مطالعه کاریوتیپی گونه‌هایی از جنس *Stipagrostis*

آناهیتا شریعت[1]، حسین میرزایی ندوشن[1] و امیر مداح[2]

چکیده

در اصلاح ژنتیکی هر گونه گیاهی، داشتن اطلاعات کافی در خصوص سطح پلوئیدی و ویژگیهای کاریوتیپی از مهمترین نیازهای اولیه می‌باشند. با توجه به اهمیت جنس *Stipagrostis* در تثبیت شنهای روان، مقاومت به خشکی و شوری و ارزش علوفه آن در احیا و استفاده از عرصه‌های طبیعی در مناطق خشک و نیمه خشک، مطالعه این جنس بسیار ضروری است. در ایران گونه‌ها و توده‌های مختلفی از جنس *Stipagrostis* وجود دارند که مطالعات بسیار اندکی در مورد آنها انجام شده است. در خصوص مطالعات سیتوژنتیکی این جنس هیچ مطالعه‌ای در ایران صورت نگرفته و در سطح دنیا نیز مطالعات بسیار محدودی انجام شده است.

در این مطالعه ۵ جمعیت از سه گونه *Stipagrostis pennata*، *Stipagrostis plumosa* و *Stipagrostis karelini* مورد مطالعه قرار گرفت و دو سطح پلوئیدی در آنها مشاهده گردید. گونه *Stipagrostis pennata* تتراپلوئید (۲n = ٤x = ٤٤) و گونه‌های *Stipagrostis plumosa* و *Stipagrostis karelini* دیپلوئید (۲n=۲x=۲۲) بودند. همچنین مشخصات کروموزومی گونه‌ها شامل طول بازوی کوتاه، طول بازوی بلند و طول کل کروموزوم و نسبت طول بازوی کوتاه به طول بازوی بلند و نسبت طول بازوی بلند به طول بازوی کوتاه مورد بررسی قرار گرفت. بعد میانگین مشخصات کروموزومی محاسبه شده و ایدیوگرام هر جمعیت ترسیم گردید و در نهایت مولفه‌های تقارن کاریوتیپی نظیر TF٪، DRL، S٪ جهت

---

۱ - مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱٦-۱۳۱۸۵

۲ - مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام سمنان

سنجش تقارن کاریوتیپی مورد محاسبه قرار گرفت تا جهت مقایسه کاریوتیپهای مورد نظر مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *Stipagrostis*، کاریوتیپ، پلی‌پلوئید

مقدمه

تنوع و غنای گونه‌های مرتعی در بیابانهای خشک بسیار کم است که تنشهای متعدد محیطی و تراکم و فراوانی نسبی کم گونه‌ها از عمده‌ترین دلایل آن می‌باشد. وجود چراگاههای مرغوب که دارای گونه *Stipagrostis plumosa* هستند باعث ایجاد علفزارهای وسیعی در سرزمینهای نیمه تثبیت شده شنی بیابانهای اطراف کاشان شده است که یکی از با اهمیت‌ترین منابع ژنتیکی گیاهی است و علاوه بر تثبیت و حفاظت خاک و جلوگیری از فرسایش بادی، نقش مهمی را در تولید علوفه مورد احتیاج دامها بازی می‌کند. حسین بتولی (۲۰۰۱) در مطالعه‌ای به بررسی اکولوژیکی علفزارهای *S. plumosa* در بیابانهای شنی دشت کاشان پرداخته است. به دلیل گستردگی سیستم ریشه‌ای و سازگاری اکولوژیکی بالا در مقابل استرسهای متعدد محیطی، به ویژه خشکی طولانی، گونه *S. plumosa* یکی از مقاومترین و سازگارترین گیاهان در صحرا می‌باشد. مطالعات نامبرده شرایط پوششی مناطق رویشی *S. plumosa*، سرعت تولید علوفه در هکتار و خواص فیزیوشیمیایی خاک، شرایط فیزیوگرافیکی مناطق رویشی، اهمیت سیستم ریشه‌ای، ساقه‌ها و روش تجدید طبیعی و زادآوری گیاه را نشان داد. علاوه بر این، اثر چرای نامنظم، به ویژه در چراگاههای از بین رفته *S. plumosa* و وجود فرسایش بادی مورد بررسی قرار گرفت.

