دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد بیستم و یکم، شماره سوم، ۱۳۹۳
http://jwfst.gau.ac.ir

بررسی محتوای DNA و تعیین سطوح پلوئیدی در گونه‌ها و هیبریدهای بین‌گونه‌ای گردو با روش فلوسیتومتری

مریم مسی‌وند[۱]، *وحیده پیام‌نور[۲]، داراب حسنی[۳] و محمد جعفرآقایی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، [۴]استادیار بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲۶

چکیده

در این پژوهش سطح پلوئیدی و شمارش کروموزومی در گونه‌ها و هیبریدهای بین‌گونه‌ای گردو (*Juglans*) برای اهداف اصلاحی با دستگاه فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. در بهار، برگ‌های جوان گردو شامل ارقام گردوی ایرانی (*J. regia*)، ژنوتیپ‌های گونه گردوی سیاه (*J. nigra*)، گونه هیندسی (*J. hindsii*) و هیبریدهای بین‌گونه‌ای رویال (*J. hindsii* × *J. nigra*) و پارادوکس (*J. hindsii* × *J. regia*) از ایستگاه تحقیقاتی کمال شهر کرج، بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر به‌طور تصادفی انتخاب شدند. سطح پلوئیدی با بهینه‌سازی بافر مورد نیاز متناسب با درختان گردو توسط دستگاه فلوسیتومتری تعیین شد. برای مقایسه و تعیین سطح پلوئیدی، کروموزوم‌های میتوزی نمونه‌هایی که دارای بیش‌ترین و کم‌ترین محتوای DNA بودند شمارش گردید. دامنه میانگین پیک‌های به‌دست آمده از جذب نوری سلول‌ها در جریان فلوسیتومتری در نمونه‌های مورد بررسی، متغیر و از ۷۱/۶۸-۴۶/۲۴ ارزیابی گردید. نمونه‌های مورد مطالعه دارای سطح پلوئیدی یکسان ۲n=۳۲ بوده و تنوع مورفولوژی و محتوای DNA مشاهده شده در آن‌ها، ناشی از تغییر در تعداد کروموزوم‌ها نمی‌باشد. استفاده از فلوسیتومتری به‌عنوان روشی مقرون به‌صرفه، آسان و سریع برای تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های این جنس و سایر درختان قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: گردو، سطح پلوئیدی، محتوای DNA، فلوسیتومتری

* مسئول مکاتبه: mnoori56@gmail.com

مقدمه

تعیین سطح پلوئیدی، اهمیت فراوانی در مطالعه رابطه‌های خویشاوندی گونه‌ها، تهیه هیبریدهای بین‌گونه‌ای، مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های به‌نژادی آن دارد (لوویس، ۱۹۸۰؛ استیبنز، ۱۹۷۱). در حقیقت محتوای DNA هسته‌ای می‌تواند برای تخمین سطح پلوئیدی استفاده شوند که از دو روش فلوسیتومتری[1] و میکرو اسپکتروفتومتری فولگن[2] قابل انجام است. همچنین تهیه ریشه از درختان برای انجام مطالعات کروموزومی بسیار سخت است، در حالی‌که فلوسیتومتری نیازی به سلول‌های در حال تقسیم نداشته برای گیاه غیرمخرب است و به مقدار کمی از بافت گیاه نیاز می‌باشد (عالیشاه و امیدی، ۱۳۸۷). فلوسیتومتری روشی برای تخمین اندازه ژنوم گیاهی، سطح پلوئیدی و تعیین مقدار DNA و تجزیه و تحلیل سلولی است. از آن‌جا که قابلیت آنالیز جمعیت بزرگی از سلول‌ها در مدت زمان کوتاهی با این روش امکان‌پذیر است، با وسعت زیادی برای یافتن آنیوپلوئیدی و پلی‌پلوئیدی‌ها قابل استفاده است (کاوارا و همکاران، ۱۹۹۹). در این روش از دو ماده به‌عنوان فلوروکروم[3] شامل پروپیدیوم یدید[4] با علامت اختصاری PI و ٤ و ٦ دی‌آمینو- ۲- فنیلیندل[5] با علامت اختصاری DAPI استفاده می‌شود. PI به‌وسیله نور مرئی با ماکزیمم جذبی در ٤۹۰ نانومتر (nm) و DAPI به‌وسیله نور فرابنفش (UV) در ۳۵۰ نانومتر (nm) تحریک می‌گردند. این دو رنگ واکنش‌های رنگی کاملاً متفاوتی دارند. PI بین جفت بازهای رشته دوتایی DNA و RNA که خاصیت بازی کمی داشته یا بدون خاصیت بازی هستند، واقع می‌شود (پروپری و همکاران، ۱۹۹۱)، در حالی‌که DAPI یک رنگ غیربینابینی است که به‌طور ترجیهی به‌صورت کمپلکس در نواحی باز A-T باند می‌شود و بین بازها قرار نمی‌گیرد (گادل و همکاران، ۱۹۹۳). گرچه رایج‌ترین روش برای تخمین سطوح پلوئیدی در درختان با استفاده از شمارش کروموزومی می‌باشد ولی در سال‌های اخیر تکنیک فلوسیتومتری به‌علت آسان بودن و سرعت بالای آن به تکنیک‌های دیگر ترجیح داده می‌شود (ریبرن، ۱۹۸۹؛ هسلاپ هاریسون، ۱۹۹۵). در این پژوهش امکان تعیین سطوح پلوئیدی گونه‌ها، ارقام و هیبریدهای مختلف گردو با استفاده از روش فلوسیتومتری به‌عنوان روشی آسان، دقیق و کارآمد برای انجام مطالعات اصلاحی آینده مورد ارزیابی قرار گرفته است. گردو گیاهی است یک‌پایه و دگرگشن که توسط باد

