معرفی روشی آسان جهت تعیین سطح پلوئیدی با استفاده از شمارش کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه در جنس شبدر (Trifolium)

فهیمه سلیم پور، دانشجوی دکتری واحد علوم و تحقیقات و مربی واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی
جواد مظفری، استادیارپژوهش، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
مصطفی اسدی، استاد پژوهش ، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۲

چکیده

جنس شبدر با حدود ۲۵۰ گونه علفی یکساله و چندساله یکی از بزرگترین و مهمترین جنس های تیره بقولات و از گیاهان علوفه ای و مرتعی با ارزش این تیره به شمار می رود. بر اساس گزارشات موجود، سطوح پلوئیدی متفاوتی در منابع ژنتیکی این گیاهان به چشم می خورد. از آن جا که اندازه کروموزوم ها در گونه های مربوط به این جنس بسیار کوچک است، شمارش کروموزومی در مرحله متافاز با دشواری صورت می گیرد. بنابراین داشتن یک روش جانشین مانند تعیین سطح پلوئیدی ازطریق شمارش کلروپلاستی می تواند کارایی بیشتری داشته باشد. به همین جهت وبه منظور بررسی ارتباط سطح پلوئیدی و تعداد کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه، ۲۴ جمعیت مختلف از ۸ گونه این جنس پس از جمع آوری از رویشگاه های طبیعی در گلخانه بانک ژن گیاهی ملی ایران کشت شد و از برگهای جوان میانی، سه نمونه به طور تصادفی انتخاب و تعداد کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه سطح زیرین برگ در بیست جفت سلول شمارش گردید. همچنین شمارش کروموزومی مریستم انتهایی ریشه در گیاهان مذکور در مرحله متافاز میتوز انجام و سطح پلوئیدی به روش معمول تعیین شد که نشاندهنده همبستگی مستقیم سطح پلوئیدی با تعداد کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه در همه جمعیتهای مطالعه‌شده می‌باشد. این همبستگی در گونه‌های دیپلوئید ، *T. tomentosume* ، *T. bullatum* ، *T. campestre* ، *T. spumosum* ، *T. physodes* ، *T. resupinatum* و گونه تتراپلوئید *T. fragiferum* مشاهده گردید.

بنابراین با توجه به مشاهدات فوق می توان این روش نوین را برای تعیین سطح پلوئیدی در جنس شبدر توصیه نمود.

کلمات کیدی: سطح پلوئیدی، کلروپلاست، سلولهای نگهبان روزنه، Trifolium، شبدر

Pajouhesh & Sazandegi No: 59 pp:54-59

A simple technique for determination of ploidy level using chloroplast number in stomatal guard cells of Trifolium plants

by: F. Salimpour 1, J. Mozafari 2, M. Assadi 3
1 Azad University, Research and Science Branch, Tehran
2 Department of Plant Genetics and Genetic Resource, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj
3 Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran

Trib Trifoleae from Fabacea family consists of four genera: Trifolium, Medicago, Melilotus and Trigonela. Trifolium is major crop plant of this tribe. Determination of ploidy level is requierd for studying interspecific relationships , developing interspecies hybrids, genetic studying of transgenic plants and plant breeding programes. All species of this genus have small chromosomes, making the conventional chromosom count in root tip cells a difficult task. Therefore an efficient alternative ploidy determination technique is requierd for this group of plants. The relationship

www.SID.ir

between ploidy level and the number of chloroplasts in stomatal guard cells, was studied in 24 populations of 8 species of Trifolium. Three randomly selected middle leaves of greenhouse grown plants were used for chloroplast counting in twenty pairs of stomatal guard cells per each leaf. Chromosome number were also determined in root tip of studied plants. The ploidy level was highly correlated with the number of chloroplasts in stomatal guard cells. Number of chloroplasts in tetraploid population of T. fragiferum was approximately twice as many diploid species : *T. spumosum* , *T. campestre* , *T. bullatum* , *T. tomentosume* , *T. resupinatum* and *T. physodes*. These results suggested that counting chloroplast number in the leaf stomatal guard cells is an efficient alternative technique for determination of ploidy level in the genus Trifolium.

