# روشهای معمول جهت تشخیص سطوح مختلف پلوئیدی در گیاهـــان

از : علی محمد خانـــی

باتوجه به اهمیت تعداد پایه های کروموزومی ( n ) در بروز خصوصیات کیفی و کمی گیاهان متدهای مختلفی برای تشخیص تعداد کروموزمهای آنها ابتدا بررسی و سپس مورد کار برد قرار گرفته است که این متدها را بطور کلی میتوان بدو دسته زیر تقسیم نمود .

الف : روش مستقیم ب : روش های غیر مستقیم

الف : روش مستقیم = کنترل کروموزمی ( شمارش کروموزومها ) :

این متد برای مشخص نمودن تعداد کروموزمهای گیاهانی که پایه های کروموزومی مختلف دارند و همچنین جهت مشخص کردن گیاهان با تعداد کروموزومهای ناقص ( آنوپلوئیـــد ) از گیاهانی با تعداد کروموزمهای کامل ( آیوپلوئیـد ) بسیار مفید بوده و ایـــن روش در حال حاضر در برخی از موٴسسات تحقیقاتی دنیا از جمله موٴسسه اصـــلاح و تهیه بذرچغندرقند گرج مورد استفاده میباشد در زیر برای آشنایی بیشتر نحوه کـــار این روش بطور مختصر میآید ابتدا قسمتی از مریستم انتهایی جوانه چغندرقند را بطول یک سانتی متر جدا کرده و جهت منقبـض نمودن کروموزمها بمدت ۳ ساعت در داخـل محلول هیدروکسی کیتولین ( $C_9H_2NO$ ) قرار میدهند و پس از سه بار شستشو در داخل محلول ( $C_2H_5OH + CI\ H$ ) با نسبـت یکی اسید و دوتا الکل بمدت ۱۰ دقیقه قرار میدهند پس از اینکه رنگ نمونه بـــزرد ی گرایید آنرا با آب مقطر شسته و بوسیله کاغذ خشک کن نم آنرا میگیرند سپس نمونه را روی لام قرار داده و قسمت پائین جوانه را نگهداشته و بقیه را حذف میکنند و قطره ای اورسئین ۲ درصد روی آن میریزند و بالامل آنرا می پوشانند دراین موقع نمونـــــه جهت مطالعه میکروسکوپی آماده است ضمنا " این روش با استفاده از قسمت انتهایـــی ریشه بذور تازه جوانه زده بیشتر کار برد داشته ولی باید مدت توقف نمونه در محلـول

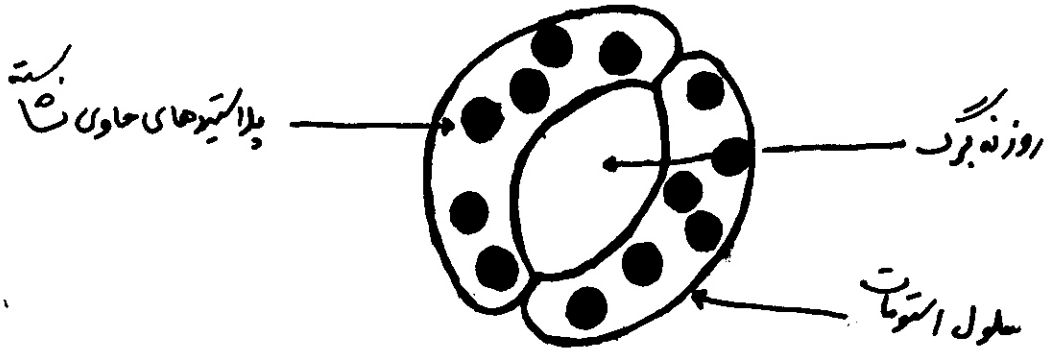
فوق به ۲۵ ــ ۲۰ دقیقه افزایش یابد .

ب = روش های غیر مستقیم :

با توجه به نیاز روش مستقیم به مهارت و تخصص خاص خود و صرف وقت زیاد جهت توده های بزرگ روشهای غیر مستقیم که‌براساس تفاوت صفات سلولی استوار هستند میتوانند مورد استفاده قرار گیرند زیرا کار برد این روش بسیار ساده‌میباشد درضمن انتخاب یک روش غیرمستقیم بسته بگونه های مختلف گیاهان متفات میباشد در زیر ۴ نمونه از معمول ترین این روشها شرح داده میشود .