1- Flow Cytometry
2- Feulgenmicrospectro Photometry
3- Fluorochrome
4- Propidium Iodide
5- 4-6-Diamidino- 2-Phenylindole

گرده‌افشانی شده و همه گونه‌های آن، نورپسند و پرنیاز، طالب آب و هوای خشک کوهستانی، دره‌های مناطق استپی و مدیترانه‌ای تا مناطق معتدله مرطوب هستند (قنادها و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعات سیتوژنتیکی با استفاده از روش شمارش کروموزوم‌های در حال تقسیم در گونه‌ها و هیبریدهای مختلف گردو و بیش‌تر در *J. regia* توسط هانس (۱۹۷۰)، یو و پالس (۱۹۹۳)، سارتوریوس و همکاران (۱۹۹۳)، تولکی و مک‌گراهان (۱۹۹٤) و یاجیما و همکاران (۲۰۰۳) انجام فرم‌های دیپلوئید و تتراپلوئید آن با کروموزوم پایه n=۱٦ دیده شده است. حسینی (۲۰۰۹) نیز به آنالیز کروموزومی در گردوی ایرانی (رقم هارتلی) پرداخت و تعداد آن را دیپلوئید و ۲n=۲x=۳۲ گزارش کرد. تعیین سطوح پلوئیدی با استفاده از روش فلوسیتومتری به‌دلیل جدید بودن نسبی، در درختان جنگلی به‌ندرت انجام شده و در مورد درخت گردو منبع خاصی یافت نشد اما در میان گونه‌های زراعی و علفی به فراوانی از دستگاه فلوسیتومتری استفاده می‌شود که فقط در ایران می‌توان به مطالعات بخشی (۲۰۰۸)، رنجبر و همکاران (۲۰۱۰)، جعفرآقایی (۲۰۱۰)، قنواتی و اسکندری (۲۰۰۰)، حسینی (۲۰۱۲) و محمدی (۲۰۱۲) اشاره نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۹ رقم گردوی ایرانی، ۸ ژنوتیپ گردوی سیاه، ۵ ژنوتیپ از هیبرید بین گونه‌های رویال و ٤ ژنوتیپ از هیبرید بین‌گونه‌ای پارادوکس و تنها ۱ پایه از گونه هیندسی به‌شرح جدول ۱ از ایستگاه تحقیقاتی کمال‌شهر، بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال بذر جمع‌آوری شد. گونه‌ها، ارقام، ژنوتیپ و هیبریدهای موردنظر از داخل کشور و کشورهای انگلیس، فرانسه، آمریکا، کالیفرنیای شمالی و... جمع‌آوری شده و در سال ۱۳۷٤ در این ایستگاه تحقیقاتی کاشته و مورد مراقبت قرار گرفته‌اند. برگ‌های جوان به‌طور تصادفی انتخاب و به آزمایشگاه سیتوژنتیک بانک ژن گیاهی ملی ایران، انتقال داده شدند. حدود ۱ سانتی‌متر از هر برگ بریده و درون پتری‌دیش قرار داده شد. بافر رنگ‌آمیزی شامل ۱۲۸ میلی‌مول NACL و ۳۷ میلی‌مول $MgCl_2$ و ۲ میلی‌مول TCA و ٤ و ٦- دی‌آمیدینو ۲- فنیل ایندول (DAPI۱) ۱gr/L بوده و به محلول آماده شده PVP ۱۰۰ gr/L اضافه شد. بر روی قطعات برگ هر نمونه ۱٦۰۰ میکرولیتر بافر رنگ‌آمیزی ریخته شد و با استفاده از تیغ کاملاً خرد شدند تا هسته‌ها آزاد شوند. سوسپانسیون حاصله از فیلتر مخصوص (ساخت

