

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 علی اصغر معصومی

مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بدر

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 بدر ۲۰: ۱۱۷-۱۲۷.

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 و آسان 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 هر گونه مطالعه گردید. نتایج نشان‌دهنده همبستگی مستقیم ( $r = .98$ ) 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. scutellata* (L.) Mill. Gard.، *M. rugosa* Desr. و *M. sativa* L. تقریباً دو برابر کلروپلاست‌های آن در گونه‌های دیپلوئید *M. noeana* Boiss.، *M. minima* (L.) Bartalini.، *M. laciniata* (L.)، *M. radiata* L.، *M. coronata* (L.) Bartalini.، *M. littoralis* Rhode.، *truncatula* Gaetrn.، *M. polymorpha* L.، *M. lupulina* L.، *M. ciliaris* (L.) Krock.، *M. arabica* (L.) Huds.، Mill. Gard.، *M. rigidula* (L.) All. و *M. orbicularis* (L.) Bartalini.، *M. constricta* Durieu. 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.

## مقدمه

محدود کننده به کارگیری تکنولوژی‌ها پلویید 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 سلول‌های محافظ روزنه ضروری بوده و می‌تواند 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 در آن‌ها استفاده شده است. همبستگی تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های محافظ روزنه و سطح پلوئیدی در گیاهان گوجه‌فرنگی (Koorneef et al., 1989)، سیب زمینی

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 و از 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

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 کارآمد در تعیین 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.) Krock. ، *M. polymorpha* L. ، *M. lupulina* L. ، *M. rigidula* (L.) All. ، *M. constricta* Durieu. و *M. orbicularis* (L.) Bartalini. جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های اصلی در مناطق مختلف (جدول ۱) در گلدان‌های پلاستیکی به عمق دوسانتی‌متر حاوی ماسه بادی، خاک برگ و خاک مزرعه در فصل پاییز در گلخانه بانک ژن گیاهی ملی ایران کشت گردیدند. برای این

وگندم گونه (Schreiter *et al.*, 1989) *T. monococum* (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 یونجه گونه‌های *A. stenosperm* L. و *Arachis hypogaea* 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. رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی و بدون جداسازی اپیدرم نیز با استفاده از میکروسکوپ لایه نگر لیزر (Laser Scanning Confocal Microscopy) امکان پذیر است (Mozafari *et al.*, 1997). این مطالعه نشان داد که برگ‌های میانی تعداد

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.

کار به طور مکانیکی وبا استفاده از کاغذ سمباده سطح بذرها خراش داده و سپس بذرها با قارچ کش بنومیل ضد عفونی شدند. گیاهان در شرایط دمایی ۲۰-۲۵ درجه سانتی گراد پرورش داده

جدول ۱- محل جمع‌آوری گونه‌های مختلف Medicago

Table 1. Collection sites of different Medicago species

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

جلوگیری از تبخیر، برگ‌ها در کیسه 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

شمارش تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه از برگ‌های میانی گیاهچه‌ها (میانگره ۶-۵)، به طور تصادفی سه نمونه انتخاب و برای

## نتایج و بحث

سطح پلوانیدی 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 تراپلوانید می‌باشند که تراپلوانید بودن این گونه‌ها با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد (شریعت و همکاران، ۱۳۸۰؛ Bauchan and Elgin, 1984؛ Mariami, 1996). گونه‌های *M. truncatula*، *M. noeana*، *M. radiata*، *M. littoralis*، *M. arabica*، *M. orbicularis*، *M. minima*، *M. coronata* و *M. laciniata*، *M. lupulina* دارای ۱۶ کروموزوم و دیپلوانید بوده که عدد پایه کروموزومی آن‌ها ۸ می‌باشد، در حالی که گونه‌های *M. Polymorpha*، *M. rigidula* و *M. constricta* دارای فقط ۱۴ کروموزوم بودند که نشانگر دیپلوانید بودن آن‌ها با عدد پایه کروموزومی ۷ است، نتایج به دست آمده گزارش‌های قبلی را تأیید می‌کند (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰؛ شریعت و همکاران، ۱۳۸۰؛ گزانیچیان، ۱۳۷۲؛ Mariami et al., 1996). از میان گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق گونه *M. ciliaris* دارای ۱۸ کروموزوم بود که نشانگر وجود عدد پایه کروموزومی ۹ در این گونه می‌باشد. این نتیجه در گزارش

