کاریوتیپ جمعیتهای مختلف دوگونه از لولیوم
(*L. rigidum* و *Lolium multiflorum*)

حسین میرزایی ندوشن [1] و هاجر ندرخانی [2]

چکیده

استفاده از ذخایر توارثی لولیوم در اصلاح گونه‌های موجود آن در کشور به داشتن اطلاعات کافی در زمینه‌های مختلف از جمله ویژگیهای کاریوتیپی منوط می‌باشد. به همین منظور تعداد ۹ جمعیت از گونه‌های *Lolium multiflorum* و *L. rigidum* از میان نمونه‌های موجود در بانک ژن منابع طبیعی کشور در این بررسی مورد مطالعات کاریوتیپی قرار گرفتند. تعداد پنج سلول متافازی از هر جمعیت مورد اندازه‌گیری ویژگیهای کاریوتیپی از قبیل طول بازوهای بلند و کوتاه کروموزومی قرار گرفته و بر اساس اطلاعات بدست آمده، طول کل کروموزوم، نسبتهای طول بازوهای کوتاه به طول بازوی بلند و به عکس نیز محاسبه گردید. تقارن کاریوتیپی این جمعیتها نیز به چند روش محاسبه شده و با استفاده از روش Levan فرمول کاریوتیپی هر جمعیت و گونه نیز مورد محاسبه قرار گرفت.

از میان جمعیتهای مورد مطالعه، دو جمعیت تتراپلوئید و پنج جمعیت دیپلوئید و دو جمعیت مخلوطی از ژنوتیپهای دیپلوئید و تتراپلوئید بودند. کاریوتیپ تعدادی از جمعیتها دارای یک تا دو جفت ماهواره بود. بیشتر کروموزمها در تمامی جمعیتهای مورد مطالعه از نوع متاسانتریک بودند که سانترومر آنها در منطقه میانی قرار داشت. از نظر

---

۱ - عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صندوق پستی ۱۱۶ - ۱۳۱۸۵

۲ - دانشجوی دانشگاه پیام نور، تهران

مؤلفه سنجش تقارن کاریوتیپی DRL در میان تتراپلوئیدها، یکی از جمعیتهای گونه *L. multiflorum* متقارن‌ترین و جمعیت دیگری از همین گونه نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را داشتند. در میان دیپلوئیدها جمعیتی از گونه *L. rigidum* متقارن‌ترین و جمعیتی از *L. multiflorum* نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: لولیوم، کاریوتیپ، سیتوژنتیک، پلی پلوئید، تقارن کاریوتیپی

مقدمه

لولیوم (*Lolium sp.*) گونه‌های متعددی دارد که بیشتر آنها از ارزش چشمگیری در مراتع مناطق مرطوب برخوردار بوده و در فضای سبز نیز قابل استفاده هستند. در کشور ما نیز تعدادی از گونه‌های لولیوم در مناطق مختلف پراکنش دارند. از این رو به منظور حفظ ذخایر توارثی این گونه‌ها و بکارگیری آنها در برنامه‌های اصلاحی، جمعیتهای متعددی از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده و در بانک ژن منابع طبیعی وابسته به مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع نگهداری می‌گردند. در کنار این ذخایر بومی تعدادی از جمعیتهای دیپلوئید و تتراپلوئید خارجی از گونه‌های مذکور نیز در بانک ژن مذکور نگهداری می‌گردند. استفاده از این ذخایر توارثی در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید ارقامی با ویژگیهای مورد نظر در مرحله اول به داشتن اطلاعات کافی در زمینه ویژگیهای کاریوتیپی آنها منوط می‌باشد. از جمله این ویژگیها، سطح پلوئیدی، اندازه و ابعاد کروموزومها، تقارن کاریوتیپی و ارتباطات کاریوتیپی گونه‌ها و جمعیتها با یکدیگر می‌باشند. به همین منظور تعدادی از نمونه‌های موجود در بانک ژن مذکور در یک بررسی کاریوتیپی مورد مطالعه قرار گرفتند که به بخشی از نتایج آن در این مقاله اشاره می‌گردد.

