

تعیین سطح پلوئیدی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک گیاه سیکلامن (*Cyclamen persicum* L.)

مهسا حسنی فرزاد^۱، اصغر میرزایی اصل^{۲*}، محمد رضا عبداللہی^۲

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲. دانشیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

چکیده

سیکلامن گیاهی چندساله با گلدهی زمستانه است. در این پژوهش ۱۴ گیاهچه حاصل از کشت بساک سیکلامن با روش‌های شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، تراکم و اندازه سلول‌های محافظ روزنه، فلوسایتومتری و نشانگرهای مولکولی بررسی گردید. در بین تعداد کلروپلاست‌ها و تراکم و اندازه طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه بین گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی و گیاهچه‌های مادری تفاوت زیادی وجود نداشت. نتایج فلوسایتومتری مشخص نمود که سطح پلوئیدی گیاهچه مادری و تمام گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک با یکدیگر برابر هستند. در این تحقیق، منشا و تنوع ژنتیکی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن با استفاده از ۵ آغازگر ISSR ارزیابی شدند. پس از تحلیل داده‌های مولکولی مشخص شد که هیچکدام از نمونه‌ها کاملاً از لحاظ ژنتیکی مشابه والد مادری نبوده و حداقل در چند مکان نشانگر بین آن‌ها با نمونه مادری تفاوت وجود داشت. در نتیجه هیچ‌یک از گیاهچه‌ها، حاصل از دیواره بساک نبوده و همگی از دانه گرده منشاء گرفته‌اند. اما با توجه به اینکه نتایج شمارش کلروپلاست، تراکم و اندازه سلول‌های محافظ روزنه و نتایج فلوسایتومتری، دیپلوئید بودن گیاهان حاصل از کشت بساک را تایید کردند به نظر می‌رسد که گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن دیپلوئید خودبه‌خودی هستند.

کلید واژگان: آغازگرهای ISSR، تعداد کلروپلاست، تنوع ژنتیکی، فلوسایتومتری

مقدمه

سیکلامن یا نگونسار (*Cyclamen persicum*) گیاهی چندساله و متعلق به خانواده *Myrsinaceae* پامچال یا *Primulaceae* سابق و دارای ۲۲ گونه می‌باشد (Grey, Wilson, 2003). تعداد کروموزوم‌های گونه سیکلامن در سطح دیپلوئید $2n=2x=48$ می‌باشد. در بین گونه‌های سیکلامن تنها گونه *persicum* به‌عنوان یک گیاه زینتی پر اهمیت در صنعت گل‌کاری استفاده می‌شود. گیاه سیکلامن دارای گل‌های بسیار زیبا و معطر و برگ‌های جذاب است و این مزیت ارزش زینتی آن را دو چندان کرده است (Anderson, 2006). بذره‌های سیکلامن به دو روش خودگشتی و دگرگشتی تولید می‌شوند. اگر خودگشتی تکرار گردد، سبب ایجاد پس‌روی ناشی از خویش‌آمیزی خواهد شد. همین موضوع باعث کاهش گلدهی و همچنین تولید تعداد گل کمتر در این گیاه می‌شود. در برنامه‌های به‌نژادی از طریق کشت بافت، تولید گیاه‌هاپلوئید و گیاهان دابل هاپلوئید در گیاهان زینتی اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Ishizaka, 1993).

سریع‌ترین روش ممکن برای رسیدن به هموزیگوسیتی در این گیاهان، آندروژن می‌باشد. با توجه به اینکه تولید لاین‌های خالص گیاه سیکلامن به روش‌های سنتی، حدود ۹ سال زمان می‌برد، زمان دست‌یابی به لاین خالص گیاه سیکلامن از طریق کشت بافت و آندروژن به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد (Germana, 2011). تعیین سطح پلوئیدی اهمیت فراوانی در تولید لاین‌های دابل هاپلوئید، مطالعه روابط خویشاوندی گونه‌ها، تهیه دورگ‌های بین‌گونه‌ای، مطالعات ژنتیک گیاهان تراریخت و برنامه‌های به‌نژادی دارد. روش‌های مختلف مستقیم و غیرمستقیم جهت تعیین سطح پلوئیدی در گیاهان پیشنهاد شده است. این روش‌ها شامل؛ شمارش کروموزوم‌ها در سلول‌های مریستمی راس ریشه، شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه و بررسی با روش فلوسایتومتری و نشانگرهای مولکولی می‌باشد. تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه انتخاب خوبی جهت بررسی سطح پلوئیدی می‌باشند، پارامترهای دیگری از جمله اندازه و طول سلول‌های محافظ روزنه نیز با سطح پلوئیدی گیاه مرتبط است. در برخی گیاهان که شمارش تعداد کلروپلاست‌ها به علت کوچک بودن آن‌ها مشکل است اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه برگ می‌تواند در تشخیص گیاهان هاپلوئید و دیپلوئید به کار رود.

روش فلوسایتومتری نیز، اندازه‌گیری سطح پلوئیدی را در مراحل اولیه رشد گیاهچه‌های حاصل از کشت میکروسپور را ممکن می‌سازد. از این رو گزینه‌ای سریع و ساده برای تعیین پلوئیدی در مقیاس بزرگ در مراحل اولیه فراهم می‌کند (Ochatt et al., 2008). نشانگرهای مولکولی بخصوص نشانگرهای DNA، از جمله نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هستند که کاربرد گسترده‌ای در تعیین سطح پلوئیدی و تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گونه‌ها دارند. در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی ISSR به‌عنوان ابزاری پر کاربرد جهت تعیین و شناسایی چند شکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است. نشانگرهای ISSR غالب و تابع توارث پذیری ساده مندلی هستند (Reddy, 2002). در ارزیابی تنوع ژنتیکی بسیاری از گونه‌ها، نشانگر ISSR به‌عنوان یک نشانگر قدرتمند، سریع، ساده، ارزان و تکرار پذیر به کار می‌رود (Gonzalez et al., 2002). منشاء آندروژنیک بادمجان باززایی شده حاصل از کشت بساک با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی شده است (Rizza et al., 2002). تنوع ژنتیکی میان ژرم‌پلاس گندم دوروم و همچنین ارقام تجاری گندم نان و خویشاوندان وحشی با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی شده است (Belli, 2007). با استفاده از نشانگر ISSR و ۳۰ نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی بین ۲۲ گونه کرچک مورد مطالعه قرار گرفت است. هر نشانگر ۶/۴ باند چند شکل نشان دادند و در کل ۶۸/۱ درصد چند شکلی مشاهده شد. چهار گونه از گیاه سیدا با ۱۰ نشانگر ISSR مورد مطالعه قرار گرفته است. این نشانگرها ۶۳ مکان ژنومی را شناسایی نمودند که از آن ۶۲ مکان چند شکلی نشان دادند (Thul et al., 2011).

