تعیین همبستگی بین تعداد کروموزوم‌های هسته و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در چغندرقند

Correlation between nucleus chromosomes number and chloroplasts number in sugar beet stomatal guard cells

بهروز احسانی مقدم[۱]، محسن آقایی زاده[۱]، سعید واحدی[۲]

۱- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند

۲- کاردان مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند

چکیده

متفاوت بودن سطوح پلوئیدی چغندرقند از جمله کمیت‌هایی است که نیاز به اندازه‌گیری و تعیین آن در مراحل مختلف بهنژادی این گیاه به کرات احساس شده که با شمارش کروموزم‌های هسته و یا با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر انجام می‌گیرد. در این تحقیق سعی گردید با تعیین تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه و تعیین همبستگی آنها با تعداد کروموزوم‌های هسته ارتباط بین این دو متغیر را پیدا نمود تا بتوان در مواقع لزوم با شمارش کلروپلاست‌ها به عنوان یک روش ساده سطوح پلوئیدی را در صورت امکان تشخیص داد. بدین منظور ۹ رقم چغندرقند در شرایط کنترل شده کشت گردیدند و در حدود ۲ ماه پس از تاریخ کاشت، مریستم انتهایی بوته‌های جوان جهت اطمینان از سطوح پلوئیدی آنها به روش اسکواش مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این بررسی ۳ رقم دیپلوئید همراه با ۳ رقم تریپلوئید و نیز ۳ رقم تتراپلوئید و در حدود ۵۰ بوته از هر رقم مورد آزمون قرار گرفت. پس از تعیین تعداد کروموزوم‌های هر بوته، تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه مشخص گردید. نتایج نشان داد متوسط تعداد کلروپلاست‌های موجود برای یکی از سلول‌های محافظ روزنه ارقام دیپلوئید (۲n=۱۸) برابر ۷/۶۷، در ارقام تریپلوئید (۳n=۲۷) برابر ۹/۷۳ و در ارقام

تتراپلوئید (۴n=۳۶) برابر ۱۱/۸۰ بود. همچنین ۸۵٪ تغییرات تعداد کلروپلاست‌ها با رگرسیون خطی تعداد کروموزوم‌ها تعیین گردید.

مقدمه

چغندرقند از جمله گیاهان زراعی است که دارای سطوح پلوئیدی متفاوتی می‌باشد که تعیین سطوح آن در مراحل مختلف عملیات به‌نژادی همواره لازم می‌باشد. از روش‌های معمول تعیین سطوح پلوئیدی، شمارش تعداد کروموزوم‌های موجود در هسته می‌باشد که بدین منظور در آزمایشگاه سیتولوژی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند از روش اسکواش جهت شمارش تعداد کروموزوم‌ها استفاده می‌شود.

برای اولین بار موکی‌زوکی و سئوکا(۹) در سال ۱۹۵۵ نشان دادند که چغندرقندهای دیپلوئید، تری پلوئید و تتراپلوئید دارای تعداد کلروپلاست‌های متفاوتی در سلول‌های محافظ روزنه می‌باشند. پس از آن بوترفس (۲، ۳ و ۴) با آزمایش بیش از ۹۰۰ گیاه مختلف توانست روش مشخصی را جهت شمارش کلروپلاست‌ها ارائه دهد، در این تحقیق نوع و سن برگ‌هایی که برای شمارش کلروپلاست‌ها بکار گرفته می‌شدند نیز مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی گرچه تعداد متوسط کلروپلاست‌ها در جمعیت دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید متفاوت بود ولی در برخی از حالات در تک تک بوته‌ها نیز تعداد کلروپلاست‌ها متفاوت بود که از این نظر باعث ایجاد اشکال در شناسایی و تعیین سطح پلوئیدی می‌گردید. همچنین این تحقیقات نشان داد که حدود تعداد کلروپلاست‌ها مابین ارقام دیپلوئید و تری پلوئید و نیز مابین ارقام تریپلوئید و تتراپلوئید نزدیک به یکدیگر می‌باشد.

