مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۷، شماره ۳، سال ۱۳۹۰

# ارتباط تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، فلوسیتومتری و سطح پلوئیدی در گونه‌های اسپرس (*Onobrychis* spp.)

# Relationship Between the Chloroplast Number in Stomatal Guard Cells, Flow Cytometry and Ploidy Level in *Onobrychis* spp.

فرنگیس قنواتی [۱] و حسن اسکندری [۲]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی ، دانشکده کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران

**تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۱۶**

## چکیده

**قنواتی، ف.، و اسکندری، ح. ۱۳۹۰.** ارتباط تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، فلوسیتومتری و سطح پلوئیدی در گونه‌های اسپرس (*Onobrychis* spp.). **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۷:** ۴۳۹ - ۴۲۷.

**در این تحقیق برای اولین بار امکان استفاده از شمارش کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه و دستگاه فلوسیتومتری به عنوان یک روش جانشین ساده و آسان برای تعیین سطح پلوئیدی در جنس اسپرس مورد بررسی قرار گرفت. از برگ‌های جوان میانی گیاهان کاشته شده هر جمعیت در گلخانه سه نمونه به طور تصادفی انتخاب و تعداد کلروپلاست‌های سلول های محافظ روزنه سطح زیرین برگ در بیست جفت سلول شمارش شد. 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 شد. نتایج نشان‌دهنده همبستگی مستقیم (r=0.95) سطح پلوئیدی با تعداد کلروپلاست‌های سلول های محافظ روزنه در کلیه گونه‌های مورد مطالعه بود. تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گونه‌های تتراپلوئید *O. viciaefolia* و *O. altissima* تقریبا دو برابر کلروپلاست‌های آن‌ها در گونه‌های دیپلوئید *O. amoena* subsp. *meshhedensis*، *O. mazanderanica* ، *O. amoena* subsp. *amoena* ، *O. subnitens* ، *O. schahuensis* ، *O. chorassanica* ، *O. michauxii* و *O. pulchella* بود. با مقایسه پیک و نسبت مد نمونه شاهد (*O. amoena* subsp. *amoena*) و سایر نمونه‌ها، سطوح پلوئیدی نمونه‌ها تخمین زده شد، به طوری که در گونه‌های تتراپلوئید تقریبا این نسبت دو برابر گونه‌های دیپلوئید بود. بنابراین با توجه به نتایج فوق شمارش کلروپلاست‌های سلول های محافظ روزنه و استفاده از دستگاه فلوسیتومتری به عنوان روش‌های نوین برای تعیین سطح پلوئیدی در جنس اسپرس توصیه می‌شود.**

