



۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

بررسی کاربوتیبی جمعیتی از گونه *vicia dasycarpa* با استفاده از سیستم آنالیز تصویر

الناز سعیدعصر^۱، ورهرام رشیدی^۲ و احمد رزبان حقیقی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات □ دانشگاه آزاد اسلامی □ تبریز □ ایران.

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

۳- مربی پژوهشی □ موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

مسئول مکاتبه: الناز سعید عصر ۰۹۱۴۱۰۲۷۳۲۷

e.saeidasr@yahoo.com

چکیده

منابع ژنتیکی یکی از پرارزشترین و حیاتیترین منابع طبیعی می باشند و از جمله عوامل موثر در انتخاب روشهای اصلاحی ساختار سیتوژنتیکی است بنابراین در این پژوهش یک جمعیت از گونه *dasycarpa* متعلق به جنس *vicia* از تیره *papilionaceae* مورد بررسی کاربوتیبی به روش اسکواش قرار گرفت به این منظور از پیش تیمارکشی سین ۰/۰۵ درصد، فیکساسیون فارمر و محلول هیدرولیز اسید کلریک ۱ نرمال و رنگ استوارسین ۲ درصد جهت مطالعه مرحله متافاز میتوز استفاده شد. نتایج، عدد کروموزومی پایه $X=7$ و سطح پلوئیدی دیپلوئید $2n=2x=14$ و فرمول کاربوتیبی $7Sm$ را نشان داد. همچنین وجود یک جفت کروموزوم ساتالایت دار شناسایی شد و تقارن کاربوتیبی با روش جدول دو طرفه استینز و $\%TF$ نامتقارن بودن کاربوتیبی را تایید کرد.

واژه های کلیدی: سیتوژنتیک- ماشک کردار- تقارن کاربوتیبی- عدد کروموزومی- متافاز میتوز



مقدمه

جنس *Vicia* با نام انگلیسی *Vetch* با بیش از ۱۶۰ گونه متعلق به خانواده بقولات و از تیره *Papiliniaceae* می باشد (مظفریان، ۱۳۸۶). این جنس تقریباً به ۲ زیر جنس شامل *Vicia* و *Vicilla* تقسیم می شود (پاکروان و همکاران، ۱۳۷۹). ماشک کرکدار با نام علمی *Vicia dasycarpa* از جمله گیاهان علوفه ای - مرتعی تیره بقولات سردسیری است و مانند یک گیاه یکساله دو ساله و چند ساله رفتار می کند. این گیاه بومی اروپا و آسیا بوده و در محدوده ای از نواحی جغرافیایی با عرض شمالی تا جنگلهای مرطوب رشد می کند. گیاهی روز بلند بوده و می توان آنرا در هر نوع خاک با زهکشی مناسب و حتی در خاکهای فقیر کشت کرد. این گیاه جهت تعلیف دامها، پوشش دهنده مراتع، کود سبز و ... مورد استفاده قرار می گیرد (میر فخرایی و همکاران، ۱۳۸۹).

از مساحت ۱۶۴ میلیون هکتاری کشور پهناور ایران تنها ۹۰ میلیون هکتار به مراتع اختصاص داده شده است که از کل مراتع نیز سهم مراتع فقیر حدود ۴۳/۳٪ و مراتع متوسط ۳۷/۳٪ و مراتع خوب ۹/۳٪ می باشد. زیان ناشی از تخریب اکوسیستم های مرتعی و ادامه بهره برداری های غیر اصولی و بی رویه در نابودی منابع

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

آب و خاک این سرزمین می انجامد و این عوامل ضرورت توجه به کشت گیاهان علوفه ای را بیش از پیش نمایان می کند. زیرا تامین علوفه از منابع دیگر می تواند بعنوان اولین گام در راه کاهش فشار بر مراتع و شروع برنامه های اصلاحی و احیای مراتع باشد. (شریفی ، ۱۳۸۹) در تحقیقات به نژادی انجام مطالعات سیتوژنتیکی از اقدامات اولیه است زیرا که شناخت تعداد کروموزوم ها در انتخاب روشهای به نژادی موثر است. تعیین سطح پلوئیدی که از مطالعات کروموزومی است در انجام دورگ گیریها از اهمیت فراوانی برخوردار است (Hieter , Griffiths , 1999) . از کاربرد دیگر مطالعات کروموزومی استفاده از این اطلاعات در شناسایی و طبقه بندی گیاهان در سیستم جدید به عنوان بخشی از تاکسونومی جدید است. تنوع زیاد کروموزومها، ثابت بودن تعداد کروموزومها در افراد یک گونه و تنوع تعداد اندازه و ساختمان کروموزوم در گونه های متفاوت شاخصهای مفید برای اهداف تاکسونومیک است (John , 1989). در تعیین روابط خویشاوندی بین گونه های یک جنس تنها تعداد کروموزوم کفایت نمی کند بلکه باید اطلاعاتی از قبیل اندازه، مورفولوژی، محل سانترومر و رفتار کروموزومها نیز بایستی مورد بررسی قرار گیرد (Stebbins , 1971). طبق تجزیه و تحلیل حاصل از آنالیز سیتوژنتیکی عدد کروموزومی در جنس *Vicia* ، $x=5-6-7$ گزارش شده است (Gaffarzadeh Namaz , et al, 2008).