Key words: Ploidy level, Chloroplast, Stomatal guard cells, Trifolium

مقدمه

تعیین سطح پلوئیدی اهمیت فراوانی در مطالعه روابط خویشاوندی گونه ها، تهیه هیبریدهای بین گونه ای، مطالعه ژنتیک گیاهان تراریخت و برنامه های به نژادی محصول با توجه به حجم بالای گیاهان در جمعیتهای در حال تفکیک و لاینهای در حال بررسی به ویژه در گیاهان زراعی از قبیل گندم، جو، سیب زمینی شدت دارد. روشهای مختلف مستقیم و غیرمستقیم جهت تعیین سطح پلوئیدی در گیاهان پیشنهاد شده است مانند : شمارش کروموزومها در سلولهای مریستمی رأس ریشه در مرحله متافاز، اندازه گیری ابعاد دانه گرده، اندازه گیری حجم ژنوم هسته ای با کمک روش فلوسایتومتری، شمارش کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه، موجود در بشرد و سلولهای میانبرگ (۱۱).

روش شمارش مستقیم کروموزومها که شامل مراحل مختلفی جهت آماده سازی نمونه نظیر جوانه‌زنی بذر سالم، مراحل پیش تیمار، تثبیت، آبگیری، رنگ آمیزی و نهایتاً بررسی نمونه میکروسکوپی می باشد، کاری وقت گیر و طولانی و نیازمند تعداد زیادی بذر سالم است(۶). در اندازه گیریهای سیتومتریک ، محتوی DNA هسته بر اساس اندازه‌گیری شدت نسبی فلوئورسانس هسته‌های رنگ‌آمیزی شده با یک رنگ فلوئورسانس DNA سنجیده می شود. نمونه ای که توسط فلوسایتومتری آنالیز می شود باید سوسپانسیونی از ذرات منفرد باشد. این روش نیز مستلزم صرف هزینه بوده و در بسیاری از موارد امکان دستیابی به ابزار آن مشکل می‌باشد(۳۱). استفاده از دانه گرده نیز مستلزم داشتن گلی سالم همراه با بساک بازنشده و نیز مراقبت از عدم آلودگی گرده های نمونه مورد بررسی با گرده های سایر گونه‌ها می باشد که هزینه بالای استفاده از میکروسکوپ لایه‌نگار (S.E.M) را نیز بایستی به آن اضافه نمود(۱۴). اما مطالعه سطح پلوئیدی به کمک شمارش کلروپلاستهای روزنه، روشی بسیار آسان، کم هزینه و نیازمند چند برگ تازه می‌باشد. از این روش در جنسها و گونه های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مناسبی نیز به دست آمده است. Brown و همکاران در سال ۱۹۹۱، تعداد کلروپلاست های موجود در چغندر قند (*Beta vulgaris*) را اندازه‌گیری و نشان دادند که در جمعیتهای هاپلوئید (۲n=۹)، تعداد کلروپلاستها تقریباً نصف این تعداد در جمعیتهای دیپلوئید (۲n=۱۸) می باشد(۴). Cardi و همکاران در سال ۱۹۹۲، با استفاده ازرنگ آمیزی و شمارش کلروپلاست در حداقل ۲۰ سلول روزنه بشره برگ،سطوح دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید را درگیاهان سیب زمینی حاصل از کشت بافت مشخص کردند(۵) . مظفری وهمکاران در سال ۱۹۹۷، توانستند سطوح پلوئیدی گیاهان سیب زمینی را بدون رنگ آمیزی بافت وبا استفاده ازمیکروسکوپ لایه نگار لیزری تعیین نمایند و نشان دهند که برگهای میانی تعداد کلروپلاستهای بیشتری نسبت به برگهای جوانتر دارند (۱۱). همچنین Abak و همکاران در سال ۱۹۹۸، در فلفل سیاه (*Piper nigrum*) نشان دادند که تراکم روزنه ای بخصوص تعداد کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه صفات مفیدی در ارزیابی سطح پلوئیدی می‌باشند(۱). Abdullaev و همکاران در سال ۱۹۹۳، فراساختار کلروپلاستهای نگهبان روزنه ای را در ۳ گونه رشادی (Arabidopsis) به کمک میکروسکوپ الکترونی بررسی کردند و نشان‌دادند که با افزایش تعدادکروموزومها از(۱۰= ۲n) به (۴۸= ۲n)، حجم تیلاکوئید کاهش و ذرات نشاسته ای درشت‌تر می شوند(۲). Murray در سال ۱۹۹۲، همبستگی معناداری را میان کاریوتیپ، اندازه دانه گرده و تعداد کلروپلاستهای نگهبان روزنه در گونه ای خلر (*Lathyrus oloratus*) نشان داده است(۱۳). Dore در سال ۱۹۸۶، طول سلول نگهبان روزنه را در کلم قمری (*Brassica oleracae*) اندازه گیری کرد که در گیاهان هاپلوئید با افزایش سطح پلوئیدی طول سلولهای نگهبان روزنه افزایش می یابد (۷). همچنین Murphy و همکاران در ۱۹۹۲، همبستگی مثبتی بین اندازه ژنوم و تعداد کلروپلاستها در گیاه ذرت مشاهده نمودند و نتیجه گرفتند که اندازه ژنوم و عوامل ژنتیکی تعیین‌کننده تعداد کلروپلاست در سلولهای نگهبان روزنه می باشند(۱۲). شبدر که از گیاهان علوفه ای مرتعی با ارزش کشور می باشد ، سطوح پلوئیدی متفاوتی را دارا می باشد از آنجا که اندازه کروموزومها در گونه های مربوط به این جنس بسیار کوچک می باشد، تعیین سطوح پلوئیدی از طریق شمارش کروموزومی کار دشواری بوده و برنامه های به نژادی بین گونه ای این گیاه را دشوار می سازد . لذا در این تحقیق امکان به کارگیری شمارش کلروپلاستهای سلول های نگهبان روزنه به منظور تسریع و تسهیل در تعیین سطح پلوئیدی در گونه های این جنس مورد ارزیابی قرار گرفته و کارآیی آن با شمارش کروموزومی سلولهای متافاز میتوزی مقایسه گردیده است . با توجه به منابع داخلی و خارجی موجود (تا سال ۲۰۰۲ میلادی)، مقاله حاضر نخستین گزارشی است که در زمینه تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های جنس شبدر با استفاده از شمارش کلروپلاست های سلول های نگهبان روزنه ارائه می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روشها