یک لام قرار داده و با محلول لوگول رنگ آمیزی شد. پس از قرارگیری لام روی لام، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده و تعداد کلروپلاست‌ها در بیست جفت سلول محافظ روزنه شمارش گردید و میانگین و انحراف معیار برای هر گونه تعیین شد.

## شمارش کروموزومی

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 ۴۸ ساعت که ریشه‌چه‌ها به اندازه ۱-۱/۵ سانتی‌متر رشد کردند، ریشه‌چه‌ها را جدا و به محلول پیش تیمار آلفا برموفتالین منتقل و به مدت ۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از شستشو با آب مقطر در 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 ۳۰-۲۴ ساعت ریشه‌چه‌ها به مدت سه ساعت در آب جاری شستشو و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. ریشه‌چه‌ها در محلول سدیم هیدروکسید نرمال به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی ۶۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز و با هماتوکسیلین رنگ آمیزی و پس از اسکواش حداقل ده پهنه متافازی میتوز برای هر گونه مطالعه گردید.

پایه کروموزومی ۹ در این گونه ممکن است مشاهده شود، در هر صورت تحقیق حاضر اولین گزارش از این مشاهده در ایران می باشد.

محققان قبلی به چشم نمی خورد. در یک بررسی (Heyn, 1963) پیشنهاد شده است که هم عدد پایه کروموزومی ۸ و هم عدد

جدول ۲- تعداد کروموزوم، تعداد کلروپلاست و سطح پلوئیدی در گونه های 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
<i>M. sativa</i>	32	4x	14	16	14.7±0.80
<i>M. rugosa</i>	32	4x	14	17	15.1± 0.89
<i>M. scutellata</i>	32	4x	14	16	14.5±0.60
<i>M. coronata</i>	16	2x	8	10	9.2±0.62
<i>M. radiata</i>	16	2x	8	10	8.8±0.64
<i>M. rigidula</i>	14	2x	7	9	8.0±0.65
<i>M. polymorpha</i>	14	2x	7	9	7.9±0.79
<i>M. constricta</i>	14	2x	7	9	7.7±0.73
<i>M. noeana</i>	16	2x	9	11	10.2±0.89
<i>M. minima</i>	16	2x	8	10	9.0±0.69
<i>M. truncatula</i>	16	2x	8	10	9.3±0.72
<i>M. littoralis</i>	16	2x	8	10	9.0±0.73
<i>M. orbicularis</i>	16	2x	8	11	9.6±0.94
<i>M. laciniata</i>	16	2x	8	10	8.8±0.72
<i>M. arabica</i>	16	2x	9	11	9.9±0.75
<i>M. ciliaris</i>	18	2x	9	11	10.3±0.57
<i>M. lupulina</i>	16	2x	8	10	9.2±0.75

گونه های دیپلوئید ۹ و در گونه های تتراپلوئید ۱۶ می باشد. این نشان می دهد که با افزایش سطح پلوئیدی، میانگین تعداد کلروپلاست ها در سلول محافظ روزنه افزایش پیدا می کند. به طوری که تعداد کلروپلاست های سلول های محافظ روزنه در گونه های تتراپلوئید تقریباً دو برابر کلروپلاست های آن در گونه های دیپلوئید است. این مطلب در شکل ۱ در