در این تحقیق از گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن، استفاده شد و سطح پلوئیدی آن‌ها به روش‌های مستقیم و غیر مستقیم شامل شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، فلوسایتومتری و نشانگرهای مولکولی DNA، تعیین گردید.

مواد و روش‌ها:

در این تحقیق از گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن و گیاه مادری آن‌ها که در آزمایشگاه کشت بافت دانشگاه بوعلی سینا تولید شده بود، استفاده شد. تعیین سطح پلوئیدی آن‌ها به روش‌های مستقیم و غیر مستقیم شامل شمارش کلروپلاست‌های سلول‌های محافظ روزنه، فلوسایتومتری و نشانگرهای مولکولی DNA، انجام شد.

شمارش تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه و بررسی تراکم و اندازه طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه

در این آزمایش از برگ‌های میانی گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی در شرایط کاملاً استریل زیر هود لامینار نمونه برداری شد. بشره سطح زیرین برگ به وسیله اسکالپل برداشته شد و روی یک لام در قطره‌ای لوگول قرار داده شد و رنگ آمیزی صورت گرفت. پس از قراردادن لامل بر روی لام، نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی $\times 40$ و $\times 100$ مشاهده شدند. تعداد کلروپلاست‌ها در ۲۰ جفت سلول محافظ روزنه برای هر نمونه به تفکیک، مورد شمارش قرار گرفت میانگین و انحراف معیار برای هر نمونه مورد آزمایش، مشخص گردید. بررسی اندازه و تعداد سلول‌های محافظ روزنه، همزمان با شمارش کلروپلاست انجام شد.

تعیین سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم با روش فلوسایتومتری

امروزه فناوری فلوسایتومتری به دلیل آسان بودن و سرعت بالای آن نسبت به سایر فناوری‌ها به عنوان یک روش سریع و دقیق برای اندازه‌گیری ژنوم گیاهی، سطح پلوئیدی، تعیین مقدار DNA و تجزیه و تحلیل سلول‌ها نسبت به روش‌های سیتوژنتیکی و شمارش کروموزوم بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ochatt et al., 2008). نمونه‌برداری از برگ‌های میانی گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن به همراه گیاه مادری و گیاه مرجع استاندارد (گوجه فرنگی)، در شرایط کاملاً استریل زیر هود لامینار صورت گرفت. یک سانتی‌متر مربع از برگ تازه، جوان و کاملاً توسعه‌یافته هر یک از نمونه‌های برگ و گیاه مادری جدا گردید و داخل پتری دیش حاوی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج هسته WPB قرار داده شدند هر کدام از نمونه‌ها

توسط تیغ تیز خرد گردید و هسته سلول‌ها، داخل بافر WPB آزاد شدند. هر نمونه آماده شده، از فیلتر مش نایلونی ۳۰ میکرومتر عبور داده شد و قطعات و بقایای بزرگ بافت‌های گیاهی حذف شدند. در ادامه، مواد فیلترشده در داخل لوله‌های استوانه‌ای مخصوص دستگاه فلوسایتومتر ریخته شد و شماره‌گذاری شدند. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از بافر رنگ‌آمیزی که حاوی رنگ فلوئورسنت پروپیدیوم یداید و آنزیم RNase بود، به هر نمونه اضافه شد. رنگ PI اختصاصی برای رنگ آمیزی DNA ژنومی و RNase برای از بین بردن RNA و جلوگیری از اتصال PI به RNA، به نمونه‌ها اضافه شد (Lorrito et al., 2007). نمونه‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و محل تاریک انکوبه گردیدند. در این مرحله سوسپانسیون هسته جهت انجام فلوسایتومتری آماده شد و به دستگاه فلوسایتومتر BD FACSCantoTM منتقل شد. پس از خوانش نمونه‌ها، هیستوگرامی توسط دستگاه ارائه شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای ISSR

نمونه‌برداری از برگ‌های میانی گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی در شرایط کاملاً استریل زیر هود لامینار انجام شد. استخراج تمام نمونه‌ها توسط کیت استخراج DNA بافت گیاهی شرکت سیناکلون انجام شد. DNA نمونه‌ها در داخل یخچال فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد، کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده، مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از ۵ آغازگر ISSR برای واکنش PCR استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ آغازگر ISSR در حجم ۳ میکرولیتر، Master Mix در حجم ۱۰ میکرولیتر، آب دیونیزه استریل در حجم ۵ میکرولیتر، DNA ژنومی در حجم ۲ میکرولیتر انجام شد. در این واکنش از دستگاه ترموسایکر مدل T100 شرکت BIO-RAD استفاده شد. چرخه حرارتی استفاده شده در این پژوهش شامل واسرشته‌سازی اولیه DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ۵ دقیقه، سپس ۳۴ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت یک دقیقه (دما بسته به آغازگر)، گسترش رشته DNA به

برداری شدند. در نهایت تصویر الگوهای بانندی آشکارسازی شد و جهت امتیازدهی مورد استفاده قرار گرفت.

وسیله آنزیم پلیمرز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و مرحله آخر، چرخه حرارتی با گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. نتایج الکتروفورز در دستگاه ثبت تصویر ژل مشاهده و عکس

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی سطح پلئیدی گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی سیکلان

ردیف	کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد نوکلئوتید	Ta (°C)
۱	P1	(GA)8C	۱۷	۵۲
۲	P2	(CT)8RC	۱۸	۵۴
۳	P3	(AG)8T	۱۷	۵۲
۴	P4	(TG)8A	۱۷	۵۲
۵	P5	(GAC)5	۱۵	۵۹

جدول ۲ آورده شده است. به‌طور کلی از آغازگرهای ISSR در مجموع ۴۷۸ باند به‌دست آمد. آغازگر (GA)8C بیشترین تعداد مکان تکثیر شده (۳۱ مکان) را در بین آغازگرهای استفاده شده، نشان داد. از بین ۸۰ مکان بانندی تولید شده توسط آغازگرهای ISSR، ۷۶ مکان از آن‌ها چندشکلی نشان دادند. در تحقیقات قبل که جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی شیرین بیان از آغازگرهای مشابه بکار رفته در این پژوهش استفاده شده است، میانگین درصد چندشکلی ۹۲/۲ بوده است (Yao et al., 2008) در حالی که آغازگرها ISSR استفاده شده در این پژوهش ۹۴/۲۵ درصد چندشکلی نشان دادند.

