Archive of SID

" نهال و بذر"
جلد ۲۰ ، شماره ۱ ، سال ۱۳۸۳

ارتباط میان سطح پلوئیدی و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در سرده یونجه*

Relationship Between the Ploidy Level and Chloroplast Number in Stomatal Guard Cells of *Medicago* sp.

فرنگیس قنواتی، جواد مظفری و علی‌اصغر معصومی

مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

تاریخ دریافت: ۸۲/۳/۲۷

چکیده

قنواتی، ف.، مظفری، ج.، و معصومی، ع. ا. ۱۳۸۳. ارتباط میان سطح پلوئیدی و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در سرده یونجه. نهال و بذر ۲۰: ۱۲۷-۱۱۷.

تعیین سطح پلوئیدی اهمیت فراوانی در مطالعه روابط خویشاوندی گونه‌ها، تهیه هیبریدهای بین گونه‌ای و برنامه‌های به‌نژادی گیاهان دارد. این کار معمولاً از طریق شمارش کروموزمی در سلول‌های مریستم ریشه انجام می‌گیرد. سرده یونجه (*Medicago* sp.) با حدود ۸۵ گونه علفی یک ساله و چند ساله دارای سطوح پلوئیدی متفاوتی بوده، ولی از آنجا که اندازه کروموزم‌ها در گونه‌های این سرده بسیار کوچک است، شمارش کروموزمی سلول‌های بدنی در مرحله متافاز به سختی امکان‌پذیر است. بنابراین در این تحقیق برای اولین بار امکان استفاده از شمارش کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه به عنوان یک روش جانشین ساده وآسان برای تعیین سطح پلوئیدی در یونجه مورد بررسی قرار گرفت. به همین جهت ارتباط و همبستگی سطح پلوئیدی و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، در ۱۷ گونه این سرده مطالعه گردید . از برگ‌های جوان میانی گیاهان گلخانه‌ای هر گونه سه نمونه به طور تصادفی انتخاب و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه سطح زیرین برگ در بیست جفت سلول شمارش گردید. برای تعیین سطح پلوئیدی، روش معمول شمارش کروموزم در سلول‌های متافازی مریستم انتهایی ریشه انجام و حداقل ده پهنه متافازی میتوز برای هرگونه مطالعه گردید. نتایج نشان‌دهنده همبستگی مستقیم (r = ۰/۹۸) سطح پلوئیدی با تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در کلیه گونه‌های مورد مطالعه بود. به طوری که تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گونه‌های تتراپلوئید *M. rugosa* Desr. ، *M. scutellata* (L.) Mill. Gard و *M. sativa* L. تقریبا دو برابر کلروپلاست‌های آن درگونه های دیپلوئید *M. minima* (L.) Bartalini. ، *M. noeana* Boiss. ، *M. littoralis* Rhode. ، *M. coronata* (L.) Bartalini. ، *M. radiate* L. ، *M. laciniata* (L.) Mill. Gard. ، *truncatula* Gaetn. ، *M. arabica* (L.) Huds. ، *M. ciliaris* (L.) Krocker. ، *M. lupulina* L. ، *M. polymorpha* L. و *M. orbicularis* (L.) Bartalini. ، *M. constricta* Durieu. *M. rigidula* (L.) All. بود. بنابراین با توجه به مشاهدات فوق شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه به عنوان یک روش نوین برای تعیین سطح پلوئیدی در سرده یونجه توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: یونجه، سطح پلوئیدی، سلول محافظ روزنه، کلروپلاست.

* بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرده یونجه (*Medicago* sp.) با حدود ۸۵ گونه علفی یک ساله و چند ساله (Small and Jomphe, 1989) یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین سرده‌های تیره بقولات و از گیاهان علوفه‌ای و مرتعی با ارزش این تیره به شمار می‌رود. از این سرده در ایران ۲۲ گونه یک ساله و چندساله موجود است که در مناطق مختلف آب و هوایی انتشار داشته واز تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند و به عنوان یک ذخیره ژنی غنی و ارزشمند برای اصلاح یونجه زراعی محسوب می‌شوند. استفاده از انجام تلاقی ژنتیکی میان انواع غیر زراعی با گونه زراعی راهی برای فائق آمدن بر نارسائی‌های یونجه زراعی، افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌های محیطی و بیماری‌ها و افزایش عملکرد کمی و کیفی است. ذخیره ژنی یونجه دارای سطوح پلوئیدی متفاوت دیپلوئید و تتراپلوئید با عدد پایه کروموزمی متفاوت ۷، ۸ و ۹ می‌باشد که موجب پیچیدگی کار اصلاح آن با استفاده از این منابع ژنتیکی می‌گردد. بنابراین تعیین سطح پلوئیدی نه تنها اهمیت فراوانی در مطالعه روابط خویشاوندی گونه‌ها داشته، بلکه حائز اهمیت زیادی در تهیه دورگ‌های بین گونه‌ای، مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های به‌نژادی آن است. از آن جا که اندازه کروموزم‌ها در گونه‌های این سرده بسیار کوچک است، تعیین سطح پلوئیدی از طریق روش معمول شمارش کروموزمی در سلول‌های مریستم ریشه در برنامه‌های اصلاحی گسترده بسیار مشکل بوده و یکی از عوامل محدود کننده به کارگیری تکنولوژی‌هاپلوئید بریدینگ می‌باشد. این روش که شامل مراحل مختلفی جهت آماده‌سازی نمونه نظیر جوانه‌زنی بذر سالم، مراحل پیش تیمار، تثبیت، هیدرولیز، رنگ آمیزی، اسکواش و نهایتاً بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها می‌باشد، کاری وقت گیر و تخصصی بوده و نیازمند تعداد زیادی بذر سالم است. بنابراین در دسترس داشتن یک روش جانشین ساده، آسان و مقرون به صرفه مانند شمارش کلروپلاست‌های سلوهای محافظ روزنه ضروری بوده ومی‌تواند کارایی برنامه‌های اصلاحی یونجه را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. کلروپلاست یک اندامک منحصر به فرد در سلول‌های گیاهی است که نقش بسیار مهمی در متابولیسم‌های اولیه مانند فتوسنتز و احیاء نیترات دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که تقسیم کلروپلاست و تعداد آن در سلول‌های برگ تحت تاثیر ژنوم هسته می‌باشد (Leech, 1981) و رابطه مستقیم تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ روزنه با سطح پلوئیدی در بعضی از گونه‌های گیاهی اثبات شده است. با توجه به سهولت و کم هزینه بودن شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در مقایسه با روش معمول شمارش کروموزم‌های سلول‌های مریستم انتهایی ریشه، از این روش برای تعیین سطح پلوئیدی درآن‌ها استفاده شده است. همبستگی تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های محافظ روزنه و سطح پلوئیدی در گیاهان گوجه‌فرنگی (Koorneef *et al.*, 1989)، سیب زمینی