Stipagrostis scoparia یک گونه چند ساله است که در محیط‌های شنی و خشک آسیا و آفریقا زندگی می‌کند. این گونه بر روی توده‌های شنی غیر پایدار و نرم به خوبی

استقرار یافته است. ریشه‌ها ممکن است ۳-۲ متر طول داشته باشند و بیشتر آنها به طور افقی در عمقی فقط به اندازه چند سانتیمتر رشد می‌کنند. Langner و Darius (۲۰۰۰) کاربرد انگشت نگاری DNA جنس *Stipagrostis* را به منظور ارزیابی الگوهای تهاجمی توده‌های شنی مورد بررسی قرار دادند. نمونه‌ها بر اساس موفقیتشان در استقرار سبزینه در این شنهای روان مورد بررسی قرار گرفتند. فرضیه بر اساس توان کلون سازی مجدد توده‌های شنی پست توسط *S. scoparia* از طریق جوانه‌زنی یا پنجه‌زنی بود. اگر تکثیر جنسی روش اصلی استقرار بود در این صورت تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا بود. برای تشخیص الگوهای فاصله‌ای کلونها، ساختمان ژنتیکی بر اساس روشهای PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تکنیک RAPD و AFLP نیز برای تشخیص پلی مورفیسم‌های ممکن در توالی DNA، استفاده گردید. نمونه‌های برگی از تپه‌های کوچک با فاصله‌های منظم ۱۰-۵ متر گرفته شد. همچنین دو نمونه اضافه از فاصله ۳۰ کیلومتری این تپه‌های شنی نیز گرفته شد. ابتدا ساختمان گیاهان، مورد بررسی قرار گرفت. عصاره DNA از برگهای مناسب استخراج شد. تجزیه و تحلیل AFLP بر پایه روش ژن کلیدی (keygen) با موفقیت انجام گرفت و هیچ پلی‌مورفیسمی در ترتیب DNA تشخیص داده نشد. تجزیه و تحلیل RAPD و AFLP هیچگونه تفاوتی را در پلی‌مورفیسم‌های DNA میان بوته‌های *S. scoparia* نشان ندادند. در نتیجه امکان این که یک کلون در ۳۰ کیلومتر پراکنده شده باشد را نشان می‌دهد.

گونه *S. namaquensis* در برابر شوری مقاوم است و در مناطق شنی جنوب غربی آفریقا، نامیبیا و صحرای کالاهاری رشد می‌کند (Anderson، ۱۹۸۹). Alnoaim و همکاران (۱۹۹۱) بر اساس مطالعه‌ای در شرق عربستان سعودی ترکیبهای شیمیایی و جوانه‌زنی بذر در هفت گونه مرتعی که به عنوان گیاه چراگاهی مفید هستند را مورد بررسی قرار داد که گونه *Stipagrostis plumosa* ازجمله گونه‌های مورد بررسی بود.

اگرچه نتیجه مطالعات نشان داد که میزان پروتئین این گونه در مقایسه با تعدادی از گونه‌های مورد مطالعه کم است، ولی همه گونه‌ها شامل مقادیری کافی از مواد معدنی مورد احتیاج تغذیه‌ای حیوانات به غیر از فسفر در زمان رسیدگی بودند. نتایج آزمایشهای جوانه‌زنی نیز نشان دادند که در بذرهای تازه، جوانه‌زنی در حدود صفر تا ٤٠٪ تغییر می‌کند، در حالی که اگر بذرها در حدود ۱۰ ماه ذخیره شوند، درصد جوانه‌زنی ٦٠ تا ٩٠٪ افزایش می‌یابد.