مطالعات سیتوژنتیک در لولیوم

بر اساس مطالعات Deniz (۱۹۹۷)، در مورد رفتارهای کروموزومی *Lolium perenne L.* و *Festuca pratensis* Huds و دورگ تریپلوئید آنها، لولیوم دیپلوئید رفتارهای میوزی بسیار منظمی داشت و دورگهای تریپلوئید بین جنسی همبستگی کروموزومی خوبی از خود نشان دادند. بیشتر کروموزومها بی‌والنت تشکیل دادند، در حالی که یونی‌والنت و کوادری‌والنت به ندرت دیده شد. تمامی دورگها تفرق کروموزومی نابرابر از خود نشان دادند. به طور کلی در این مطالعات هیچ گونه دورگی با رفتارهای میوزی منظم و پایدار مشاهده نگردید. Deniz و Tufan (۱۹۹۷)، با بررسی سیتوژنتیکی دورگ بین گونه‌های *L. multiflorum* و *L. perenne* رفتارهای کروموزومی را نیز مورد مطالعه قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند. در این مطالعه نیز عدم ثبات ژنتیکی دورگ در نسلهای متوالی مشاهده گردید و دو برابر شدن کروموزومهای آن جهت تولید آلو تتراپلوئید و رفع مشکل پیشنهاد گردید.

میرزایی ندوشن و ندرخانی (۱۳۷۹) تعدادی از جمعیتهای تتراپلوئید گونه‌های *L. prenne* و *L. rigidum* را از نظر ویژگیهای کاریوتیپی مورد مطالعه قرار داده و ضمن ارائه مشخصات کلیه کروموزمهای جمعیتهای مورد مطالعه، مؤلفه‌های سنجش تقارنی لازم را نیز جهت مقایسه جمعیتها و گونه‌های مورد نظرشان ارائه نموده‌اند.

تقارن کاریوتیپی

جهت مقایسه کاریوتیپی گونه‌ها و جمعیتهای مختلف گیاهی، علاوه بر تعداد کروموزومها و خصوصیات مورفولوژیکی گونه‌های گیاهی، صفات دیگری مانند تقارن و عدم تقارن کاریوتیپی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ـ کاریوتیپ متقارن: کاریوتیپی است که کروموزومهای آنها هم اندازه و دارای سانترومرهای میانی یا به تقریب میانی باشند. چنانچه محل سانترومر از حالت میانی به

تقریباً انتهایی یا انتهایی تغییر کند و یا اختلافهای اندازه نسبی کروموزومها افزایش یابد، کاریوتیپی با تقارن کمتر تولید می‌شود.

ـ کاریوتیپ نامتقارن: کاریوتیپی است که کروموزومهای آنها به صورت ساب‌متاسانتریک و یا بیشتر به صورت آکروسانتریک باشند.

ـ کاریوتیپ دو شکلی (Bi-modal): به کاریوتیپ نامتقارنی گفته می‌شود که دو دسته کروموزوم به اندازه کاملاً متفاوت به دو صورت بزرگ و کوچک دارند، (Stebbins، ۱۹۷۱).

روشهای اندازه‌گیری تقارن کاریوتیپی

به منظور درک عدم تقارن کاریوتیپ، باید ارتباط بین افزایش عدم تقارن با سایر صفات سلولی مانند صفات مورفولوژیکی، اکولوژیکی و عدد کروموزومی و وجود یا عدم وجود ویژگیهای مشخص مورفولوژیک را بررسی کرد. چنانچه درجات عدم تقارن بوجود آید، مقایسه بین این درجات و عدم تقارن کاریوتیپ با سهولت عملی می‌شود.