مواد گیاهی

۲۴ جمعیت از ۸ گونه جنس شبدر از رویشگاههای طبیعی کشور با اقلیم های کوهستانی و سرد، مدیترانه ای، معتدله و نیمه گرم و بیابانی و گرم، از استانهای مازندران، گلستان، گیلان، آذربایجان غربی و شرقی، کرمانشاه، لرستان، فارس و خوزستان جمع‌آوری گردید(جدول ۱). بذور پس از شستشوی اولیه به منظور سترون سازی پوشش بذر، ابتدا ۱۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ قرار گرفتند و پس از شستشو به مدت ۱۵ دقیقه با سدیم هیپوکلریت ۱۰ درصد تیمار شدند. از هر جمعیت، ۳ تکرار ۲۵ واحدی با فاصله ۲۰ میلی متر از یکدیگر درون تشک پتری‌هایی به قطر ۱۵سانتی‌متر روی دو لایه کاغذ صافی مرطوب قرار گرفته و روی آنها نیز با یک برگ کاغذ صافی پوشانده شد. سپس در گلخانه بانک ژن گیاهی ملی ایران، بذرهای جوانه زده در گلدانهای پلاستیکی به قطر ۲ سانتی‌متر حاوی ترکیب ماسه بادی، خاک برگ و خاک مزرعه به نسبت به ترتیب ۴:۱:۴ کاشته شدند و رطوبت آنها یک روز درمیان در حد مطلوب تأمین شد به طوری که حالت غرقابی ایجاد نگردد و زهکشی به خوبی انجام شود. دانه رستهایی با ارتفاع حدود ۲۰ سانتی متر، برای شمارش کلروپلاست مورد استفاده قرار گرفتند(۸).

شمارش کلروپلاست

به منظور جلوگیری از تعرق و پلاسمولیز سلولهای نگهبان روزنه موجود در بشره برگ، درساعات اولیه روز، از برگهای جوان میانی، سه نمونه به طور تصادفی انتخاب و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد تا آب برگ تبخیر نگردد. سپس بشره سطح زیرین برگ برداشته شد و روی یک لام در قطره ای لوگول قرار داده شد. پس از قراردادن لامل روی لام، نمونه در زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی‌های ۴۰۰X، ۱۰۰X و ۱۰۰۰X مشاهده و تعداد کلروپلاستها در