شرکت Partec) به سایز ۳۰µm، از دستگاه عبور داده شد تا تجمعات سلولی و قطعات درشت حذف شوند. با استفاده از دستگاه Ploidy Analyzer (Partec GmbH 2005 ساخت کشور آلمـان) سـطح پلوئیدی نمونه‌های مورد آزمایش تعیین و اطلاعات نمونه‌هایی که دارای پیک مناسب بودنـد ذخیـره و در پایان چاپ گردید.

جدول ۱- نمونه‌های مورد مطالعه تهیه شده از ایستگاه کمال شهر کرج.

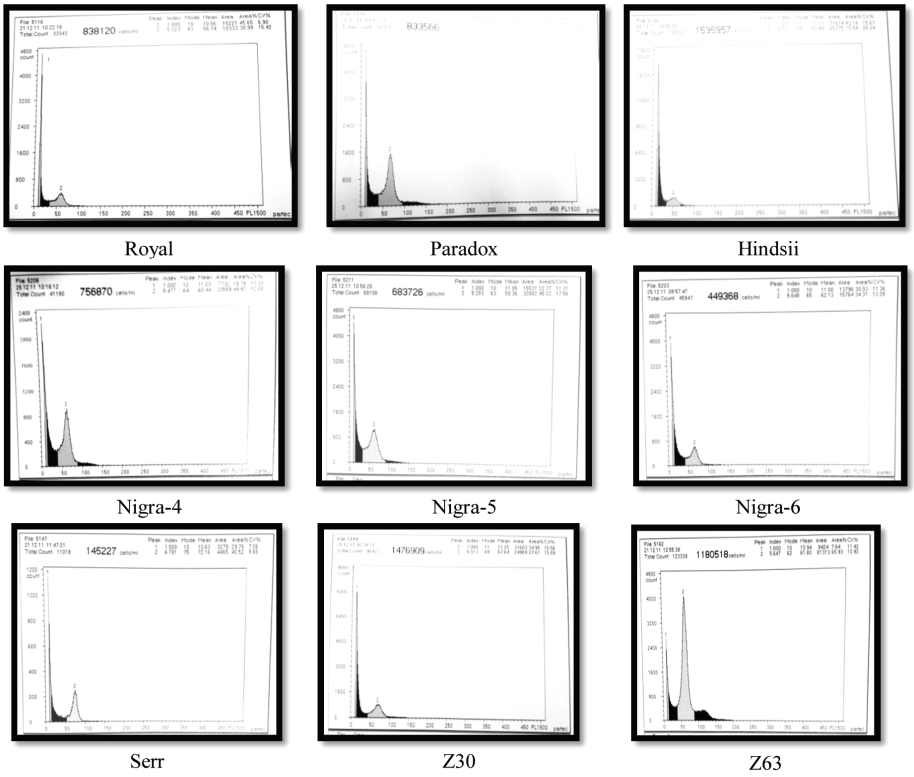
(*Hindsii*)	(*J. nigra*)	(*J. regia*)	(*J. hindsii* × *J. nigra*)	(*J. hindsii* × *J. regia*)
گونه	ژنوتیپ‌ها	ارقام	هیبرید بین‌گونه‌ای	هیبرید بین‌گونه‌ای
هیندسی	گردوی سیاه	گردوی ایرانی	پارادوکس	رویال
J.hindsii-1	Nigra-1	B21	Paradox-1	Royal-1
-	Nigra-2	Serr	Paradox-2	Royal-2
-	Nigra-3	Z30	Paradox-3	Royal-3
-	Nigra-4	Ronde	Paradox-4	Royal-4
-	Nigra-5	Pedro	-	Royal-5
-	Nigra-6	Hartley	-	-
-	Nigra-7	Chandler	-	-
-	Nigra-8	Z63	-	-
-	-	k72	-	-

برای مقایسه و اطمینان از نتایج، کروموزوم‌های میتوزی نمونه‌هایی که دارای بیش‌ترین و کم‌تـرین مد یا میانگین پیک به‌دست آمده از جذب نوری سلول‌ها در جریان فلوسیتومتری بودند، بـا اسـتفاده از روش آقایف (۱۹۹۸ و ۲۰۰۲) شمارش گردید، که مختصراً شامل مراحل زیر می‌باشد:

۱- ریشه‌دار کردن بذور، ۲- پیش‌تیمار با استفاده از ۸- هیدروکسی کینولین و یا بـا آلفـا برمونفتـالین، ۳- تثبیت سلول‌هـا (یـک قـسمت محلـول اکـسید کرومیـک ۰/۱ و یـک قـسمت فرمالدهیـد ۰/۱۰)، ٤- شستشوی ریشه‌چه‌ها، ٥- هیدرولیز و حذف دیواره سلولی (محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال)، ٦- رنگ‌آمیزی (هماتوکسلین)، ۷- تهیه نمونه میکروسکوپی و قـرار دادن نمونـه‌هـا در آنـزیم سـیتاز، ۸- اسکواش و ۹- مشاهده نمونه‌ها و عکس‌برداری. سطح پلوئیدی نمونه‌ها با مقایسه پیک نمونه مورد بررسی با نمونه‌هایی که شمارش کروموزومی آن‌ها بررسی شده است تعیین گردید.

نتایج و بحث

نتیجه تجزیه فلوسیتومتری به شکل هیستوگرام نمایش داده می‌شود که محور افقی آن سطح پلوئیدی سلول‌ها و محور عمودی، تعداد سلول‌های شمارش شده برای هر اندازه است. بر روی هیستوگرام ممکن است چندین پیک مشاهده شود که معمولاً پیک اول نشانگر خطای دستگاه (Noise) و پیک شماره ۲ محتوای DNA نمونه مورد بررسی در مرحله G1 تقسیم سلولی را نشان می‌دهد. پیک‌های بعدی محتوای DNA سلول‌ها در مرحله G2 تقسیم سلولی را نشان می‌دهند. به این ترتیب هرچه پیک شماره ۲ به سمت راست هیستوگرام متمایل شود نمونه مورد بررسی محتوای DNA بیش‌تری را شامل می‌شود. شکل ۱ پیک‌های فلوسیتومتری سطح پلوئیدی رسم شده توسط دستگاه را نشان می‌دهد که بیانگر محتوای DNA متفاوت در نمونه‌های مورد بررسی است.



شکل ۱- پیک فلوسیتومتری محتوای DNA رسم شده توسط دستگاه PA.

جدول ۲ نتایج تجزیه واریانس شاخص DNA بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد که در سطح ۱ و ۵ درصد معنی‌دار شده است. میانگین DNA به‌دست آمده از فلوسیتومتری بالاترین نقطه پیک و سطح زیر منحنی نیز مساحت زیر پیک است.

جدول ۲- تجزیه واریانس براساس شاخص محتوای DNA بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه.

گونه / ژنوتیپ	درجه آزادی گونه	میانگین مربعات گونه	درجه آزادی خطا	میانگین مربعات خطا
میانگین پیک فلوسیتومتری	۱۱	۱۷۹/۰۲۸*	۲۶	۷۳/۲۴۲
سطح زیر منحنی	۱۱	۵۰۴/۱۲۴**	۲۶	۷۱/۱۸۸

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳ مقایسه میانگین به روش دانکن، میانگین، ماکزیمم، مینیمم و انحراف معیار سطوح پلوئیدی و میانگین سطح زیر منحنی را در ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد بررسی، نشان می‌دهد. میانگین سطح زیر نمودارها از ۶۳/۷۸-۲۰/۱۴، متغیر اندازه‌گیری شد. کم‌ترین میانگین سطح زیر نمودار متعلق به رقم Hartly از گردوی ایرانی و بیش‌ترین سطح را رقم Z63 متعلق به گونه گردوی ایرانی، به خود اختصاص داد. دامنه میانگین محتوای DNA متغیر و از ۷۱/۶۸-۵۰/۴۹ ارزیابی شد. کم‌ترین محتوای DNA در نمونه‌های مورد مطالعه برای گونه هیندسی و بیش‌ترین محتوای DNA برای رقم Z30 از گونه گردوی ایرانی محاسبه شد. میانگین محتوای DNA در ژنوتیپ‌های گردوی سیاه ۵۸/۲۰ در ارقام و ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی ۶۲/۵۹ و در هیبریدهای بین‌گونه‌ای ۵۶/۸۲ و در گونه هیندسی ۵۰/۴۹ محاسبه شد. در میان نمونه‌های مورد مطالعه ارقام گردوی ایرانی دارای بیش‌ترین میانگین محتوای DNA ارزیابی شد. میانگین سطح زیر نمودار در گونه‌ها، ژنوتیپ‌ها و هیبریدهای مورد مطالعه ۴۳/۹۴ اندازه‌گیری شد (جدول ۳). نتایج به‌دست آمده از مقایسه میانگین DNA نمونه‌ها به روش آزمون دانکن در سطح ۵ درصد، در جدول ۳ ارایه شده است. چنان‌چه مشاهده می‌شود، مقادیر به‌دست آمده از سطح زیر منحنی، نمونه‌ها را به ۶ گروه تقسیم کرده است. دو رقم Z63 و k72 دارای بیش‌ترین مقدار و متفاوت از سایر رقم‌ها با کلاس معنی‌داری a نشان داده شده است، همچنین رقم Hartley از گردوی ایرانی نیز با کم‌ترین سطح زیر منحنی با کلاس معنی‌داری d و متفاوت نسبت به سایر نمونه‌ها نمایان شده است. از نظر میانگین محتوای DNA، نمونه‌ها به ۵ گروه تفکیک شده‌اند. رقم Z63 دارای کم‌ترین میانگین محتوای DNA با کلاس معنی‌داری c و رقم Z30 نیز بیش‌ترین میانگین محتوای

