استفاده از روش سی بندینگ جهت بررسی کروموزومهای چغندرقند

Study on sugar beet chromosomes by C-Banding technique

محسن آقایی زاده[۱]، پریچهر احمدیان[۲]، علیرضا طالعی[۲]، بهمن یزدی صمدی[۲]، ایرج علیمرادی[۱] و یوسف آقایف[۳]

۱- موسسه تحقیقات چغندرقند ۲- دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران ۳- دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

کوچکی کروموزومهای چغندرقند و شباهت آنها به یکدیگر از نظر اندازه و شکل امر مطالعه آنها را دشوار ساخته است. کروموزومهای چغندرقند اغلب متاسنتریک هستند و یک یا دو کروموزوم ساب متاسنتریک در ژنوم آن وجود دارد، بدین جهت تعیین جفتهای کروموزومی و همچنین وضعیت کروموزومها در کاریوتیپ بسیار مشکل است.

روش سی - بندینگ[۱] برای اولین بار در ایران جهت بررسی بیشتر کروموزومهای چغندرقند مورد استفاده قرار گرفت تا در صورت امکان اطلاعات کاملتری جمع‌آوری گردد.

به علت کوچکی کروموزومها باندهای هتروکروماتین مشخصی در طول بازوهای کروموزومی به دست نیامد و تشکیل باندها صرفاً محدود به نواحی سانترومتری بود. در اغلب موارد اختلاف بین کروموزومها از نظر محل باند، عرض آن و همچنین طول کروموزومها بسیار ناچیز بود، به همین دلیل امکان تهیه کاریوتیپ براساس کروموزوم‌های مورد نظر وجود نداشت.

مقدمه

روشهای نواربندی به منظور بررسی دقیقتر کروموزومهای متافازی از سال ۱۹۷۰ توسعه پیدا کرده‌اند(۱). یکی از این روشها استفاده از روش سی- بندینگ است که در آن کروموزومها توسط ماده‌ای به نام گیمسا رنگ آمیزی می‌شوند. اساس کار بر پایه رنگ آمیزی بخش هتروکروماتین ساختاری در کروموزومها استوار است که اغلب در نواحی سانترومری و بلومری وجود دارد(۴). با استفاده از این روش نواحی مذکور به رنگ تیره در می‌آیند در حالی که نواحی یوکروماتین هیچگونه رنگی نمی‌گیرند، بدین ترتیب کروموزوم به صورت نوار بندی تیره و روشن تظاهر می‌کند که در کروموزومهای همتا[۲] محل این نوارها یکسان است.

در گونه‌هائی که دارای کروموزومهای کوچکی هستند، تعداد باندها کم و اغلب ضعیف است و در بیشتر موارد باندها در نواحی سانترومری تشکیل می‌شود و چون تفاوت بین کروموزومها از نظر اندازه بسیار ناچیز است، تشخیص کروموزومهای همتا دشوار می‌باشد.

1- C - Banding

2- Homologous

مواد و روشها

تقریباً اغلب محققینی که از روش سی- بندیگ جهت مطالعه کروموزومی استفاده کرده‌اند بسته به گونه مورد مطالعه تغییراتی در نحوه استفاده از مواد مورد نیاز (از نظر حجم و مدت زمان به کارگیری مواد) داده‌اند. در این تحقیق روشی را که دیانگ و دباک (۱۹۷۷) استفاده کرده بودند، مدنظر قرار گرفت. در این خصوص بررسی‌های بی‌شماری به منظور مشخص کردن مناسب‌ترین ترکیب، صورت گرفت که در نهایت روش استفاده از کلشیسین به عنوان پیش تیمار به مدت شش ساعت، شستشوی ریشه چه‌ها با آب مقطر و انتقال آنها به اسید استیک ۴۵٪ به مدت نیم ساعت، انتقال ریشه‌چه‌ها به محلول اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اطاق و سپس ۲-۱ دقیقه در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد، انتقال مجدد ریشه‌چه‌ها به اسید استیک ۴۵٪ به مدت نیم ساعت و پس از آن تهیه نمونه‌ها انجام پذیرفت.