**واژه‌های کلیدی: اسپرس، سطح پلوئیدی، سلول محافظ روزنه، کلروپلاست، فلوسیتومتری.**

نویسنده مسئول: f_ghanavati83@yahoo.com **تلفن: ۰۲۶۱-۲۷۰۱۲۶۰**

**مقدمه**

جنس اسپرس (Onobrychis) با دارا بودن بیش از ۱۳۰ گونه یک ساله و چندساله یکی از بزرگ‌ترین و مهم‌ترین سرده‌های تیره بقولات است. تعدادی از گونه‌های این جنس دارای ارزش علوفه‌ای هستند و برخی در کنترل فرسایش و یا به عنوان گیاهان زنبورپسند به کار می‌روند. تعدادی از گونه‌های این جنس نیز به عنوان گیاهان زینتی کشت می‌شوند (Mabberley, 1997؛ Lock and Simpson, 1991). جنس Onobrychis (اسپرس) در اوراسیا و شمال شرقی آفریقا پراکنش دارد و مرکز تنوع آن نواحی معتدل منطقه ایرانو تورانی است (Rechinger, 1984). در ایران جنس Onobrychis دارای ۶۳ گونه‌ی (۱۳ گونه یک ساله و ۵۰ گونه چند ساله) است که در مناطق مختلف آب و هوایی انتشار داشته و از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند و به عنوان یک ذخیره ژنی غنی و ارزشمندبرای اصلاح گونه زراعی محسوب می‌شوند. استفاده از تلاقی ژنتیکی میان انواع غیر زراعی با گونه زراعی راهی برای فائق آمدن بر نارسایی‌های اسپرس زراعی، افزایش مقاومت آن‌ها به تنش‌های محیطی و بیماری‌ها و افزایش عملکرد کمی و کیفی است. ذخیره ژنی این جنس دارای سطوح پلوئیدی متفاوت دیپلوئید و تتراپلوئید با عدد پایه کروموزمی متفاوت ۷، ۸ و ۹ است که موجب پیچیدگی کار اصلاح آن با استفاده از این منابع ژنتیکی می‌شود (Ghanavati *et al*., 2010). بنابراین تعیین سطح پلوئیدی نه تنها اهمیت فراوانی در مطالعه روابط خویشاوندی گونه‌ها داشته، بلکه حائز اهمیت زیادی در تهیه هیبریدهای بین گونه‌ای، مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های به‌نژادی آن است. از آن‌جا که اندازه کروموزم‌ها در گونه‌های این جنس 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 محدودکننده به کارگیری تکنولوژی‌ها پلوئید بریدینگ است. این روش که شامل مراحل مختلفی جهت آماده‌سازی نمونه نظیر جوانه‌زنی بذر سالم، مراحل پیش تیمار، تثبیت، هیدرولیز، رنگ‌آمیزی، اسکواش و نهایتاً بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها است، کاری وقت‌گیر و تخصصی بوده و نیازمند تعداد زیادی بذر سالم است. بنابراین وجود یک روش جانشین ساده، آسان و مقرون به صرفه مانند شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه ضروری بوده و می‌تواند کارایی برنامه‌های اصلاحی اسپرس را به میزان قابل توجهی افزایش دهد (Ghanavati *et al*., 2004). 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 تأثیر ژنوم هسته است (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)، سیب‌زمینی (Schreiter *et al.*, 1989) و گندم گونه *T. monococcum* (Hawke and Leech, 1990) تائید شده است. در مطالعه دیگری همبستگی معنی داری میان تعداد کروموزم، اندازه دانه گرده و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گیاه *Lathyrus odoratus* L. (Murray and Standing, 1992) و در هیبریدهای بین گونه‌ای *Arachis hypoyaea* L. و *A. stenosperm* L. (Singsit and Oaias-Akians, 1992) مشاهده شد. این مطالعه شمارش تعداد کلروپلاست را روش مناسبی برای تعیین گیاهان 2n، 3n، 4n و 6n اعلام کرد. 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 کند (Cardi *et al.*, 1992). قنواتی و همکاران (Ghanavati *et al.*, 2004) ارتباط وهمبستگی سطح پلوئیدی و تعداد کلروپلاست های محافظ روزنه در ۱۷ گونه سرده یونجه را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد تعداد کلروپلاست های سلول های محافظ روزنه در گونه های تتراپلوئید تقریبا دو برابر آن در گونه های دیپلوئید بود. از طرف دیگرمحتوای DNA هسته ای که در کروموزوم های درون هسته سلول گیاهان موجود است، نیز می تواند به عنوان شاخصی برای تخمین سطح پلوئیدی مورد استفاده قرار گیرد. معمولاً برای تعیین مقدار DNA هسته سلول های گیاهی از دو روش فلوسیتومتری و میکرواسپکتروفتومتری فولگن استفاده می شود. در این سری آزمایش‌های از گیاهانی استفاده می شود که مقدار DNA آن‌ها در محدوده ای بین ۱ تا ۳۴ پیکوگرم قرار دارد (Bennett *et al.*, 2000). در روش فلوسیتومتری از دو ماده به عنوان فلوروکروم استفاده می‌شود. این دو ماده عبارتند از پروپیدیوم یدید (Propidium Iodid) و ۴و۶ دی آمینو-۲- فنیل ایندول (4,6-Di Amino 2-Phenil Indol). PI به وسیله نور مرئی با ماکزیمم جذبی در ۴۹۰ نانومتر (nm) تحریک می شود، در حالی‌که DAPI به وسیله نور فرابنفش (UV) در ۳۵۰ نانومتر (nm) تحریک می شود. این دو رنگ واکنش های رنگی کاملاً متفاوتی دارند. PI بین جفت بازهای رشته دوتایی DNA و