جدول شماره ۱- جمعیتهای مورد مطالعه در جنس Trifolium و مناطق جمع‌آوری شده

محل جمع آوری	گونه
گنبد کاووس، ۸۰ متر، سلیم پور، ۱۴	*T. fragiferum*
آذربایجان شرقی: قوشچی به طرف شاپور، ۱۶۰۰ متر، سلیم پور، ۱۵	*T. fragiferu*
،فارس: چنار شاهیجان، ۵۱۰ متر، سلیم پور	*T. fragiferum*
فارس: مرودشت، ۱۶۸۰ متر، سلیم پور، ۲۰	*T. fragiferum*
فارس: تخت‌جمشید، ۱۶۱۶ متر، سلیم‌پور، ۲۳	*T.fragiferum*
گیلان: اسالم به خلخال، ۱۰ متر، سلیم پور، ۱۵۱	*T. fragiferum*
آذربایجان غربی: سردشت به پیرانشهر، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور،۱۵۲	*T. physodes*
گیلان: [illegible]، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور،۱۵۳	*T. physodes*
فارس: به طرف کازرون، [illegible] متر، سلیم پور، ۱۰	*T. resupinatum*
فارس، سپیدان، ۷۰۰ متر، [illegible] پور، ۲۶	*T. resupinatum*
مازندران: سوادکوه، ۴۸۰ متر، [illegible] پور، ۲۷	*T. resupinatum*
خوزستان: چغازنبیل، ۱۰۰ متر، سلیم پور، ۱۵	*T. resupinatum*
کرمانشاه: کرند غرب، ۳۵۰ متر، سلیم پور، ۵۷	*T. bullatum*
آذربایجان غربی: پردنا، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور،۵۸	*T. bullatum*
لرستان: کاکارضا، ۱۴۵۰ متر، سلیم پور،۵۶	*T. bullatum*
کرمانشاه: قصر شیرین، ۳۵۰ متر، سلیم پور، ۶۱	*T. tomentosum*
لرستان: کاکارضا، ۱۴۵۰ متر، سلیم پور، ۶۰	*T. tomentosum*
خوزستان: چغازنبیل، ۱۰۰ متر، سلیم پور، ۱۵۴	*T. tomentosum*
کرمانشاه: روانسر، ۱۴۲۰ متر، سلیم پور،۱۵۷	*T. spumosum*
لرستان: دیمله، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور،۱۵۵	*T. spumosum*
فارس: چشمه شاپور، ۸۹۰ متر، سلیم پور، ۵	*T. campestre*
گلستان: توسکاستان، ۸۶۰ متر، سلیم پور، ۱۵۸	*T. campestre*
مازندران: ورسک، ۱۵۴۰ متر، سلیم پور، ۱۵۹	*T. campestre*
آذربایجان غربی: پردنا، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور، ۶۷	*T. purpureum*

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰ جفت سلول روزنه شمارش گردید. میانگین، انحراف میانگین، واریانس و انحراف معیار با استفاده از نرم افزار SPSS ، برای هر جمعیت مورد آزمایش تعیین شد.

شمارش تعداد کروموزوم

ابتدا بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در قارچ کش بنومیل ۱٪ غوطه ور و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر، در تشک پتری‌های محتوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شده و جهت تسهیل در جوانه زنی به ژرمیناتور منتقل شدند. پس از ریشه دار شدن بذرها، ریشه چه ها سه ساعت در محلول پیش تیمار (آلفابرمونفتالین) نگهداری و سپس ۳۰ ساعت در محلول فیکساتور لویتسکی در یخچال نگهداری شدند. بعد از شستشو، ریشه‌چه ها در محلول سدیم هیدروکسید نرمال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه هیدرولیز شدند و بعد از رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلن، با روش اسکواش، لام تهیه شد. حداقل ۱۰ پهنه متافازی برای هر گونه مطالعه گردید.

نتایج و بحث

تعداد کروموزم در سلول های متافازی میوز ، دامنه تغییرات(حداقل و حداکثر)، میانگین و انحراف معیار تعداد کلروپلاست های سلول های نگهبان روزنه در هشت گونه شبدر تعیین گردید که در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس این مشاهدات، تمام گونه های بررسی شده دیپلوئید (۲n= ۱۶) بوده و عدد پایه کروموزومی در گونه های *T*، T.physodes. *T. fragiferum*، *T. resupinatum* ،*T. bullatum* *T.tomentosume* و *T. spumosume* هشت (X=۸) و در گونه های T. campestre و *T. purpureum* هفت (X=۷) بوده که نتایج منتشرشده قبلی را تأیید می نماید(۱۶). در حالی که در گونه *T. fragiferum* علاوه بر جمعیتهای دیپلوئید (n۲=۱۶) جمعیتهای تتراپلوئید (۳۲= n۲) نیز مشاهده گردید (شکل ۱) .

نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می دهد که کلروپلاست ها در جمعیت گونه‌های *T. bullatu* ، *T. campestre*، T. *spumosume* ، *T. resupinatum* ، *T. tomentosum* ، *T. purpureum* و *T. physodes* ۵-۷ عدد می باشد. درحالی که در جمعیت گلستان گونه T fragiferum. با افزایش سطح پلوئیدی از دیپلوئید به تتراپلوئید ، تعداد کلروپلاست ها از ۷- ۵ کلروپلاست به ۱۲-۱۰ افزایش یافته است. همچنین در جمعیت مذکور با دو برابر شدن تعداد کروموزوم های متافازی از دیپلوئید به تتراپلوئید، تعداد کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه نیز تقریبا دو برابر شده است، در حالی که با افزایش تعداد کروموزم ها از ۱۴ به ۱۶ در جمعیت های دیپلوئید گونه‌ای مانند *T. resupinatum* تعداد کلروپلاستها افزایش نیافته است. این نتیجه با کار تحقیقاتی Mochizuki و همکاران در ۱۹۹۵ برروی چغندر قند (*Beta vulgaris*) مطابقت نشان می دهد(۱۰). آنها نشان دادند همبستگی مثبتی میان درجه پلوئیدی و تعداد کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه وجود دارد. به طوری که در جمعیتهای هاپلوئید، تعداد کلروپلاستها ۸ عدد و در جمعیتهای هگزاپلوئید تعداد کلروپلاست ها به ۳۶ عدد رسیده است.

انحراف معیار برای میانگین تعداد کلروپلاست های سلول های نگهبان روزنه درجمعیتهای مورد مطالعه نشان داد که تغییرات تعداد کلروپلاست در یک سطح پلوئیدی و در هر جمعیت زیاد نبوده و برای تعیین سطوح پلوئیدی شاخص قابل اعتمادی می باشد. تنوع بین گونه ای تعداد کلروپلاست های سلول های نگهبان روزنه قابل توجه بوده به طوری که در گونه های دیپلوئید (۲n=۱۴) *T. resupinatum* و *T. physodes* ۲n =۱۶ کمتر و در گونه T. fragiferum بیشتر از سایر گونه ها بود(جدول ۲). نتایج نشان می دهد که در برخی از جمعیت های *T. fragiferum* با افزایش تعداد کلروپلاستها، تعداد روزنه در واحد سطح کمتر و اندازه آنها درشت تر می‌شوند (شکل ۱). مطالعات Mariri در سال ۱۹۹۴بر روی گیاهان هاپلوئید حاصل از کشت بساک توتون (*Nicotiana tobacom*) نشان داد که در گیاهان هاپلوئید، سلولهای روزنه کوچکتر و تعداد کلروپلاستها کمتر از گیاهان دیپلوئید بودند(۹). Sari و همکاران نیز در سال ۱۹۹۹ در هندوانه (*Citrulus lanatus*) نشان دادند که طول و قطر سلولهای نگهبان روزنه موجود در بشره برگ و تعداد کلروپلاستهای این سلولها شاخص مهمی در تعیین سطح پلوئیدی است به طوری که با تغییر سطح پلوئیدی از n=۱۱ به n=۲۲ ، هر سه صفت افزایش معناداری نشان می دهند(۱۵). با توجه به اینکه با تغییر عدد کروموزومی از ۲n=۱۴ به ۲n=۱۶ در جمعیت خوزستان *T. resupinatum* تغییر محسوسی در تعداد کلروپلاستها مشاهده نشد ، بنابراین از روش فوق نمی توان در تعیین عدد پایه کروموزومی (ست کروموزومی،X) استفاده کرد. این نتیجه با کار تحقیقی Brown و همکاران در سال ۱۹۹۱ همخوانی نشان می دهد. آنها بیان داشته اند در مواردی که اختلافات پلوئیدی در سطح پایینی باشد، تکنیک شمارش کلروپلاستهای سلولهای نگهبان روزنه موجود در بشره برگ، نمی تواند موثر باشد و باید از روشهای دیگر بویژه فلوسایتومتری جهت تعیین اختلافات پلوئیدی جمعیتها و نیز تعیین مقدار DNA هسته ای استفاده نمود (۴). شایان ذکر است بر اساس نتایج این تحقیق ، شمارش کلروپلاست های سلول های نگهبان روزنه به عنوان روشی مقرون به صرفه، آسان و سریع برای تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های جنس شبدر توصیه می گردد .