قبل از استفاده از هریک از این روشها، بذرها به مدت ۷ ساعت در آب ۳۰ درجه سانتی‌گراد خیسانده شده، پس از کشت بر روی کاغذ صافی به ژرمیناتور منتقل گردیدند. با مشاهده اولین علائم جوانه‌زنی، آنها را به یخچال انتقال داده برای ۳ تا ۴ روز در این وضعیت باقی ماندند. بعد از گذشت زمان مورد نظر مجدداً بذرها به ژرمیناتور منتقل و زمانی که طول ریشه‌چه‌ها به حدود ۱/۵ سانتی‌متر رسید از آنها برای تهیه اسلاید استفاده گردید.

اسلایدها در زیر میکروسکوپ کنترل شده و نمونه‌هائی که در آن کروموزومها دارای توزیع مناسبی بودند به ازت مایع منتقل شدند. پس از گذشت ۳ دقیقه لامل از لام جدا گشته و اسلاید به الکل اتیلیک انتقال یافته و سرانجام توسط جریان هوا خشک گردید. آخرین مرحله عبارت بود از رنگ‌آمیزی اسلایدها که به شرح ذیل انجام گرفت.

ابتدا اسلایدها در محلول هیدروکسید باریم به مدت ۶ دقیقه نگه‌داری شدند، پس از آن اسلاید شسته شده و به محلول اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال انتقال یافتند سپس شستشوی مجدد و انتقال به محلول SSC و نگه‌داری در آن به مدت یک ساعت در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در انتها رنگ‌آمیزی توسط گیمسای محلول در بافر با غلظت ۴ در هزار به مدت یک تا چهار ساعت صورت گرفت.

پس از بررسی اسلایدها در زیر میکروسکوپ از سلولهای مناسب توسط میکروسکوپ نوری زایس عکس گرفته شد، مراحل ظهور و چاپ در موسسه تحقیقات چغندرقند انجام گرفت.

نتایج و بحث

مطالعات انجام شده بیانگر این مطلب است که کروموزومهای سلولهای سماتیک چغندرقند از نظر تولید باند بسیار ضعیف عمل می‌کنند. در مرحله متافاز تنها باندهای مشخص

در ناحیه سانترومری کروموزومها به دست آمد، (۱و ۲)، بندرت باند اضافی در سایر نواحی کروموزومی مشاهده شد (شکل یک). در بعضی از کروموزمها که کوچکتر بودند تمامی بازوی کوچک به صورت یک باند ظاهر شد. در بعضی از سلولها یک یا دو جفت کروموزوم بدون هیچگونه باند و یا با باند بسیار ضعیف و باریک در سانترومتر دیده شدند.

شکل ۱- کروموزومهای متافازی حاصل از روش سی - بندینگ محل باند بافلش مشخص شده است

شکل ۲- کروموزومهای پرومتافازی حاصل از روش سی - بندینگ محل باند با فلش مشخص شده است

در کروموزومهای پرومتافازی که دارای طول بلندتری هستند، باندهای ضعیف اضافی در طول بعضی از کروموزومها مشاهده گردید ولی به علت متغیر بودن محل باندها و تعداد آنها، عدم وضوح کامل و در نتیجه عدم تشخیص کروموزومهای همتا تهیه آیدوگرام میسر نشد (شکل ۲).

در نهایت مطالعه کروموزمها در مراحل پرومتافاز و متافاز توسط روش سی - بندینگ

اطلاعات بیشتری جهت تعیین و شناسائی کروموزومها به دست نداد و به علت محدود بودن باندها به نواحی سانترومری در کروموزومهای متافازی و شباهتشان از نظر اندازه و همچنین عدم وضوح باندهای اضافی در کروموزومهای پرومتافازی بررسی جداگانه کروموزومها میسر نشد.

فهرست منابع

1- De Jong, J.H & De Bock, T.S.M. 1977. Use of haploid *Beta vulgaris L.* for the study of Orcein and Gimsa stained chromosomes. - Euphytica 27: 41- 47

2- Loptien, H. 1985. Breeding nematode - resistant beets. (3). C- Banding patterns on mitoic chromosomes in *Beta vulgaris L.* and wild species of the section patellares. - Plant Breeding 94: 41- 49

3- Laursen, L. 1975. Gimsa C- Banding of the chromosomes of "Emir" barley.- Hereditas 81: 285- 289

4- Schaffer, J,S. 1985. Cytogenetics - Plants, Animals, Humans. Springerverlag Inc New York Heidlberg, Berlin. pp 43- 47