۱ــ شمارش پلاستیـد ها

یکی از ساده ترین راههای تعیین پلوئیدی درچغندر قند شمارش‌تعداد پلاستیدها درسلولهای اسیتومات میباشد . برای این منظور با سرسوزن سر نیزه‌ای بشره زیرین برگ چغندرقند را جدا کرده و یا محلول پتاسیم یده ( ۲ گرم KI + ۳۰۰ cc آب مقطر ) آغشته میکنند بااین عمل پلاستید های سلولهای محافظ روزنه های برگ چون حاوی نشاسته میباشند برنگ آبی تیره در میآیند بلافاصله بشره مورد نظر را روی لام قرار داده و بالامل آنرا میپوشانند سپس زیر میکروسکوپ مطالعه میکنند . پلاستیدها با ساختمان کروی و اندازه های نسبتا" درشت خود در زیر میکروسکوپ به سادگی قابل شمارش ( شکل شماره ۱ ) هستند .




شکل شماره ۱ = سلولهای محافظ روزنه برگ چغندرقند درزیرمیکروسکوپ (استوماتها)

شمارش پلاستیدها برروی سلولهای روزنه برگ در چغندر های با سطوح مختلف پلوئیدی( دیپلوئید تریپلوئید و تتراپلوئید ) . بطور عملی توسط ۲۵ کارشناس ( نگارنده و ۲۴ کارشناس دیگر ) بررسی شده که نتایج آن در جدول شماره یک و منحنی مربوط ( دیاگرام الف ) آمده است .

روش مطالعه بدین صورت است که ابتدا هریک از افراد سه برگ چغندرقند با سطوح مختلف پلوئیدی ( یک برگ دیپلوئید ، یک برگ تری پلوئید و یک برگ تتراپلوئید ) تهیه کرده و برروی هریک ازبرگها تعداد پلاستید های مربوط به سلولهای پنج روزنه را بطور مجزا شمارش و یادداشت کردند که حداقل و حداکثر تعداد پلاستیدهای مربوط به ۵ شمارش از هر برگ تحت عنوان range و میانگین مربوط نیز تحت عنوان( mean ) برای هرفرد در جدول آمده است

بطور کلی از بررسی های فوق نتیجه میگیریم که یک گیاه تتراپلوئید دارای تعداد بیشتری پلاستید در سلولهای استوماتهای خود نسبت به دیپلوئید های آن گیاه میباشد وتعداد آن در چغندر قند تتراپلوئید تقریبا " دو برابر دیپلوئید و درچغندر قند تری پلوئید تقریبا " ۱/۵ برابر دیپلوئید ها میباشد با توجه به موضوع فوق بنظر میرسد که تعداد ژنوم های یک گیاه با تعداد پلاستیدهای موجود در سلولهای روزنه های برگ آن همبستگی مثبت دارد .