در روش Stebbins (۱۹۷۱)، سه درجه مختلف بر اساس نسبت بزرگترین کروموزوم به کوچکترین کروموزوم مجموعه و چهار درجه بر اساس نسبت کروموزومهایی که آکرو یا تلوسانتریک هستند، به منظور مقایسه کاریوتیپها، ارائه شده است (جدول شماره ۱). در جدول شماره ۱، دوازده گروه موجود می‌باشد که در آن تقارن کاریوتیپی از چپ به راست و همچنین از بالا به پایین کاهش می‌یابد. بدین ترتیب کاریوتیپ گروه 1A متقارن‌ترین و کاریوتیپ گروه 4C نامتقارن‌ترین کاریوتیپ خواهد بود. در سلسله گیاهی، کاریوتیپهای متقارن به طور معمول ابتدایی‌تر هستند، تمایل اصلی در تغییر تکاملی کاریوتیپ، تغییر از حالت متقارن به سوی نامتقارن است. گرچه ممکن است عکس این حالت نیز صورت گیرد.

جدول شماره ۱: جدول دسته‌بندی دو طرفه استبینز

نسبت بلندترین کروموزوم به کوتاه‌ترین کروموزوم	نسبت بازوهای کروموزوم >۲:۱			
	۰/۰۰	۰/۰۱-۰/۰۵	۰/۵۱-۰/۹۹	۱/۰
۲:۱>	۱A	۲A	۳A	۴A
۲:۱-۴:۱	۱B	۲B	۳B	۴B
۴:۱<	۱C	۲C	۳C	۴C

در روشی که توسط Huziwara، (۱۹۶۲) ارائه گردیده است نیز جهت مقایسه و بررسی تقارن کاریوتیپها ، از کمیتی تحت عنوان درصد فرم کلی (TF%)[1] به عنوان شاخص دسته‌بندی کاریوتیپ استفاده شده است. نحوه تعیین این کمیت طبق فرمول زیر می‌باشد:

%TF =(مجموع طول کل کروموزومها/مجموع طول کل بازوهای کوتاه)×۱۰۰

هر چه میزان TF% به عدد ۵۰ نزدیکتر باشد، نشان دهنده حضور بیشتر کروموزومهای متاسانتریک نسبت به سایر حالتهای کروموزومی می‌باشد. چنانچه TF% به عدد صفر نزدیک‌تر شود، نشان دهنده حضور بیشتر کروموزومهای آکرو و تلوسانتریک می‌باشد.

Huziwara (۱۹۶۲) علاوه بر کمیت درصد فرم کلی (TF%) از F%[2] نیز در

1- Total Form Percentage

2- Form Percentage

تشخیص و تعیین وضعیت تقارنی کاریوتیپ استفاده نمود. هر چه اختلاف موجود میان کروموزومها از نظر F% وسیع‌تر باشد، تقارن کاریوتیپی در آنها کمتر خواهد بود (Tai و Ikonen، ۱۹۸۸).

F% =(طول کل کروموزوم/طول بازوی کوتاه کروموزوم)×۱۰۰

مواد و روشها

پنج جمعیت از گونه *Lolium multiflorum* و چهار جمعیت از گونه *L. rigidum* در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفتند. شماره ثبت و نام اختصاری جمعیتهای مذکور در جدول شماره ۲ ارائه گردیده است.

جدول شماره ۲: گونه، شماره ثبت و نام اختصاری جمعیتهای مورد مطالعه.

ردیف	گونه	شماره ثبت	نام اختصاری	سطح پلوئیدی
۱	*L. multiflorum*	۷۷۵	LM1	۲n=۴x=۲۸
۲	*L. multiflorum*	۱۷۶۶	LMD2	۲n=۲x=۱۴
۳	*L. multiflorum*	۱۷۶۶	LMP2	۲n=۴x=۲۸
۴	*L. multiflorum*	۱۲۵۳	LM3	۲n=۲x=۱۴
۵	*L. multiflorum*	۱۵۵۷	LM4	۲n=۲x=۱۴
۶	*L. multiflorum*	۸۲۶۸	LM5	۲n=۲x=۱۴
۷	*L. rigidum*	۱۱۶	LR1	۲n=۴x=۲۸
۸	*L. rigidum*	۱۱۲	LR2	۲n=۲x=۱۴
۹	*L. rigidum*	–	LR3	۲n=۲x=۱۴
۱۰	*L. rigidum*	۱۰۴۶۹	LRD4	۲n=۲x=۱۴
۱۱	*L. rigidum*	۱۰۴۶۹	LRP4	۲n=۴x=۲۸