www.SID.ir

Archive of SID

(Schreiter *et al.*, 1989) و گندم گونه *T. monococoum* (Hawke and Leech,1990) اثبات شده است. در مطالعه دیگری همبستگی معنی‌داری میان تعداد کروموزم، اندازه دانه گرده و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گیاه *Lathyrus odoratus* L. (Murray and Standing, 1992) در هیبریدهای بین گونه‌ای *Arachis hypoyaea* L. و *A. stenosperm* L. (Singsit and Oaias-Akians, 1992) مشاهده شد. مطالعه اخیر شمارش تعداد کلروپلاست را روش مناسبی برای تعیین گیاهان 2n، 3n، 4n و 6n اعلام نمود. رنگ‌آمیزی و شمارش کلروپلاست در حداقل بیست سلول محافظ روزنه‌ای در اپیدرم برگ توانست گیاهان سطوح دیپلوئید، تتراپلوئید و تریپلوئید حاصل از کشت بافت ساقه سیب‌زمینی را مشخص نماید (Cardi *et al.*, 1992). اهری زاد (۱۳۷۰) برای تعیین سطح پلوئیدی یونجه‌های یک ساله از تعداد روزنه استفاده نمود. مطالعه دیگری نشان داد که تعیین سطوح پلوئیدی گیاهان سیب‌زمینی حاصل از کشت بافت غده با شمارش کلروپلاست‌های محافظ روزنه بدون رنگ‌آمیزی و بدون جداسازی اپیدرم نیز با استفاده از میکروسکوپ لایه نگار لیزری (Laser Scaning Confocal Microscopy) امکان پذیر است (Mozafari *et al.*, 1997). این مطالعه نشان داد که برگ‌های میانی تعداد کلروپلاست‌های بیشتری نسبت به برگ‌های جوان‌تر دارند. در مورد امکان استفاده از این روش در تعیین سطح پلوئیدی یونجه تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است. بنابراین در این تحقیق امکان به کارگیری شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه به عنوان یک روش آسان، دقیق و کار آمد درتعیین سطح پلوئیدی گونه‌های سرده یونجه بررسی شده و کارایی آن با شمارش کروموزمی سلول‌های متافاز میتوزی مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر ۱۷ گونه یونجه شامل *M. sativa* L.، *M. scutellata* (L.)، *M. rugosa* Desr.، *M. noeana Boiss.*، Mill. Gard.، *M. minima* (L.) Bartalini.، *M. littoralis*، *M. truncatula* Gaetn.، *M. coronata* (L.) Bartalini.، Rhode.، *M. laciniata* (L.) Mill.، *M radiata* L.، *M. arabica* (L.) Huds.، Gard.، *M. ciliaris* (L.) Krocker.، *M. polymorpha* L.، *M. lupulina* L.، *M. rigidula*(L.) All.، *M. constricta* Durieu. و *M. orbicularis*(L.) Bartalini. جمع آوری شده از رویشگاه‌های اصلی در مناطق مختلف (جدول۱) در گلدان‌های پلاستیکی به عمق دوسانتی‌متر حاوی ماسه بادی، خاک برگ وخاک مزرعه در فصل پاییز در گلخانه بانک ژن گیاهی ملی ایران کشت گردیدند. برای این

www.SID.ir

Archive of SID

کار به طور مکانیکی وبا استفاده از کاغذ سمباده سطح بذرها خراش داده و سپس بذرها با قارچ کش بنومیل ضدعفونی شدند. گیاهان در شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد پرورش داده شدند و یک روز در میان آبیاری گردیدند. پس از این که دانه رستها به حدود ده برگی رسید برای شمارش کلروپلاست مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱- محل جمع آوری گونه‌های مختلف Medicago

Table 1. Collection sites of different Medicago species

گونه Species	محل جمع آوری Collection site
M. sativa	Ardebil: Dailaman, Karvana, 1000m, Ghanavati 6441*
M. rugosa	Khuzestan: Ahvaz, Hamidieh, 18m, Ghanavati 6462
M. scutellata	Bushehr: Dashtestan, Tang-e-Zard, 460m, Ghanavati 6307
M. coronata	Khuzestan: Masjedsolaiman , 110m, Ghanavati 6469
M. radiata	Fars: Firuz abad, Ismail abad 1450m, Ghanavati 6053
M. rigidula	Kermanshah: Ghasr-e-Shirin, 350m, Ghanavati 6134
M. polymorpha	Gilan: Lahijan, 10 m, Ghanavati 6496
M. constricta	Kermanshah: Ghasr-e-Shirin, 350m, Ghanavati 6129
M. noeana	Lurestan: Aleshtar, Raimaleh, 1500m, Ghanavati 6074
M. minima	East Azarbaijan: Arasbaran, 1460m, Ghanavati 6195
M. truncatula	Fars: Kazerun, Chenarshahijan, 810m, Ghanavati 6335
M. littoralis	Busheher: Genaveh, 10m, Ghanavati 6212
M. orbicularis	West Azarbaijan: Piranshahr, 1440m, Ghanavati 6173
M. laciniata	Khuzestan: Omidieh, Ragsefid, 100m, Ghanavati 6260
M. arabica	Golestan: Agh ghala, Marzankalateh, 80m, Ghanavati 6206
M. ciliaris	Khuzstan: Behbahan, Marun, 300m, Ghanavati 6343
M. lupulina	Qazvin: Abiek, 1300m, Ghanavati 6066

* کد نمونه گیاهی در هرباریوم بانک ژن گیاهی ملی ایران.

* Code of specimen in herbarium of National Plant Genebank of Iran.