اهدافی که در این تحقیق در نظر است دنبال شود عبارتند از تعیین عدد کروموزومی و سطح پلوئیدی، مطالعه شکل و اندازه کروموزومها و تعیین تقارن و عدم تقارن جمعیت مورد مطالعه. تا با این کار بتوان گامی موثر در شناسایی هرچه بیشتر این گونه و استفاده از آن در برنامه های اصلاحی برداشت.

موارد و روشها:

به منظور بررسی کاربوتیپی در جمعیتی از جنس *Vicia* متعلق به گونه ی *Dasycarpa* مطالعه ای در آزمایشگاه ژنتیک باغ گیاهشناسی تبریز انجام گرفت (مشخصات جمعیت در جدول ۱ آورده شده است).

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

جهت مطالعه تقسیم میتوز از مریستم نوک ریشه استفاده شد به این منظور ابتدا بذور به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰٪ ضد عفونی شدند و بعد از شستشو با آب مقطر بذره‌های استریل شده مابین دو لایه کاغذ صافی مرطوب در داخل پتری دیش های استریل شده جهت جوانه زنی در شرایط طبیعی حاکم بر آزمایشگاه با دمای 24°C و نور طبیعی روز و شب به منظور جوانه زنی کشت گردیدند. بعد از جوانه زنی زمانی که طول ریشه ها به اندازه ۱cm رسید نمونه گیری انجام شد. با توجه به اینکه مطالعات میتوزی کروموزوم ها در مرحله متافاز که کوتاهترین طول و بهترین شرایط را برای مطالعه دارند صورت می پذیرد ضروری است بافت مورد مطالعه طوری آماده گردد که درصد بالایی از سلولها در مرحله متافاز باشند به این منظور جهت دستیابی به کروموزومهایی با حداکثر فشردگی داخل سلول بایستی توسط مواد شیمیایی عمل رشته دوکها را مختل کرده تا کروموزومها از ادامه بقیه مراحل میتوز باز بمانند و در مرحله متافاز تجمع گردند. بنابراین در این مرحله نمونه های آماده تحت پیش تیمار با محلول کلشی سین ۰/۰۵ درصد به مدت ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند بعد از خارج شدن از محلول پیش تیمار به طور کامل با آب مقطر شستشو گردید و سپس برای تثبیت مریستم ها پیش تیمار شده، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C درجه سانتیگراد در محلول فارمر با نسبت ۱ حجم اسید استیک گلیسول و ۳ حجم اتانول خالص قرار گرفتند بعد از طی زمان مذکور نمونه ها شستشو و تا زمان مطالعه در الکل اتیلیک ۷۰٪ در دمای 4°C نگهداری شدند. جهت نرم شدن بافت، نمونه ها در محلول هیدرولیز HCl یک مولار به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و سپس رنگ آمیزی توسط محلول استوارسین ۲٪ برای مدت ۶-۷ ساعت در دمای 4°C انجام شد و در نهایت نوک مریستم به اندازه ۱-۲ mm برش داده شد و اسلایدها به روش اسکواش با محلول سوسپانسیون اسید استیک ۴۵٪ آماده گردیدند. اسلایدهای آماده شده به کمک میکروسکوپ نوری BX50 با لنز ۱۰۰ به کمک روغن ایمرسیون مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت ۵ صفحه متافازی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

(تکرار) با استفاده از نرم افزار Adobe premiere با بزرگ نمایی $4233/33$ ضبط و ثبت گردید برای هر متافاز کاریوتیپ به کمک فتوشاب تهیه شد و اندازه ی بازوهای کوتاه و بلند کروموزوم و در صورت وجود ساتلایت با استفاده از نرم افزار Micro measure اندازه گیری و طول کل کروماتین محاسبه شد و در نهایت ایدیوگرام جمعیت تهیه و تقارن کاریوتیپی به روش Stibbenz و TF% و تیپ کروموزوی به روش لوان و سادبرگ تعیین گردید.