حداقل، حداکثر و میانگین تعداد کلروپلاست های سلول های محافظ روزنه در گونه های ذکر شده تعیین و در جدول ۲ آمده است. نتایج جدول نشان می دهد که تعداد کلروپلاست ها در سلول های محافظ روزنه گونه های دیپلوئید بین ۷ تا ۱۱ عدد بوده در حالی که در گونه های تتراپلوئید ۱۴ تا ۱۶ عدد است و میانگین تعداد کلروپلاست ها در

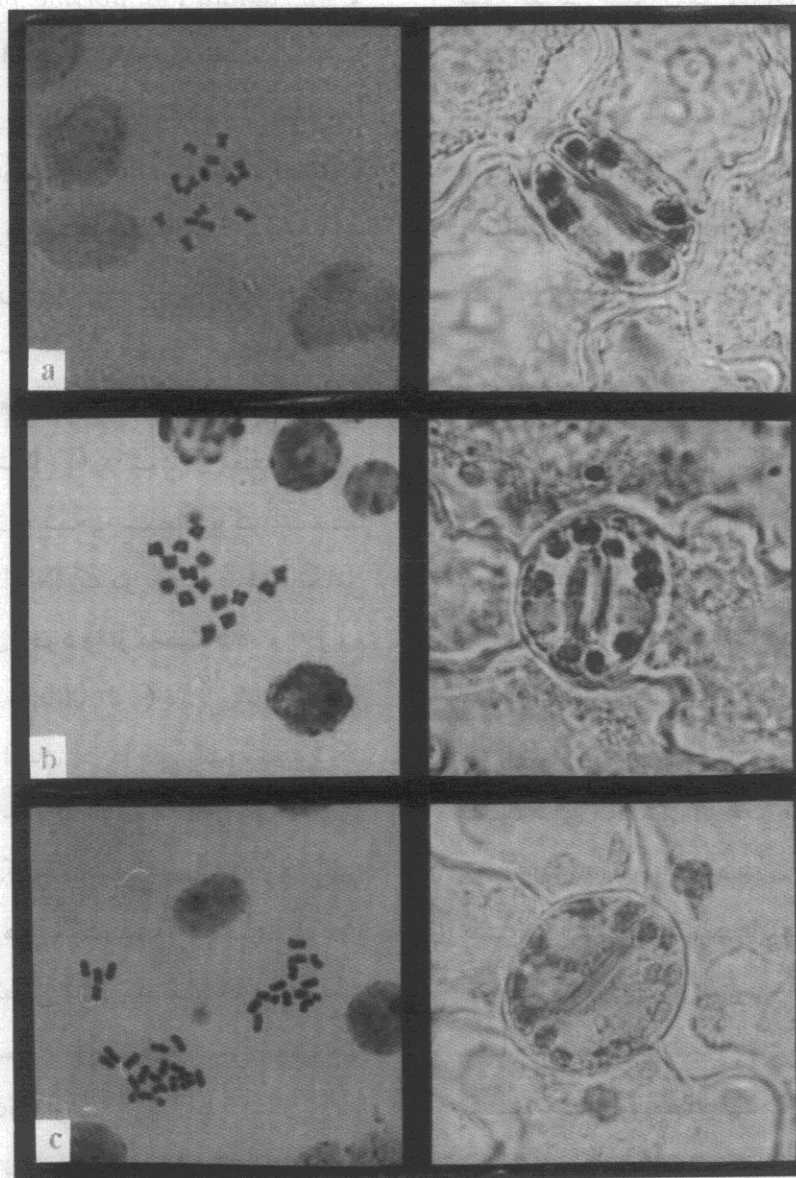
طور تقریبی صد ژن در DNA آن موجود است ولی باید توجه داشت که تقسیم، رشد و عمل بیوشیمیایی آن با بیان ژن‌های موجود در هسته ارتباط دارد (Leech, 1981). ناکانو و همکاران (Nakano et al., 2001) معتقدند ماهیت انتقال پیام از طریق DNA هسته به DNA کلروپلاست هورمونی است. وی اظهار داشت این هورمون سیتوکینین می‌باشد، 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 تأیید می‌شود.

