دراسة العدد الكروموسومي مع تحليل الهيئة الكروموسومية لنبات Lycium barbarum L. في بعض مناطق جنوب العراق .

م.محمد عباس عبد علي

كلية العلوم / جامعــة ميســان

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية حساب العدد الكروموسومي الاحادي 1n=12 والعدد الكروموسومي الثنائي 2n=24 لنبات العوسج Lycium barbaum L. الذي يعود الى العائلة (Solanaceae) والتي تضم اكثر من ٨٣ نوعا ، كما وجد منتشرا في مناطق مختلفة من محافظتي البصرة وميسان من جنوب العراق . كما تمكنت الدراسة الحالية من تحليل الهيئة الكروموسومية karyotyp analysise وكذلك تحديد الانماط الكروموسومية لهذا النوع وشوهدت بعض الاطوار الكروموسومية كالطور التشتتي Diakinesis والطور الانفصالي المتأخر Late anaphase والطور النهائي وتكوين الرباعيات Tetrade ولم يلاحظ اي نوع من الشذوذ الكروموسومي في نبات العوسج.

Chromosome number and karyotype studies of Lycium barbarum L. (Solanaceae) in some region of south of Iraq.

In the present study, included the current account chromosomes number of the haploid number were found 1n = 12 and n chromosomal diploid number were also recorded as 2n = 24 to the species Lycium barbaum L. Which to the family (Solanaceae), which includes more than 83 species, also found widespread in different region of the provinces of Basra and Missan in southern of Iraq. The current study was able to analyze the aberrations karyotyp analysis as well as identifying chromosomal phases of this species were seen some phase of cellular phones which appear clearly as a Diakinesis and Late anaphase as well as telophase The Tetrade phase, did not notice any type of chromosomal aberrations in the Lycium barbarum L.

المقدمة

ان للمعلومات الخلوية أهمية كبيرة لبيان العلاقات الوراثية والتطورية بين الأنواع ، ومن السمات المهمة في الدراسات الخلوية ما يتعلق منها بصفات الكروموسومات كما في العدد والمظهر والسلوك في الانقسام الاختزالي (Stibbins , 1971) ،ويعد تحليل الهيئة الكروموسومية Karyotype مهما وذلك لوصف التغايرات العددية والتغايرات الهيكلية التي تطرأ على الكروموسوم وذلك في العدد والحجم والنسبة الذراعية والتي يمكن ان تختلف حتى بين الأنواع الشديدة القرابة (Levin , 2000).

تفتقر اغلب الأنواع النباتية في العراق الى الدراسات الخلوية فيما عدى دراسة المياح (1977) لأعداد وأشكال وسلوك الكروماسومات لأنواع من عائلة Leguminoseae التي توضح أهمية الدراسة الخلوية على مستوى العائلة ، وهناك دراسات خلوية أخرى على الصعيد المحلي منها دراسة المشهداني (1977) لجنس Aegilops في العراق تناولت تحليل الهيئة الكروموسومية مع بيان أهمية بعض الصفات الوراثية التي يمكن ان تنقل الى الحنطة المحلية لتحسين بعض الصفات النوعية من خلال عمليات التهجين ، ودراسة Al-Musawi(1978) ،ذ تضمنت دراسة العددين الكروموسومين الأحادي والثنائي مع تحليل الهيئة الكروموسومية لجنس Hyoscyamus.ودراسة الحلفي (1993) لأثنى عشر صنفا زراعيا من النخيل مع تحليل الهيئة الكروموسومية لهذه الأصناف الزراعية ، ودراسة لفتة (1996) لأنواع جنس Atriplex في العراق،كما أجرت الربيعي (1998) دراسة خلوية لأنواع من جنس Zizphus ، ودراسة العيداني (1998)لعائلة Convolvulaceae ، ودراسة السعدي (1999) لأنواع جنس Datura ، ودراسة الربيعي (2008) التي تناولت فيها دراسة كروموسومية لبعض أنواع عائلة الحنطة السوداء .