مواد و روشها

بذر ٥ جمعیت از سه گونه *Stipagrostis plumosa* ، *S. pennata* و *S. karelini* از رویشگاههای این جنس در استانهای سمنان، یزد و قم جمع آوری گردید. بذرها به مدت ۲ ماه در سردخانه نگهداری شدند. پس از آن بذرها با وایتکس ١٥٪ ضدعفونی و بعد با محلول قارچ کش بنومیل ۲ در هزار نیز ضدعفونی شدند. به دلیل سرعت آلودگی این بذرها به قارچ و پوسیدگی سریع آنها ضدعفونی سطحی بذرها دو بار انجام شد. بعد حدود ١٥ بذر در هر پتری بر روی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد. با توجه به اینکه بذرهای *Stipagrostis* دارای خواب هستند، به منظور شکستن خواب بذرها، ابتدا به مدت ۲ ماه در سردخانه نگهداری شدند و بعد از اینکه در داخل پتریهای مرطوب قرار داده شدند به مدت ٤٨ ساعت نیز در داخل سردخانه با دمای ٤ درجه سانتیگراد و بعد به داخل ژرميناتور با دمای ٢٥ درجه سانتیگراد انتقال داده شدند. این مراحل تا حدی در شکسته شدن خواب بذر مفید است. بذرها بعد از ۲ تا ۳ هفته جوانه زدند. زمانی که طول ریشه‌ها به حدود ۱-۰/۵ سانتیمتر رسید، نمونه برداری آغاز شد. برای اینکه ریشه‌ها دارای حداکثر سلولهای در حال تقسیم باشند یک ساعت بعد از اتمام چرخه تاریکی ژرميناتور، نمونه برداری آغاز می‌شد. بعد ریشه‌ها در محلول اشباع آلفابرمونفتالین به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند و بعد به مدت ۳ دقیقه با آب روان

شسته شده و بعد به مدت ۲۰ ساعت نیز در محلول تثبیت کننده فارمر (۱ اسید استیک: ۳ الکل) قرار داده شدند. مرحله شستشو به طور مجدد انجام شد و در نهایت در الکل ۷۰٪ و در سردخانه نگهداری شدند. در زمان تهیه لام ابتدا ریشه‌ها در اسیدکلریدریک ۱ نرمال در حمام آب گرم به مدت ۵ دقیقه هیدرولیز شدند و بعد از شستشو با آب مقطر به مدت ٤٥ دقیقه با رنگ هماتوکسیلین در مجاورت حرارت غیر مستقیم حمام آب گرم رنگ آمیزی شدند. بعد از این مراحل، انتهای مریستمی ریشه‌ها جدا گردیده و در داخل شیشه ساعت قرار داده شدند. بعد یک قطره آنزیم سیتاز بر روی انتهای مریستمی ریشه‌ها ریخته و به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری شد. با توجه به تعداد زیاد کروموزومهای جنس Stipagrostis و چسبندگی بین کروموزومها، این آنزیم در جدا شدن کروموزومها از یکدیگر و شمارش تعداد آنها بسیار مؤثر بود. بعد از این مدت لام‌ها تهیه و توسط میکروسکوپ دوربین‌دار مورد بررسی قرار گرفتند. از سلولهای مناسب عکس برداری شد. همچنین طول بازوهای کروموزومها نیز با استفاده از میکرومتر چشمی اندازه گیری شد.

بحث و نتایج

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان دادند که ۵ جمعیت مورد مطالعه *Stipagrostis* که متعلق به سه گونه بودند، از نظر سطح پلوئیدی با یکدیگر متفاوت هستند. گونه *S. plumosa* نمونه سمنان و نمونه قم و گونه *S. karelini* نمونه یزد دیپلوئید ۲n = ۲x = ۲۲ بودند. در حالی که گونه *S. pennata* نمونه یزد ونمونه سمنان تتراپلوئید ۲n = ٤x = ٤٤ بودند.