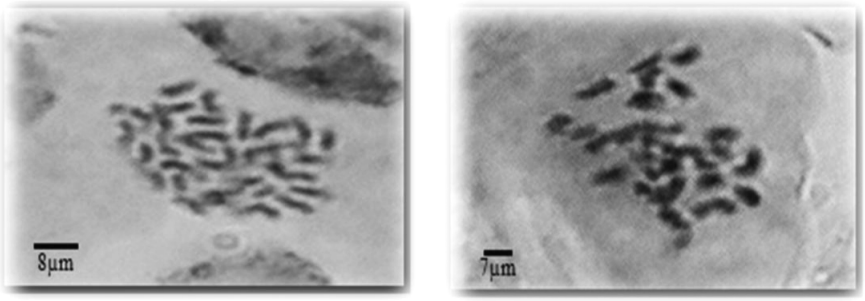
DNA و با کلاس معنی‌داری a نمایش داده شده است. قابل ذکر است که میانگین محتوای DNA با میانگین سطح زیر نمودار هر نمونه رابطه مستقیمی ندارد، زیرا همان‌طورکه در جدول ذیل مشاهده می‌شود رقم Hartly دارای سطح زیر نمودار کوچکی می‌باشد (۲۰/۱٤) اما بالعکس میانگین محتوای بالایی دارد (٦۹/۱۸). مقدار میانگین محتوای هر پیک مرتبط با میزان پراکندگی (ضریب تغییرات) آن پیک می‌باشد و با آن رابطه مستقیم دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین به روش دانکن، میانگین محتوای DNA و میانگین سطح زیرنمودار پیک فلوسیتومتری در نمونه‌ها.

ژنوتیپ	ماکزیمم	مینیمم	انحراف معیار	میانگین محتوای DNA	میانگین سطح زیرمنحنی
Serr	۷۲/۱٦	٥۱/٤۸	۱۰/٤۱	٦۲/٥۳^{abc}	٥۰/۱٤^{ab}
Rond	٦۰/۷۷	٥۸/۷٤	۱/٤۳	٥۹/۷٥^{abc}	۳۹/۲۹^{bc}
Hartly	۷۰/۷۳	٦۷/٦۳	۲/۱۹	٦۹/۱۸^{ab}	۲۰/۱٤^{d}
Pedro	۸۲/۹٦	٦۱/۲	۱۱/۱۷	۷۰/٦^{ab}	۲٦/٥۱^{cd}
B21	۷۲/۱٦	٤۷/۳۹	۱۳/۰۷	٥۷/۳٦^{ab}	٥۰/۳۹^{ab}
Z30	۷٥/۲۲	٦۹/۰٥	۳/۱۸	۷۱/٦۸^{a}	۲۸/۰۲^{cd}
Z63	٦۱/۰۸	۳۰/۹۱	۱٥/٤٤	٤٦/۲٤^{c}	٦۳/۷۸^{a}
K72	٦۰/۳۲	٤۳/۷۲	۸/۹۸	٥۳/۸٦^{bc}	٥۹/٥۷^{a}
Chandlar	۷٤/٥۳	٥۹/۷۳	۸/۳۲	٦۹/۳۲^{abc}	۳٦/۷۳^{bc}
Royal	٥۹/٥٦	٥۱/٤۷	۱۰/۱۰	٥٦/۰۱^{abc}	۳۹/٦۹^{bc}
Paradox	٦٤/۹٦	٥۰/۰۳	۳/۹٦	٥۷/٦۳^{abc}	۳۲/۱٦^{cd}
Hensii	٥۰/٤۹	٥۰/٤۹	۰	٥۰/٤۹^{abc}	–
nigra-1	٦۲/۱۳	٦۲/۱۳	۰	٦۲/۱۳^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-2	٦۳/۰٥	٦۳/۰٥	۰	٦۳/۰٥^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-3	٦۰/٤٤	٦۰/٤٤	۰	٦۰/٤٤^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-4	٥۲/۷۷	٥۲/۷۷	۰	٥۲/۷۷^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-5	٦۳/۰۹	٦۳/۰۹	۰	٦۳/۰۹^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-6	٥۱/۷۱	٥۱/۷۱	۰	٥۱/۷۱^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-7	٥۸/۳٦	٥۸/۳٦	۰	٥۸/۳٦^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
nigra-8	٥٤/۱۲	٥٤/۱۲	۰	٥٤/۱۲^{abc}	٤۸/٥٦^{ab}
کل	۸۲/۹٦	٤۳/۷۲	۹/۱۳	٦۱/۰۸	–