كما أجريت دراسات كروموسومية حديثة في مناطق مختلفة من العالم منها دراسة Turki et al (2000) لأعداد الكروموسومات الثنائية لاحدى وثلاثين صنفا تعود لأربع عشرة عائلة من النباتات الزهرية مع تحليل الهيئة الكروموسومية لبعض منها ، وأشار Singhal & Kumar (2008) إلى ظاهرة Cytomixis في خلايا الام لحبوب اللقاح في الأنواع الثنائية والرباعية التضاعف المجموعي للنوع Withania somnifera.

المواد وطرائق العمل

اولا- جمع العينات

جمعت البراعم الزهرية Floral buds من النباتات مباشرة وهي في الحقل بطريقة عشوائية وذلك بأخذ عدد من البراعم أو ألأنظمة الزهريةInflorescences من عدة نباتات تعود لنفس النوع في المنطقة الواحدة وحفظت في المثبت Fixative مباشرة في قناني صغيرة Vials بعد ترقيمها ثم جمعت بضعة نباتات للنوع الذي اقتطفت منه البراعم ورقمت بنفس رقم القنينة الحاوية على البراعم ،أما البذور فقد حفظت في أكياس من الورق ورقمت بنفس الطريقة التي اتبعت للبراعم الزهرية وقد تم كبس وتجفيف بعض النباتات من أللأنواع التي جمعت منها البراعم أو البذور لغرض ايداعها في معشب كلية العلوم - جامعة البصرة وقد تم جمع البراعم الزهرية والبذور من خلال اجراء عدد من السفرات العلمية الى مناطق مختلفة من محافظة البصرة ولفترتين ألأولى من 15 /3 / 2009 ولغاية 20 / 7 / 2009 والثانية من 15 / 2 / 2010 ولغاية 20 / 7 / 2010.

ثانيآ- القتل والتثبيت

أ-البراعم الزهرية

ثبتت البراعم الزهرية لجميع الانواع المدروسة بمثبت كارنوي الاول وألذي يتكون من ثلاثة حجوم من الكحول الاثيلي المطلق مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي Glacial acetic Acid بتركيز 45%، وضعت البراعم او الأنظمة الزهرية في المثبت مباشرة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة ثم سكب المثبت وغسلت البراعم بالكحول الأثيلي بتركيز 70% مع الرج بين فترة وأخرى وحفظت القناني في ألثلاجة بدرجة 4 مئوية لا ستعمالها مباشرة وخزن بعضها بدرجة -20 مئوية لحين الأستعمال (Darlington & Lacour,1962).

ب- الجذور

وضعت البذور في اطباق زجاجية Pitri dishes بعد وضع ورقة ترشيح Filter paper وغطيت البذور بورقة ترشيح مبلله بالماء، وترك بعضها بدرجة حرارة الغرفة والبعض الأخر بدرجة 25 مئوية في الحاضنة

لحين الإنبات وعند وصول أطوال ألجذور من0.5 – 1 سنتيمتر قطعت أطرافها وتم معاملها الجذور بمحلول Colchicine بتركيز 0.5% لمدة 2-3 ساعات بدرجة حرارة الغرفة وذلك كمعاملة مسبقة Pretreatment لجذور معظم الأنواع كما استخدمت مادة

8-Hydroxyqunoline للانواع المتبقية من الجذور كمعاملة مسبقة بدلا عن Colchicin. وتضح من خلال العمل ان مادة Colchicine هي الأفضل عند الاستخدام كمعاملة مسبقة، كما وجد ان مثبت كارنوي الأول يؤدي الى زيادة تصلب الأنسجة في اغلب الأحيان لذلك ينصح باستعمال Hcl (1N) كمادة مفككة تساعد على التقليل من صلابة نسجه المتوك والجذور.

ثالثآ- تحضير الصبغة

استعملت صبغة Aceto– Carmine بتركيز 2%،اذحضرت الصبغة بأضافة

2 غم من الصبغة الى دورق يحتوي على 100 سنتيمتر

مكعب من حاامض الخليك الثلجي G. A. A %45 وسخن المزيج على نار هادئه في حمام مائي لمدة 30 - 45 دقيقة ثم ترك ليبرد بعد ذلك رشحت الصبغة بورق ترشيح Watman.No.1 لمرتين متتاليتين وحفضت في الثلاجة لحين الاستعمال.

رابعآ- تحضير الشرائح

استعملت طريقة الهرس Squash method في جميع الشرائح المحضرة لأعطائها نتائج افضل ولأغلب الانواع المدروسة.