با استفاده از فراوانی آلی برای هر آغازگر به‌طور جداگانه، محتوای اطلاعات چندشکلی محاسبه گردید. بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگر 8A (TG) به میزان ۳۴ درصد بود. با توجه به جدول ۲، آغازگرهایی که مقدار PIC بالاتری را نشان دادند، بهتر از بقیه آغازگرها توانستند تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش را مشخص کنند. در این مطالعه آغازگر 8C (GA) با کمترین مقدار PIC قدرت بالایی برای جداسازی نمونه‌ها نداشت. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۳۰ درصد بود که میزان چندشکلی ایجاد شده را به خوبی توجیه می‌کند.

روش‌های آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه خوشه‌ای

برای تجزیه خوشه‌ای از نرم افزار MEGA 6.0 با استفاده الگوریتم تجزیه خوشه‌ای Neighbour-Joining و ضریب فاصله p-distance برای رسم دندروگرام گردید. افرادی که در یک خوشه قرار می‌گیرند، شباهت‌های زیادی دارند و افرادی که در خوشه‌های جداگانه قرار می‌گیرند، تفاوت‌های زیادی دارند. بنابراین اگر طبقه‌بندی به‌طور صحیح انجام گرفته باشد، افرادی که در یک خوشه قرار دارند در نمودار تجزیه خوشه‌ای در کنار هم قرار گرفته و افرادی که در خوشه‌های جداگانه قرار دارند، از هم دورتر خواهند بود. در این روش معیارهای محتوای اطلاعات نشانگرها با شاخص محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) و شاخص نشانگری (MI) و شاخص قدرت تفکیک (Rp) بررسی شد.

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک با آغازگر ISSR

در این پژوهش آغازگرهای ISSR قطعاتی با اندازه طولی از ۲۰۰ تا ۱۲۰۰ جفت باز تکثیر نمودند. خلاصه نتایج به دست آمده برای آغازگرهای ISSR استفاده شده در بررسی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک و گیاهچه مادری در

شاخص نشانگری (MI) معیار کارایی نشانگر در محاسبه چندشکلی را مشخص می‌کند. این شاخص برای هر ۵ آغازگر ISSR استفاده شده در این آزمایش به‌طور جداگانه محاسبه گردید. مقدار این شاخص بین ۲/۷۰ تا ۸/۶۱ بود. میانگین MI به دست آمده، ۴/۴۹ بود. در آغازگر 8C (GA) این شاخص بیشترین مقدار را داشت. این موضوع نشان دهنده این است که هرچه میزان این شاخص بالاتر باشد، کارایی نشانگر در آن ژرم پلاسما را بهتر نشان دهد.

شاخص قدرت تفکیک (Rp) معیار مناسبی برای تمایز آغازگرها می‌باشد. این شاخص بیانگر توانایی یک آغازگر در تمایز افراد مورد بررسی می‌باشد. شاخص قدرت تفکیک (Rp) با تعداد آلل‌های مشاهده شده در الگوی باندهای رابطه مستقیم دارد. با توجه به جدول ۲ بیشترین میزان Rp مقدار ۱۲/۱۳ بوده است که مربوط به آغازگر 8C (GA) است. این آغازگر قدرت تفکیک بالاتری نسبت به سایر آغازگرها داشته است. کمترین میزان شاخص قدرت تفکیک مربوط به آغازگر 8RC (CT) با مقدار ۳/۶۰ بود.

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی سه شاخص PIC، MI و Rp در ۵ نشانگر ISSR استفاده شده بر روی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک

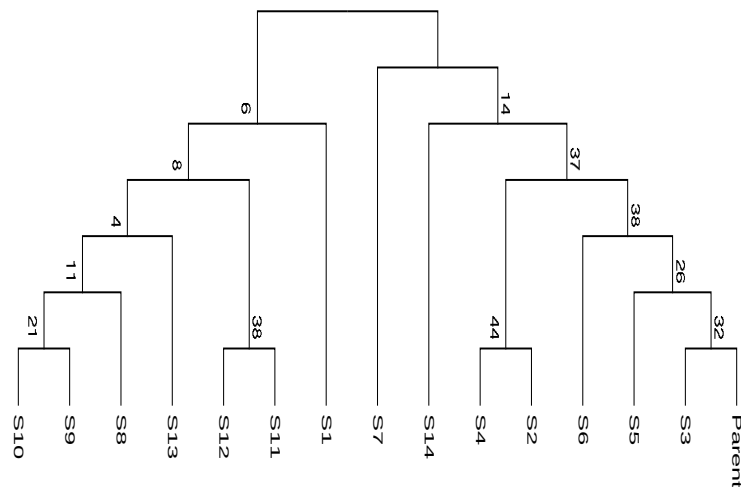
سیکلان و گیاهچه مادری							
شماره	توالی آغازگر	تعداد مکان تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چند شکلی	Rp	PIC	MI
ISSR							
۱	(GA)8C	۳۱	۳۱	۱۰۰	۱۲/۱۳	۰/۲۷۸	۸/۶۱
۲	(CT)8RC	۹	۹	۱۰۰	۳/۶۰	۰/۳۰۰	۲/۷۰
۳	(AG)8T	۱۳	۱۱	۸۴/۶۱	۴/۹۳	۰/۳۱۱	۳/۴۱
۴	(TG)8A	۱۲	۱۲	۱۰۰	۶/۶۶	۰/۳۴۰	۴/۰۸
۵	(GAC)5	۱۵	۱۳	۸۶/۶۶	۵/۰۶	۰/۲۸۴	۳/۶۹
مجموع		۸۰	۷۶	-	۳۲/۳۸	-	-
میانگین		۱۶	۱۵/۲	۹۴/۲۵	۶/۴۷	۰/۳۰۲	۴/۴۹