شمارش تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه

از برگ‌های میانی گیاهچه‌ها (میانگره ۶-۵)، به طور تصادفی سه نمونه انتخاب و برای جلوگیری از تبخیر، برگ‌ها درکیسه پلاستیکی قرار داده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. با استفاده از تیغ جراحی قطعه‌ای کوچک از اپیدرم سطح زیرین برگ برداشته شد و روی

www.SID.ir

Archive of SID

یک لام قرار داده و با محلول لوگول رنگ‌آمیزی شد. پس از قرارگیری لامل روی لام، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤٠٠ مشاهده وتعداد کلروپلاست‌ها در بیست جفت سلول محافظ روزنه شمارش گردید و میانگین و انحراف معیار برای هر گونه تعیین شد.

شمارش کروموزمی

بذرهای تیمار شده به روشی که در بالا به آن اشاره شد در تشتک‌های پتری محتوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفت و جهت جوانه‌زنی به ژرمیناتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. پس از گذشت حدود ٤٨ساعت که ریشه‌چه‌ها به اندازه ۱/۵-۱ سانتی‌متر رشد کردند، ریشه‌چه‌ها را جدا و به محلول پیش تیمار آلفا برمو نفتالین منتقل و به مدت ٤ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از شستشو با آب مقطردر محلول فیکساتور لویتسکی (محلول یک به یک فرمالین ده درصد و کروم اکسید یک درصد) قرار داده و در یخچال نگهداری گردیدند. پس از گذشت ۳۰-۲٤ ساعت ریشه‌چه‌ها به مدت سه ساعت در آب جاری شستشو و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. ریشه‌چه‌ها درمحلول سدیم هیدروکسید نرمال به مدت ۱۵دقیقه در حمام آبی ٦۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز وبا هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی و پس از اسکواش حداقل ده پهنه متافازی میتوز برای هرگونه مطالعه گردید.

نتایج وبحث

سطح پلوئیدی با استفاده از شمارش تعداد کروموزم‌های سلول‌های متافاز میتوز در ۱۷ گونه از سرده Medicago تعیین گردید که در جدول ۲ نشان داده شده است. این مشاهدات نشان داد که گونه‌های *M. sativa*، *M. rugosa* و *M. scutellata* دارای ۳۲ کروموزوم بوده و تتراپلوئید می‌باشند که تتراپلوئید بودن این گونه‌ها با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد (شریعت و همکاران، ۱۳۸۰؛ Bauchan and Elgin, 1984؛ Mariami, 1996). گونه‌های *M. truncatula*، *M. littoralis*، *M. radiata*، *M. noeana*، *M. minima*، *M. orbicularis*، *M. arabica*، *M. lupulina*، *M. laciniata* و *M. coronata* دارای ۱٦کروموزم و دیپلوئید بوده که عدد پایه کروموزمی آن‌ها ۸ می‌باشد، در حالی که گونه‌های *M. Polymorpha*، *M. rigidula* و *M. constricta* دارای فقط ١٤ کروموزم بودند که نشانگر دیپلوئید بودن آن‌ها با عدد پایه کروموزمی ۷ است، نتایج به دست آمده گزارش‌های قبلی را تأئید می‌کند (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰؛ شریعت و همکاران، ۱۳۸۰؛ گزانچیان، ۱۳۷۲؛ Mariami *et al.*, 1996). از میان گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق گونه *M. ciliaris* دارای ۱۸ کروموزم بود که نشانگر وجود عدد پایه کروموزمی ۹ در این گونه می‌باشد. این نتیجه در گزارش

www.SID.ir

Archive of SID

محققان قبلی به چشم نمی‌خورد. در یک بررسی (Heyn, 1963) پیشنهاد شده است که هم عدد پایه کروموزمی ۸ و هم عدد پایه کروموزمی ۹ در این گونه ممکن است مشاهده شود، در هر صورت تحقیق حاضر اولین گزارش از این مشاهده در ایران می‌باشد.

جدول ۲- تعداد کروموزوم، تعداد کلروپلاست و سطح پلوئیدی در گونه‌های یونجه

Table 2. Number of chromosomes, number of chloroplasts and ploidy level in *Medicago* sp.