تحضير الشرائح من البراعم الزهرية

لدراسة وحساب عدد الكروموسومات من خلايا الأم لحبوب اللقاح (PMC) أوخذ البرعم أو النظام الزهري المحفوظ في الكحول الأثيلي بتركيز 70% ووضع في حامض الهيدروكلوريك (Hcl) المخفف (1N) بدرجة الغليان لبضعة ثواني ثم غسل بالماء الحار لعشرة دقائق ثم بماء الحنفية لخمس دقائق بعدها ترك في الماء للاستعمال المباشر، بعد ذلك وضع البرعم على شريحة زجاجية نظيفة وأضيف أليه قطرة من 45% حامض الخليك الثلجي ،ثم هرس بواسطة ابرتي تشريح هرساً دقيقاً بعدها أضيفت قطرة من صبغة Aceto-Carmine وباستعمال أبرة تشريح قديمة سحقت المتوك في الصبغة لمرة ثانية وذلك لزيادة الهرس وأعطاء الصبغة كمية من آيون الحديديك ، بعدها وضع غطاء الشريحة برفق لمنع تكوين الفقاعات وبواسطة النهاية الصلبة لأبرة التشريح ضرب بالطف عدة ضربات سريعة ومستمرة على غطاء الشريحة لعزل الخلايا وتوزيعها بشكل متساوي واخراج الفقاعات الهوائية ثم سخنت الشريحة على لهب مصباح غازي 4-5 مرات متتالية مع تجنب غليان الصبغة ، ثم وضت الشريحة بين طيات ورقتي ترشيح وضغطت بالأبهام بقوة، بعدها فحصت الشرائح بواسطة المجهر الضوئي تحت العدسةالشيئية الصغرى ثم العدسة الكبرى الجافة بعدها بواسطة العدسة الزيتية بعد وضع قطرة من زيت العدسات على الشريحة .صورت النتائج بكاميرا رقمية 12.3ميكابكسل نوع Sony W230 ذات منشأ ياباني.

تحضير الشرائح من القمم الجذور النامية

تم قطع الجذور التي أطوالها بين (0.5-1) سنتيمتر ووضعت في قنينة زجاجية صغيرة تحتوي على حامض Hcl (1N) وسخنت على مصباح غازي حتى الغليان ، بعدها تم غسل الجذور بالماء الحار ثم بالماء البارد لمدة 15-30 دقيقة ، أغمرت الجذور بعد ذلك بحامض ألخليك الثلجي لمدة 10 – 15 دقيقة ثم وضعت في الصبغة لفترة 6 - 12 ساعة ،ثم وضعت الجذور (1-2) على شريحة زجاجية نظيفة وأزيلت القلنسوة Root cap ،بعدها أوخذ 1-2 مليميتر من طرف الجذر وأضيفت اليه قطرة من صبغة Aceto-Carmine الحاوية على ايون الحديديك ثم وضع غطاء الشريحة ،وضعت الشريحة بين طيتي ورقة ترشيح وضغطت بالأبهام بقوة بعدها فحصت الشرائح باستخدام المجهر الضوئي تحت العدسة الشيئية الصغرى ثم الكبرى الجافة ثم بالعدسة الزيتية بعد وضع قطرة من زيت العدسات على الشريحة ،صورت النتائج بواسطة كاميرا رقمية 12.3 ميكا بكسل نوع Sony W230 ذات منشأ ياباني.

تحليل الهيئة الكروموسومية

فحصت الشرائح بالمجهر الضوئي وتم اختيار الخلايا ذات الانقسامات في الطور الاستوائي والتي ظهرت فيها الكروموسومات معزولة عن بعضها بشكل واضح .صورت النتائج بواسطة كاميرا رقمية 12.3 ميكا

