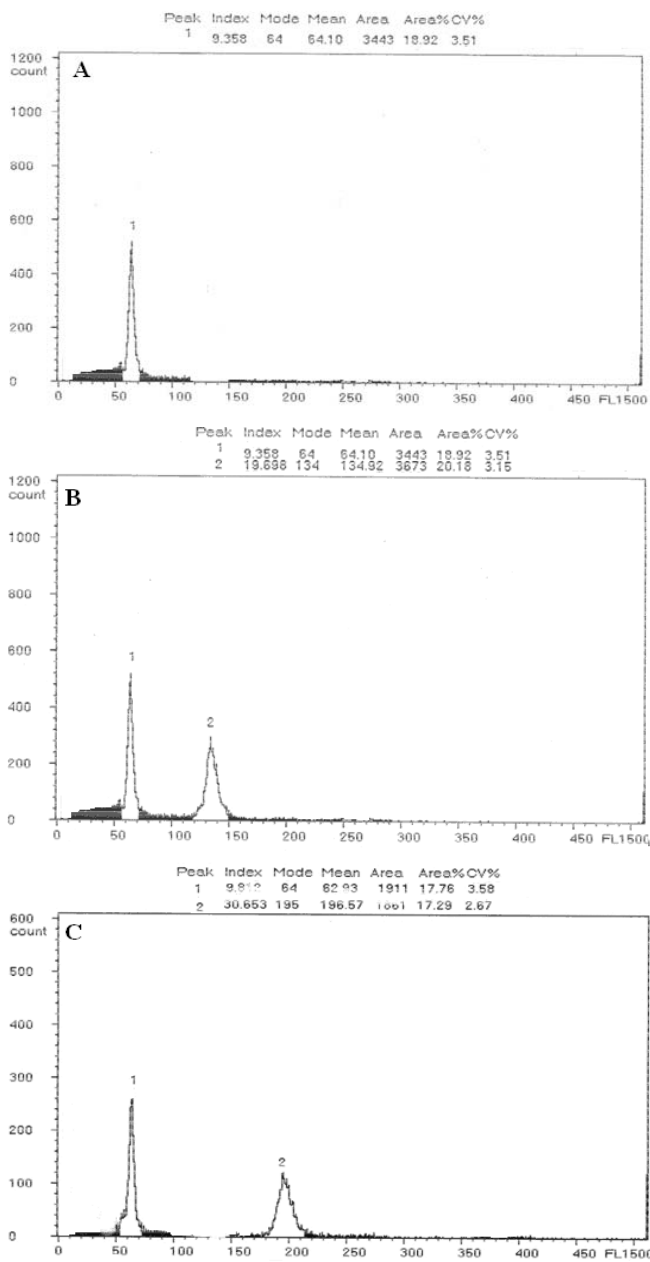
برای تایید و اطمینان از نتایج سطح پلوئیدی حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نمونه‌های هگزاپلوئید و تتراپلوئید شناخته شده از طریق مطالعات سیتولوژی با استفاده از روش اسکواش پیشرفته نیز مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات سیتولوژیکی نتایج حاصل از مطالعات فلوسایتومتری را تایید کرده و نشان داد که نمونه‌های بومی ایران دارای ۲ سطح پلوئیدی هگزاپلوئید و تتراپلوئید می‌باشند (شکل‌های ۲ و ۳). پس از تهیه کاریوتیپ این دو سیتوتیپ با استفاده از ۵ صفحه متافازی، در سیتوتیپ تتراپلوئید طول بلندترین کروموزوم (شماره ۱) $13/88 \pm 0/65$ میکرومتر و طول کوتاه‌ترین کروموزوم (شماره ۱۴) $8/75 \pm 0/43$ میکرومتر و هر دو متاسنتریک می‌باشند.