مطالعات سیتوژنتیکی: جهت مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتیپی از مریستم نوک ریشه استفاده شد. به این منظور ابتدا بذرهای جمعیتهای مورد نظر به مدت ۷-۵ دقیقه با قارچکش بنومیل ضد عفونی شدند. در ادامه بذرها روی یک لایه کاغذ صافی مرطوب در داخل پتری دیش قرار گرفته و در دمای اطاق قرار داده شدند. وقتی طول ریشه‌ها به حدود یک سانتی متر رسید جهت یافتن زمان مناسب نمونه‌گیری در ساعتهای اولیه صبح به فاصله نیم ساعت شروع به نمونه گیری گردید تا زمان مناسب تقسیم بدست آمد. گاهی به جای استفاده از بذر، می‌توان از پنجه گیاه که در داخل تانک ریشه‌زایی، ریشه‌دار شده و یا ساقه‌هایی که در داخل گلدان حاوی خاک مناسب آن گیاه ریشه‌دار شده‌اند نیز استفاده کرد.

در مرحله متافاز از تقسیم میتوز که کروموزومها کوتاه‌ترین طول و بهترین شرایط را برای مطالعه دارند مریستم انتهایی ریشه‌ها قطع شده و مورد مطالعه قرار گرفتند. از آنجا که مراحل مختلف تقسیم سلولی وضعیت پویایی دارند و پیوسته در حال تبدیل وضعیت هستند، لازم است سلولهای متافازی را وادار نمود تا در مراحل مورد نظر ثابت بمانند. این عمل با استفاده از مواد شیمیایی تحت عنوان پیش تیمار[1] صورت می‌گیرد. این مواد با مختل نمودن رشته‌های دوک، از حرکت کروموزومها به قطبین سلول جلوگیری می‌کنند. بدین صورت کروموزومها مراحل تقسیم را تا مرحله متافاز طی نموده و بعد در مرحله متافازی باقی می‌مانند. می‌توان از محلولهای مختلفی از جمله کلشی سین، α- برمونفتالین، ۸- هیدروکسی کینولئین، پارادی کلروبنزن (PDB) و آب صفر درجه سانتیگراد به عنوان مواد پیش تیمار استفاده نمود. در این بررسی از محلول اشباع α- برمو نفتالین به مدت ۲ ساعت به عنوان پیش تیمار در دمای ۴ درجه سانتیگراد استفاده شد. مدت زمان استفاده از این ماده برای گیاهان مختلف ۶-۲ ساعت می‌باشد.

1 - Pretreatment

برای تثبیت مریستمهای پیش تیمار شده، آنها را پس از خارج کردن از پیش تیمار به طور کامل با آب مقطر شستشو داده شده و پس از خشک کردن، به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در محلول تثبیت کننده فارمر (نسبت یک حجم اسید استیک گلاسیال به سه حجم اتانول خالص) قرار داده شدند.

جهت نگهداری ریشه‌ها تا زمان مناسب مطالعه، پس از خارج کردن آنها از محلول تثبیت کننده، آنها را با آب مقطر یا الکل ۷۰٪ به خوبی شستشو داده شده و در الکل ۷۰٪ در یخچال نگهداری شدند. بدیهی است که در صورت عدم نیاز به نگهداری ریشه‌ها، فقط شستشو با آب مقطر یا الکل کافی است.