نتایج و بحث:

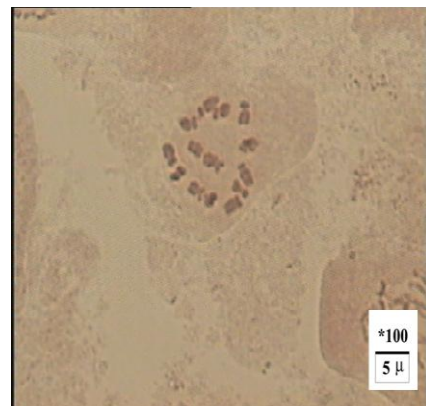
نتایج پس از شمارش کروموزومی نشان داد که عدد کروموزومی پایه ی این گونه $x=7$ و $2n=2x=14$ بوده و این جمعیت از لحاظ سطح پلوئیدی دیپلوئید شناخته شد. در شکل (۱) کروموزومهای متافازی، شکل (۲) کاریوتیپ، شکل (۳) ایدیوگرام هاپلوئید جمعیت مذکور نشان داده شده است. در این جمعیت از گونه ی *V.dasycarpa* یک جفت کروموزوم ساتلایت دار تشخیص داده شد (کروموزوم شماره یک ایدیوگرام و جفت کروموزوم شماره 3 کاریوتیپ) در این جمعیت از گونه ساتلایت روی بازوی کوتاه کروموزوم واقع شده است و طول آن 0.29 ± 0.88 میکرون برآورد گردید. طول بلندترین کروموزوم 3.29 ± 0.36 میکرون و طول کوتاهترین کروموزوم 1.96 ± 0.47 میکرون و طول کل ژنوم $18/8$ میکرون اندازه گیری شد از لحاظ تیپ کروموزومی به روش Levan & Sadberg تمامی کروموزومها دارای تیپ ساب متاسانتریک بوده و فرمول کاریوتیپی این جمعیت $7SM$ گزارش شد (جدول ۳). بر اساس جدول Stebbins این جمعیت در کلاس A 4 قرار گرفت که این امر موید کاریوتیپ نامتقارن و سیر تکاملی جمعیت می باشد. درصد شکل کلی کاریوتیپ TF% مشخصه ای برای بیان وضعیت تقارن کاریوتیپ کروموزومهاست هنگامی که این درصد به 50% برسد نشان دهنده ی قرار گرفتن سانترومرها در وسط کروموزومهاست و کاریوتیپ متقارن هرچه این درصد از 50% کمتر باشد وجود کروموزومهایی با سانترومرانتهایی و کاریوتیپ نامتقارن را بیان

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

جنس	گونه	تیره	شماره هرباریومی در مرکز تحقیقات دیم مراغه	محل جمع آوری بذر	زادگاه اصلی
Vicia	dasycarpa	papiliniaceae	۲۴۳۸	لبنان	سوریه

می کند. نتایج حاصل از اندازه گیری %TF نیز کاربوتیپ نامتقارن حاصل از جدول استینز را تأیید نمود.
(جدول ۲).

جدول ۱. مشخصات جمعیت مطالعه شده



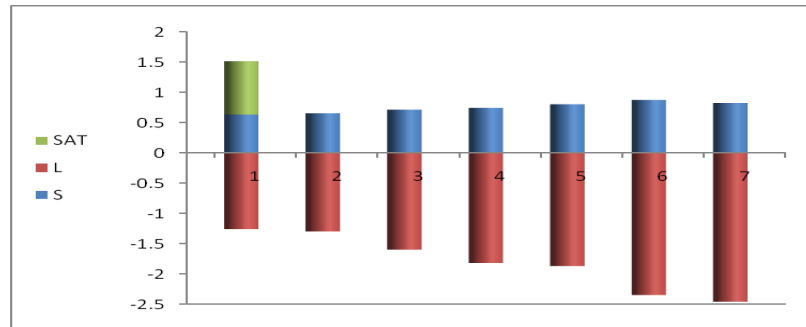
شکل ۲. کاربوتیپ

شکل ۱. کروموزومهای متافازی

جمعیت ۲۴۳۸ *V. dasycarpa*

جمعیت ۲۴۳۸ *V. dasycarpa*

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی



شکل ۱.۳. ایدیوگرام جمعیت ۲۴۳۸ *V.dasycarpa*

جدول ۲. میزان کروماتین نسبی، نسبت بازو، تقارن کاریوتیپی، فرمول کاریوتیپی

شماره هرباریومی	فرمول کاریوتیپی	۲n	SC	%TF	%S	%L	Arm ration	VRC
۲۴۳۴	۷SM	۱۴	A۴	۲۹/۰۵	۲/۸۵	۶/۷۱	۲/۴۷	۲/۶۹