ایدیوگرام مربوط به هر جمعیت در شکلهای شماره ۱ الی ۵ ترسیم گردیده است. در ایدیوگرام جمعیتهای مورد مطالعه تصویر کروموزومها بر اساس کاهش طول

کروموزومها مرتب شده است و سانترومر آنها در راستای همدیگر قرار گرفته و کروموزومهای ماهواره‌دار نیز مشخص گردیدند.

با توجه به اینکه اندازه‌های میکرومتر چشمی با اندازه‌های لام استاندارد مورد استفاده متفاوت بود، تمامی داده‌های حاصل از اندازه گیری توسط میکرومتر چشمی در عدد ۰/٦٤٥ ضرب گردید تا داده‌ها به میکرون تبدیل شوند. تمامی عملیات محاسباتی و رسم ایدیوگرامها در برنامه Excel انجام گردید.

مولفه‌های درصد شکل کلی (TF%)، اختلاف دامنه طول نسبی (DRL) و طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم و تعداد دیگری از مولفه‌های سنجش تقارن کاریوتیپی مورد محاسبه قرار گرفته و در جدول شماره ۱ ارائه شده است (میرزایی ندوشن و ندرخانی، ۱۳۸۰).

بررسی کمی TF% یا درصد شکل کلی نشان داد که حداکثر این مقدار ٤۳/۰۹ مربوط به گونه *S. karelini* نمونه یزد و حداقل آن ۳۹/۰۹ مربوط به گونه *S. plumosa* نمونه سمنان بود. با توجه به اینکه TF% و تقارن کاریوتیپی دارای همبستگی مثبت هستند، در نتیجه *S. karelini* نمونه یزد دارای متقارن‌ترین کاریوتیپ و *S. plumosa* نمونه سمنان نیز از نظر این مولفه نامتقارن‌ترین کاریوتیپ است. نامتقارن بودن کاریوتیپ احتمالاً به علت وقوع تغییرات ساختمانی کروموزومها از قبیل حذفهای کروموزومی و یا ترانسلوکاسیونهای نابرابر و غیره است، که میان کروموزومها در جمعیتهای مختلف صورت گرفته و بعد مسیرهای مختلفی را از نظر انتخاب طبیعی و مصنوعی در محیطهای مختلف سپری نموده است و سبب شده است که تغییراتی در هر جمعیت شکل بگیرد و در نهایت اختلافهای کاریوتیپی را میان گونه‌ها و جمعیتها ایجاد کند.

از دیگر معیارهای تشخیص تقارن کاریوتیپی اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومها DRL است که حداکثر میزان این کمیت مربوط به *S. karelini* نمونه یزد و حداقل

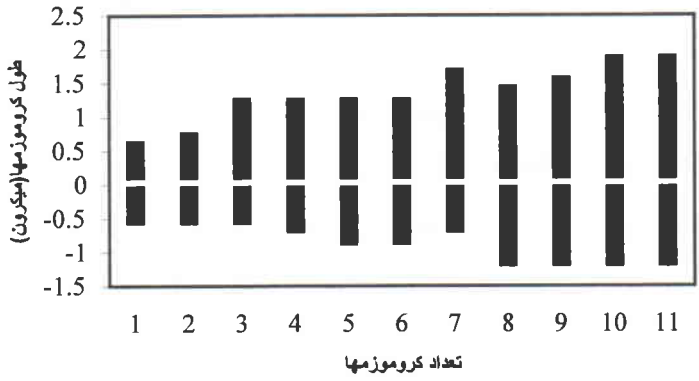
میزان آن مربوط به *S. pennata* نمونه یزد می‌باشد که نشان می‌دهد که جمعیتهایی که این معیار در آنها کمتر است، تقارن بیشتری دارند.