گونه Species	تعداد کروموزوم No. chromosome	سطح پلوئیدی Ploidy level	تعداد کلروپلاست No. Chloroplast		
			حداقل Minimum	حداکثر Maximum	میانگین Mean ± SD
M. sativa	32	4x	14	16	14.7±0.80
M. rugosa	32	4x	14	17	15.1± 0.89
M. scutellata	32	4x	14	16	14.5±0.60
M. coronata	16	2x	8	10	9.2±0.62
M. radiata	16	2x	8	10	8.8±0.64
M. rigidula	14	2x	7	9	8.0±0.65
M. polymorpha	14	2x	7	9	7.9±0.79
M. constricta	14	2x	7	9	7.7±0.73
M. noeana	16	2x	9	11	10.2±0.89
M. minima	16	2x	8	10	9.0±0.69
M. truncatula	16	2x	8	10	9.3±0.72
M. littoralis	16	2x	8	10	9.0±0.73
M. orbicularis	16	2x	8	11	9.6±0.94
M. laciniata	16	2x	8	10	8.8±0.72
M. arabica	16	2x	9	11	9.9±0.75
M. ciliaris	18	2x	9	11	10.3±0.57
M. lupulina	16	2x	8	10	9.2±0.75

حداقل، حداکثر و میانگین تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گونه‌های ذکر شده تعیین و در جدول ۲ آمده است. نتایج جدول نشان می‌دهد که تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های محافظ روزنه گونه‌های دیپلوئید بین ۷ تا ۱۱ عدد بوده در حالی که در گونه‌های تتراپلوئید ۱۴ تا ۱۶ عدد است و میانگین تعداد کلروپلاست‌ها در گونه‌های دیپلوئید ۹ و در گونه‌های تتراپلوئید ۱۶ می‌باشد. این نشان می‌دهد که با افزایش سطح پلوئیدی، میانگین تعداد کلروپلاست‌ها در سلول محافظ روزنه افزایش پیدا می‌کند. به طوری که تعدادکلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گونه‌های تتراپلوئید تقریبا دو برابر کلروپلاست‌های آن در گونه‌های دیپلوئید است. این مطلب در شکل ۱ در

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های *M. polymorpha*، *M. radiata* و *M. scutellata* نشان داده شده است. مطالعات قبلی در خربزه (Fassuliotis and Newlson, 1992) و سیب‌زمینی (Mozafari *et al.*, 1997) نیز تعداد کلروپلاست‌های ارقام تتراپلوئید را تقریبا دو برابر ارقام دیپلوئید گزارش نموده‌اند. همبستگی بین تعداد کلروپلاست وتعداد کروموزوم (r =./۹۸)، مثبت و در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (شکل ۲). دانشمندان معتقدند نیای کلروپلاست یک سیانوباکتر است (Molnar, 1999)* که در طی فرایند تکامل عمده ژن‌های خود را از دست داده و به ژنوم کوچک‌تری (~150kbp) تبدیل شده است و یا به وسیله انتقال ژن داخلی اندوسیمبیوتیک مابقی ژن‌های خود را به هسته منتقل کرده است. از آن جا که تکثیر غیرجنسی سیانوباکترها باعث تجمع جهش‌های کشنده در اندامک شده و سبب کاهش تطابق آن با محیط گردیده، ممکن است اندامک براثر رانش ژنتیکی (Genetic drift) از بین برود. اما با انتقال ژن از کلروپلاست به هسته در واقع تکثیر آن از غیرجنسی به جنسی تبدیل شده و با افزایش نوترکیبی بقاء موجود افزایش یافته است (Martin *et al.*, 1998).