همچنین هشت صفت کیفی شامل: عادت رشد (۱- ایستاده ۷۰-۹۰ درجه ۳- نیمه ایستاده ۳۰-۷۰ درجه ۵- خوابیده کمتر از ۳۰ درجه)، رنگ ساقه (۱- سبز کم رنگ ۳- سبز پر رنگ ۵- ارغوانی و سبز ۷- ارغوانی)، شکنندگی محور سنبله (۱- خیلی شکننده ۳- متوسط ۵- محکم)، رنگ گلوم (۱- سفید ۲- قرمز تا قهوه‌ای ۳- ارغوانی تا سیاه)، کرک گلوم (۱- فاقد کرک ۳- خیلی کم ۵- متوسط ۷- زیاد)، رنگ پرچم (۱- سبز ۲- زرد ۳- بنفش)، کرک ساقه (۱- فاقد کرک ۳- خیلی کم ۵- متوسط ۷- زیاد) و بافت دانه (۳- آردی ۵- نیمه‌شیشه‌ای ۷- شیشه‌ای) برای هر نمونه یادداشت گردید. به منظور تشخیص صفات مورفولوژیکی کمی متمایزکننده سیتوتیپ‌های هگزاپلوئید و تتراپلوئید از آزمون t استیودنت جفت نشده و برای صفات کیفی از آزمون مانویتنی استفاده گردید (Ranjbar et al., 2007).

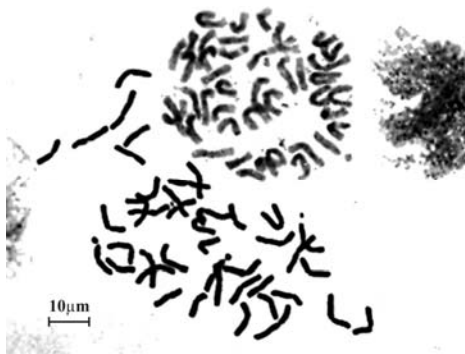
نتایج و بحث

مطالعه فلوسایتومتری

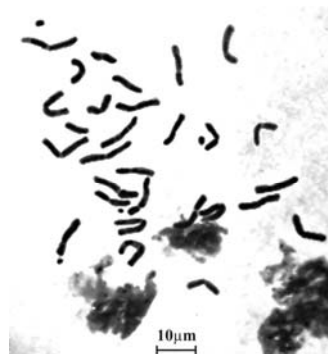
به منظور تعیین سطح پلوئیدی ۶۷ نمونه آزیلوپس کراسای بومی ایران از طریق دستگاه فلوسایتومتری، نسبت میزان DNA هسته برگ از نمونه‌های آزیلوپس کراسا و گیاه شاهد آزیلوپس تائوشی مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا یک نمونه از گیاه شاهد را در محلول استخراج خرد کرده و هسته‌ها را بوسیله DAPI رنگ‌آمیزی شده و تا پیک G_1 (مد) آن و شدت فلورسنس هسته‌های آن مشخص شود. همانطور که در شکل (۱A) مشاهده می‌کنیم مد آزیلوپس تائوشی برابر ۶۴ و شدت فلورسنس هسته‌ها در حدود ۷۰-۶۰ و ضریب تغییرات کمتر از ۵٪ می‌باشد. سپس با بررسی همزمان شاهد و نمونه‌های مورد بررسی هرگاه پیک G_1 و شدت فلورسنس نمونه‌های مورد بررسی ۲ برابر گیاه شاهد بدست آمد نمونه مورد بررسی تتراپلوئید در نظر گرفته شدند. همانطوری که در شکل ۱B مشاهده می‌شود پیک شماره ۲ بیانگر یک نمونه آزیلوپس کراسای تتراپلوئید می‌باشد که دارای مد ۱۳۴ و شدت فلورسنس ۱۴۰-۱۲۰ است که نسبت به مد و شدت



شکل ۱- شدت فلورسنس DAPI (محور x)، تعداد هسته‌ها (محور y) گیاه شاهد آزیلوپس تائوشی (A)، گیاه شاهد تائوشی و نمونه تتراپلوئید (B)، گیاه شاهد تائوشی و نمونه هگزاپلوئید (C)



شکل ۳- یک نمونه سیتوتیپ هگزاپلوئید $2n = 6x = 42$, (*Aegilops crassa*)



شکل ۲- یک نمونه از سیتوتیپ تتراپلوئید $2n = 4x = 28$, (*Aegilops crassa*)