بررسی میزان طول نسبی کوتاهترین کروموزوم(S%) بیانگر این است که حداکثر این مقدار ۵/۸۶ مربوط به *S. plumosa* نمونه سمنان است. این موضوع نشان دهنده این است که جمعیتهایی که طول نسبی کوتاهترین کروموزوم بیشتری دارند، کاریوتیپ متقارنتری دارند.

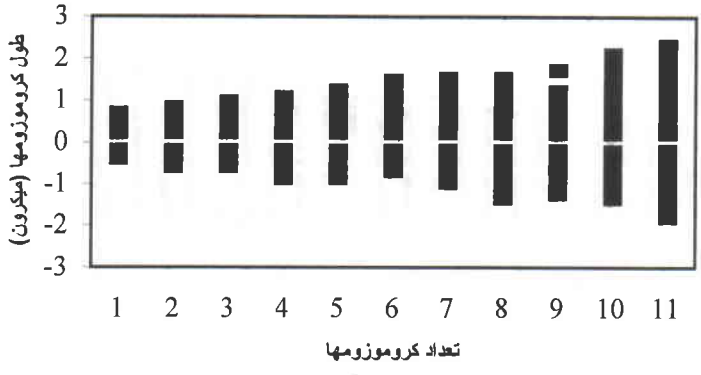
کمیت TL بیانگر طول یک دسته کامل کروموزومی است که حداکثر این مقدار ۳۶/۸۱ مربوط به *S. pennata* جمع آوری شده از یزد بود. با توجه به اینکه دو نمونه جمع آوری شده از استانهای یزد و سمنان از گونه *S. pennata* تتراپلوئید بودند، ولی مقدار TL در آنها اختلاف زیادی با یکدیگر دارند، به طوری که میزان TL در نمونه سمنان برابر ۲۸/۵۶ و در نمونه یزد برابر ۳۶/۸۱ میکرون است که این موضوع بیانگر این واقعیت است که در تمایز جمعیتها از یکدیگر مقدار کمّی DNA نقش عمده‌ای را داشته و باعث ایجاد تفاوتهای ژنتیکی شده است.

فرمول کاریوتیپی محاسبه شده بر اساس روش Levan و همکاران (۱۹٦٤) نشان داد که کروموزوم با سانترومر مرکزی فقط به تعداد یک جفت در نمونه *S. plumosa* جمع آوری شده از قم وجود دارد و اغلب کروموزومها را نوع تقریباً متاسانتریک (m) و تعداد بسیار کمی هم ساب متا سانتریک تشکیل می‌دهد. همان طور که در ستون آخر جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، جمعیت *S. plumosa* جمع آوری شده از سمنان دارای ۳ جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک و ۹ جفت کروموزوم متاسانتریک است که در مقایسه با سایر جمعیتها دارای نامتقارن‌ترین فرمول کاریوتیپی می‌باشد. متقارن‌ترین فرمول کاریوتیپی مربوط به نمونه سمنان از گونه*S. pennata* است که دارای ۲۰ جفت کروموزوم متاسانتریک و یک جفت کروموزوم ساب‌متاسانتریک است.

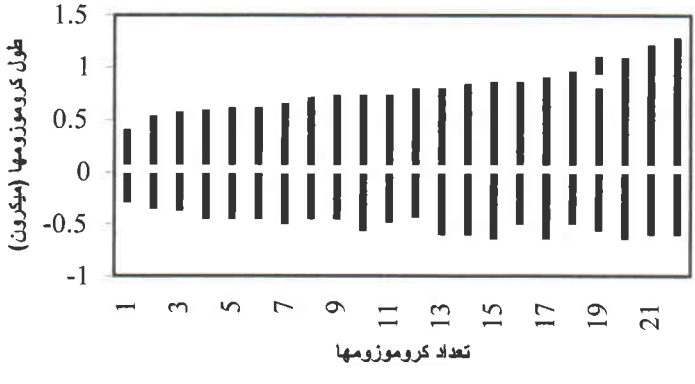
شکل شماره ۱: ایدیوگرام گونه *Stipagrostis plumosa* نمونه سمنان