RNA که خاصیت بازی کمی داشته یا فاقد خاصیت بازی هستند، واقع می‌شود (Properi *et al.*, 1991)، در حالی که DAPI یک رنگ غیر بینابینی است که به طور ترجیحی به صورت کمپلکس در نواحی باز-A T باند می‌شود و بین بازها قرار نمی‌گیرد (Godelle *et al.*, 1993). در سال‌های اخیر تکنیک فلوسیتومتری به علت آسان بودن و سرعت بالای آن به تکنیک های دیگر ترجیح داده می‌شود (Heslop-Harrison, 1995؛ Rayburn *et al.*, 1989). نتیجه آنالیز با فلوسیتومتری به شکل هیستوگرام نمایش داده می‌شود که با محتوای DNA مربوط است. چون یک جمعیت بزرگ از سلول‌ها را می‌توان در مدت زمان کوتاهی با این روش آنالیز کرد، از فلوسیتومتری با وسعت زیادی برای یافتن آنیوپلوئیدی و پلی پلوئیدی (Kawara *et al.*, 1999) و مشاهده اختلال در تقسیم سلولی (Rabinovich, 1994) استفاده می‌شود. ارزشC، محتوای DNA هسته‌های سلول‌های سوماتیک دیپلوئید را نشان می‌دهد. هر یک پیکوگرم نیز معادل ۹۸۰ میلیون جفت باز (Mbp) است (Bennett *et al.*, 2000). در تعیین مقدار DNA هسته سلول گیاهی اهمیت استانداردهای مرجع و استفاده ویژه آن‌ها مورد تاکید است. در این تحقیق امکان به کارگیری شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه و فلوسیتومتری به عنوان روش‌هایی آسان، دقیق و کارآمد در تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های سرده اسپرس بررسی شده و کارایی آن با شمارش کروموزمی سلول‌های متافاز میتوزی مقایسه شد.

**مواد و روش‌ها**

بذرهای نوزده جمعیت ده گونه اسپرس جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های اصلی در مناطق مختلف، در گلدان‌های پلاستیکی به عمق دو سانتی‌متر حاوی ماسه بادی، خاک برگ و خاک مزرعه در فصل پاییز در گلخانه بانک ژن گیاهی ملی ایران کشت شدند. برای این کار به طور مکانیکی و با استفاده از کاغذ سمباده سطح بذرها خراش داده شد و سپس با قارچ‌کش بنومیل ضدعفونی شدند. گیاهان در شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد رشد داده و یک روز در میان آبیاری شدند. پس از این که دانه‌رست‌ها به حدود ده برگی رسیدند برای شمارش کلروپلاست مورد استفاده قرار گرفتند.

برای شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه،از برگ‌های میانی گیاهچه‌ها (میانگره ۵-۶)، به طور تصادفی سه نمونه انتخاب و برای جلوگیری از تبخیر برگ‌ها در کیسه پلاستیکی قرار داده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. با استفاده از تیغ اسکالپل قطعه‌ای کوچک از اپیدرم سطح زیرین برگ را برداشته و روی یک لام قرار داده و با محلول لوگول رنگ‌آمیزی شد. پس از قرار دادن لامل روی لام، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ تعداد کلروپلاست‌ها در بیست جفت سلول محافظ

روزنه شمارش و میانگین و انحراف معیار برای هر جمعیت تعیین شد.

برای تعیین سطوح پلوئیدی با فلوسیتومتری، تعداد دو برگ جوان از هر بوته به اندازه چهار سانتی‌متر از هر گیاه بریده و درون تشتک پتری قرار داده شدند. مقدار ۱۶۰۰ میکرولیتر از بافر DAPI بر روی برگ ها ریخته شد و با استفاده از تیغ کاملاً خرد شدند تا هسته‌ها آزاد شوند. سوسپانسیون حاصله از فیلتر مخصوص دستگاه عبور داده شد تا تجمعات سلولی و قطعات درشت حذف شوند.محلول فیلتر شده در داخل لوله استوانه‌ای دستگاه Partec GmbH 2005) Ploidy Analyzer ساخت کشور آلمان) ریخته شد و پس از نصب در محل مخصوص، محتوای DNA نمونه های مورد آزمایش تعیین شد.

برای شمارش کروموزومی، بذرهای تیمارشده به روشی که در بالا به آن اشاره شد در تشتک های پتری محتوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند و برای جوانه‌زنی به ژرمیناتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت که ریشه‌چه‌ها به اندازه ۱/۵-۱ سانتی‌متر رشد کردند، ریشه‌چه‌ها جدا و پس از انتقال به محلول پیش تیمار ۸- هیدروکسی کینولئین، به مدت ۳/۵ ساعت در یخچال نگهداری شدند. نمونه ها در ادامه پس از شستشو با آب مقطر در محلول فیکساتور لویتسکی (محلول یک به یک فرمالین ده درصد و اکسید کرم یک درصد) قرار داده و در یخچال نگهداری شدند. پس از گذشت ۳۰-۲۴ ساعت ریشه چه ها به مدت سه ساعت در آب جاری شستشو و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. ریشه‌چه‌ها در محلول سدیم هیدروکسید نرمال به مدت ۱۲ دقیقه در حمام آبی ۶۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز و سپس با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. برای از بین بردن تیغه میانی و تهیه گسترش بهتر سلولی، ریشه چه ها به مدت یک ساعت در آنزیم سلولاز و پکتیناز قرار داده شدند و پس از اسکواش، ۱۰-۵ پهنه متافازی میتوز سلول‌های مریستم نوک ریشه برای هر گونه مورد مطالعه قرار گرفت.