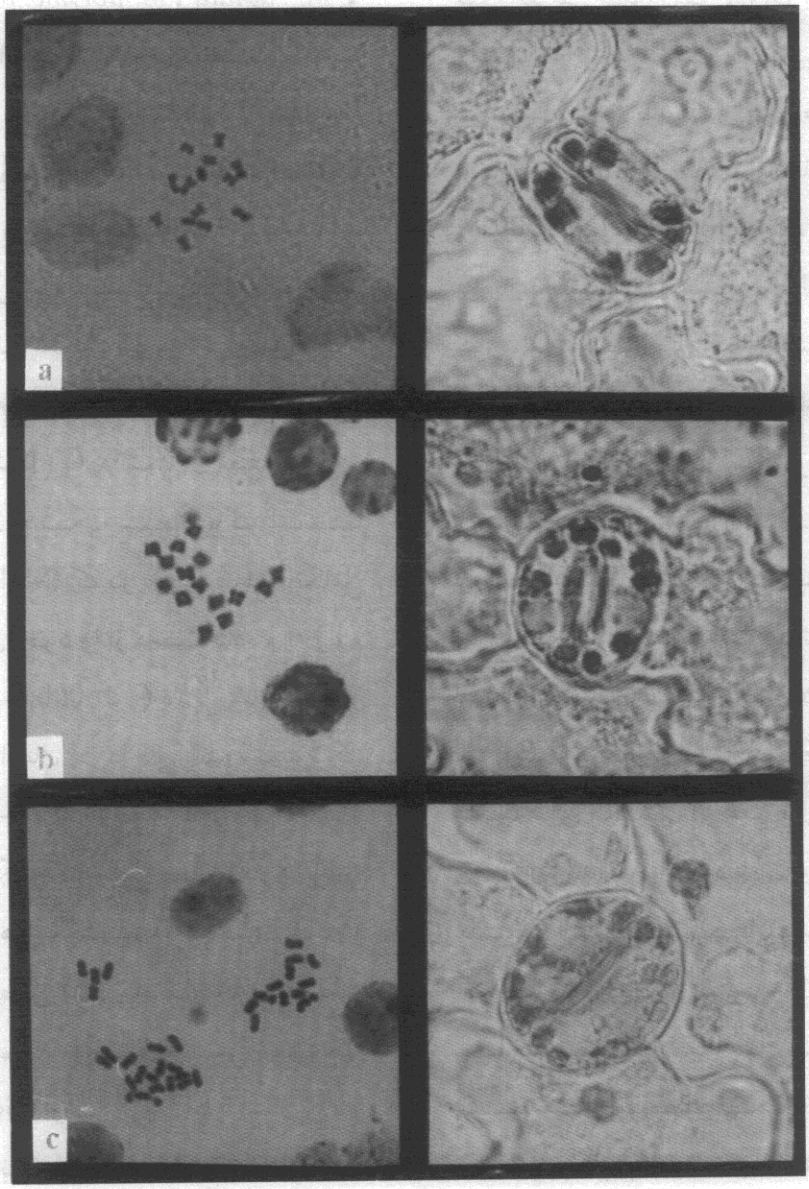
کلروپلاست دارای DNA حلقوی و مستقلی است که ژن‌های موجود در آن در گونه‌های مختلف بسیار پایدارند (Martin and Hermann, 1998). اگر چه این اندامک ژن‌های مخصوص به خود را دارد و به طور تقریبی صد ژن در DNA آن موجود است ولی باید توجه داشت که تقسیم، رشد و عمل بیوشیمیایی آن با بیان ژن‌های موجود در هسته ارتباط دارد (Leech, 1981). ناکانو وهمکاران (Nakano *et al.*, 2001) معتقدند ماهیت انتقال پیام از طریق DNA هسته به DNA کلروپلاست هورمونی است . وی اظهار داشت این هورمون سیتوکینین می‌باشد، هر چند وی نتوانست ژن‌هایی را که قبل از تولید سیتوکینین در گیرند را مشخص سازد. حال اگر قبول کنیم که ژن‌های مربوط به تشکیل کلروپلاست به DNA هسته منتقل شده‌اند، پس پلی‌پلوئیدی تعداد نسخ ژن‌های مربوط به تشکیل کلروپلاست را افزایش می‌دهد و در نتیجه جهش در یک یا تعدادی از نسخه‌های یک ژن اثر معنی‌داری بر سازگاری موجود زنده نخواهد داشت و قادر به حذف طبیعی اندامک نمی‌باشد. از آن جایی که کلروپلاست در نتیجه تظاهر این ژن‌ها ساخته می‌شود، با پلی‌پلوئیدی تعداد نسخه‌های موجود یک ژن یا ژن‌های سازنده کلروپلاست بیشتر شده و با افزایش میزان سیگنال‌های مناسب، تعداد کلروپلاست نیز افزایش می‌یابد (Gupta, 2003). در این بررسی ارتباط میان تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه با سطح پلوئیدی در گونه‌های مختلف یونجه تأئید می‌شود.