* (PIC) شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی، (MI) شاخص نشان (Rp) شاخص قدرت تفکیک

نتایج حاصل از ۵ آغازگر ISSR

طی بررسی‌های انجام شده، میزان تشابه گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلان با گیاهچه مادری مشخص شد. این نمونه‌ها در چندین مکان ژنی با والد مادری متفاوت بودند و هیچکدام از آن‌ها نتایج الگوی نواری و دندروگرام کاملاً مشابهی با والد مادری نداشتند. همانطور که در شکل ۱ که حاصل بررسی نتایج کلی از هر ۵ آغازگر ISSR می‌باشد، نشان داده شده است، الگوی نواری نمونه S3 مشابه

نمونه مادری و در دندروگرام حاصل نیز نزدیک به نمونه مادری می‌باشد. اما طی بررسی دقیق الگوی نواری مشخص شد، نمونه S3 در ۱۵ مکان نشانگر با والد مادری متفاوت بوده است. هریک از این مکان‌های ژنی متفاوت بین نمونه‌ها و والد مادری، به‌عنوان یک نشانگر مولکولی لحاظ می‌گردد و بیانگر این است که گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلان، از دانه‌گرده منشأ داشته و حاصل از دیواره بساک نبودند.



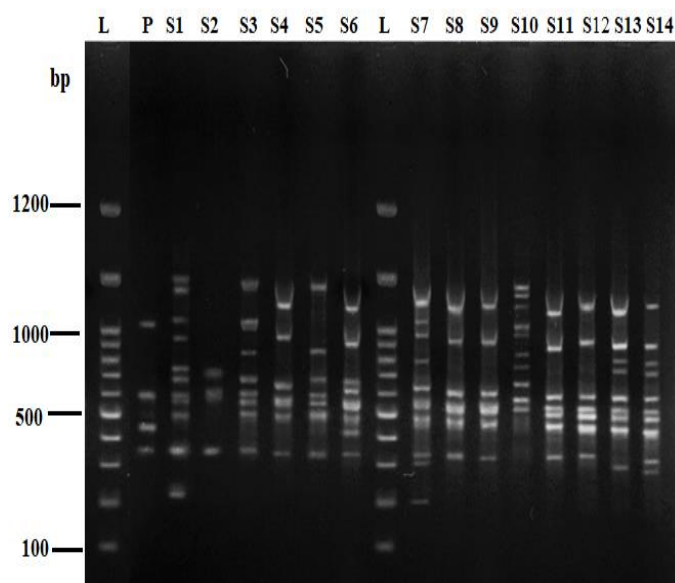
شکل ۱- دندروگرام حاصل از بررسی ۱۵ نمونه گیاهچه حاصل از کشت بساک و گیاهچه مادری (Parent) با استفاده از ۵ آغازگر ISSR

بودند. با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که کلیه گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن، از دانه گرده منشاء گرفته و حاصل از دیواره بساک نبودند. نتایج حاصل از الگوی نواری و همچنین دندروگرام حاصل از هر آغازگر برای تمام نمونه‌ها این موضوع را تایید می‌کند (شکل ۱ و ۲).

بررسی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن و گیاهچه مادری توسط ۵ آغازگر ISSR درصد بالایی از چندشکلی را گزارش نمود (جدول ۳). اما در مقایسه نمونه‌ها با نمونه مادری، هیچ یک از گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک، به‌طور کامل مشابه به گیاهچه مادری نبودند و حداقل در یک مکان نشانگری با گیاهچه مادری متفاوت

جدول ۳- نتایج بررسی مشابه‌ترین نمونه به نمونه مادری ۵ آغازگر ISSR و مجموع آغازگرها

ردیف	آغازگر	مشابه‌ترین نمونه به مادری	مکان‌های ژنی مشابه با مادری	مکان‌های نشانگر متفاوت با مادری	درصد تشابه در دندروگرام
۱	(GA)8C	S11	۳	۵	۲۷
۲	(CT)8RC	S1	۳	۱	۵۴
۳	(AG)8T	S6	۵	۲	۲۶
۴	(TG)8A	S5	۴	۱	۴۲
۵	(GAC)5	S2	۵	۴	۳۸
۶	مجموع آغازگرها	S3	۱۷	۱۵	۳۲



شکل ۲- مقایسه الگوی الکتروفورزی DNAهای تکثیرشده از گیاهچه‌های کشت بساک سیکلامن و گیاه مادری، توسط آغازگر 8C(GA) (در ژل یک درصد آغازز با نشانگر ۱۰۰ bp)

و حاصل از دیواره بساک نبودند. نتایج حاصل از الگوی نواری و همچنین دندروگرام حاصل از هر آغازگر برای تمام نمونه‌ها این موضوع را تایید می‌کند.

تعیین سطح پلوئیدی بر پایه ویژگی‌های میکروسکوپی

شمارش کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه برگ
تعیین سطح پلوئیدی یک گیاهچه مادری و ۱۰ گیاهچه کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن، به روش شمارش کلروپلاست در ۲۰ جفت سلول محافظ روزنه موجود در هر نمونه برگ انجام شد. مقدار حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف معیار تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه مادری و گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی در جدول ۴ آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، تعداد کلروپلاست‌ها در ۲۰ جفت سلول محافظ روزنه گیاه مادری سیکلامن بین ۱۷ تا ۲۵ عدد و در گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک، بین ۱۶ تا ۳۰ عدد تعیین شد. میانگین تعداد کلروپلاست‌ها در گیاهچه دابل هاپلوئید مادری ۲۱/۰۵ و میانگین در گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی ۲۳/۱۵ بود (جدول ۴). در مطالعات انجام شده توسط سایر محققین، همبستگی تعداد کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه با سطح پلوئیدی در

این آغازگرها با توجه به نتایج قابل اعتمادی که از کاربرد آن‌ها در بررسی تنوع و منشاء ژنتیکی گیاهان مختلف به دست آمده است (Redy et al., 2002) در این مطالعه انتخاب شدند. در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی شیرین بیان با استفاده از آغازگرهای ISSR مشابه به آغازگرهای مورد استفاده در پژوهش ما، میانگین درصد چند شکی ۹۲/۲ بوده است (Yao et al., 2008). در حالی که درصد چندشکلی ایجاد شده در این تحقیق توسط این آغازگرها به‌طور میانگین ۹۴/۲۵ بدست آمده است. در بررسی ۲۴ نمونه گیاهچه پنیرک حاصل از کشت بساک با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، کارایی بالای این نشانگرها در تشخیص منشاء نمونه‌ها گزارش شد، به‌طوری که در این بررسی نمونه‌ها و والد مادری کاملاً از یکدیگر تفکیک شدند (Celka et al., 2010).