**نتایج و بحث**

نام و رویشگاه گونه‌هایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج این بررسی نشان داد که از نظرتعداد کروموزوم پایه، بین گونه‌ها عدد پایه کروموزومی ۷و ۸ مشاهده شد. مطالعات کروموزومی این تحقیق نشان داد که به جز گونه‌های *O. viciaefolia* و *O. altissima* که تتراپلوئید تعیین شدند، همه گونه‌های مورد بررسی دیپلوئید بودند. جمعیت‌های گونه *O. michauxii* و گونه *O. pulchella* با عدد پایه کروموزومی x=۸ ، تعداد کروموزوم ۲n =۲x =۱۶، گونه های *O. viciaefolia* و *O. altissima* با پایه کروموزومی x=۷ ، تعداد کروموزوم ۲n=۴x=۲۸ و سایر گونه‌ها، با پایه کروموزومی x=۷، تعداد کروموزوم ۲n=۲x=۱۴ را نشان دادند. نتایج مطالعات

جدول ۱- گونه‌های مورد مطالعه جنس Onobrychis و رویشگاه آن‌ها
Table 1. Studied species of Onobrychis and their habitats

| Species | Habitate |
|---|---|
| *O. mazanderanica* Rech.f. | Mazanderan: Noshahr, Zaloos, Dalam, 571† |
| *O. mazanderanica* Rech.f. | Mazanderan: Sari, Narmabdos, Saidabad, 171† |
| *O. amoena* subsp. *meshhedensis* Širj. & Rech.f. | Fariman, arreh kamar, 1900m |
| *O. amoena* subsp. *amoena* M. Pop. et Vved. | Bojnord, Shoghan, 2000m |
| *O. subnitens* Bornm. | East Azerbaijan: Sarab, 278† |
| *O. subnitens* Bornm. | East Azerbaijan: Hashtrod, Zolbin, 318† |
| *O. schahuensis* Bornm. | Kermanshah, Eslamabad-e- Gharb, Govareh, 419† |
| *O. schahuensis* Bornm. | Kermanshah: Javanrod, 413† |
| *O. chorassanica* Bunge. | Bojnord: Samsiyab, 475† |
| *O. chorassanica* Bunge. | Khorrasan Razavi: Mashhad, Kalat road to Dargaz, 588† |
| *O. michauxii* DC. | East Azerbaijan: Mianeh, 291† |
| *O. michauxii* DC. | East Azerbaijan: Kaleibar, 280† |
| *O. pulchella* Schrenk. | Khorrasan Razavi: Mashhad, Kalat, Chenar, 471† |
| *O. viciaefolia* | East Azarbaijan: Kaleibar, 280† |
| *O. viciaefolia* | West Azarbaijan: Naghadeh, Oshnaviyeh, Nalus, 134† |
| *O. viciaefolia* | West Azarbaijan: Bukan, Bami, Bardehzard, 136† |
| *O. altissima* | Lorestan: Aligodarz, Kahrizsorkh, 236† |
| *O. altissima* | Markazi: Shahzand, Hendodar, 260† |
| *O. altissima* | Markazi: Khandab, 262† |

† : شماره TN در بانک ژن

† : Number of TN Gene Bank

سیتوژنتیکی توسط دیگر محققین در مورد این جنس نیز موید نتایج این تحقیق است (Hesamzadeh Hejazi and Ziaei Nasab, 2009؛ Goldblatt,1992-1993؛ Zohary, 1972؛ Ansari Asl *et al.*, 2000).

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که هرچند گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف اسپرس دارای تعداد متفاوتی کروموزم پایه هستند ولی همگی در داشتن کروموزم‌های کوچک مشترک هستند، به عبارت دیگر در مقایسه با بسیاری از گونه‌ها و جنس‌های دیگر گیاهی میانگین طول کروموزم‌های اسپرس کوچک تر است.