در مقایسه با شمارش تعداد کلروپلاست در سلول‌های محافظ روزنه ملاحظه می‌شود که

* Molnar, S. 1999. Chloroplast genetics. http://www.geocities.com/we-evolve/Pants/chloroplast.html

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تعداد کروموزوم در پهنه متافازی سلول‌های مریستم ریشه (چپ) و تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه (راست) در گونه‌های یونجه: *M. polymorpha* (a) ، (b) *M. radiata* ، (c) *M. scutellata*

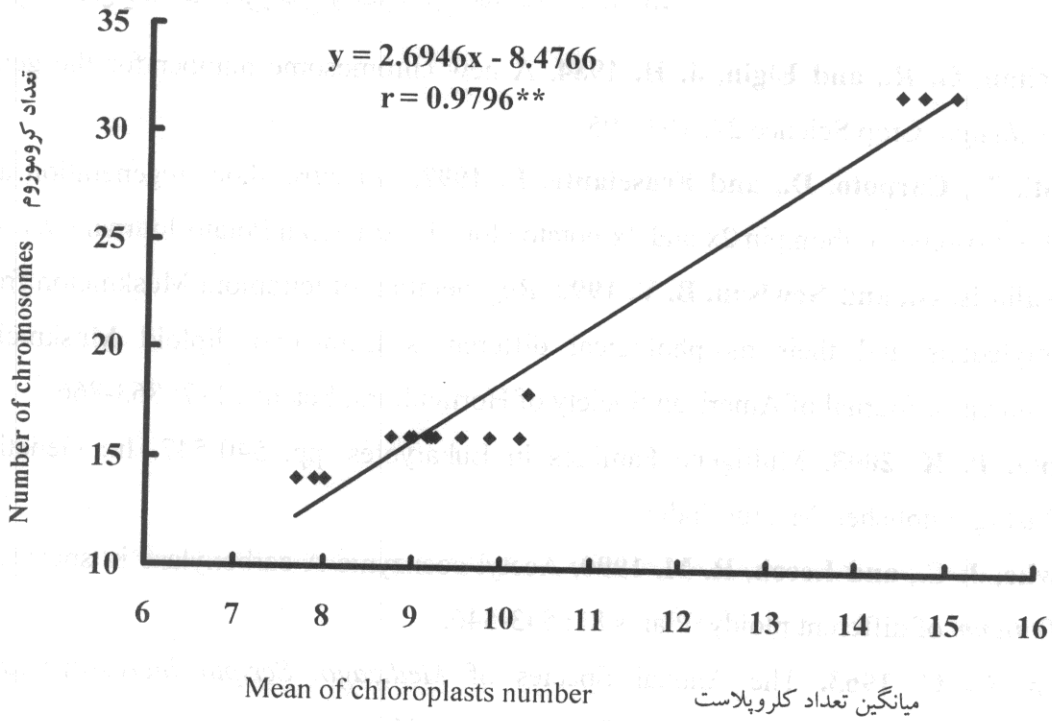
Fig. 1. Number of chromosomes in root tip cells in metaphase stage (left) and chloroplasts in stomatal guard cells (right) in Medicago species: *M. polymorpha* (a), *M. radiata* (b), *M. scutellata* (c)

تعیین سطح پلوئیدی به روش شمارش کروموزمی سلول‌های متافاز میتوزی ضمن مشکل بودن، مستلزم داشتن بذر سالم و صرف حداقل یک هفته زمان برای مراحل آماده سازی

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌هاست، در حالی که باشمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، تنها با داشتن چند برگ تازه و در زمانی بسیار کوتاه‌تر یعنی در حدود ۱۰ دقیقه می‌توان سطح



شکل ۲- همبستگی بین میانگین تعداد کلروپلاست و کروموزوم در ۱۷ گونه یونجه

Fig. 2. Correlation between mean of chloroplasts number and chromosomes number in 17 Medicago species

پلوئیدی را تعیین کرد. لذا بر اساس نتایج این تحقیق شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه به عنوان روش مقرون به صرفه، آسان و سریع جهت تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های سرده یونجه توصیه می‌گردد.