مهمترین هدف تحقیقات بوترفس (۳) در سال ۱۹۶۱، تعیین تنوع تعداد کلروپلاست‌ها در سطوح مختلف پلوئیدی چغندرقند، بوده است. وی نشان داد که برای تعیین حدود تنوع کلروپلاست‌ها در هر یک از سطوح پلوئیدی می‌باید اندازه‌گیریها بر روی هر یک از گلدان‌های مورد مطالعه متمرکز گردد. وی ابراز داشت شمارش کلروپلاست‌ها در ۱۰ عدد سلول محافظ روزنه اجازه خواهد داد تا بتوان سطوح پلوئیدی را در بوته‌های مورد آزمایش تشخیص داد. با این وجود این ارزیابی دارای خطایی معادل

۱/۵ - ۱٪ برای این بوته‌ها می‌باشد و نیز در ۱۸٪ از نمونه‌ها قابل اجرا نمی‌باشد. بر طبق مشاهدات گرف (۷) تعیین سطوح پلوئیدی در تک‌تک بوته‌ها و در جمعیت دیپلوئیدها دارای خطایی معادل ۱/۱۴٪، در تریپلوئیدها معادل ۷٪ و در تتراپلوئیدها ۵/۶٪ می‌باشد. همچنین بر اساس مطالعات دادلی (۶) که بر روی هشت رقم چغندرقند تتراپلوئید استواربود، مشخص گردید که ارقام دیپلوئید از طریق شمارش تعداد کلروپلاست‌ها در سلول‌های محافظ رونه شان به راحتی قابل تفکیک می‌باشند.

از سوی دیگر در آزمایش‌هایی که ساویتسکی (۱۹۶۴) انجام داد مشخص گردید که شمارش تعداد کلروپلاست‌ها در سطوح برگ‌های ارقام چغندرقند تتراپلوئیدی که از دو برابر کردن ارقام دیپلوئید و با استفاده از کلشی‌سین بدست آمده‌اند روش مناسبی جهت تشخیص آنها می‌باشد. براساس آزمایش‌های وی تعداد متوسط کلروپلاست‌ها در بوته‌های دیپلوئید در مجموع دو سلول محافظ روزنه برابر با ۱۳، ۱۴، ۱۵و یا ۱۶ عدد بود. این تعداد در بوته‌های تتراپلوئید بیش از ۲۴ عدد شمارش گردید. در آزمایش فوق در میان ارقام کشت شده تنها ۴۴/۴٪ از بوته‌ها حاوی تعداد کلروپلاست‌هایی با مشخصات مربوط به بوته‌های دیپلوئید و ۴۶/۲٪ از آنها دارای تعداد کلروپلاست‌هایی با مشخصات بوته‌های تتراپلوئید بودند. در این بین در ۹/۳٪ از بوته‌ها تعداد کلروپلاست‌ها بیش از مقدار پیش‌بینی شده مربوط به بوته‌های دیپلوئید بود(۱۱).

همچنین در بین ارقام تتراپلوئید ۷۶/۲٪ از بوته‌ها حاوی کلروپلاست‌هایی با تعداد مربوط به بوته‌های تتراپلوئید بودند و تنها ۱۰/۲٪ از بوته‌های حاوی کلروپلاست‌هایی با تعداد مربوط به ارقام دیپلوئید بودند. همچنین در ۱۳/۶٪ از بوته‌های تتراپلوئید تعداد کلروپلاست‌ها کمتر از مقادیر پیش‌بینی شده مربوط به بوته‌های تتراپلوئید بود. به هر حال بر اساس نتیجه‌گیری ساویتسکی گزینش بوته‌های تتراپلوئید در توده بوته Co میکسوپلوئید[1] بر اساس خصوصیاتی نظیر تعداد کلروپلاست‌ها، تعداد کروموزوم‌ها، اندازه سلول‌های روزنه و نظایر آن غیر قابل اطمینان بوده و به جای آن در این توده از گیاهان جهت اطمینان بالا می‌توان از گامت‌های دیپلوئید حاصل از بوته‌های تتراپلوئید (دانه‌های گرده) استفاده نمود.

1- Mixoploid

از طرفی در برخی از گزارش‌هایی که تا کنون ارائه گردیده است بر مفید بودن روش شمارش کلروپلاست‌ها در گزینش توده‌ای گیاهان چغندرقند اشاره شده است. به عنوان مثال دترس و همکاران در سال ۱۹۸۸ (۵) و در ارزیابی بوته‌های میکسوپلوئید حاصل از ریز ازدیادی گیاهان چغندرقند و بررسی تنوع سوماکلونال از شمارش کلروپلاست‌ها در سلول‌های محافظ روزنه در سطوح زیرین برگهای بوته‌های جوان جهت جهت شناسایی سطوح پلوئیدی استفاده نمودند. در این تحقیق حداقل ۱۵ سلول مورد ارزیابی قرار گرفتند و در آزمایش‌هایی که اخیراً توسط کین و روتینو در سال ۱۹۹۵ (۱۰) بر روی ارتباط بین سطوح پلوئیدی و تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه در گیاه فلفل صورت گرفت مشخص گردید که کارآیی تشخیص سطوح پلوئیدی به وسیله روش فوق به حدی است که به راحتی می‌توان بوته‌های هاپلوئید را تشخیص داد.