جدول شماره ۱ : نتایج اندازه گیریهای آزمایشگاهی

| شماره آزمایش (نفر) | دیپلوئید mean | دیپلوئید range | تری پلوئید mean | تری پلوئید range | تتراپلوئید mean | تتراپلوئید range |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۱۲/۸ | ۱۱–۱۴ | ۱۷/۴ | ۱۴–۲۰ | ۲۰/۰ | ۱۹–۲۳ |
| ۲ | ۱۲/۸ | ۱۰–۱۵ | ۱۵–۰ | ۱۴–۱۶ | ۲۵/۲ | ۲۲–۲۷ |
| ۳ | ۱۲/۰ | ۱۱–۱۳ | ۱۷/۴ | ۱۳–۱۵ | ۲۳/۰ | ۲۱–۲۵ |
| ۴ | ۱۴–۰ | ۱۳–۱۵ | ۱۶/۸ | ۱۸–۲۳ | ۲۳/۰ | ۲۰–۲۹ |
| ۵ | ۱۳/۶ | ۱۲–۱۵ | ۱۴/۲ | ۱۲–۱۵ | ۲۱/۰ | ۱۶–۲۴ |
| ۶ | ۱۳/۰ | ۱۲–۱۵ | ۱۴/۸ | ۱۳–۱۶ | ۲۱/۴ | ۲۰–۲۳ |
| ۷ | ۱۴/۲ | ۱۳–۱۶ | ۱۶/۴ | ۱۶–۱۷ | ۲۰/۸ | ۱۸–۲۳ |
| ۸ | ۱۴/۰ | ۱۳–۱۶ | ۱۸/۶ | ۱۸–۱۹ | ۲۵/۰ | ۲۴–۲۶ |
| ۹ | ۱۳/۸ | ۱۳–۱۵ | ۱۷/۲ | ۲۰–۲۲ | ۲۵/۸ | ۲۴ –۲۷ |
| ۱۰ | ۱۴/۴ | ۱۳/۱۶ | ۲۱/۰ | ۲۰–۲۳ | ۲۵/۸ | ۲۴–۲۸ |
| ۱۱ | ۱۱/۸ | ۱۰–۱۳ | ۱۴/۴ | ۱۱–۱۸ | ۱۵/۸ | ۱۵–۱۷ |
| ۱۲ | ۱۳/۸ | ۱۲–۱۶ | ۱۷/۰ | ۱۶–۱۸ | ۲۲/۸ | ۲۰–۲۵ |
| ۱۳ | ۱۲/۸ | ۱۰–۱۶ | ۱۶/۸ | ۱۴–۲۰ | ۲۲/۰ | ۲۰–۲۴ |
| ۱۴ | ۱۴/۰ | ۱۲–۱۶ | ۱۹/۲ | ۱۸–۲۰ | ۲۴/۲ | ۲۰–۲۶ |
| ۱۵ | ۱۴/۸ | ۱۴–۱۶ | ۱۸/۴ | ۱۷–۲۰ | ۲۱/۶ | ۲۰–۲۳ |
| ۱۶ | ۱۴/۸ | ۱۳–۱۶ | ۱۹/۲ | ۱۸–۲۱ | ۲۴/۲ | ۲۲–۲۶ |
| ۱۷ | ۱۵/۸ | ۱۴–۱۹ | ۱۶/۲ | ۱۵–۱۸ | ۲۴/۰ | ۲۲–۲۶ |
| ۱۸ | ۱۵/۰ | ۱۳–۱۷ | ۱۶/۸ | ۱۵–۱۸ | ۲۲/۰ | ۲۱–۲۳ |
| ۱۹ | ۱۱/۲ | ۱۰–۱۳ | ۱۶/۶ | ۱۵–۱۹ | ۱۹/۲ | ۱۷–۲۲ |
| ۲۰ | ۱۳/۰ | ۱۰–۱۹ | ۱۹/۴ | ۱۸–۲۱ | ۲۲/۴ | ۲۱–۲۴ |
| ۲۱ | ۱۱/۸ | ۱۱–۱۲ | ۱۷/۸ | ۱۷–۱۸ | ۲۳/۸ | ۲۳–۲۴ |
| ۲۲ | ۱۳/۰ | ۱۲–۱۴ | ۱۴/۸ | ۱۴–۱۶ | ۲۴/۴ | ۲۳–۲۶ |
| ۲۳ | ۱۵/۶ | ۱۲–۱۷ | ۲۱/۴ | ۱۷–۲۵ | ۲۶/۶ | ۲۱–۳۱ |
| ۲۴ | ۱۲/۸ | ۱۲–۱۴ | ۱۹/۸ | ۱۸–۲۲ | ۲۲/۰ | ۲۰–۲۴ |
| ۲۵ | ۱۳/۴ | ۱۲–۱۶ | ۱۴/۰ | ۱۱–۱۷ | ۲۳/۰ | ۲۱–۲۵ |
| میانگین کل آزمایش | ۱۳/۵ | ۱۰–۱۹ | ۱۷/۲ | ۱۱–۲۵ | ۲۲/۸ | ۱۵–۳۱ |

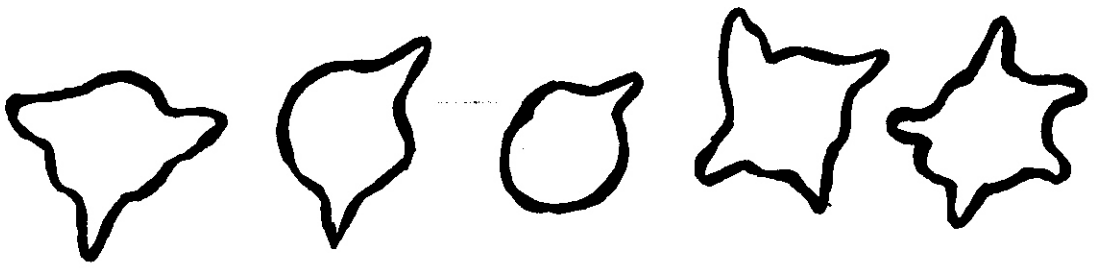
۲ـ تعیین پلوئیدی از طریق اندازه گیری قطر دانه های گرده :