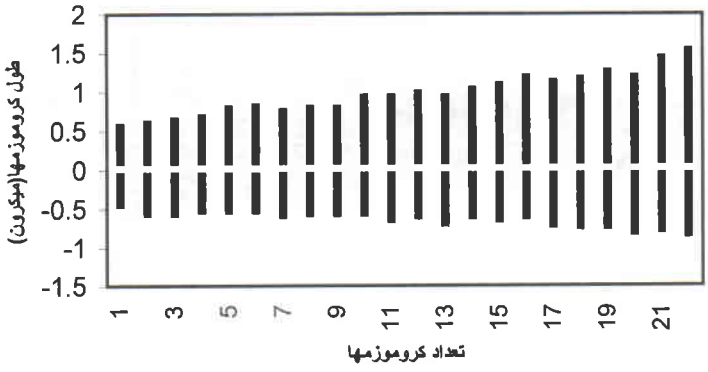
شکل شماره ۲- ایدیوگرام گونه *Stipagrostis plumosa* نمونه قم



شکل شماره ۳-ایدیوگرام گونه Stipagrostis karelini نمونه یزد



شکل شماره ٤- ایدیوگرام گونه *Stipagrostis pennata* نمونه سمنان



شکل شماره ۵- ایدیوگرام گونه *Stipagrostis pennata* نمونه یزد

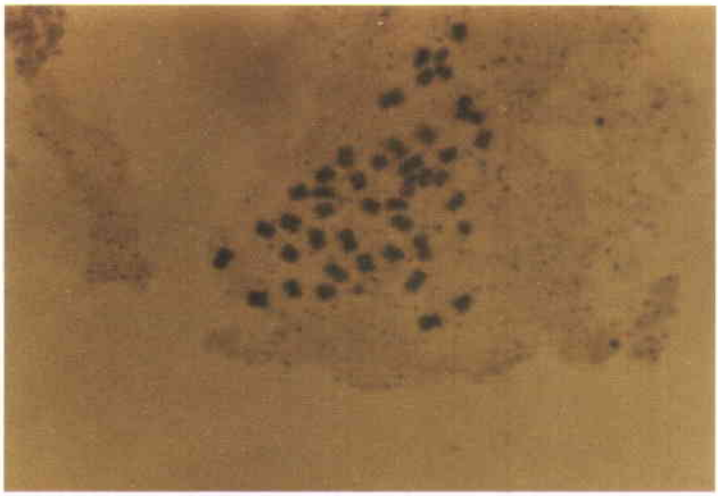
جدول شماره ۱: آماره‌های محاسبه شده از ویژگیهای کاریوتیپی، درصد شکل کلی (Total Form Percentage)، DRL : اختلاف میان حداقل و حداکثر طول نسبی کروموزومها، S% : طول نسبی کوتاهترین کروموزوم، S/L : نسبت کوتاهترین کروموزوم به بلندترین کروموزوم، TL : طول یک سری کامل کروموزومی، .Sat : جفت کروموزومهای ماهواره‌دار، فرمول کاریوتیپی: دسته بندی کروموزومها بر حسب روش لوان.