حداقل، حداکثر و میانگین تعداد کلروپلاست های سلول های محافظ روزنه در گونه های مختلف اسپرس در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، تعداد کلروپلاست ها در سلول‌های محافظ روزنه گونه های دیپلوئید بین ۸ تا ۱۴ عدد و در گونه ی تتراپلوئید بین ۱۵ تا ۲۰ عدد بود. میانگین تعداد کلروپلاست ها در گونه های دیپلوئید ۱۱ و در گونه های تتراپلوئید ۱۹ بود. این مطلب در شکل ۱ در گونه‌های *O. amoena* subsp. *amoena*، *O. pulchella* و *O. viciefolia* نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده همبستگی مثبت (r=0.95) سطح پلوئیدی با تعداد کلروپلاست های سلول های محافظ روزنه در کلیه گونه های مورد مطالعه بود(شکل ۲). به طوری که تعداد کلروپلاست های سلول های محافظ روزنه در گونه های تتراپلوئید *O. viciaefolia* و *O. altissima* تقریبا دو برابر کلروپلاست های آن در گونه های دیپلوئید *O. mazanderanica*، *O. subnitens*،

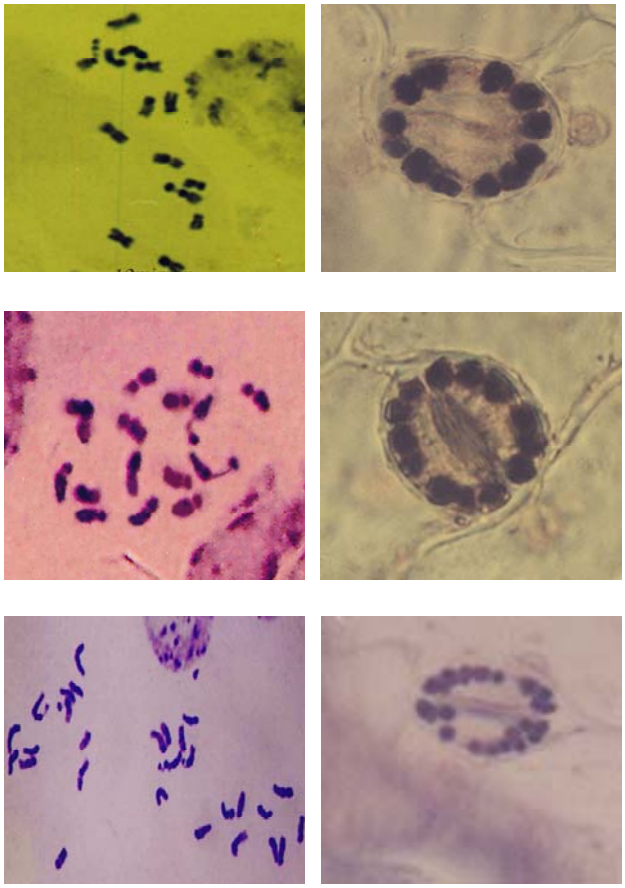
جدول ۲- تعداد کروموزوم، تعداد کلروپلاست و سطح پلوئیدی در گونه‌های مختلف اسپرس

Table 2. Number of chromosomes, number of choloroplasts and ploidy level in different species of Onobrychis

| Species | تعداد کروموزوم Number of chromosome | سطح پلوئیدی Ploidy level | تعداد کلروپلاست Number of chloroplast | | | انحراف معیار Standard deviation |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | حداقل Min. | حداکثر Max. | میانگین Mean | |
| *O. mazanderanica* 1 | 14 | 2x | 8 | 11 | 9.9 | 1.1 |
| *O. mazanderanica* 2 | 14 | 2x | 10 | 13 | 11.4 | 1.1 |
| *O. amoena* subsp. *meshhedensis* | 14 | 2x | 10 | 13 | 11.4 | 1.0 |
| *O. amoena* subsp. *amoena* | 14 | 2x | 10 | 14 | 11.9 | 1.3 |
| *O. subnitens* 1 | 14 | 2x | 9 | 13 | 10.6 | 1.3 |
| *O. subnitens* 2 | 14 | 2x | 11 | 13 | 12.0 | 0.8 |
| *O. schahuensis* 1 | 14 | 2x | 11 | 14 | 12.2 | 0.9 |
| *O. schahuensis* 2 | 14 | 2x | 11 | 14 | 12.2 | 1.0 |
| *O .chorassanica* 1 | 14 | 2x | 11 | 14 | 11.9 | 1.1 |
| *O. chorassanica* 2 | 14 | 2x | 11 | 13 | 12.2 | 0.8 |
| *O. michauxii* 1 | 16 | 2x | 10 | 12 | 10.6 | 0.7 |
| *O. michauxii* 2 | 16 | 2x | 10 | 13 | 11.7 | 0.9 |
| *O. pulchella* | 16 | 2x | 11 | 13 | 11.3 | 1.1 |
| *O. viciaefolia* | 28 | 4x | 17 | 20 | 18.8 | 1.0 |
| *O. viciaefolia* | 28 | 4x | 17 | 19 | 18.0 | 1.2 |
| *O. viciaefolia* | 28 | 4x | 18 | 20 | 19.5 | 1.1 |
| *O. altissima* | 28 | 4x | 16 | 18 | 17.0 | 0.9 |
| *O. altissima* | 28 | 4x | 17 | 19 | 18.0 | 1.1 |
| *O. altissima* | 28 | 4x | 15 | 17 | 16.0 | 0.9 |