کوچکترین کروموزوم ۲/۵ میکرومتر، میانگین شاخص سانترومری ۴۲/۵۹ میکرومتر، کل سهم بازوی‌های بلند کروموزوم در طول کروموزوم ۵۷/۲۹ میکرومتر، کل سهم بازوی‌های کوتاه کروموزوم در طول کروموزوم ۴۲/۷۱ میکرومتر، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی ۰/۲۵ میکرومتر، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی ۰/۱۴ میکرومتر، نمونه‌های هگزاپلوئید مورد بررسی دارای سه جفت ماهواره در کروموزوم‌های شماره ۳، ۶ و ۱۰ که اندازه آنها به ترتیب ۱/۰۹، ۲/۰۹ و ۱/۵۴ میکرومتر و فرمول کروموزومی این سیتوتیپ به صورت زیر محاسبه شده است:

$$2n=6x=42=36m+2m^{sat}+2m^{sat}+2sm^{sat}$$

نتایج بدست آمده در این مطالعه، در تیپ کروموزوم‌ها، تعداد ماهواره، نسبت بازوها و طول نسبی کروموزوم با نتایج بدست آمده (1998) Badeava et al. هم‌خوانی داشت. کلاس تقارن هر دو سیتوتیپ بر اساس جدول دو طرفه (1971) Stebbins 1A بدست آمد که نشان‌دهنده این موضوع می‌باشد که کاریوتیپ این گونه متقارن می‌باشد، یعنی بیشتر کروموزوم‌ها به طرف سانترومری میانی (متاسنتریک) تمایل پیدا کرده‌اند و در مراحل اولیه تکامل قرار دارند (جداول ۲ و ۳). روند تغییرات دو شاخص $\%TF$ و A_1 (به عنوان شاخص‌های عدم تقارن درون کروموزومی) در دو سیتوتیپ مورد بررسی بیانگر وجود رابطه معکوس بین دو شاخص فوق بود، همچنین روند تغییرات دو شاخص DRL و A_2 (به عنوان شاخص‌های عدم تقارن بین کروموزومی) در دو سیتوتیپ بیانگر رابطه مستقیم براساس سطوح پلوئیدی می‌باشد، یعنی هرچه سطح پلوئیدی بیشتر میزان این دو شاخص کمتر است (جداول ۲ و ۳). ویژگی‌های کروموزومی سیتوتیپ‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید در جداول ۲ و ۳ آمده است.

صفات مورفولوژیکی متمایزکننده بین سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید

به منظور شناسایی صفات متمایزکننده دو نوع سیتوتیپ از آزمون t (برای صفات کمی) و یا آزمون مانویتنی (برای صفات کیفی) استفاده گردید که نتایج آن در جداول ۴ و ۵ آمده است.

تیپ کروموزوم به روش (1964) Levan et al. تعیین و معلوم شد که از مجموع ۱۴ جفت کروموزوم به جز کروموزوم‌های شماره ۴، ۸ و ۱۳ بقیه کروموزوم‌های این سیتوتیپ متاسنتریک بوده ولی این سه کروموزوم ساب متاسنتریک و اندازه نسبت بازوها به ترتیب در آنها 1.0 ± 0.17 ، 1.17 ± 0.16 و 1.12 ± 0.14 میکرومتر و اندازه متوسط طول کروموزوم در سیتوتیپ تتراپلوئید 11.21 ± 0.20 میکرومتر، طول کل ژنوم 156.88 میکرومتر، میانگین نسبت بازوها در این سیتوتیپ 1.03 ± 0.14 ، میانگین بازوی کوتاه 4.66 ± 0.11 میکرومتر، میانگین بازوی بلند 6.54 ± 0.12 میکرومتر، میانگین شاخص سانترومری 41.50 میکرومتر، کل سهم بازوی‌های بلند کروموزوم در طول کروموزوم 58.40 میکرومتر، کل سهم بازوی‌های کوتاه کروموزوم در طول کروموزوم 41.60 میکرومتر، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی 0.28 میکرومتر، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی 0.15 میکرومتر، اختلاف درصد طول نسبی بزرگترین و کوچکترین کروموزوم 3.27 میکرومتر، درصد چندشکلی 41.59 میکرومتر، نمونه‌های تتراپلوئید مورد بررسی دارای دو جفت ماهواره در کروموزوم‌های شماره ۴ و ۱۰ که اندازه آنها به ترتیب 1.33 و 2.19 میکرومتر و فرمول کروموزومی این سیتوتیپ به صورت زیر محاسبه شده است:

$$2n=4x=28=20m+2m^{sat}+2sm^{sat}+4sm$$

در سیتوتیپ هگزاپلوئید طول بلندترین کروموزوم (شماره ۱) 12.95 ± 0.56 میکرومتر و طول کوتاهترین کروموزوم (شماره ۲۱) 7.53 ± 0.34 میکرومتر و هر دو متاسنتریک بوده و تمام جفت کروموزوم‌ها به جز کروموزوم شماره ۳ از نوع متاسنتریک می‌باشد در حالیکه کروموزوم شماره ۳ از نوع ساب متاسنتریک و اندازه نسبت بازو آن 1.02 ± 0.17 میکرومتر است. اندازه متوسط طول کروموزوم در این سیتوتیپ 10.35 ± 0.23 میکرومتر، طول کل ژنوم 217.39 میکرومتر، میانگین نسبت بازوها 1.03 ± 0.13 میکرومتر، میانگین بازوی کوتاه 4.42 ± 0.12 میکرومتر، میانگین بازوی بلند 5.93 ± 0.14 میکرومتر، درصد چندشکلی 42.7 میکرومتر، اختلاف درصد طول نسبی بزرگترین و

جدول ۲- ویژگی کروموزوم‌ها در سیتوتیپ تترا پلوئید اژیلوپس کراسا (۲n = 4x = 28)

شماره	Total (L+S) μm	Long arm(L) μm	Short arm(S) μm	Arm ratio(L/S)	CI (S*100/(L+S))	Sat	Type	L%	S%	RL%
۱	۱۳/۸۸±۰/۶۵	۷/۴۹±۰/۴۲	۶/۳۹±۰/۳۴	۱/۱۸±۰/۰۶	۴۶/۲۵	-	m	۴/۷۷	۴/۰۸	۸/۸۵
۲	۱۳/۲۹±۰/۵۹	۷/۴۲±۰/۴۶	۵/۸۷±۰/۲۴	۱/۲۷±۰/۰۸	۴۴/۲۸	-	m	۴/۷۳	۳/۷۴	۸/۴۷
۳	۱۲/۹۸±۰/۵۶	۷/۴۲±۰/۴۰	۵/۵۶±۰/۲۷	۱/۳۵±۰/۰۸	۴۳/۱۳	-	m	۴/۷۳	۳/۵۴	۸/۲۷
۴	۱۲/۶۵±۰/۴۰	۷/۹۴±۰/۳۵	۴/۷۱±۰/۱۷	۱/۷۰±۰/۱۰	۳۷/۱۳	۱/۳۳	sm	۴/۰۶	۳/۰۰	۸/۰۶
۵	۱۲/۳۶±۰/۵۴	۶/۵۱±۰/۳۰	۵/۵۸±۰/۲۷	۱/۱۲±۰/۰۳	۴۷/۳۸	-	m	۴/۱۵	۳/۷۳	۷/۸۸
۶	۱۱/۹۸±۰/۵۴	۷/۰۵±۰/۳۹	۴/۹۳±۰/۱۹	۱/۴۳±۰/۰۶	۴۱/۳۸	-	m	۴/۴۹	۳/۱۴	۷/۶۳
۷	۱۱/۳۹±۰/۴۹	۶/۴۰±۰/۱۹	۴/۹۹±۰/۳۶	۱/۳۲±۰/۰۹	۴۳/۵۰	-	m	۴/۰۸	۳/۱۸	۷/۲۶
۸	۱۱/۱۲±۰/۵۷	۷/۵۸±۰/۵۵	۳/۵۳±۰/۱۱	۲/۱۶±۰/۱۷	۳۲/۲۵	-	sm	۴/۸۳	۲/۲۵	۷/۰۹
۹	۱۰/۵۷±۰/۵۱	۶/۰۱±۰/۳۵	۴/۵۶±۰/۳۴	۱/۳۷±۰/۱۳	۴۳/۱۳	-	m	۳/۸۳	۲/۹۱	۶/۷۴
۱۰	۱۰/۳۶±۰/۳۸	۶/۲۳±۰/۲۸	۴/۱۳±۰/۲۱	۱/۵۳±۰/۰۹	۳۹/۸۸	۲/۱۹	m	۳/۹۷	۲/۶۳	۶/۶۰
۱۱	۹/۵۵±۰/۳۹	۵/۸۸±۰/۳۰	۳/۶۷±۰/۱۳	۱/۶۱±۰/۰۷	۳۸/۵۰	-	m	۳/۷۵	۲/۳۴	۶/۰۹
۱۲	۹/۲۳±۰/۳۷	۵/۲۲±۰/۲۱	۴/۰۱±۰/۱۹	۱/۳۱±۰/۰۴	۴۳/۳۸	-	m	۳/۳۳	۲/۵۶	۵/۸۸
۱۳	۸/۷۸±۰/۲۹	۵/۶۷±۰/۲۶	۳/۱۱±۰/۱۲	۱/۸۴±۰/۱۲	۳۵/۵۰	-	sm	۳/۶۱	۱/۹۸	۵/۵۹
۱۴	۸/۷۵±۰/۴۳	۴/۸۰±۰/۲۸	۳/۹۵±۰/۱۹	۱/۲۲±۰/۰۵	۴۵/۲۵	-	m	۳/۰۶	۲/۵۲	۵/۵۸
میانگین کل	۱۱/۲۱±۰/۲۰	۶/۵۴±۰/۱۲	۴/۶۶±۰/۱۱	۱/۴۶±۰/۰۳	۴۱/۵۰			۵۸/۴۰	۴۱/۶۰	