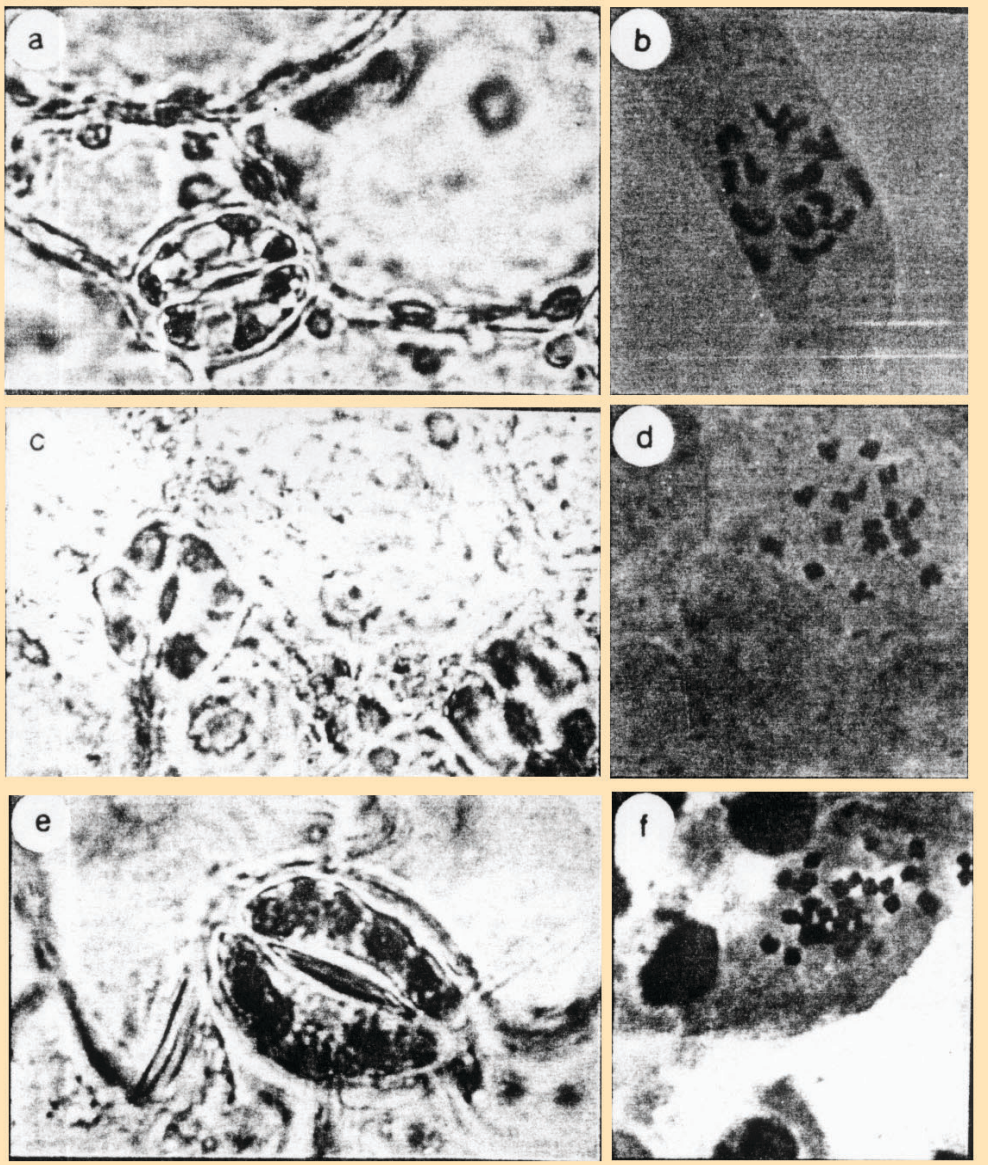
منابع مورد استفاده

1-Abak, K., Comlekcioğlu, N., Buyukalaca, S., Sari, N., 1998. Use of stomatal characteristics to estimate ploidy level of haploid and diploid pepper plants. Thenth EUCARPIA Meeting Capsicum and Eggplant, 7-11 september 1998. Avignon, France, pp: 179-182

2-Abdullaev, A., Israfilive, U. and Usmanav, D., 1993.Chromosome number on chloroplast structuer and function in Arabidopsis. Institute of plant physiology and biophysics.Tajic Academy of Sience, Dushanbe, USSR.