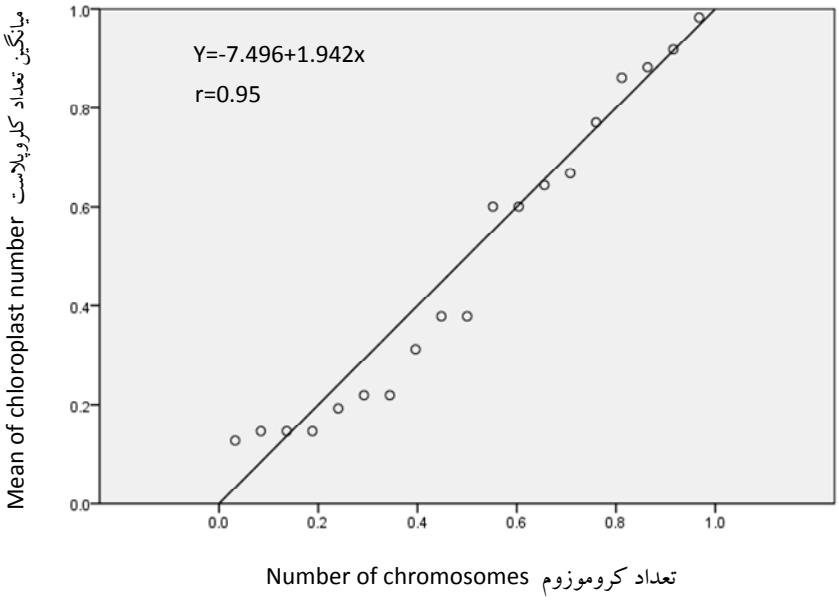
*O. amoena* subsp. *meshhedensis*، *O. schahuensis*، *O. chorassanica*، *O. amoena* subsp. *amoena*، *O. michauxii* و *O. pulchella* بود. مطالعات قبلی در خربزه (Fassuliotis and Newlson, 1992) و سیب‌زمینی (Mozafari *et al.*, 1997) و یونجه (Ghanavati *et al.*, 2004). نیز تعداد کلروپلاست‌های ارقام تتراپلوئید را تقریباً دو برابر ارقام دیپلوئید گزارش کرده‌اند.

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 یکصد 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



شکل۱- متافاز میتوزی (A) و تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه (B) به ترتیب در گونه‌های *O. amoena* subsp. *amoena* (1)، *O. pulchella* (2) و *O. vicaefolia* (3)

Fig. 1. Mitotic metaphase (A) and the choloroplast number of stomata guard cells (B) of *O. amoena* subsp. *amoena* (1) , *O. pulchella* (2) and *O. vicaefolia* (3)




شکل ۲- رگرسیون خطی بین میانگین تعداد کلروپلاست و کروموزوم نوزده جمعیت اسپرس

Fig. 2. Linear regression between mean of chloroplasts number and chromosomes number in nineteen Onobrychis populations

همکاران (Nakano *et al.*, 2001) معتقدند ماهیت انتقال پیام از طریق DNA هسته به DNA کلروپلاست هورمونی است. آن‌ها اظهار داشتند این هورمون سیتوکینین است، هر چند نتوانستند ژن‌هایی را که قبل از تولید سیتوکینین در گیرند را مشخص کنند. حال اگر فرض شود که ژن‌های مربوط به تشکیل کلروپلاست به DNA هسته منتقل شده‌اند، پس پلی‌پلوئیدی تعداد نسخه 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 نیست. از آن‌جایی 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 نیز ارتباط میان تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه با سطح پلوئیدی در گونه‌های مختلف اسپرس تأیید شد.