ژنوتیپ	۲n	%TF	DRL	میانگین کل	%S	S/L	TL	Sat	فرمول کاریوتیپی
G1	۲۲	۳۹/۰۹	٦/۹٥	۲/۰۹	٥/۸٦	۰/٤٥	۲۳/۰۲	۱	۹m+۳Sm
G2	۲۲	٤۰/۹	۷/٤۸	۲/۲۷	٤/۹۸	۰/٤	۲٥/۰٦	-	M+۸m+۲Sm
G3	۲۲	٤۳/۰۹	۹/٥٦	۲/۸۱	٥/۰٤	۰/۳٤	۳۰/۹۳	۱	۱۰m+۱Sm
G4	٤٤	٤۰/۸۲	۳/۹٥	۱/۲۹	۲/۳۸	۰/۳۷	۲۸/٥٦	۱	۲۰m+۱Sm
G5	٤٤	٤۱/۱۳	۳/٦٦	۱/٦۷	۲/۹۳	۰/٤٤	۳٦/۸۱	-	۱۸m+۳Sm

G1: گونه *S. plumosa* نمونه سمنان G2: گونه *S. plumosa* نمونه قم

G3: گونه *S. karelini* نمونه یزد G4: گونه *S. pennata* نمونه سمنان

G5: گونه *S. pennata* نمونه یزد



شکل شماره ٦: سلول متافازی تقسیم میتوز از گونه *S. pennata* نمونه یزد، ٤٤ = ٤x = ٢n

شکل شماره ۷ : سلول متافازی میتوز از گونه *S. plumosa* نمونه سمنان، ۲۲ = ۲x = ۲n

شکل شماره ۸: سلول متافازی تقسیم میتوز از گونه *S. karelini* نمونه یزد، ۲۲ = ۲x = ۲n

منابع

میرزایی ندوشن، حسین و هاجر ندرخانی، ۱۳۸۰. کاریوتیپ جمعیتهای مختلف دو گونه از لولیوم. تحقیقات ژنتیکی گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، شماره ۸: ۲۶-۱.

Alnoaim, A.A., A.A. Elgazzer, T.G. Rumney, and Y.S. Alkoraiem. 1991. Study of chemical composition of range plants in the eastern province of Saudi Arabia. Arab Gulf Journal Science Research, 9:77-92.

Anderson, J.A. 1989. Haloph, a data base of salt tolerant plants of the world. Office of arid and studies. University of Arizona, Tucson, 77pp.

Batoli, H. 2001. The study of ecological properties of the grassland Stipagrostis plumose in the desert sand plain of Kashan. http://www.ru.ac.za/instituts/rgi/irc2003/a4/volunteer.htm

Langner, S and F. Darius. 2000. Application of DNA- fingerprinting to assess possible invasion patterns of the sand dune pioneer Stipagrostis. Institute of Ecology, Technical Univarsity, Berlin.

Levan, A., K. Fredga, and A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosome. Heriditas, 52: 201-220.

Karyotypic investigation no several species of *Stipagrostis*

Shariat[1],A., Mirzaie-Nodoushan[1], H. and Maddah[2], A.

Abstract

Preparing appropriate information on ploidy level and karyotypic characteristics is one of the most important requirements for breeding purposes of all plant species. Regarding the importance of *Stipagrostis* in sand dune fixation, its drought and salinity resistance and its values as a fodder in better utilization of natural resources in arid and semi-arid areas, investigation of various aspects of this genus is necessary. In Iran, there are numerous populations and species of *Stipagrostis* on which little study has been done. There is not any attempt to investigate cytogenetics of the genus in Iran and world wide study on this genus is also scarce.

Five populations from three species named *Stipagrostis pennata*, *S. plumose* and *S. karelini* were studied in this work. Two ploidy levels were observed in the populations. *S. pennata* was tetraploid (2n = 4x = 44) and the species *S. plumose* and *S. karelini* were diploid (2n = 2x = 22). Chromosome characteristics of the species such as long arm length (L), and Short arm length (S) were measured based on which L/S, S/L and total length of the chromosomes were obtained. Ideograms of the genotypes were also drown. Several parameters, such as TF%, DRL and S% were also estimated for comparing the karyotyps.

Key words: *Stipagrostis pennata, S. plumose, S. karelini, Karyotype, Polyploidy*

1 - Research Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box: 13185 – 116. Tehran
2 - Semnan Provincial Natural Resources Research Center.