جدول ۳. ویژگیهای کاریوتیپ جمعیت ۲۴۳۸ گونه *V.dasycarpa*

جفت کروموزوم	طول بازوی کوتاه (μ)	طول بازوی بلند (μ)	طول ساتلایت (μ)	طول کلی کروموزوم (μ)	نسبت بازوی بلند به کوتاه	تیپ کروموزوم
1	0.63±0.24	1.26±0.39	0.88±0.29	2.77±0.43	2.01	SM



ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی



همایش ملی
ایده های نو در کشاورزی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

2	0.65±0.11	1.30±0.38	-	1.96±0.47	1.97	SM
3	0.71±0.22	1.60±0.2	-	2.32±0.32	2.25	SM
4	0.74±0.09	1.82±0.26	-	2.56±0.19	2.45	SM
5	0.80±0.17	1.87±0.18	-	2.67±0.18	2.32	SM
6	0.87±0.18	2.35±0.29	-	3.22±0.34	2.70	SM
7	0.82±0.12	2.46±0.46	-	3.29±0.36	2.99	SM

سپاسگذاری



۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

به دین وسیله از مسئولین و کارکنان محترم باغ گیاهشناسی تبریز و اساتید ارجمند جناب آقای دکتر ورهرام رشیدی و دکتر احمدرزبان حقیقی که امکانات این پژوهش و راهنمایی های خود را در اختیار قرار دادند و از همراهیشان بهره بسیار برده ام کمال تشکر و قدردانی را دارم.

منابع مورد استفاده

- ۱- شریفی، ر. حکم علی پور، س. ۱۳۸۹. زراعت گیاهان علوفه ای. انتشارات عمیدی. ۵۸۵ صفحه
- ۲- مظفریان، و. ۱۳۸۶. فرهنگ نامهای گیاهان ایرانی. انتشارات فرهنگ معاصر.
- ۳- میر فخرایی، ن.، مقدم، م.، اهری زاد، س.، رزبان حقیقی، الف. ۱۳۸۹. ارزیابی ژنوتیپهای ماشک کرکدار در شرایط خشکی. مجله دانش کشاورزی پایدار، جلد ۲/۲۰. شماره ۱. ص ۱۳۳ تا ۱۴۱.
- ۴- پاکروان، م. جلیلیان، ن.، نعمتی، م. ۱۳۷۹. فلورایرن، شماره ۳۳، تیره پروانه آسا، قبیله ماش. انتشارات مرکز تحقیقات جنگل و مراتع.
- 5- Gaffarzadeh Namaz , L.,Badarzadeh , M. , Asghari zaaria , R. 2008 . Karyotyp of several vicia species from iran. Asian jornal of plant sciences , 7 (4) : 417-420.
- 6- Hieter , P. and Q, Griffiths . 1999 . Polyploidy more is more of less. Science . 285 : 210 – 211
- 7- John , C.K. 1989. Cytological studies in the genus Aysicarpus neck. PHD thesis , Poona university . India.
- 8- Stebbins , G.L. 1971 . Chromosomal evolution in higher plants . Edward Arnold publisher LDT . London- 216 pp.



ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی



همایش ملی
ایده های نو در کشاورزی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

- 9- Meric , C. , Dane , F. 1999. Karyological Studies on vicia sativa L. In cisa (Bieb). Arc . varincies. Tr.J.of Botany . 23:63-67.



Karyotype investigation of the population of *vicia dasycarpa* using image analysis system

- 1-E.saeidasr. Msc plant breeding student of Islamic Azad University, Faculty of Agriculture , Tabriz, Iran . e.saeidasr@yahoo.com
- 2- V.Rashidi. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran .
- 3-A.Razban Haghighi . Member of Scientific Board ,Research Institute of Forests & Rangelands.

Abstract

Genetically sources are one of the most valuable and vital sources of natural sources. Also they are one of the most effective factors in choosing modification method of cytogenetic constructions. So in the following research, a group of *Dasycarpa* specie , *Vicia* genus, Papiliniaceae family had been investigated Karyologically on the basis of Squash method. Then for metafaz level of study, we used 0.05% pretreatment colchicin, fixation farmer and normal 1 hydrolyzation HCL and staining in 2% acetic orcein . The results showed that the fundamental chromosome number is $x=7$ and level of ploidy is diploid whit $2n=2x=14$ and karyotype formula is 7SM. Also the existence of a pair of satellite chromosome and karyotype symmetry by applying binary stebbinz table method had been recognized and %TF was confirmed non-symetricness of karyotype.

Key word: cytogenetic –*vicia dasycarpa* –number of choromosom –metafaz - Karyotype symmetry