3-Arumnugana, K., Earle, E., 1991. Estimation of nuclear

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- مقایسه تعداد کلروپلاست در سلولهای نگهبان روزنه (چپ) و
تعداد کروموزمهای سلولهای مریستم ریشه (راست) در دو گونه

www.SID.ir

جدول ۲- دامنه تغییرات، میانگین تعداد کلروپلاست در سلولهای نگهبان روزنه و عدد کروموزومی در گونه‌هایی از شبدر

گونه	تعداد کلروپلاستها	عدد کروموزومی	انحراف معیار± میانگین
T. resupinatum	۶–۷	۱۴	۵/۹۲±۱/۳۱
T. resupinatum	۵–۷	۱۶	۶/۰۱±۲/۲۴
T. fragiferum	۵–۷	۱۶	۵/۵۷±۰/۷۴
T. fragiferum	۱۰–۱۲	۳۲	۱۰/۷۱±۱/۴
T. physodes	۶–۸	۱۶	۷/۰۷±۱/۴
T. bullatum	۶–۷	۱۶	۶/۴۲±۱/۵۵
T. tomentosum	۶–۷	۱۶	۶/۵±۱/۳۲
T. campestre	۵–۷	۱۴	۷/۱۴±۳/۳۹
T. spumosum	۶–۸	۱۶	۷/۳۵±۱/۴۸
T. purpureum	۷–۸	۱۴	۷،۵±۱،۳۲

10- Mochizuki, A., 1995. Degress of ploidy and numbers of Chloroplast in *Beta vulgaris*. Ann appl boil, 124: 183-188

11- Mozafari, J., Wolyn, D., J., 1997. Chromosome doubling via tuber disc culture in dihaploid potato as determined by confocal microscopy. Plant Cell Reports, 16: 329-333

12- Murphy, M., Rayburn, K., 1992. Chromosal and cell size analysis of cold tolerant maize. Theor Appl Genet, 87: 798-802

13- Murray, H., Standing, L., 1992. Genomic co[illegible]ney during the development of lathyrus odoratus [illegible]vars. Heredity, 68: 321-377

14- Pitrat, M., Sari, N., Rode, J. C., 1[illegible]94. [illegible]uction of partenogenetic haploid embry[illegible]s af[illegible] po[illegible]ination by irradiated pollen watermelon. Ho[illegible] Sci[illegible]ce, 29:1189-1190

15- Sari, N., Abak, K., Pitrat, [illegible], 1999. Comparition of ploidy level screening met[illegible]ds i[illegible]atermelon (Citrulus lanatu). Science Hor[illegible]iculture, [illegible]2:265-277

16 - Zohary, M., He[illegible]ler, [illegible] 1984. The genus Trifolium. The Israeal academy [illegible]f scie[illegible]ce, Jerusalem

DNA [illegible]ontent [illegible]plants by flow cytometry. Plant Mol. Biol., 9:22[illegible]-231

4-Brown, S. [illegible]., Devaux, P., Marie, D., Bergouniounx, C., 1991. Cy[illegible]etrie en flux: Application analyse de la ploidie [illegible]ez les vegetaux. Biofuture, 105:2-16

5-[illegible]di, T., Carputo, D., Frusciante, L., 1992. In vitro shoot [illegible]gene[illegible]tion and chromosome doubling in 2x and 3x potato clones. American potato journal, 69:1-12

6-De laat, A. M., Gohde, W., Vogezang, M.J.D. C., 1987. Determination of ploidy of single plants and population by flow cytometry. Plant Breeding, 99:303-307

7-Dore, C., 1986. Evaluation du niveau de ploide des plantes dune population de choux de Bruxelles (*Brassica oleraceae*) origine pollinique. Agronomie, 6:797-801

8-Manning, J. C., Vanstaden, J., 1987. The role of lens in seed inhibition and seedling vigour of *Sesbania punicea*. Annals of Botany, 50:705-713

9-Mariri, J., 1994. Production of Tobacco Mosaic Virus resistant Tobacco (*Nicotina tabacum* L.) Hybrids Using Protoplast Technology. Ann Appl Biol,124:178-182

Archive of SID

www.SID.ir