از محلولهای اسید کلریدریک یک نرمال و سود یک نرمال می‌توان جهت هیدرولیز استفاده نمود. در این بررسی از اسید کلریدریک یک نرمال استفاده شد. بدین ترتیب که ریشه‌ها پس از خارج شدن از الکل ۷۰٪ یا محلول تثبیت کننده و شستشو به مدت ۵ دقیقه در اسید کلریدریک یک نرمال که از قبل دمای آن به وسیله حمام آب گرم به ۶۰ درجه سانتیگراد رسیده بود قرار داده شدند. پس از آن ریشه‌ها از اسید خارج شده و با آب مقطر شستشو داده شدند.

مطالعه شکل و ساختمان کروموزومها از طریق مشاهده میکروسکوپی و با استفاده از محلولها و روشهای خاص رنگ آمیزی امکان پذیر می‌گردد. مقصود از رنگ آمیزی تیره‌تر کردن بعضی از اعضای سلول یا رنگ گرفتن متناوب آنها نسبت به اعضای دیگر است. به طوری که بتوان هنگام مطالعه با میکروسکوپ بخشهای مختلف نمونه را از هم تمیز داد. در این بررسی از رنگ هماتوکسیلین استفاده گردید.

تهیه نمونه میکروسکوپی: پس از رنگ آمیزی یک میلیمتر انتهایی مریستم انتهایی ریشه‌ها، بر روی لام له گردیدند. به این ترتیب که مریستم را روی لام گذاشته و یک قطره اسید استیک ۴۵٪ به عنوان فاز مایع به آن اضافه گردید تا رنگهای اضافی اطراف مریستم

حذف شوند و سیتوپلاسم نیز کمرنگ‌تر گردد. در ادامه با قرار دادن لامل روی مریستم با وسیله‌ای مانند ته خودکار، ضرباتی به آرامی روی لامل وارد گردید تا سلولها به طور کامل پخش شده و کروموزومها در یک سطح قرار گیرند.

بررسی میکروسکوپی: از ۵ سلول متافازی مناسب از هر جمعیت که در آن کروموزومها قابل اندازه‌گیری بودند ضمن گرفتن عکس توسط فتومیکروسکوپ به وسیله میکرومتر چشمی، طول بازوهای کروموزومها اندازه‌گیری و یادداشت شد.

تجزیه واریانس: اینکه آیا بین جمعیتهای مورد مطالعه از نظر اجزای مختلف کروموزومی و نیز بین کروموزومهای هر جمعیت نیز اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد یا نه و اینکه آیا اثر متقابلی بین جمعیتها و کروموزومها مشاهده می‌شود یا نه سؤالی بود که ابتدا باید به آن پاسخ داده می‌شد. برای پاسخ به این سؤالها ابتدا جمعیتهای دیپلوئید و تتراپلوئید به طور جداگانه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در جمعیتهایی که سطوح پلوئیدی متفاوتی را نشان دادند نیز اطلاعات مربوط به هر سطح پلوئیدی با گروه مربوطه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به این ترتیب چهار دسته اطلاعات مربوط به ژنوتیپهای تتراپلوئید و هفت دسته اطلاعات مربوط به ژنوتیپهای دیپلوئید مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در گروه تتراپلوئیدها اطلاعات موجود در قالب یک طرح فاکتوریل که در آن عامل‌های جمعیت با چهار سطح و کروموزوم با چهارده سطح در طرح پایه کاملا تصادفی که در آن تعداد سلولهای مورد مطالعه در هر جمعیت به عنوان تکرار قلمداد گردید مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همین طور در گروه دیپلوئیدها، اطلاعات موجود در قالب طرح فاکتوریل دیگری که در آن دو عامل جمعیتها و کروموزومها هر دو با ۷ سطح در طرح پایه کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این مورد نیز تعداد سلولهای مورد مطالعه در هر ژنوتیپ به عنوان تکرار قلمداد گردید. نتایج حاصل از هر

دو تجزیه و تحلیل حاکی از معنی‌دار بودن اختلاف بین ژنوتیپها در تعدادی از مؤلفه‌ها و بین کروموزومها بود. با توجه به معنی‌دار بودن این اختلافها در سطح بالا، انجام تجزیه و تحلیل‌های تکمیلی نیز ضروری گردید.