فرمول کروموزومی = 2n=4x=28= 20m+2m^{sat}+2sm^{sat}+4sm; SC=1A; A₁=۰/۲۸; A₂=۰/۱۵; %TF= ۴۱/۵۹; %DRL=۳/۲۷

L: طول بازوی بلند کروموزوم (μm), S: طول بازوی کوتاه کروموزوم (μm), AR: نسبت بازوها, CI: شاخص سانترومری, (m: متاستریک, sm: ساب متاستریک) تیپ سانترومری مطابق (Levan et al., 1964). RL%: طول نسبی کروموزوم, Sat: ماهواره, SC: کلاس تقارن (Stebbins, 1971), A₁, A₂: شاخص‌های عدم تقارن, TF%: درصد چندشکلی, %DRL: اختلاف درصد طول نسبی بزرگترین و کوچکترین کروموزوم, S% و L%: شاخص‌هایی که سهم هر بازوی کروموزوم را در طول کروموزوم کاربوتیپ نشان می‌دهد.

جدول ۳- ویژگی کروموزوم‌ها در سیتوتیپ هگزاپلوئید اژیلوپس کراسا (۲n = 6x = 42)

شماره	Total (L+S) μm	Long arm(L) μm	Short arm(S) μm	Arm ratio(L/S)	CI (S*100/(L+S))	Sat	Type	L%	S%	RL%
۱	۱۲/۹۵±۰/۵۶	۷/۴۲±۰/۳۹	۵/۵۳±۰/۱۷	۱/۳۴±۰/۰۳	۴۲/۵۰	-	m	۳/۴۱	۲/۵۴	۵/۹۶
۲	۱۲/۶۱±۰/۱۶	۶/۸۷±۰/۴۷	۵/۷۴±۰/۳۲	۱/۲۱±۰/۱۵	۴۶/۰۰	-	m	۳/۱۶	۲/۶۴	۵/۸۰
۳	۱۲/۱۴±۰/۰۸	۷/۷۲±۰/۰۴	۴/۴۰±۰/۰۶	۱/۷۶±۰/۰۲	۳۶/۵۰	۱/۰۹	sm	۳/۵۵	۲/۰۲	۵/۵۸
۴	۱۱/۶۴±۰/۰۶	۶/۴۳±۰/۵۲	۵/۲۳±۰/۵۸	۱/۲۶±۰/۲۴	۴۵/۰۰	-	m	۲/۹۶	۲/۴۰	۵/۳۵
۵	۱۱/۳۶±۰/۰۵	۶/۸۴±۰/۱۷	۴/۵۳±۰/۱۲	۱/۵۲±۰/۰۸	۴۰/۰۰	-	m	۳/۱۴	۲/۰۸	۵/۲۳
۶	۱۱/۲۴±۰/۰۷	۶/۰۰±۰/۱۰	۵/۲۴±۰/۰۳	۱/۱۵±۰/۰۲	۴۶/۵۰	۲/۰۹	m	۲/۷۶	۲/۴۱	۵/۱۷