یک سنجش ساده دیگر جهت مشخص کردن پلوئیدی درگیاهان اندازه گیری قطر دانه های گرده میباشد

برای اینکار ابتدا پولن های گل های باز شده چغندرقند را در داخل محلول فوشین قرار داده و سپس روی لام قرار میدهند و در زیر میکروسکوپ مجهز به میکرومتر قطر آنها رااندازه میگیرند درحقیقت اندازه قطر دانه های گرده تتراپلوئید بزرگتر از دیپلوئیدهای همان گونه گیاه میباشند ( قطر دانه های گرده چغندرقند دیپلوئید حدودا " ۱۸ و در تتراپلوئیدحدودا " ۲۷ میکرون میباشد ) .

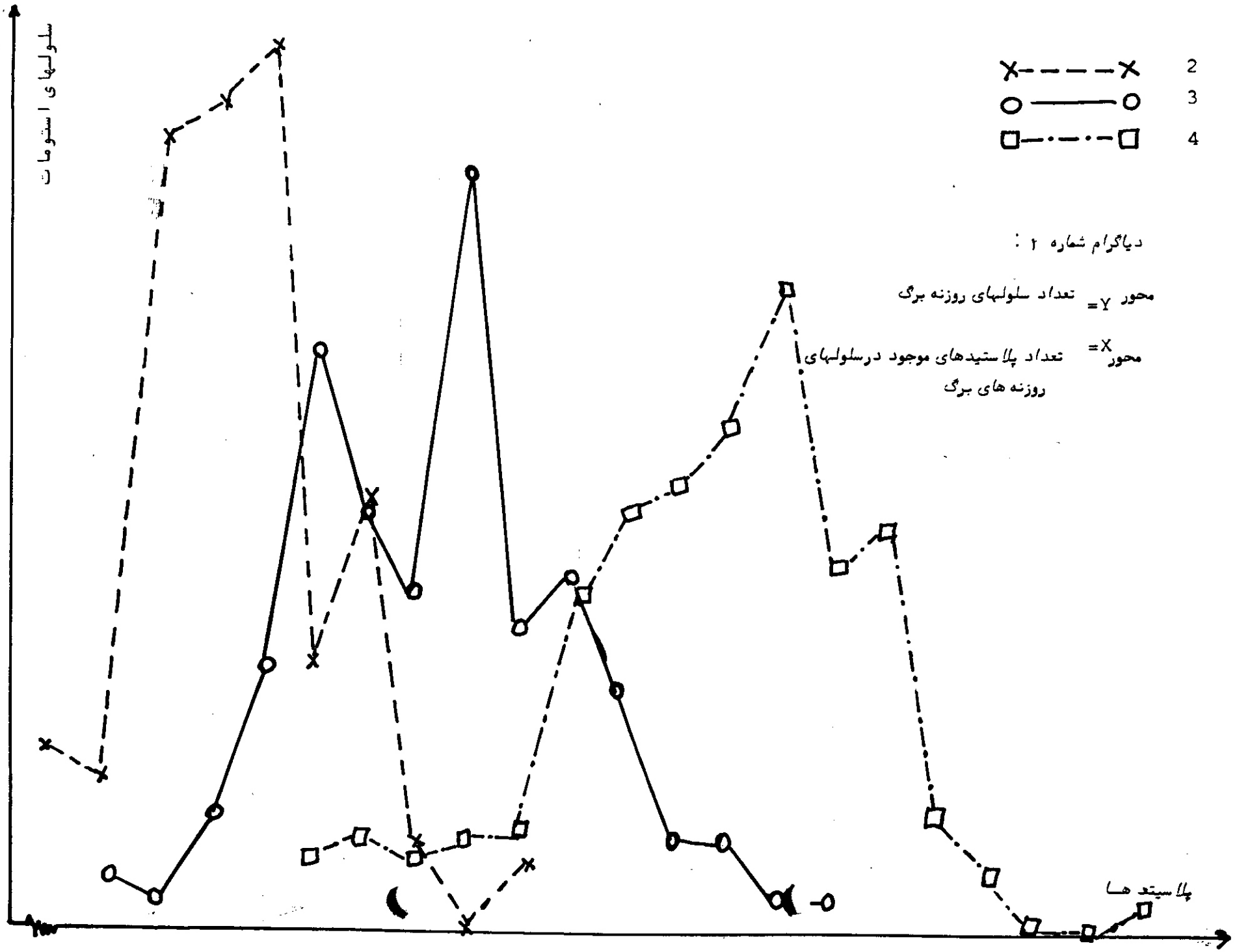
۳ـ مطالعه پلوئیدی بوسیله شمارش تعداد زائـدهای رویشی دانه گرده دولپه‌ای ها :