حروف نامشابه در هر ردیف وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها را (در سطح ٥ درصد) نشان می‌دهد.

با توجه به تفاوت از کلاس معنی‌داری a تا کلاس معنی‌داری b و این‌که تعداد کروموزوم‌ها از کلاس a تا کلاس c با هم برابر بودند بنابراین برای یافتن علت تفاوت در سطح پلوئیدی نمونه‌های مورد مطالعه و برای کسب اطمینان از نتایج، نمونه‌هایی که نسبت به سایرین دارای تفاوت بیش‌تری از نظر محتوای DNA بودند (بیش‌ترین و کم‌ترین محتوای DNA) با استفاده از روش آقایف (۱۹۹۸) و آقایف (۲۰۰۲) جدا و شمارش کروموزومی شدند. پس از شمارش، تعداد کروموزوم‌ها در هر دو نمونه یکسان و دیپلوئید ۲n=۳۲ بوده که نشانگر سطح پلوئیدی یکسان در تمامی نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد. مشخص گردید که تفاوت در اندازه کروموزوم‌ها است و نمونه‌های مورد مطالعه دارای تعداد کروموزوم یکسان هستند (شکل ۲).



شکل ۲- کروموزوم‌های داخل هسته سمت راست رقم دماوند (Z63) و رقم جمال (Z30)، ۲n=۳۲.

بحث

از آن‌جا که ایران یکی از مراکز مهم پراکنش گردو در جهان به‌شمار می‌رود لزوم پژوهش‌های گسترده در خصوص این گونه اقتصادی و چندمنظوره کاملاً احساس می‌شود. در همین راستا، با هدف حفاظت و توسعه ظرفیت بهره‌برداری از ذخایر ژنتیک گیاهی و همچنین انجام بررسی‌های به‌نژادی، به‌زراعی و تکنولوژیکی، تعداد به‌نسبت زیادی از گونه‌ها، واریته‌ها و هیبریدهای گردو در ایستگاه تحقیقاتی کمال شهر کرج جمع‌آوری و مورد پژوهش قرار گرفته است. با توجه به تنوع موجود در این کلکسیون، کاشت این گونه‌ها و هیبریدهای حاصله در سایر نقاط می‌تواند برای افزایش غنا و تنوع ژنتیکی گونه‌های کشور مفید باشد؛ در این خصوص بررسی تفاوت در تعداد کروموزوم‌ها و سطح پلوئیدی انجام گرفت. در پژوهش‌های به‌نژادی، انجام بررسی‌های سیتوژنتیکی از قدم‌های اولیه محسوب می‌شود چرا که تلاقی بین گونه‌هایی که از شباهت کروموزومی بیش‌تری برخوردار هستند،