۷	۱۱/۱۴±۰/۱۳	۶/۰۰±۰/۴۳	۵/۱۵±۰/۲۹	۱/۱۸±۰/۱۵	۴۶/۰۰	-	m	۲/۷۶	۲/۳۷	۵/۱۲
۸	۱۰/۹۰±۰/۰۴	۵/۷۱±۰/۰۴	۵/۲۰±۰/۰۴	۱/۱۰±۰/۰۲	۴۷/۵۰	-	m	۲/۶۳	۲/۳۹	۵/۰۱
۹	۱۰/۸۵±۰/۰۴	۶/۰۸±۰/۱۶	۴/۷۸±۰/۱۶	۱/۲۸±۰/۰۸	۴۴/۰۰	-	m	۲/۷۹	۲/۲۰	۴/۹۹
۱۰	۱۰/۷۸±۰/۰۵	۶/۵۸±۰/۳۱	۴/۲۰±۰/۲۶	۱/۵۸±۰/۱۷	۳۹/۰۰	۱/۵۴	m	۳/۰۲	۱/۹۳	۴/۹۶
۱۱	۱۰/۵۹±۰/۰۵	۶/۶۳±۰/۲۴	۳/۹۷±۰/۲۹	۱/۶۸±۰/۱۸	۳۷/۵۰	-	m	۳/۰۵	۱/۸۲	۴/۸۷
۱۲	۱۰/۴۸±۰/۰۵	۵/۹۲±۰/۰۱	۴/۵۶±۰/۰۱	۱/۳۰±۰/۰۱	۴۳/۵۰	-	m	۲/۷۲	۲/۱۰	۴/۸۲
۱۳	۱۰/۳۳±۰/۰۴	۵/۴۴±۰/۰۱	۴/۸۹±۰/۰۳	۱/۱۲±۰/۰۱	۴۷/۰۰	-	m	۲/۵۰	۲/۲۵	۴/۷۵
۱۴	۱۰/۱۴±۰/۱۸	۶/۲۵±۰/۰۸	۳/۸۹±۰/۲۶	۱/۶۲±۰/۱۳	۳۸/۰۰	-	m	۲/۸۸	۱/۷۹	۴/۶۶
۱۵	۹/۶۸±۰/۰۹	۵/۶۵±۰/۱۲	۴/۰۳±۰/۰۲	۱/۴۰±۰/۰۴	۴۱/۵۰	-	m	۲/۶۰	۱/۸۵	۴/۴۵
۱۶	۹/۱۰±۰/۰۷	۵/۰۷±۰/۱۶	۴/۰۳±۰/۲۲	۱/۲۶±۰/۱۱	۴۴/۰۰	-	m	۲/۳۳	۱/۸۵	۴/۱۸
۱۷	۸/۸۴±۰/۰۲	۵/۳۳±۰/۱۲	۳/۵۱±۰/۱۰	۱/۵۳±۰/۰۸	۳۹/۵۰	-	m	۲/۴۵	۱/۶۱	۴/۰۶
۱۸	۸/۵۳±۰/۰۹	۴/۵۹±۰/۰۴	۳/۹۴±۰/۱۴	۱/۱۷±۰/۰۵	۴۶/۰۰	-	m	۲/۱۱	۱/۸۱	۳/۹۲
۱۹	۸/۴۰±۰/۰۱	۴/۸۷±۰/۱۰	۳/۵۴±۰/۰۹	۱/۳۸±۰/۰۶	۴۲/۰۰	-	m	۲/۲۴	۱/۶۳	۳/۸۶
۲۰	۸/۲۱±۰/۱۰	۴/۷۴±۰/۲۲	۳/۴۷±۰/۱۳	۱/۳۷±۰/۱۲	۴۲/۰۰	-	m	۲/۱۸	۱/۶۰	۳/۷۷
۲۱	۷/۵۳±۰/۳۴	۴/۴۵±۰/۰۸	۳/۰۸±۰/۴۲	۱/۴۸±۰/۲۳	۴۰/۵۰	-	m	۲/۰۵	۱/۴۱	۳/۴۶
میانگین کل	۱۰/۳۵±۰/۲۳	۵/۹۳±۰/۱۴	۴/۴۲±۰/۱۲	۱/۳۶±۰/۰۳	۴۲/۵۹			۵۷/۲۹	۴۲/۷۱	

فرمول کروموزومی = 2n=6x=42=36m+2m^{sat}+2m^{sat}+2sm^{sat}; SC=1A; A₁=۰/۲۵ A₂=۰/۱۴; %TF=۴۲/۷۰; %DRL=۲/۵