تحقیق حاضر با این هدف آغاز گردید تا ضمن روشن ساختن همبستگی آماری بین تعداد کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه و کروموزوم‌های موجود در هسته بتوان در صورت امکان روش مفید، کم هزینه و آسانی را جهت تعیین سطوح پلوئیدی در گیاه چغندرقند معرفی نمود.

مواد و روشها

ارقام چغندرقند مورد استفاده در این طرح به شرح جدول زیر می‌باشند.

جدول ۱- ارقام مورد استفاده که دارای سطوح مختلف پلوئیدی می‌باشند

Table 1. The list progeny lines with diferent ploidy levels

دیپلوئید2n	تری‌پلوئید3n	تتراپلوئید4n
MST-R	C3.3 * MST-R	C3.3
MST-C2	19669 * MST-C2	19669
MST ct*	13593 * MST-C.t	13593

* ct : (مقاوم به بیماری کرلی تاپ)

همانطور که ملاحظه می‌شود در این طرح سه رقم چغندر دیپلوئید و سه رقم تتراپلوئید همراه با تریپلوئیدهای آنها مورد بررسی قرار گرفتند در نتیجه جامعه گیاهی شامل ۹ رقم و بیش از ۴۰ نمونه از هر یک مجموعاً (۴۳۳ بوته) مورد بررسی قرار گرفت. بذور ارقام در شرایط گلخانه کشت شدند و گیاهچه‌های جوان در مرحله دو برگی جهت شمارش کروموزم‌های آنها مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق از مریستم انتهایی برگ هر یک از گیاهچه‌ها طبق روش معمول سیتولوژیکی (روش اسکواش) شامل ۳ ساعت تیمار با محلول اکسی کینولین، تثبیت با محلول ۱:۳، الکل اتیلیک و اسید استیک و سرانجام شستشو با آب مقطر جهت تعیین کروموزم‌ها استفاده گردید. جهت مشاهدات و تعیین تعداد کلروپلاست‌ها در هر یک از بوته‌های ارقام کشت شده، برگ‌های انتهایی و جوان آنها قطع گردید و اپیدرم زیرین آنها جداسازی و به مدت یکساعت در محلول الکل اتیلیک : اسید استیک به نسبت ۱:۳ قرار داده شدند(۵). با این تفاوت که از ماده یدید پتاسیم جهت رنگ آمیزی کلروپلاست‌هااستفاده نگردید(۴). سپس شمارش کلروپلاست‌ها در نمونه‌های تثبیت شده بوسیله میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر انجام گردید. در این بررسی حداقل ۱۰ سلول محافظ روزنه در هر نمونه‌گیری مورد شمارش قرار گرفت. روش آماری جهت تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده، تجزیه رگرسیون در شرایطی بود که X برابر با تعداد کروموزم‌های هسته سلول‌های گیاهی و Y برابر با متوسط تعداد کلروپلاست‌ها برای یکی از سلول‌های محافظ روزنه بود.

نتایج و بحث

همانطور که گفته شد ارقام مورد آزمایش ۹ رقم بود که در سه گروه دیپلوئید،تری پلوئید و تتراپلوئید قرار داشتند. بدلیل مسائلی از جمله از دست دادن نمونه و یا سبز نشدن بذر کشت شده، تعداد نمونه‌های هر یک از ارقام متفاوت بود. از آنجایی که بدلیل حجم زیاد جداول و تکراری بودن اعداد بدست آمده ضرورتی در ارائه تمامی آنها مشاهده نگردید لذا ترجیح داده شد که خلاصه آنها به صورت جدول ۲ ارائه گردد.

جدول ۲- خلاصه نتایج در مورد شمارش تعداد کلروپلاستها و پارامترهای آماری آنها در ارقام مختلف

Table 2- The Summary of results

انحراف معیار	میانگین										تعداد نمونه‌ها	سطح پلوئیدی	رقم
		7	8	9	10	11	12	13	14				
s_n	$\bar{y}$	No of chloroplasts									No sanpler	ploidy	variety
0.54	7.76	24	40	6	-	-	-	-	-		70	2n	MST-R
0.48	7.68	24	47	1	-	-	-	-	-		72	2n	MST-C2
0.49	7.56	-	-	-	-	-	-	-	-		37	2n	MST c.t
0.69	9.85	-	2	17	17	3	-	-	-		39	3n	C3.3 *MST-R
0.65	9.79	-	-	18	28	5	-	-	-		51	3n	19669 * MST-R
0.49	9.95	-	-	13	21	-	-	-	-		34	3n	13593 * MST-c.2
0.82	11.90	-	-	1	2	11	17	3	1		35	4n	C3.3
0.53	11.82	-	-	1	1	24	19	1	-		46	4n	19669
0.49	11.65	-	-	-	-	25	12	-	-		37	4n	13593