موفقیت‌آمیزتر است. با توجه به این‌که نمونه‌های مورد بررسی در ایستگاه، دارای صفات مورفولوژیکی متفاوتی هم در برگ و هم میوه بودند (پایش نویسندگان) این فرضیه وجود داشت که نمونه‌ها نیز از نظر محتوای DNA و سطح پلوئیدی دارای تفاوت چشم‌گیری باشند. ریز بودن کروموزوم‌های گونه‌های جنگلی همواره مشکلات زیادی را در مطالعات مربوطه باعث می‌شود بنابراین استفاده از سایر تکنیک‌ها که سرعت مناسبی نیز داشته باشند به‌طور مسلم بسیار راه‌گشا خواهد بود. در این خصوص از فلوسیتومتری به‌عنوان روشی جایگزین استفاده گردید و مشخص شد که دامنه میانگین محتوای DNA در نمونه‌های مورد بررسی، متغیر و از ۷۱/۶۸-۵۰/۴۹ می‌باشد که می‌تواند دلیلی بر تمایز مورفولوژی وسیع برگ و بذر بین آن‌ها باشد. برای ارزیابی سطح پلوئیدی و به‌دلیل نبود شاهد از پژوهش‌های قبلی، کروموزوم‌های نمونه‌ها با حداکثر و حداقل محتوای DNA به‌عنوان شاهد، شمارش شدند. میانگین محتوای DNA در گونه گردوی سیاه، گردوی ایرانی، هیبریدهای بین‌گونه‌ای و گونه هیندسی به‌ترتیب ۵۸/۲۰، ۸۲/۵۹، ۵۶/۶۲ و ۵۰/۴۹ محاسبه شد. با وجود دامنه تغییرات زیاد در محتوای DNA کروموزوم‌ها، که همگی بسیار ریز بودند، تمام نمونه‌ها، دیپلوئید و ۲n=۳۲ شمارش شدند. حسینی (۱۳۸۸) نیز تعداد کروموزوم‌های رقم هارتلی از *J. regia* را شمارش و آن را دیپلوئید و ۳۲ کروموزومی اعلام نمود. در مطالعات غیرایرانی نیز گونه *J. regia* مورد مطالعه قرار گرفته و با n=۱۶ فرم‌های دیپلوئید (پوگوسیان و همکاران، ۱۹۷۶؛ سارتوریوس و همکاران، ۱۹۹۳؛ یاجیما و همکاران، ۲۰۰۳)، تریپلوئید (تولکی و مک‌گراهان، ۱۹۹۴) و تتراپلوئید (سارتوریوس و همکاران، ۱۹۹۳؛ یاجیما و همکاران، ۲۰۰۳) آن گزارش گردیده است. به این ترتیب مشخص شد مورفوتیپ‌های مورد آزمایش از سطح کروموزومی مشابه برخوردار بوده و تنوع محتوای DNA مشاهده شده در آن‌ها ناشی از تغییر در تعداد کروموزوم‌ها (آنیوپلوئیدی) نمی‌باشد. این احتمال وجود دارد، که تنوع مشاهده شده از نظر میزان DNA ژنومی در بین نمونه‌ها، ناشی از تغییرات گسترده ساختمان کروموزومی در آن‌ها باشد که منجر به تنوع وسیع در مورفولوژی درختان بالا شده است. براساس نتایج این پژوهش، استفاده از فلوسیتومتری به‌عنوان روشی مقرون به‌صرفه، آسان و سریع برای تعیین سطح پلوئیدی گونه‌های این جنس و سایر درختان قابل توصیه است. اگرچه در این روش تعیین تعداد دقیق کروموزوم‌ها، به راحتی مقدور نیست، ولی با استفاده از رابطه نزدیک میان میزان محتوای DNA و به‌خصوص با ارزیابی شاهدهای مناسب اندازه ژنوم گیاهی امکان‌پذیر است. با توجه به نبود ناهنجاری ژنومی بارز در بین نمونه‌های آزمایش شده، استفاده از باندینگ برای یافتن تنوع ساختمانی کروموزومی بین و درون‌گونه‌های آزمایش شده پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1.Agayave, Y.M. 1998. Advanced squash for investigation of plants. Fourth Iranian Congress on crop production and Breeding Science, Isfahan University Technology, Isfahan, Iran, Pp: 1-20. (In Persian)

2.Agayave, Y.M. 2002. New feutures in karyotype stracture and origin of saffron, Crcoussativus L. Cytologia. 67: 245-252.

3.Alishah, O. and Omidi, M. 2008. Plant Cytogenetics. Tehran University Press, 565p. (In Persian)

4.Bakhshi, B., Jaffaraghaei, M., Bihamta, R., Darvish, F. and Zarifi, E. 2008. Ploidy determination of AegilopscylindricaHost. accessions of iran by using flow cytometry and chromosome counting. Iran. J. Bot. 16: 2. 258-266.

5.Ghanadha, M.R., Zahravi, M. and Vahdati, K. 2003. Breeding Horticultural Crops. Dibagaran Tehran Press, 344p. (Translated In Persian)

6.Ghanavati, F. and Eskandari, H. 2000. Relationship between the chloroplast number in stomatal guard cells, Flow cytometry and ploidy level in Onobrychis spp. Seed Plant Improv. J. 27: 1. 427-439. (In Persian)

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

8.Hans, A. 1970. Chromosome numbers in the Juglandaceae. Dep. Bot., Panjab Univ., Chandigarh, Ind. J. Arnold Arboretum. 51: 534-539.