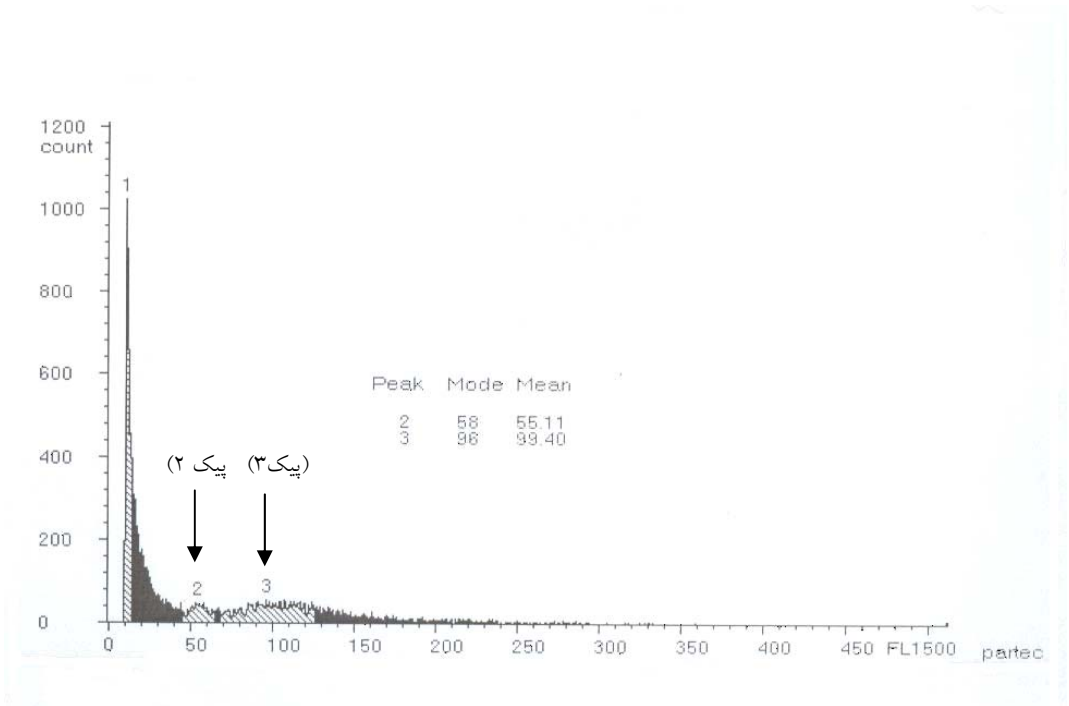
برای مطالعه محتوای DNA جمعیت‌های مورد آزمایش، گونه *O. amoena* subsp. *amoena* که دیپلوئید است به عنوان شاهد استفاده شد (شکل ۳). این نمونه چندین بار مورد آزمایش قرار گرفت و در نهایت مشخص شد که دستگاه، شاخص محتوای DNA (mode) را به طور متوسط ۵۵ نشان می دهد. به این ترتیب شاخص محتوای DNA مورد انتظار برای یک اسپرس دیپلوئید در محدوده ۶۰-۵۰ تخمین زده شد. تمام گونه های مورد آزمایش، با نمونه شاهد مخلوط و در صورت دیپلوئید بودن شاخص سانترومری(مد) آن‌ها در همین محدوده و پیک‌ها بر همدیگر منطبق شد.در حالی که در گونه تتراپلوئید *O. viciefolia* حدود۹۸ و تقریبا دو برابر مد نمونه‌های دیپلوئید بود و تشکیل پیکی جدا از نمونه شاهد داد (جدول ۳ و شکل۳) .

در مقایسه با شمارش تعداد کلروپلاست در سلول های محافظ روزنه و فلوسیتومتری ملاحظه می‌شود که 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 آماده‌سازی نمونه‌هاست، در حالی‌که با شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه و فلوسیتومتری تنها با داشتن چند برگ تازه و در زمانی بسیار کوتاه‌تر یعنی در حدود ۱۰ دقیقه می‌توان سطح پلوئیدی را تعیین کرد. بنابراین بر اساس نتایج این تحقیق شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه به عنوان روش مقرون به صرفه، آسان و سریع جهت تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های جنس اسپرس توصیه می‌شود با این حال در دو روش شمارش کلروپلاست و فلوسیتومتری به سختی می توان در یک سطح پلوئیدی مشخص، تعداد کروموزوم‌ها یعنی ۱۴ یا ۱۶ کروموزومی

جدول ۳- نسبت‌های مد جمعیت‌های اسپرس با نمونه شاهد بر اساس پیک فلوسایتومتر

Table 3. Ratio of mode of Onobrychis populations with control based on flow cytometer peak