بكسل نوع Sony W230 ذات منشأ ياباني، وحسب عدد الكروموسومات للنوع قيد الدراسة ثم قيس الطول الكلي لكل كروموسوم بالمايكروميتر وحدد طول الذراعين الطويلة والقصيرة لغرض أيجاد النسبة الذراعية التي حسبت بقسمة طول الذراع الطويلة على طول الذراع القصيرة ، وقد حدد على أساسها نوع الكروموسوم من حيث موقع الجزء المركزي . فكانت النسبة الذراعية من 1–1.7 في الكروموسوم وسطي الجزء المركزي Metacentric ومن 1.7-3 في الكروموسوم تحت وسطي الجزء المركزي Submetacentric ومن 3- 7 في الكروموسوم تحت طرفي الجزء المركزي Subacrocentric ومن 7- ∞ يكون طرفي الجزء المركزي Acrocentric و في الكروموسوم النهائي الجزء المركزي Telocentric(Stace, 1980)، كما حسب الطول النسبي لكل كروموسوم وذلك بجمع الأطوال الكلية لكروموسومات الخلية الواحدة لكل نوع ثم حسبت النسبة المئوية لكل كروموسوم نسبة الى المجموع ،أخذت ألقياسات لمعدلات 6-8 قراءات من كل كروموسوم في النوع الواحد بعدسة عينية متدرجة ،ثم رسمت الهيئة الكروموسومية اعتمادا على تدرج الكروموسومات في الطول وموقع الجزء المركزي.

النتائج

حسب العدد الكروموسومي الثنائي (2n) في خلايا النوع *Lycium barbarum* وتبين ان 2n = 24 كعدد كروموسومي ثنائي (اللوحة) والتي تباينت في اطوالها ، اذ انها تحتوي على زوج كروموسومي واحد طويل وثلاثة أزواج كروموسومية متوسطة الطول وثمانية أزواج كروموسومية صغيرة كما موضح في (الجدول ١) ، وانها تحتوي على تسعة أزواج كروموسومية متوسطة الجزء المركزي *metcentric* تمثلت بالازواج الكروموسومية الثاني والثالث والسادس والسابع والثامن والتاسع والعاشر والحادي عشر والثاني عشر وثلاثة أزواج كروموسومية تحت وسطية الجزء المركزي *Submetacentric* هي الأزواج الكروموسومية الأول والرابع والخامس ، كما امكن تتبع بعض مراحل الانقسام الخيطي المختلفة mitosis كالطور الشتتي Diakinesis والطور الاستوائي وبداية تكون خيوط المغزل *metaphase & spendle* كما موضح في (الجدول 16 والشكل 6 واللوحة 16) .

الجدول (1)

الأعداد الكروموسومية المسجلة في الدراسة الحالية والدراسات السابقة للعوسج *Lycium barbarum*

ت	الأنواع	نتائج الدراسات الحالية		نتائج الدراسات السابقة		المصادر
		العدد الأحادي	العدد الثنائي	العدد الأحادي	العدد الثنائي	
١	Lycium barbarum	12	24	12	24	Darlington & wyle 1955 ; Fedrov 1969 , Bernardello 1982 ; chiang 1982 Bernardello et al , 2008

جدول (٢)

تحليل الهيئة الكروموسومية في النوع *Lycium barbarum*

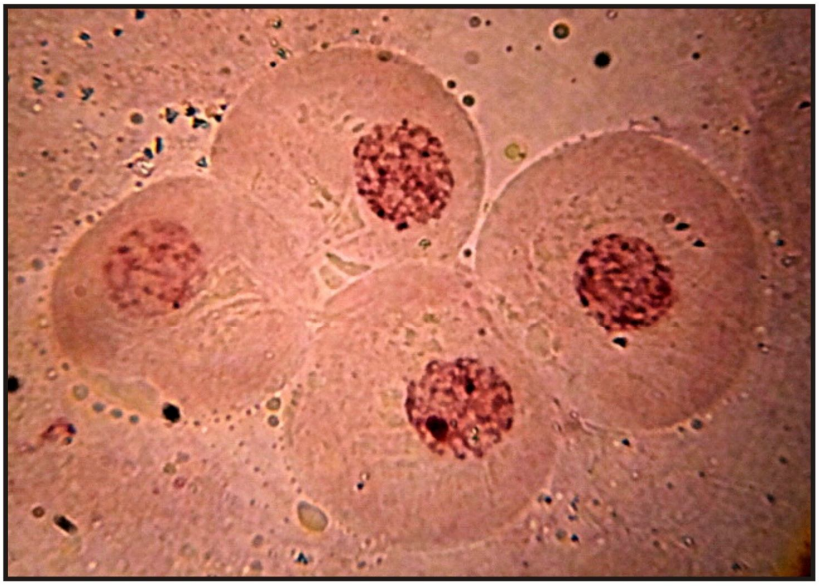
رقم الكروموسوم	معدل طول الكروموسوم	طول الذراع الطويل	طول الذراع القصيرة	النسبة الذراعية	موقع الجزء المركزي	الطول النسبي للكروموبوم
1	3.25	2.1	1.15	1.82	Sm	10.20
2	3.1	1.8	1.3	1.38	M	9.73
3	3.1	1.6	1.5	1.06	M	9.73
4	2.9	1.9	1.0	1.9	Sm	9.10
5	2.5	1.8	0.7	2.57	Sm	7.84
6	2.5	1.5	1.0	1.5	M	7.84
7	2.5	1.3	1.2	1.08	M	7.84
8	2.3	1.4	0.9	1.55	M	7.22
9	2.2	1.3	0.9	1.44	M	6.90
10	2.2	1.2	1	1.2	M	6.90
11	2.2	1.3	0.9	1.44	M	6.90
12	2.0	1.0	1.0	1.0	M	6.26
	31.85					