بررسی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن و گیاهچه مادری توسط ۵ آغازگر ISSR درصد بالایی از چندشکلی را نشان داد. اما در مقایسه نمونه‌ها با نمونه مادری، هیچ یک از گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک، به‌طور کامل مشابه به گیاهچه مادری نبودند و حداقل در یک مکان نشانگری با گیاهچه مادری متفاوت بودند. با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که کلیه گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن، از دانه گرده منشاء گرفته

گیاه گوجه فرنگی، گندم، یونجه، شبدر، سیبزمینی اثبات شده است (Korneef et al., 2009). طبق تحقیقات انجام شده روی گونه هاپلوئید و گونه دیپلوئید گیاه چغندر قند (*Beta vulgaris*) تعداد کلروپلاست در سطح هاپلوئید ۵ الی ۷ عدد و در سطح دیپلوئید ۱۰ الی ۱۲ عدد گزارش شده است (Mushizuki et al., 1995). طبق نتایج حاصل از بررسی بر روی گیاهان هاپلوئید حاصل از کشت بساک توتون (*Nicotiana tobacum*) مشخص شد که تعداد کلروپلاست‌ها در گیاهان هاپلوئید به‌طور تقریبی نصف

گیاهان دیپلوئید بود (Thomas & Rose, 1983). در این پژوهش تعداد کلروپلاست‌ها در بین نمونه مادری و گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن تقریباً نزدیک و مشابه بود. مقدار این تفاوت در گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک، نصف دیپلوئید مادری نبود. در نتیجه نمی‌توان گفت که گیاهچه‌ها هاپلوئید بودند. با توجه به نتایج حاصل‌شده، گیاهچه‌های مورد بررسی دیپلوئید می‌باشند.

جدول ۴- تعداد کلروپلاست در گیاهچه مادری و گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن

انحراف معیار	میانگین	حد اکثر	حداقل	نمونه
۲/۶	۲۱/۰۵	۲۵	۱۷	Parent
۲/۱	۲۰/۳۰	۲۳	۱۶	S1
۲/۷	۲۰/۶۵	۲۵	۱۶	S2
۲/۸	۲۴/۰۵	۲۸	۲۰	S3
۲/۴	۲۵/۰۹	۲۹	۲۲	S4
۲/۳	۲۵/۰۹	۲۹	۲۱	S5
۲/۶	۲۲/۳	۲۸	۱۷	S6
۲/۵	۲۳/۲۵	۲۹	۱۸	S7
۳/۳	۲۳/۵۰	۲۸	۱۷	S8
۲/۷	۲۴/۳	۲۹	۱۹	S9
۳/۱	۲۳/۵۵	۳۰	۱۸	S10

اندازه‌گیری تراکم و طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه

اندازه‌گیری طول و عرض و شمارش تعداد سلول‌های محافظ روزنه اپیدرم زیرین برگ در تعیین سطح پلوئیدی گیاهان کاربرد دارد. شمارش تعداد و بررسی اندازه سلول‌های محافظ روزنه در یک گیاهچه مادری و ۱۰ گیاهچه‌ی کاندید هاپلوئید حاصل از کشت بساک سیکلامن انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی در این آزمایش، همزمان در اسلایدهای میکروسکوپی مربوط به شمارش کلروپلاست هر

نمونه، مورد بررسی قرار گرفت. تمام اندازه‌گیری‌ها بر اساس میکرومتر در جدول ۶ آورده شده است. با توجه به نتایج جدول ۵ تعداد سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه مادری حداقل ۱۰ و حداکثر ۱۲ عدد تعیین گردید که میانگین آن برابر با ۱۱/۴ محاسبه شد. همچنین تعداد سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه‌های کاندید هاپلوئید، حداقل ۶ و حداکثر ۱۲ عدد تعیین گردید که میانگین آن برابر با ۹/۴ محاسبه شد. اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه در گیاهچه مادری و ۱۰ گیاهچه کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن مورد بررسی قرار گرفت. حداقل

حاصل از کشت بساک توتون نشان داده است که در گیاهان دیپلوئید تعداد و اندازه سلول‌های روزنه، به‌طور تقریبی دو برابر گیاهان هاپلوئید است. در هندوانه مشخص شده است که تعداد و اندازه طول و عرض سلول‌های محافظ روزنه موجود در بشره برگ با افزایش سطح پلوئیدی به‌طور تقریبی دو برابر می‌شود (Sarri *et al.*, 1999). با توجه به نتایج بدست آمده و مقایسه آن با نتایج تحقیقاتی که در گذشته انجام شده است، اگر تعداد، اندازه طول و عرض سلول محافظ روزنه در گیاهچه مادری به‌طور تقریبی دو برابر گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک بود، سطح پلوئیدی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک به‌عنوان گیاهچه هاپلوئید قابل گزارش بود. اما با توجه به اینکه اندازه و تعداد این سلول‌ها در گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک به‌طور تقریبی، بسیار نزدیک و مشابه نمونه مادری بود، سطح پلوئیدی گیاهچه‌ها دیپلوئید ($2n=2x=48$) تعیین شد.