در این جدول تعداد نمونه‌ها در واقع تعداد بوته‌های مورد مشاهده هر رقم می‌باشد. هریک از مشاهدات خود حاصل ۱۰ مشاهده تصادفی از سلول‌های محافظ روزنه می‌باشد به عنوان مثال عدد ۷۰ که مربوط به تعداد بوته‌های مورد آزمایش رقم MST-R می‌باشد شامل ۷۰۰ مشاهده می‌باشد. همچنین در این تحقیق تعداد کلروپلاست‌های نمونه‌ها در هشت گروه شامل اعداد ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ قرار داشتند که در این جدول جهت سهولت، تعداد مشاهداتی که در یکی از این گروه‌ها قرار داده شده‌اند ذکر شده است.

بررسی داده‌های بدست آمده نشان داد متوسط تعداد کلروپلاست‌های موجود سلول‌های محافظ روزنه در ارقام دیپلوئید (۲n=۱۸) برابر با ۷/۶۷، در ارقام تریپلوئید (۳n=۲۷) برابر با ۹/۷۳ و در ارقام تتراپلوئید (۴n=۳۶) برابر با ۱۱/۸ می‌باشد. تجزیه رگرسیون در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

جدول شماره ۳- تجزیه رگرسیون بین دو متغیر

Table 3- Regression analysis between two parameters

S.O.V	df	SS	MS	F
رگرسیون reg	1	$b^2\Sigma(Xi - \bar{X})^2 = 1060.15$	1060.15	5.26
باقیمانده (اشتباه)e	n-2 = 431	$[\Sigma_i(yi - \bar{y})^2 - b\Sigma_1 (xi - \bar{x})^2]$	201.61	
		$= \Sigma(yi - \hat{y}i)^2 = 201.61$		
کل	n-1 = 432	$\Sigma_i(yi - \bar{y})^2 = 1261.76$		

با توجه به معنی‌دار بودن رگرسیون و وجود همبستگی معنی‌دار بین دو متغیر (R=۰/۹۲) معادله آنها به صورت زیر تخمین گردید.

$$t = \frac{r}{\sqrt{v(r)}} = \frac{r}{\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}} = \frac{۰/۹۲}{\sqrt{\frac{1-(۰/۹۲)^2}{۴۳۳-۲}}} = ۴۸/۷۳^{**}$$

$$Y = ۴/۵۸ + ۰/۱۸۹\ X$$

بنابراین رگرسیون معنی‌دار بوده و نشان می‌دهد که تغییرات مربوط بـه اثـرات سطوح مختلف پلوئیدی دارای رابطه معنی‌داری با تعداد کلروپلاست‌ها می‌باشد.

از بررسی داده‌ها ضریب همبستگی r=۰/۹۲، ضریب تشخیص (r^2) برابر ۰/۸۵ و درصد باقیمانده ($1-r^2$) برابر ۰/۱۵ برآورد گردید. بنابراین می‌توان گفت که حدود ۸۵٪ تغییرات yکه با مجموع مربعات انحرافات y نشان داده شده با رگرسیون خطی بین x و y تبیین می‌شود و ۱۵٪ از تغییرات فوق مربوط به رگرسیون خطی دو متغیر نمی‌باشد.

علی رغم بدست آمدن معادله رگرسیونی مشخص در مورد دو متغیر باید دقت نمود که استفاده از چنین معادله‌ای محدود به دامنه تغییرات مشخص از عامل x یـعنی تعداد کروموزوم‌های هسته می‌گردد. به عبارت دیگر با وجود آنکه در چغندرقند احتمال وجود تعداد کروموزوم‌هایی بین دو سطح پلوئیدی نیز موجود است ولی بوسیله چنین معادله‌ای و نیز اطلاعات حاصل از این تحقیق نمی‌توان از آنها جهت تشخیص این گونه سطوح پلوئیدی استفاده نمود. از طرفی همانطور که اشاره شد در حدود ۸۵٪ تـغییرات عامل yبا رگرسیون خطی بین این متغیر و متغیر x بیان شده و ۱۵٪ از تغییرات مربوط به

رگرسیون خطی دو متغیر نمی‌باشد و ممکن است بوسیله عوامل نامشخصی تحت تأثیر قرار گیرد. در گزارش تحقیقات بوترفس (۳) خاطر نشان شده است که با وجود آنکه می‌توان از طریق شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه اقدام به تعیین سطوح پلوئیدی نمود ولی در ۱۸٪ از نمونه‌ها چنین مشاهداتی قابل قبول نخواهد بود که این مقدار در مشاهدات مربوط به ساویتسکی (۱۱) برابر ۱۳/۶٪ می‌باشد.