Lycium barbarum

سجل العدد n = 12 كعدد كروموسومي احادي في طور Diakinesis ، اذ لوحظ وجود 12 ثنائية كروموسومية bivalentes مع وجود 4 قطع ، كما امكن تتبع بعض الأطوار الأخرى من الانقسام الاختزالي كالطور Late anaphase 1 ومرحلة تكوين الرباعيات Tetrades (اللوحة ٢) .

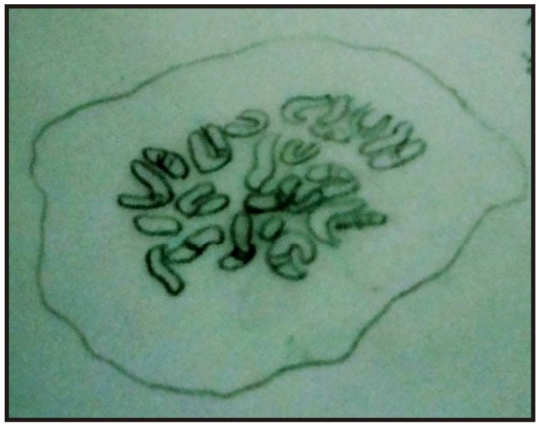
300x Diakinesis N=12

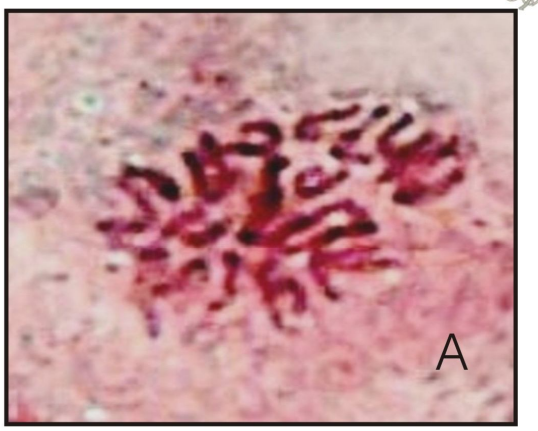
Late anaphase 1



Tetrade

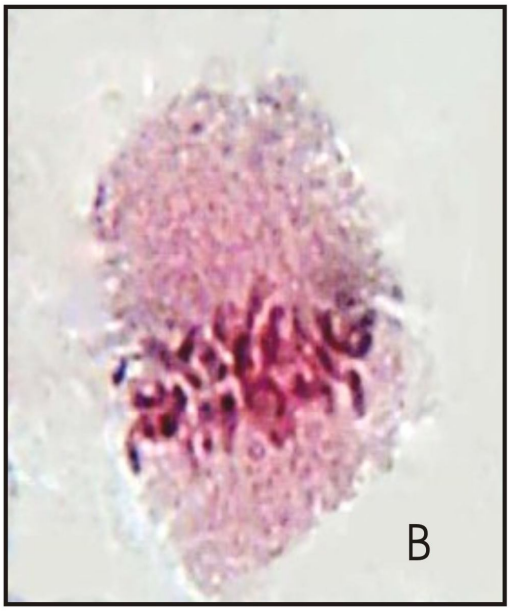
لوحة(5)توضح الاطوار الخلوية المختلفة في النوع *Lycium barbarum* (250x)