جدول ۴- نتایج آزمون t برای شناسایی صفات کمی متمایزکننده دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید آزیلوپس کراسا

sig	مقدار t	صفات	
		تتراپلوئید میانگین ± انحراف معیار	هگزاپلوئید میانگین ± انحراف معیار
۰/۰۸	-۱/۷۵	۸/۱۸±۰/۸۸	۸/۹۵±۲/۳۴
۰/۰۸	-۱/۷۹	۳/۷۶±۰/۲۶	۳/۹۵±۰/۲۶
۰/۶۷	۰/۴۲	۴/۲۸±۰/۵۰	۴/۲۰±۰/۶۰
۰/۶۱	۰/۵۱	۱/۳۰±۰/۱۱	۱/۲۸±۰/۱۰
۰/۹۹	-۰/۰۰۵	۳/۴۳±۰/۳۸	۳/۴۳±۰/۵۷
۰/۵۰	۰/۶۷۷	۰/۹۷±۰/۰۰۷	۰/۹۵±۰/۰۰۴
۰/۸۷	۰/۱۶	۳/۲۷±۰/۴۶	۳/۲۷±۰/۳۷
۰/۰۰۶	-۲/۸۵	۱۰/۱۰±۰/۱۰	۱۲/۶۴±۳/۸۴
۰/۲۰	-۱/۳۰	۱۰/۴۰±۰/۱۳	۱۱/۲۲±۳/۵۶
۰/۵۸	۰/۵۶	۶/۳۱±۰/۴۳	۶/۱۴±۰/۲۰
۰/۱۶	-۱/۴۱	۱/۷۶±۰/۱۹	۱/۸۸±۰/۲۶
۰/۱۰	-۱/۶۷	۰/۷۳±۰/۰۰۷	۰/۷۸±۰/۰۰۵
۰/۰۸	-۱/۷۶	۳/۱۳±۰/۱۶	۳/۲۵±۰/۱۹
۰/۰۰۶	-۲/۹۴	۵۴/۶۴±۸/۲۰	۶۴/۸۵±۱۴/۹۸
۰/۱۸	-۱/۳۵	۵/۰۱±۰/۳۳	۵/۱۸±۰/۲۳

جدول ۵- نتایج آزمون مانویتی برای شناسایی صفات کیفی متمایزکننده دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید آزیلوپس کراسا

sig	مقدار Z	صفات	
		تتراپلوئیدها	هگزاپلوئیدها
۰/۴۲	-۰/۷۸	۱/۴۳	۱/۵۷
۰/۸۶	-۰/۱۸	۱/۳۷	۱/۲۹
۰/۶۰	-۰/۵۲	۲/۶	۲/۴۳
۰/۰۴	-۲/۰۲	۲/۲۲	۲/۵۷
۰/۰۰	-۲/۷۲	۵/۳۰	۷
۰/۹۹	-۰/۱۳	۳/۵۷	۳/۵۷
۰/۴۸	-۰/۷۱	۲/۰۹	۲/۱۴
۰/۴۴	-۰/۷۸	۱/۴۳	۱/۵۷

نتیجه کلی

در مجموع نتایج مطالعات فلوسایتومتری و سیتولوژیکی نشان داد که هر دو سیتوتیپ گونه آزیلوپس کراسا در ایران وجود دارد و بر اساس کاربرد زیاد سیتوتیپ هگزاپلوئید در زمینه ایجاد نر عقیمی در گندم برای تولید گندم هیبرید و از بین بردن حساسیت به طول روز در گندم (Murai & Tsunewaki, 1993) مطالعه بیشتر روی این سیتوتیپ جدید برای کاربردهای اخیر لازم و ضروری به نظر می‌رسد. همچنین با توجه به اهمیت مطالعات مورفولوژیکی در اصلاح گیاهان، این ۴ صفت می‌توانند در شناسایی دو سیتوتیپ از نظر مطالعات مورفولوژیکی استفاده شود.

نتایج این آزمون‌ها نشان می‌دهد که دو صفت کمی شامل: ارتفاع و طول برگ پرچم و دو صفت کیفی (کرک گلوم و رنگ گلوم) دارای تفاوت معنی‌داری در دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید می‌باشند. بنابراین از این صفات می‌توانند به عنوان صفات متمایزکننده برای شناسایی دو سیتوتیپ استفاده نمود. بر خلاف این تحقیق، در مطالعات قبلی (Kimber & Feldman, 1987; Van Slegeren, 1994) شده بود که دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید از طریق صفات مورفولوژیکی غیرقابل تشخیص می‌باشند.