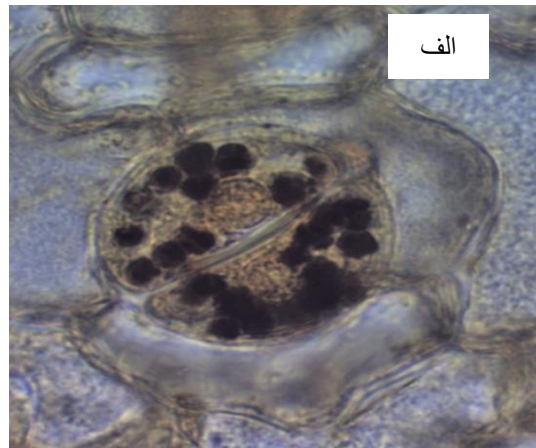
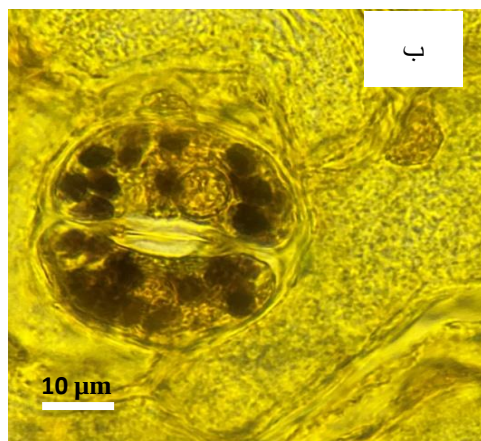
طول و عرض در ۲۰ جفت سلول محافظ روزنه گیاهچه مادری به ترتیب ۳۴ و ۳۲ بود. حداکثر طول و عرض در ۲۰ جفت سلول محافظ روزنه گیاهچه مادری به ترتیب ۵۰ و ۴۶ بود. حداقل طول و عرض در گیاهچه‌های کاندید هاپلوئید ۳۴ و ۳۰ عدد و حداکثر طول و عرض در گیاهچه‌های کاندید هاپلوئید ۵۵ و ۵۳ عدد بود (جدول ۶ و شکل ۳). به‌طور کلی بین نتایج حاصل از اندازه‌گیری حداقل و حداکثر طول و عرض در یک گیاهچه مادری و ۱۰ گیاهچه کاندید هاپلوئیدی تفاوت دو برابری وجود ندارد که تعیین کننده سطح هاپلوئید برای گیاهچه‌های کاندید باشد و این تفاوت کمتر از ۱۰ عدد در تمام فاکتورهای مورد بررسی بود. طی بررسی‌هایی که قبلاً بر روی کلم قمری انجام شده است، مشخص شد که تعداد سلول‌های محافظ روزنه در واحد سطح برگ با افزایش سطح پلوئیدی به‌صورت دو برابری افزایش می‌یابد و اندازه آن‌ها بزرگتر می‌گردد (Dore, 1986). مطالعات انجام شده بر روی گیاهان هاپلوئید

جدول ۵- تعداد سلول روزنه در گیاهچه مادری و گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن

انحراف معیار	میانگین	حد اکثر	حداقل	نمونه
۰/۶	۱۱/۴	۱۲	۱۰	Parent
۰/۸	۷/۹	۹	۷	S1
۰/۹	۹/۲	۱۱	۸	S2
۰/۸	۹	۱۰	۸	S3
۰/۹	۹/۱	۱۱	۸	S4
۰/۹	۶/۹	۹	۶	S5
۰/۷	۹/۱	۱۰	۸	S6
۰/۹	۸/۷	۱۰	۷	S7
۰/۶	۱۰/۹	۱۲	۱۰	S8
۰/۸	۱۰/۸	۱۲	۱۰	S9
۰/۹	۱۱	۱۲	۱۰	S10

جدول ۶- اندازه طول و عرض سلول محافظ روزنه در گیاهچه مادری و گیاهچه‌های کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن

نمونه	طول روزنه (μm)				عرض روزنه (μm)			
	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار
Parent	۳۴	۵۰	۴۳/۷	۵/۰۷	۳۲	۴۶	۴۱/۰۵	۴/۷
S1	۳۴	۵۰	۴۳/۷	۴/۹	۳۳	۴۸	۴۱/۶	۴/۹
S2	۳۴	۵۲	۴۴/۴	۵/۳	۳۰	۴۶	۴۰/۲	۵/۲
S3	۴۰	۵۵	۴۸/۲	۳/۹	۳۰	۴۸	۴۳/۱	۴/۶
S4	۴۲	۴۸	۴۵/۹	۱/۹	۴۰	۵۳	۴۵/۲	۳/۸
S5	۴۰	۴۸	۴۵/۳	۲/۸	۳۵	۴۷	۴۰/۹	۳/۳
S6	۳۴	۴۸	۴۱/۴	۵/۷	۳۰	۴۸	۳۹/۰۵	۵/۷
S7	۴۰	۵۳	۴۶/۸	۲/۷	۳۵	۴۸	۴۳/۶	۳/۸
S8	۳۵	۴۸	۴۵/۹	۳/۰۵	۳۶	۴۸	۴۴/۴	۳/۶
S9	۴۰	۵۳	۴۵/۷	۳/۴	۳۵	۴۷	۴۰/۹	۳/۲
S10	۳۴	۴۸	۴۳/۶	۴/۴	۳۰	۳۷	۴۰/۵	۵/۶

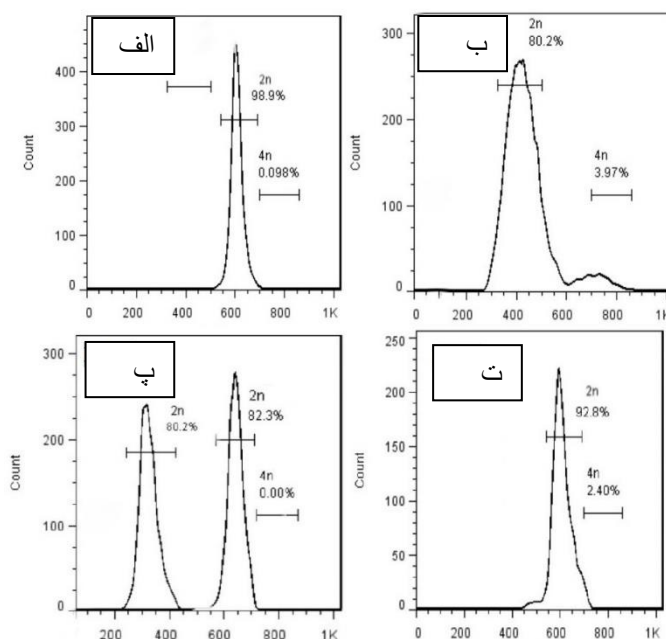


شکل ۳- تعداد کلروپلاست و اندازه طول و عرض سلول محافظ روزنه در گیاهچه مادری و گیاهچه کاندید هاپلوئیدی سیکلامن (الف) گیاهچه مادری سیکلامن (ب) گیاهچه کاندید هاپلوئیدی حاصل از کشت بساک سیکلامن