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

گونه‌های *M. radiata*، *M. polymorpha* 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 تقریباً دو برابر ارقام دیپلوئید گزارش نموده‌اند. همبستگی بین تعداد کلروپلاست و تعداد کروموزوم ( $r = .98$ )، 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 بر اثر 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 نو ترکیبی 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

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



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

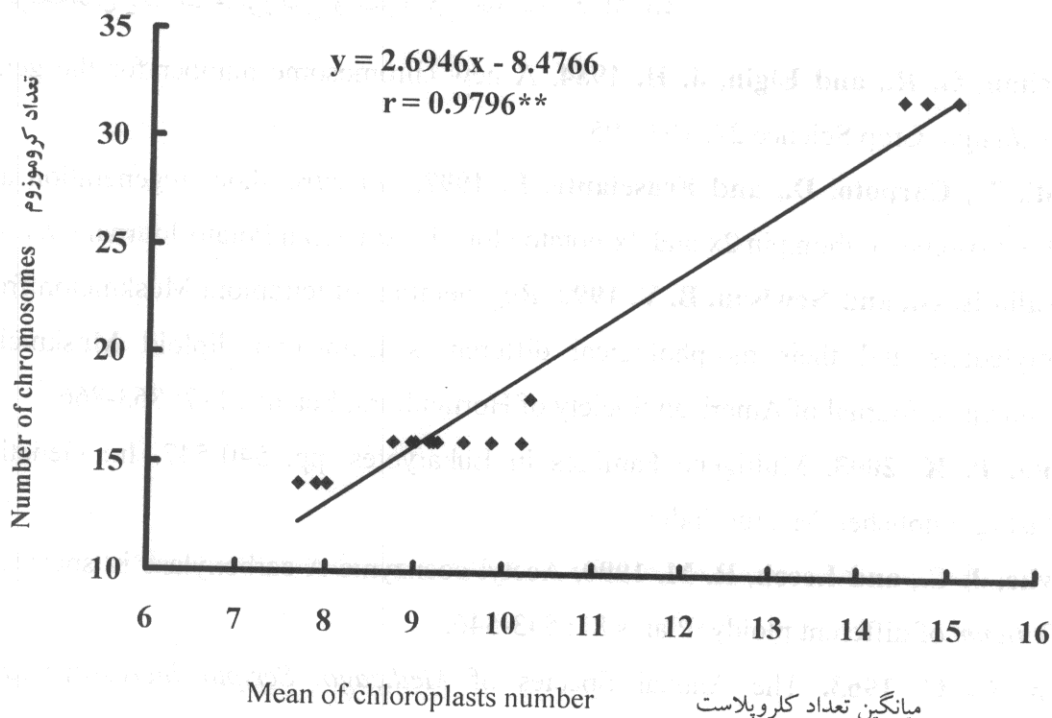
Fig. 1. Number of chromosomes in root tip cells in metaphase stage (left) and chloroplasts in stomatal guard cells (right) in Medicago species: *M. polymorpha* (a), *M. radiata* (b), *M. scutellata* (c)

مشکل بودن، مستلزم داشتن بذر سالم و صرف حداقل یک هفته زمان برای مراحل آماده سازی

تعیین سطح پلوئیدی به روش شمارش کروموزومی سلول‌های متافاز میتوزی ضمن



نمونه‌هاست، در حالی که باشمارش کروپلاست‌های 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 و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۶: ۲۳-۱.

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 ۱۴-۴: ۵۸-۶۳.

- 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 Phytologist* 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 happens 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.

- 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 ploidigrades durch chloroplast enzahlungen in stomata bei *In-vitro* kulturen regenerierten von kartoffeln. *Arch. Zuchtungsforsch., 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 فنوانی- 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 ۴۱۱۹، کرج ۳۱۵۸۵.

علی اصغر معصومی- مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع، پیکان شهر، تهران.