روش کار چنین است که گل رسیده یک گیاه دیپلوئید و یک گیاه تتراپلوئید از یک گونه مثلا " تیره سیب زمینی را گرفته و روی لام های جداگانه تکان میدهند سپس با سوزن سرنیزه‌ای با فشار دادن به بساکهای روی لام با پاره شدن بساکها دانه های گرده آزاد میگردد بعد از این عمل یک قطره محلول که حاوی یک قسمت اسید سولفوریک ۹۵ درصد و سه قسمت اسید استیک ۲ درصد است روی آن ریخته و بالامل می پوشانند و زیر میکروسکوپ مطالعه میکنند دراین حالت پولن های هاپلوئید ( مربوط به گیاهان دیپلوئید ) بصورت از ۲ و حداکثر ۳ زایده‌ای و حال آنکه پولن های دیپلوئید ( مربوط به گیاهان تتراپلوئید ) بصورت ۴ و حداکثر ۵ زایده‌ای دیده میشوند مانند شکل های زیر .



پولنهای مربوط به گیاهان تتراپلوئید — پولنهای مربوط به گیاهان دیپلوئید

دولپه‌ای ها درزیر میکروسکوپ — دولپه ای ها درزیر میکروسکوپ




دیاگرام شماره ۲ :

محور Y= تعداد سلولهای روزنه برگ

محور X= تعداد پلاستیدهای موجود درسلولهای روزنه های برگ

۴ـ تعیین پلوئید ی بوسیله اندازه گیری طول استوماتها ( سلولهای اطراف روزنه های برگ )

روش کار چنین است که ابتدا حدود یک سانتی متر مربع از بشره زیرین برگ گیاهی مثل چاودار را بامحلول Nail Varnish میپوشانند پس از چند دقیقه بشره مورد نظر بصورت پوسته نازک خشک شده ای درمی آید که بوسیله سوزن سرنیزه‌ای بآسانی از سطح برگ جدا میشود سپس آنرا روی لام قرار داده و قطره آبی نیز روی آن می ریزند و بالامل آنرا می پوشانند و در زیر میکروسکوپ که دارای میکرو متر باشد قرار میدهند بطور کلی مشاهده میگردد که طول استوماتهای گیاه تتراپلوئید دقیقا " دوبرابر طول استوماتها ی گیاه دیپلوئید آن میباشد ( طول استوماتها در گیاه تتراپلوئید چاودار ۲۰ میکرون و در دیپلوئید همان گیاه ۱۰ میکرون میباشد ) .

شکل استوماتها درچاودار دیپلوئید
( طول ۱۰ میکرون در زیر میکروسکوپ )

شکل استوماتها درچاودارتتراپلوئید
( طول ۲۰ میکرون درزیر میکروسکوپ )

بطور کلی متدهای غیرمستقیم در مورد گیاهانی که دارای تعداد کروموزومهای زیادتری هستند روش قابل اعتمادی میباشند . از معایب روشهای غیر مستقیم اینست که کار برد آنها فقط در مورد گیاهانی که حداقل در یک یا دو ژنوم اختلاف دارند روشهای موفقی خواهند بود . گیاهانی که تنها در تعدا کمی کروموزوم اختلاف دارند ( آئوپلوئیدها ) در ضمن در متد های غیر مستقیم معمولا " تفاوت بین دیپلوئید ها و تتراپلوئید ها بهتر از تفاوت تری پلوئید ها با تتراپلوئید ها و دیپلوئید ها مشخص میگردد .

منابع مورد استفاده :


۱- علی محمد خانی قسمتی از نتایج بررسیهای انجام شده در آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشکده کشاورزی واگینگن هلند

2- Dr.Ir.W.Lange, Cytogenetics As a Tool In Plant Breeding , 1981

3- Ing.G.J.Speckman And Dr.Ir.Lange, Practical Exercises In Cytogenetics,1985