دسته‌بندی میانگین‌ها: تجزیه اطلاعات میتوزی در قالب طرح فاکتوریل در نهایت به این منجر خواهد گردید که آیا اختلافی بین جمعیتها از نظر ویژگیهای مورد مطالعه وجود دارد یا خیر. همین طور کروموزومهای مختلف هر جمعیت با هم اختلاف آماری دارند یا خیر و به همین ترتیب آیا اثر متقابل بین دو عامل وجود دارد یا نه. ولی اینکه به فرض وجود اختلافهای مذکور آیا جمعیتها و کروموزومها در چند دسته قرار می‌گیرند و دامنه دسته‌ها چگونه است موضوعی است که باید با استفاده از یکی از روشهای مقایسه میانگین‌ها مورد بررسی قرار گیرد. از این رو با استفاده از روش دانکن این موضوع مورد مطالعه قرار گرفت و جمعیتها از نظر کلیه ویژگیهای مورد مطالعه مورد دسته‌بندی قرار گرفتند.

مؤلفه‌های سنجش تقارن کاریوتیپی:

طول نسبی کروموزوم (RL[1]): این مؤلفه با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$$\text{طول نسبی کروموزوم} = \frac{\text{طول کروموزوم}}{\text{طول کل کروموزومها}} \times ۱۰۰$$

طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم (S٪): این کمیت نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

1- Relative Length

طول نسبی کوتاهترین کروموزوم = $\frac{\text{طول کوتاه‌ترین کروموزوم}}{\text{مجموع طول کل کروموزومها}} \times ۱۰۰$

طول نسبی و طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم نیز از کمیت‌هایی هستند که جهت تشخیص تقارن کاریوتیپی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Romero-Zarco، ۱۹۶۸ و Gennur و همکاران، ۱۹۸۸a).

اختلاف طول نسبی حداقل و حداکثر (DRL)

پس از محاسبه طول نسبی کروموزومها که برای هر کدام جداگانه محاسبه گردید، جهت تخمین میزان DRL تفاضل کمترین مقدار طول نسبی و بیشترین مقدار طول نسبی محاسبه گردید. هر چه اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومها کمتر باشد، کاریوتیپ متقارن‌تر است (Gennur و همکاران، b و ۱۹۸۸a)

DRL = طول نسبی حد اکثر − طول نسبی حد اقل

نسبت طول بازوی کوتاه به بازوی بلند (Arm ratio): Mathew و Mathew (۱۹۸۲) با استفاده از نسبت طول بازوهای کوتاه، تغییرات و اختلافهای ریختی کروموزومها را بر اساس تغییر محل سانترومر بررسی نمود.

$$\text{Arm ratio} = \frac{SA}{LA} = \frac{\text{طول بازوی کوتاه}}{\text{طول بازوی بلند}}$$

نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه (r-Value): بنابر نظر Stebbins (۱۹۷۱) هر چه این نسبت در کاریوتیپ بیشتر باشد، نشان دهنده وجود عدم تقارن بیشتر کروموزومهای کاریوتیپ می‌باشد. این نسبت از فرمول زیر تعیین شد:

$$(\text{r-Value}) = \frac{\text{طول بازوی بلند}}{\text{طول بازوی کوتاه}}$$

مؤلفه‌های دیگری نظیر TF٪، r-value، S٪ و DRL[1] که هر یک به نحوی تقارن کاریوتیپها را مورد آزمون قرار می‌دادند محاسبه و ارائه گردید.