برآورد اندازه ژنوم و تعیین سطح پلوئیدی با فلوسایتومتری

در این تحقیق، تعداد ۱۱ گیاهچه حاصل از کشت بساک سیکلامن و یک گیاهچه مادری به همراه یک گیاه استاندارد مرجع، توسط دستگاه فلوسایتومتری به منظور تعیین سطح پلوئیدی مورد بررسی قرار گرفتند. در این ارزیابی از گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) رقم ۴۲۲۴ شرکت زیمنس که سطح پلوئیدی آن دیپلوئید ($2n=2x=24$) بود به عنوان گیاه مرجع استاندارد استفاده شد. نتایج حاصل از آنالیز با دستگاه فلوسایتومتری با استفاده از هیستوگرام نمایش داده شد و اندازه پیک هر نمونه بر اساس تابعی از محتوای DNA نمونه‌ها تعیین گردید. محور عمودی گراف، تعداد هسته‌ها و محور افقی، محتوای DNA را نشان می‌دهد. پیک منحنی‌های حاصل از نمونه‌ها در مرحله G1 (مرحله بعد از فاز میتوز) از تقسیم سلولی، مقدار ماده وراثتی یا همان محتوای DNA را به نسبت تعداد سلول‌های تفکیک شده و مورد بررسی، نشان داده است و موقعیت نسبی آن‌ها در مقایسه سطح پلوئیدی را تایید می‌کند. در این پژوهش پیک نمونه استاندارد و گیاه مادری و نمونه‌های هدف به طور نسبی به دست آمد (شکل ۴) که با مقایسه‌ی این نسبت‌ها، سطوح پلوئیدی نمونه‌ها تخمین زده شد. با توجه به اینکه اندازه ژنوم نمونه استاندارد برابر $1/9 \text{ pg}$ و اندازه ژنوم نمونه مادری $3/7 \text{ pg}$ گزارش شده بود، نمودار هیستوگرام آن‌ها هم‌پوشانی نداشت و دو هیستوگرام مجزا از هم تشکیل گردید. در این بررسی، سطح پلوئیدی نمونه استاندارد، دیپلوئید گزارش شده است. با توجه به پیک به دسته آمده بین نمونه مادری و نمونه استاندارد (شکل ۴-پ)، با در نظر گرفتن اختلاف اندازه ژنوم گیاهچه مادری و گیاهچه استاندارد، سطح پلوئیدی گیاهچه مادری، دیپلوئید

($2n=2x=48$) گزارش شده است. با توجه به (شکل ۴-ت)، هیستوگرام حاصل از آنالیز همزمان نمونه مادری و گیاهچه حاصل از کشت بساک، پیک‌های یکسانی گزارش شد که در نمودار هیستوگرام با یکدیگر هم‌پوشانی داشتند. به طور کلی با بررسی شاخص فلوسایتومتری (محتوای DNA)، تمام نمونه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن در این تحقیق، در محدوده دیپلوئید بودند (شکل ۴). با توجه به نتایج نشانگرهای مولکولی ISSR مشخص شد که منشاء گیاهچه‌های حاصل از دیواره بساک نبوده و از لحاظ ژنتیکی تفاوت‌هایی با گیاه مادری دارند که به دلیل هتروزیگوت بودن والد مادری است و به نظر می‌رسد که منشاء گیاهچه‌ها از دانه‌گرده است. در بررسی‌های اولیه کالوس‌های حاصل از کشت بساک گیاه سیکلامن مشخص گردید که این کالوس‌ها هاپلوئید بوده است (نتایج منتشر نشده). در پژوهشی تاثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی از جمله سطوح مختلف کربوهیدرات‌های ساکارز، گلوکز، مانیتول و همچنین استفاده از سطوح مختلف کلشی‌سین، پیش تیمار n -بوتانول، شوک الکتریکی و سانتیفریوژ بر کشت بساک گیاه سیکلامن در محیط جامد B5 مورد بررسی قرار گرفت. کالوس‌های بدست آمده از این تحقیق به مدت بیش از یک سال واکشت شدند و باززایی صورت گرفت. بنابراین می‌توان گفت که دیپلوئید شدن خودبخودی در این کالوس‌ها صورت گرفته است. در گزارش‌های متعددی به دوبر شدن خودبخودی کروموزوم‌ها اشاره شده است. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در کشت بساک سویا، نشان داد که گیاهچه‌های حاصل، دابل هاپلوئید خودبخودی بودند (Cardoso et al., 2004). طی بررسی‌های انجام شده، تولید دیپلوئیدهای خودبخودی ذرت از حاصل از کشت بساک گزارش شده است (Chase, 1952).



شکل ۴- هیستوگرام‌های حاصل از تجزیه تحلیل نتایج فلوسایتومتری؛ نمونه مادری (الف)، نمونه استاندارد (ب)، پیک سمت راست؛ نمونه مادری پیک سمت چپ؛ گوجه فرنگی استاندارد (پ)، پیک نمونه مادری و نمونه حاصل از کشت بساک که همپوشانی دارند (ت).

اندازه طول عرض سلول‌های محافظ روزنه مشخص شد، نتیجه گرفت که گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن دیپلوئید شده‌اند. به دلیل قرارگیری طولانی مدت در محیط کشت بافتی به دیپلوئید خودبخودی تبدیل گردیده‌اند. همچنین نتایج فلوسایتومتری، نتایج حاصل از شمارش کلروپلاست و بررسی‌های سیتوژنتیکی گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن را تایید کرد و مشخص شد که تمام گیاهچه‌ها دیپلوئید بودند.

سپاسگزاری

از دانشگاه بوعلی سینا به دلیل فراهم کردن بودجه این پژوهش، قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از آغازگرهای مولکولی ISSR مشخص شد که هیچ یک از نمونه‌های حاصل از کشت بساک سیکلامن کاملاً از لحاظ ژنوتیپی مشابه والد مادری نبوده و حداقل در چند مکان نشانگری بین آن‌ها با نمونه مادری تفاوت وجود داشت و حتی شبیه‌ترین نمونه نیز به‌طور کامل مشابه نمونه مادری نبود. در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که هیچکدام از گیاهچه‌های حاصل از کشت بساک حاصل از دیواره بساک نبوده و همگی از دانه‌گرده منشاء گرفته‌اند. همچنین با توجه نتایج حاصل شمارش کلروپلاست سلول‌های محافظ روزنه و همچنین تراکم و