References

منابع مورد استفاده

اهری زاد، س. ۱۳۷۰. بررسی تعداد روزنه و ارتفاع بوته و ارتباط آن‌ها با سطح پلوئیدی در یونجه‌های یک ساله. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

شریعت، ا.، میرزایی ندوشن، ح.، قمری زارع، ع.، و سنگتراش، م. ح. ۱۳۸۰. بررسی کاریوتیپ گونه‌هایی از یونجه‌های یک ساله با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره. تحقیقات ژنتیک واصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ٦: ۲۳-۱.

www.SID.ir

Archive of SID

گزانچیان، ع. ۱۳۷۲. بررسی مورفولوژیک و سیتولوژیک یونجه‌های یک ساله استان خراسان، پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی کرج.

میرزایی ندوشن، ح.، شریعت، ا.، قمری زارع، ع.، و سنگتراش، م. ح. ۱۳۸۰. مطالعات سیتوژنتیک گونه‌هایی از یونجه‌های یک ساله. پژوهش و سازندگی جلد ۱٤-٤: ٦٣-٥٨.

Bauchan, G. R., and Elgin, J. H. 1984. A new chromosome number for the genus *Medicago*. Crop Science 24: 193-195.

Cardi, T., Carpoto, D., and Frusciante, L. 1992. *In vitro* shoot regeneration and chromosome doubling in 2x and 3x potato cloned . American Potato Journal 69:1-12.

Fassuliotis, G., and Newlson, B. V. 1992. Regeneration of tetraploid Muskmelon from cotyledons and their morphological differences from two diploid Muskmelon genotypes. Journal of American Society of Horticultural Science 117: 863-866.

Gupta, P. K. 2003. Multigene Families in Eukaryotes. pp. 540-547. In: Genetics. Rastogi Publisher. Meerut, India.

Hawke, J. C., and Leech, R. M. 1990. Acetyl coenzyme A carboxylase in species of *Triticum* of different ploidy. Plants 81: 543-546.

Heyn, C. C. 1963. The Annual Species of *Medicago*. *Scripta hierosolymitana.* Publication of the Hebrew University, Jerusalem. 153 pp.

Koorneef, J., Vandieepen, A. M., Hanhart, C. J., Kieboom-de Wast, A. C., Martinell, C., Schoenmakers, H.C.H., and Wijbrandi, J. 1989. Chromosome instability in cell and tissue cultures of tomato haploid and diploid. Euphytica. 43: 179-186.

Leech, R. M. 1981. Observation of the mechanism of chloroplast division in higher plants. New Phytopathologist 87: 1-9.

Mariami, A., Pupilli, F., and Calderini, O. 1996. Cytological and molecular analysis of annual species of the genus *Medicago*. Candian Journal of Botany 74: 299-307.

Martin, W., and Herman, R. G. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus:how much, what happenes and why . Plant Physiology 118: 9-17.

Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M. and Kowallik, K. 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. Nature 400: 119-120.

www.SID.ir

Archive of SID

Mozafari, J., Wolyn, D. J., and Ali-Khan, S. T. 1997. Chromosome doubling via tuber disc culture in dihaploid potato as determined by confocal microscopy. Plant Cell Reporter 16: 329-333.

Murray, H., and Standing, L. 1992. Genomic constancy during the development of *Lathyrus odoratus* cultivars. Heredity 68: 321-327.

Nakano, T., Kimura, T., Kaneko, I., Nagata, N., Matsuyama, T., Asami, T., and Yoshida, S. 2001. Molecular mechanism of chloroplast development regulated by plant hormones. Piken Review 41: 86-87.

Schreiter, J., Munzert, B., and Moll, A. 1989. Bestimmung des ploidiegrades durch chloroplast enzahlungen in stomata bei *In-vitro* kia lusregeneraten von kartoffeln. Arch. Zuchtungs forsch., Berlin 19: 69-73.

Singsit, C., and Oaias-Akians, P. 1992. Rapid estimation of ploidy levels *In vitro* regenerated interspecific *Arachis* hybrids. Euphytica 64: 3, 183-188

Small, E., and Jomphe, M. 1989. A Synopsis of the genus Medicago (Leguminosae). Canadian Journal of Botany 67: 3260-3294.

آدرس نگارندگان:

فرنگیس قنواتی- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.

جواد مظفری- بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ٤١١٩، کرج ٣١٥٨٥.

علی‌اصغر معصومی- مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، بیکان‌شهر، تهران.

www.SID.ir