300x Diakinesis 2n=24

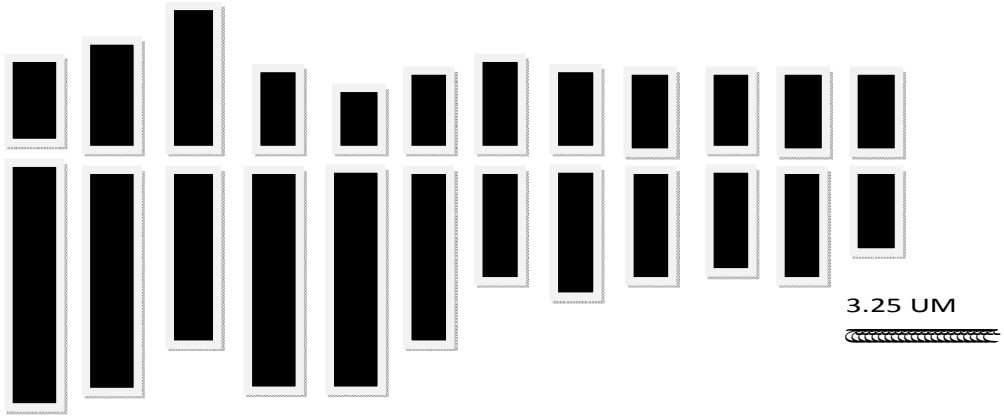
200x Metaphase&Spindle



250x Anaphase

لوحة(16)توضح الاطوار الخلوية المختلفةفي الأنقسام المباشر في النوع *Lycium barbarum*

C : عملية تكون خيوط المغزلSpindle في نهاية طور Metaphase



Lycium barbarum (1)

المناقشة

لم تتوفر دراسة كروموسومية للنوع البري العوسج *Lycium barbarum* ، كما ان الدراسات في العالم امتازت بقلتها ، تمكنت الدراسة الحالية من حساب العدد الكروموسومي الأحادي
كما سجل n = 12 كعدد كروموسومي احادي و 2n = 24 كعدد كروموسومي ثنائي في النوع *Lycium barbarum* وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه الباحثون (Darlington and Wyle , 1955 ; Fedrov , 1969; Bernardello , 1982 ; Chiang , 1982 ; Bernardello *et al* ., 2008)
ذكر Darlington and Wylie (1955) ان العدد الكروموسومي الأحادي n = 12 و 2n = 24 كعدد كروموسومي ثنائي في النوع وهذه النتائج لا تتفق مع ما توصلت اليه الدراسة الحالية اذ سجل n = 11 كعدد كروموسومي احادي في خلايا الام لحبوب اللقاح (PMC) كما سجل 2n = 22 كعدد كروموسومي ثنائي في خلايا طرف الجذر .
وجد Darlington and Wylie (1955) ان العدد الكروموسومي الأحادي n =١٢
كما اظهرت الدراسة الحالية وجود العديد من الأطوار والتي تظهر الكروموسومات بصورة واضحة وقد حددت الأطوار الكروموسومية ومنها الطور الاستوائي الأول والانفصالي الأول والاستوائي الثاني والنهائي الثاني اعتمادا على جاردنر وبيتر سنستاذ (١٩٩٩) .

تباين الأنماط الكروموسومية

اختلفت نسبة وجود الأنماط الكروموسومية في النوع *Lycium barbarum* إذ شكلت نسبة ٩ وسطية الجزء المركزي إلى ٣ تحت وسطية الجزء المركزي ٩ : ٣ ،
كما بينت النتائج وجود اختلاف في معدل طول كل كروموسوم وفي طول الذراعين الطويلة والقصيرة ، ولوحظ ان الكروموسومات وسطية الجزء المركزي كانت الاكثر شيوعا في الأنواع المدروسة وبنسبة بلغت ٨ ٧١ % تليها الكروموسومات تحت وسطية الجزء المركزي اذ بلغت ٤ ٢٢ % بينما شكل النمط الكروموسومي تحت الطرفي اقل نسبة مئوية ٨ ١ % في حين سجلت الكروموسومات الطرفية الجزء المركزي نسبة مئوية ٢ ٣ % ، ولم تشاهد اي زوائد كروموسومية الا انه لوحظ وجود بعض حالات عدم الانتظام الكروموسومي والتي يمكن ان تسهم في تكوين او نشوء أنواع جديدة .