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

10.Hosseiny, F. 2012. Variation Among Species Aegilopsumbellulata Collection of Cytogenetic Characteristics. Thesis For the M.Sc. degree in plant breeding, Islamic Azad University Science and Research, Iran. 75p. (In Persian)

11.Hosseiny, M. and Lotfi, M. 2009. Haploiydy Induction in Walnut by pollen. Sixth Iranian Horticultural Science Congress. In Tehran. (In Persian)

12.Jaffaraghaei, M. 2010. Diversity in Glu-lA locus and Genomic DNA Content in Iranian Morphotypes of wild Triticummonococcum. Thesis for the M.Sc. degree in Agricultural Biotechnology. Shahid Bahonar University of Kerman Faculty of Agriculture, Iran. 111p. (In Persian)

13.Kawara, S., Takata, M. and Takehara, K. 1999. High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Bowen disease. J. Dermatol. Sci. 21: 23-26.

14.Mohammadi, B. 2012. Cytotype Distribution of the Hexaploid and Tetraploid Aegilops crassa Bioss. in Iran. Thesis for the M.Sc. degree in plant Breeding Islamic Azad University Science and Research, Iran. 80p. (In Persian)

15.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.

16.Pogosian, A. and Kartelev, I.V.G.A. 1976. Comparative caryological analysis of two natural botanical varieties of walnut (*Juglans regia* L.). Institut Botanik, Armenia SSR. Biologicheskii Zhurnal Armenii (Hayastani Kensabanakan Handes). 29: 4. 89-91.
17.Lewis, W.H. 1980. Polyploidy in species population, P 103-142. In: W.H. Lewis [ed.], Polyploidy. Biological Relevance, Plenum Press, New York, USA.
18.Ranjbar, M., Naghavi, M., Zali, A., Jaf Faraghai, M. and Zarify, A. 2010. Identification of Aegilopscytotypes from Iran and theirdiscriminat morphological traits. Iranian Crop Sciences. 41: 2. 225-234.
19.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. J. Exp. Bot. 40: 1179-1183.
20.Sartorius, R., Abou-el-Nasr, N. and Stösser, R. 1993. Untersuchung der Chromosomenzahl im Endosperm bei der Walnuss (*Juglans regia* L.). Institut für Obst-, Gemüse- und Weinbau, Universität Hohenheim, 7000 Stuttgart 70, Hohenheim, Germany. Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung. 43: 1-2. 13-15.
21.Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. London, UK: Edward Arnold (Publishers) Ltd.
22.Tulecke, W. and McGranahan, G.H. 1994. The walnut germplasm collection of the University of California, Davis: A description of the collection and a history of the breeding program of Eugene L. Serr and Harold I. Forde, Genetic Resources Conservation Program, Division of Agriculture and Natural Resources. 39p.
23.Yu, K. and Pauls, K.P. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor. Appl. Genet. 86: 788-794.
24.Yajima, M., Nakamura, H., Takahashi, K.,Watanabe, Y., Saito, S. and Yokozawa, Y. 2003. Somatic chromosome numbers of colchicine-treated Shinano walnut (*Juglans regia* L.) and its F1 seedlings. Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65: 4. 677-683.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 21 (3), 2014
http://jwfst.gau.ac.ir

DNA content and ploidy level of Walnut species and inter-specific hybrids by flow cytometry

M. Mosivand[1], *V. Payamnoor[2], D. Hassani[3] and M. Jaffaraghaei[4]
[1]M.Sc. Student, Faculty of Forest Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Faculty of Forest Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Associate Prof., Horticulture Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, [4]Assistant Prof., Genetics and Genetic Resources Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj
Received: 09/07/2013; Accepted: 10/18/2014

Abstract

In this study, for the first time, the possibility of DNA content and ploidy level of species and inter-specific hybrids of walnut for breeding purposes were examined by flow cytometry. In the spring, the young leaves of samples, including of Persian walnut *(J. regia*), black walnut *(J. nigra*), *J. hindsii* and inter-specific hybrids Paradox *(J. hindsii × J. nigra)* and Royale *(J. hindsii × J. regia*) in research station of Karaj, Horticulture Research Department of Seed and Plant improvement In statute were selected, Randomly. DNA content of walnut trees were optimized on the base of tree leaves by method of flow cytometry. In order to comparison and determine the ploidy level, mitotic chromosomes of samples with highest and lowest level of DNA, were counted by method of Agayave (1998 and 2002). Range of mean of DNA content in samples were different from 46.24 to 71.68. However, the samples had equal (2n=32), so morphologic diversity of DNA content were not from changes in the number of chromosomes (Aneuploidy). The use of flow cytometry as an affordable, easy and rapid method for determination of ploidy level and other tree speciesis recommended Walnut and the other trees.

Keywords: Ploidy level, DNA content, Flow cytometry

* Corresponding Authors; Email: mnoori56@gmail.com