با وجود این تحقیقات و نتایج برخی از محققین (۱) نشان داده است که شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه برای تعیین سطوح پلوئیدی گیاهان کشت شده در شرایط کشت درون شیشه[1] مناسب می‌باشد. در هر حال بالا بودن مقدار ضریب همبستگی و معنی‌دار شدن آن در سطح ۱٪ حاکی از همبستگی قوی و مثبت بین دو متغیر تعداد کروموزوم‌ها و تعداد کلروپلاستهای سلول‌های محافظ روزنه می‌باشد. ولی همانطور که ذکر شد علی رغم قوی بودن چنین همبستگی بدلیل نزدیک بودن حدود دامنه‌های تعداد کلروپلاست‌ها در سطوح مختلف پلوئیدی، در تخمین تعداد دقیق کروموزوم‌هایی که بین دو سطح پلوئیدی قرار داشته و در برخی موارد تعیین و تشخیص دقیق آنها جزء مهمی از مراحل تحقیقات به‌نژادی چغندرقند می‌باشد (نظیر بررسی ژنتیکی مونوسومی در تعیین نقشه‌های ژنتیکی و انتقال صفات مطلوب زراعی از گونه‌های وحشی به چغندرقند) (۸) از چنین عاملی نمی‌توان استفاده نمود. به هر حال به نظر می‌رسد که بالا بودن دقت روش شمارش کروموزومی به عنوان یک روش مطمئن مطرح بوده و در کنار آن شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه بتواند در برخی شرایط مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با ارائه تسهیلات مؤسسه تحقیقات تهیه و اصلاح بذر چغندرقند انجام گرفت که بدین وسیله از ریاست محترم مؤسسه تشکر و قدردانی بعمل می‌آید. همچنین از جناب آقای دکتر محمود مصباح بدلیل نقد و بررسی و پیشنهادات ارزنده‌شان در نگارش این مقاله سپاسگزاری می‌گردد. از کارکنان آزمایشگاه سیتولوژی به خاطر

1- In vitro

زحمات آنها در شمارش کروموزومی و همچنین از آقای منوچهر کوهستانی و خانم نورانی به خاطر تایپ این مقاله قدردانی بعمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

1- Bajaj, Y.P.S. 1989. Biotechnology in Agriculture and Forestry 12, Haploids in Crop Improvement I. 354.

2- Butterfass, Th. 1958. Die praktische ermittlung des ploidiegrads von zukerrueben durch zahlen der schliesszellen chloroplasten. zuchter. 28(7): 309- 314

3- Butterfass, Th. 1961. Die chloroplasten zahl als Merkmal. Berichte der Deutsche Botanische Gesellschaft 74(6): 217- 218.

4- Butterfass, Th. 1961. Das verhalten der chloroplastenzellen in den schliesszellen paaren von zuckerrueben verschiener ploidiestufen vom keimling bis zur bluhenden pflanze. zuchter. 31(2): 62- 71.

5- Detrez C., Sangwan r.s. and sangwan - Norrel B. S., 1988. Phenotypic and Karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiol culture. TAG.77: 462-468.

6- Dudly, J.W. 1958. Number of chloroplasts in the guard cells of inbred lines of tetraploid and diploid sugar beets. Agr. J. 50:169-170.

7- Graf, A. 1959. Bestimmung des ploidiegrades in zuckerrueben gebrauchssaatgut. Zucker. 12: 344-349.

8-Mesbah M., De Bock T. S. M., Sandbrink J. M., Klein - Lankhorst R. M. and Lange W. 1996. Selection of monosomic addition plants in offspring families using repetitive DNA probs in *Beta l.* Theor. Appl. Genet. 92 : 891 - 897.

9- Mochizuki, H. and Sueka N. 1955. Genetic studies on the number of plastid in stomata. 1. Effects of autopolyploid in sugar beets. Cytologia (Tokyo). 20:358-366.

10- Qin X. and Rotino G.L., 1995. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro - grown androgenic pepper plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 41: 145- 149.

11- Savitsky H. 1964. Effectiveness of selection for tetraploid plants in C generation on the basis of the number of chloroplasts in stomata. Am. Soc. Sugar Beet Technol.