منابع

- Anderson, N. O. (2006). Cyclamen. In: Anderson, N. O. Flower Breeding and Genetics. Springer. Netherlands. pp. 459-478.
- Cardoso, M. B., Kaltchuk-Santos, E., Mundstock, E. C. D., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2004). Initial segmentation patterns of microspores and pollen viability in soybean cultured anthers: indication of chromosome doubling. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47, 703-712. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000500005>
- Beli, P. J., & Terzopoulos, P. J. (2007) "Genetic Diversity of Wheat Germplasm Using ISSR Markers". In "Plant Genetic Resources and their Exploitation in the Plant breeding for Food and Agriculture. Slovak Agricultural Research Centre - Research Institute of Plant Production Piestany EUCARPIA, 203 pp.
- Celka, Z., Szczecińska, M., & Sawicki, J. (2010). Genetic relationships between some of Malva species of anther culture as determined with ISSR markers. *Biodiversity Research and Conservation*, 19 (1), 23–32. <https://doi.org/10.2478/v10119-010-0006-2>
- Chase, S. S. (1952). Production of spontaneitydiploids of maize from antheat culture. 44, 263–267.
- Dore, C. (1986). Evaluation du niveau de ploïde des plantes d'une population de choux de Bruxelles (*Brassica oleracea*) origine politique. *Agronomie*, 6(9), 797-801. <https://doi.org/10.1051/agro:19860903>
- Gonzalez, A., Coulson, A., & Brettell, R. (2002) "Development of DNA markers (ISSRs) in mango". *Acta Horticulture*, 575, 139-143. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Germana M. A. (2011). Another culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104(3), 283-30. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.575.13>
- Genovesi, A. D., & Collins, G. B. (1982). In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science*, 22(6), 37-44. <https://doi.org/10.2135/cropsci1982.0011183X002200060013x>
- Grey-Wilson, C. (2003). Cyclamen: A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists, New edition. Batsford, London.
- Hou, Y., Yan, Z., & Wei, Y. (2005). Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. *Genetics Newsletter*, 35, 9-22.
- Ishizaka, H. Junjiro, U. (1993). production of plants from in cyclamenpersicum Mill through another culture. Japanese Journal of Breeding, 43, 207-218.
- Koorneef, J., Vandiepen, A. M., Hanhart, C. J., Kieboom-de Wast, A. C., Martinell, C., Schoenmakers, H. C. H., and Wijbrandi, J. (1989). Chromosome instability in cell and tissue cultures of tomato haploid and diploid. *Euphytica*, 43, 179-186.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa A., & Santos, C. (2007b). Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. europaea var. sylvestris) and portuguese cultivars of O. europaea using flow cytometry. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(1), 21–25. <https://doi.org/10.1007/s10722-006-9115-3>
- Mushizuki, M. (1995). 24th international eucarpia symposium-section ornamentals. Ornamental plant breeding through interspecific hybridization, somatic hybridization and genetic transformation, p.22.
- Ochatt, S. J. (2008). Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry A*, 73(7), 581–598. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20562>
- Reddy, P. M., Sarla, N., & Siddig, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17. <https://doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- Rizza, F., Mennella, G., Collonnier, C., Sihachakr, D., Kashyap, V., Rajam, M. V., Prestera, M., & Rotino, G. L. (2002). Androgenetic dihaploids from somatic hybrids between Solanum melongena and S. aethiopicum group gilo as a source of resistance to Fusarium oxysporum f. sp. melongenae. *Plant Cell Reports*, 22(11), 1022–1032. <https://doi.org/10.1007/s00299-001-0429-5>
- Sari, N., Abak, K., & Pitrat, M., (1999). Comparison of ploidy level screening methods in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Science horticulture*, 3(83), 265-277. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00077-1)
- Thul, T. (2011). Cyclamen. In: Anderson, N. O. (Ed.), Flower Breeding and Genetics. Springer, Berlin, pp. 459–478.
- Thomas, M. R., & Rose, R. J., (1983). Plastid number and plastid structural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration. *Planta*, 158, 329–338. <https://doi.org/10.1007/BF00397335>
- Yao, H., Zhao Y., Chen, D. F., Chenj, K., & Zhou., T. S. (2008). ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of *Glycyrrhiza uralensis*. *Biological Plantarum*, 52 (1), 117-120. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0022-7>

Determination of ploidy level of plantlets obtained from *Cyclamen persicum* anther culture

Mahsa Hassani Farzad¹, AsgharMirzaie-Asl^{2*}, Mohammad Reza Abdollahi²

1. MSc. Graduate, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2. Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 28-09-2024

Accepted: 06-01-2025

Abstract

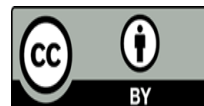
The cyclamen plant (*Cyclamen persicum* L.) is a perennial plant with winter flowering. In this study, 14 plantlets obtained from cyclamen anther culture were investigated using various methods, including determination of the number of the chloroplasts in the stomatal guard cells, stomatal guard cell density and size, flow cytometry, and molecular markers. No significant differences were observed in the number of chloroplasts, stomatal guard cell density, or the length and width of stomatal guard cells between the haploid candidate plantlets and the mother plantlets. The results of flow cytometry indicated that the ploidy level of the mother plant and all plants obtained from another culture was the same. Additionally, this study evaluated the origin and genetic diversity of plantlets obtained from cyclamen anther culture using 5 ISSR primers. Analysis of the molecular data revealed that none of the samples obtained from cyclamen anther culture were genetically identical to the maternal plant. Differences were observed between the samples and the maternal plant at least in some marker loci. As a result, it was concluded that none of the plantlets were derived from the anther wall and all of them originated from pollen grains. However, the results of chloroplast counting in the stomatal guard cells, stomatal guard cell density and size on the lower leaf surface, and flow cytometry confirmed the diploid nature of the plants obtained from another culture. This suggests that all the plantlets obtained from the anther culture of cyclamen are spontaneous diploids.

Keywords: Chloroplast number, Flow cytometry, Genetic diversity, ISSR markers

Citation: Hassani Farzad, M., Mirzaie-Asl, A., & Abdollahi, M. R. (2025). Determination of ploidy level of plantlets obtained from *Cyclamen persicum* anther culture *Plant Production and Genetics*, 6(1), 111-124. [https://doi.org/ 10.22034/plant.2025.142160.1128](https://doi.org/10.22034/plant.2025.142160.1128)

Copyrights:

Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



*Corresponding Author Email: a.mirzaie@basu.ac.ir