REFERENCES

1. Agayev, Y. M. (2002). New features in karyotype structure and origin of saffron *Crocus sativus* L. *Cytologia*, 67, 245-252.
2. Badeava, E. D., Friebe, B., Zoshchuk, S. A., Zelenin, A. V. & Gill, B. S. (1998). Molecular-cytogenetic analysis of tetraploid and hexaploid *Aegilops crassa*, *Chrom Res*, 6, 629-637.
3. Badeava, E. D., Amosova, A. V., Muravenko, O. v., Samatadze, T. E., Chikida, N. N., Zelenin, A. V., Friebe, B. & Gill, B. S. (2002). Genome differentiation in *Aegilops*. 3. Evolution of the D-genome cluster, *Plant Syst Evol*, 231, 163-190.
4. Bagwell, C. B., Baker, D., Whetstone, S., Munson, M., Hitchcox, S., Ault, K. A. & Lovett, E. J. (1989). A simple and rapid method for determining the linearity of a flow cytometer amplification system, *Cytometry*, 10, 689-694.
5. Badeava, E. D., Amosova, A. V., Samatadze, T. E., Zoshchuk, S. A., Shostak, N. G., Chikida, N. N., Zelenin, A. V., Raupp, W. J., Friebe, B. & Gill, B. S. (2004). Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster, *Plant Syst Evol*, 246, 45-76.
6. Dubkovsky, J. & Dvorak, J. (1995). Genome identification of the *Triticum crassum* complex (Poaceae) with the restriction patterns of repeated nucleotide sequences, *Amer J Bot*, 82, 131-140.
7. Friebe, B., Schubert, V., Bluthner, W. D. & Hammer, K. (1992). C-banding pattern and polymorphism of *Aegilops caudate* and chromosomal constitution of the amphiploid *T. aestivum*-*Ae. caudate* and six derived chromosome addition lines, *Theor Appl Genet*, 83, 589-596.
8. Kihara, H. & Tanaka, M. (1970). Attendum to the classification of the genus *Aegilops* by means of genome analysis, *Wheat Inf Serv*, 30, 1-2.
9. Kihara, H. (1957). Completion of genome-analysis of three 6x species of *Aegilops*, *Wheat Inf. Serv*, 6, 11.
10. Kihara, H. (1963). Interspecific relationship in *Triticum* and *Agilops*. *Seiken Ziho*, 15, 1-12.
11. Kimber, G. & Feldman, M. (1987). Wild wheat, an introduction. College of Agriculture University of Missouri. *Columbia*, 142pp.
12. Kimber, G. & Zhao, Y. H. (1983). The D genome of the Criticize. *Can J Genet Cytol*, 25, 581-589.
13. Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201-220.
14. Murai, K. & Tsunewaki, K. (1993). Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat with *Ae. crassa* cytoplasm. *Euphytica*, 67, 41-48.
15. Pfosser, M., Amon, A., Lafferty, J., Heberle-Bors, E. & Lelley, T. (2006). Gain or loss of single chromosomes in wheat-rye addition lines and in 6x triticale detected by flow cytometry. *Plant Breeding*, 6, 555-557.
16. Ranjbar, M., M. R. Naghavi., A. Zali. & M. J. Aghaei. (2007). Multivariate analysis of morphological variation in accessions of *Aegilops crassa* from Iran. *Pakistan J Biol Sci*, 10(7), 1126-1129.
17. Sax, K. (1922). Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids, *Genetics*, 7, 513-552.
18. Stebbins, G. L. (1971). Chromosomal Evolution in higher plants. Edward Arnold Publisher LTD, London. 216pp.
19. Tsunewaki, K. (1993). Genome-plasmon interactions in wheat. *Jpn J Genet*, 68, 1-34.
20. Van Slegeren, M. W. (1994). Wild wheats: a monograph of *Agilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach.) Eig. (poaceae). Wageninge Agricultural University, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, *Veenman Drukkers, Wageningen*, pp. 512.
21. Yokoya, K., Roberts, A. V., Mottley, J., Lewis, R. & Brandham, P. E. (2000). Nuclear DNA amounts in roses, *Annals of Botany*, 85, 557-561.
22. Zarifi, E., Agayev, Y. M., Ganavati, F., & Aminizadeh, Z. (2005). Cytogenetics and evolution of Karyotype in wormwood, *Artemisia vulgaris* L. *Seed and Plant Journal*, 22(1). (In Farsi).
23. Zhang, H. B., Dvorak, J. (1992). The genome origin and evolution of hexaploid *Triticum crassum* and *Triticum syriacum* determined from variation in repeated nucleotide sequences, *Genome* 35, 806-814.
24. Zohary, D. (1966). The evolution of genome in *Aegilops* and *Triticum*. In: Proceedings of 2nd International Wheat Genetic Symposium, Sweden, Lund, pp. 207-217.