| Species | مد نمونه های اصلی<br>Mode of main samples | مد شاهد<br>Mode of control sample | نسبت<br>Ratio |
|---|---|---|---|
| *O. mazanderanica* 1 | 55 | 55 | 1.00 |
| *O. mazanderanica* 2 | 56 | 55 | 1.00 |
| *O. amoena* subsp. *meshhedensis* | 55 | 55 | 1.00 |
| *O. amoena* subsp. *Amoena* | 55 | 55 | 1.00 |
| *O. subnitens* 1 | 54 | 55 | 1.00 |
| *O. subnitens* 2 | 59 | 55 | 1.07 |
| *O. schahuensis* 1 | 58 | 55 | 1.05 |
| *O. schahuensis* 2 | 55 | 55 | 1.00 |
| *O. chorassanica* 1 | 60 | 55 | 1.09 |
| *O. chorassanica* 2 | 53 | 55 | 1.00 |
| *O. michauxii* 1 | 58 | 55 | 1.05 |
| *O. michauxii* 2 | 59 | 55 | 1.07 |
| *O. pulchella* | 50 | 55 | 0.90 |
| *O. viciaefolia* | 96 | 58 | 1.70 |
| *O. viciaefolia* | 92 | 55 | 1.67 |
| *O. viciaefolia* | 89 | 54 | 1.64 |
| *O. altissima* | 93 | 55 | 1.69 |
| *O. altissima* | 90 | 54 | 1.66 |
| *O. altissima* | 95 | 55 | 1.72 |




شکل۳- مقایسه گونه تتراپلوئید *O. viciaefolia* (پیک۳) با دیپلوئید *O.amoena* subsp. *amoena* (پیک ۲) بر اساس فلوسیتومتری

Fig. 3. Comparison of Samples tetraploid *O. viciaefolia* (peak 3) with diploid *O.amoena* subsp. *amoena* (peak 2) based on flow cytometry

بودن را به دقت تعیین کرد و تنها سطح پلوئیدی یعنی دیپلوئید یا تتراپلوئید بودن مشخص می شود که این از معایب این دو روش به حساب می‌آید.

## References

**Ansari Asl, F., Ahmadian, P., and Nasirzadeh, A. 2000**. Cytological study of

Onobrychis germplasm in Tehran province. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 5: 36-56( in Persian).

**Bennett, M.D., Bhandol, P., and Leitch, I.J. 2000.** Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses of new estimates. Annals of Botany 86: 859-909.

**Cardi, T., Carpoto, D., and Frusciante, L. 1992.** *In vitro* shoot regeneration and chromosome doubling in 2X and 3X potato cloned. American Journal of Potato Research 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.

**Ghanavati, F., Eskandari, H., Bakhshi Khaniki, G., Sorkhi, B., and Amirabadizadeh, H. 2010.** Karyotypic study of sect. Hymenobrychis of Onobrychis in Iran. Seed and Plant Improvement Journal 26: 545-560( in Persian).

**Ghanavati, F., Mozafari, J., and Masumi, A. A. 2004.** Determination of ploidy level with counting the chloroplast number in stomatal guard cells in *Medicago* sp. Seed and Plant 20: 117-127(in Persian).

**Godelle, B., Cartier, D., Marie, D., Brown, S.C., and Siljak-ya-kovlev, S. 1993.** Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. Cytometry 14: 618-626.

**Goldblatt, P. 1992-1993.** Index to Plant Chromosome Numbers for 1992-1993. Monographs in Systematic Botany, Vol. 58. Botanical Garden, Saint Lois Missori.

**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.

**Hesamzadeh Hejazi, S.M., and Ziaei Nasab, M. 2009.** Cytogenetic study on several populations of diploid species of *Onobrychis* in natural gene bank of Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 16: 158-179(in Persian).

**Heslop-Harrison, J.S. 1995.** Flow cytometry and genome analysis. Probe 5: 14-17**.**

**Kawara, S., Takata, M., and Takehara, K. 1999.** High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Bowen's disease. Journal of

Dermatological Science 21: 23-26.

**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.

**Lock, J. M., and Simpson, K. 1991**. Legume of the West Asia: A Chek-list. Royal Botanical Gardens, Kew, UK. 452pp.

**Mabberley, D. J. 1997.** The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants, 2nd ed.. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 342 pp..

**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.

**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.

**Properi, E., Giangare, M.C., and Bottiroli, G. 1991.** Nuclease induced DNA structural changes assessed by flow cytometry with the intercalating dye propidium iodide. Cytometry 12: 323-329.

**Rabinovich, P. S. 1994.** DNA content histogram and cell cycle analysis. pp. 263-296. In: Darznkiewicz, Z., Robinson, J. P., and Crissman, H. A. (eds.) Methods in Cell Biology: Flow Cytometry. Academic Press, San Diego, USA.

**Rayburn, A.L., Auger, J.A., Benzinger, E.A., and Hepburn, A.G. 1989.** Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. Journal of Experimental Botany 40: 1179-1183.

**Rechinger, K. H. 1984.** Papilionaceae. pp. 387- 464. In: Rechinger, K. H. (ed. ) Flora Iranica 157.

**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 of *in-vitro* regenerated interspecific Arachis hybrids. Euphytica 64: 183-188.

**Zohary, M. 1972.** Flora Palestina, Part Two. The Israel Academy of Scinces and Humanities, Israel.