تحليل الهيئة الكروموسومية المتناظرة وغير المتناظرة

عدت الهيئة الكروموسومية متناظرة *Symmetrical karyotype* عندما تكون نسبة طول اصغر كروموسوم الى طول أكبر كروموسوم في المجموعة الكروموسومية ≤ ٠.٥ ، وتعد الهيئة الكروموسومية غير متناظرة *asymmetrical karyotype* في حالة كون النسبة اقل من < ٠.٥ (Stebbins 1971) والذي اوضح ان الهيئة الكروموسومية متناظرة عندما تكون الكروموسومات متساوية او متقاربة في حجمها او عندما يكون موقع الجزء المركزي في الكروموسومات وسطي او تحت وسطي او وجود كلتا الحالتين معا وان الميل نحو حالة عدم التناظر تحصل عندما يتغير موقع الجزء المركزي من الوسطي إلى تحت الطرفي او الطرفي ، بحيث تصبح الهيئة الكروموسومية مختلفةاكثر.

ويستدل من الجدول (١٦) تميز النـــــــوع *Lycium barbarum* بهيئة متناظرة *Symmetrical karyotype* وهذه النتائج تتفق مع Stiefkens *et al* (2010) .

Reference **المصادر**

- Bernardello L . M . (1982) . Estudios en Lycium (Solanaceae) . ll . Recuentos cromosomicos en entidades argentinas . Hickenia , 1 : 321 – 328 .
- Bernardello G . , Stefkens L . , and Las Penans M . L . (2008) . Karyotype Studies in Grabowskia and pd – rodus (Solanaceae) . plant Systematies and Evolution , 275 : 265 – 269.
- Bir S . S . , Neelam. (1984). SOCGI plant Chromosome number reports LXII \\ J - cytol . Genet 19 : 113 – 114.
- Bir S . S . , Kumari S . , Shoree S . P , Saggoo M . S . (1978). Cytological studies in certain Bicarpellatae from north and central India \\ J - cytol . Genet 13 : 99 – 106 .
- Chakravarty , H . L . (1976) . Plant weath of Iraq . vol um one , Baghdad , Ministry of Agriculture and Agrarian Reform , Iraq.
- Chiany , Cabrera F . , (1982) . Estudios cromosom – icos en Lycium (Solanaceae)deNorteamerica . Boletin dela Sociedad Botanica de Mexico, 43:9 – 23 .
- Darlington C . D and L . F . Lacour . (1969). The Handling of chromosome , 4th ed . George . Allen and Unwin , London 272 pp.
- Fedorov A . , (Ed) , (1969) . Chromosome numbers of flowering plants . V . L . Komarov Bot . Inst , Reprinted . Koeningstein : Koeltz Sci . Publ . , Leningrad , 1974.
- Bernardello L . M. (1982) . Estudios en Lycium (Solanaceae) . ll . Recuentos cromosomicos en entidades argentinas . Hickenia , 1 : 321 – 328 .
- Bernardello G . , Stefkens L . , and Las Penans M . L . (2008) . Karyotype Studies in Grabowskia and pd – rodus (Solanaceae) . plant Systematies and Evolution , 275 : 265 – 269.
- Bir S . S . , Neelam. (1984). SOCGI plant Chromosome number reports LXII \\ J - cytol . Genet 19 : 113 – 114.
- Bir S . S . , Kumari S . , Shoree S . P , Saggoo M . S . (1978). Cytological studies in certain Bicarpellatae from north and central India \\ J - cytol . Genet 13 : 99 – 106 .
- Chiany , Cabrera F . , (1982) . Estudios cromosom – icos en Lycium (Solanaceae) de Norteamerica . Boletin dela Sociedad Botanica de Mexico , 43 : 9 – 23 .
- Darlington C . D and L . F . Lacour . (1969). The Handling of chromosome , 4th ed . George . Allen and Unwin , London 272 pp.