نامگذاری انواع کروموزومها با استفاده از روش Levan: Levan و همکاران، (۱۹۶۴) با استفاده از مؤلفه نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه (r-Value) انواع مختلف کروموزومها را مشخص و نامگذاری کردند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: نامگذاری کروموزومها بر اساس روش Levan

نسبت بازوی بلند به کوتاه	محل سانترومر	نوع کروموزوم
۱/۰۰	نقطه میانی	M (متاسانتریک)
۱/۰۱-۱/۶۹	منطقه میانی	m (متا سانتریک)
۱/۷-۳	منطقه نزدیک به میانی	Sm (ساب متاسانتریک)
۳/۰۱-۷	منطقه نزدیک به انتهایی	St (ساب تلوسانتریک)
۷/۰۱-۳۹/۰۰	نقطه انتهایی	T (تلوسانتریک)

رسم ایدیوگرام: جهت عینی کردن تفاوتهای میان کروموزومهای یک جمعیت و جمعیتهای مختلف با استفاده از میانگین اندازه بازوهای بلند و کوتاه کلیه کروموزومهای جمعیتهای مورد مطالعه و به وسیله نرم‌افزار کواتروپرو ایدیوگرام جمعیتهای مورد مطالعه نیز رسم گردید.

1- Difference of Relative Length

نتایج

با بررسی کروموزومی جمعیتهای مورد نظر، دو جمعیت که به ترتیب LM1، و LR1 نامیده شدند، پلی‌پلوئید بودند که در مرحله اول، شمارش کروموزومی در مورد آنها انجام شده و سطح آنها تتراپلوئید تشخیص داده شد. همچنین سطح پلوئیدی در پنج جمعیت که به ترتیب LM3، LM4، LM5، LR2 و LR3 نامیده شدند دیپلوئید بود. دو جمعیت دارای دو سطح پلوئیدی دیپلوئید و تتراپلوئید بودند که ژنوتیپهای تتراپلوئید به ترتیب LRP4 و LMP2 و ژنوتیپهای دیپلوئید به ترتیب LRD4 و LMD2 نامیده شدند. به عبارت دیگر این دو جمعیت مخلوطی از ژنوتیپهای دیپلوئید و تتراپلوئید می‌باشند که این امر باید در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد. مطابق روش تحقیق ارائه شده اندازه‌گیری کروموزومی در مورد کلیه کروموزومهای حداقل پنج سلول از هر جمعیت انجام شده و اطلاعات حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتیجه تجزیه واریانس نشان داد که جمعیتها از نظر طول بازوی بلند و کوتاه و نیز طول کل کروموزوم با یکدیگر اختلاف دارند (جدولهای شماره ۴ و ۵). با توجه به معنی‌دار شدن اختلاف بین تعدادی از ویژگیهای کاریوتیپی اندازه‌گیری شده، سایر مطالعات و اندازه‌گیریها در مورد این ویژگیها انجام شد. برای این منظور در ابتدا میانگین کل صفات کاریوتیپی کروموزومهای هر جمعیت دسته‌بندی شد (جدولهای شماره ۶ و ۷). مؤلفه‌های سنجش تقارن کاریوتیپی نیز مورد محاسبه قرار گرفتند که نتایج آنها در جدول شماره ۸ ارائه شده است. از تعدادی از سلولهای تتراپلوئید و دیپلوئید مورد مطالعه عکسبرداری شده که در شکلهای شماره ۱ تا ۴ مشاهده می‌شوند. با استفاده از میانگین ابعاد کروموزومها ایدیوگرام هر یک از جمعیتها رسم شد (شکلهای شماره ۵ تا ۱۵).

جدول شماره ۴: میانگین مربعات جدولهای تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده از روی کروموزومها در جمعیتهای تتراپلوئید مورد مطالعه (۲n=۴x=۲۸). S/L نسبت طول بازوی کوتاه به طول بازوی بلند و L/S نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه می‌باشد.

منابع تغییر	درجه آزادی	بازوی کوتاه	بازوی بلند	طول کل	S/L	L/S
ژنوتیپ	۳	۱/۹۶**	۲/۰۹**	۷/۹**	۰/۱۲ns	۰/۰۱۶ns
کروموزوم	۱۳	۴/۴۲**	۳/۵۶**	۱۵/۳**	۰/۷۷**	۰/۱۳۹**
اثر متقابل	۳۹	۰/۱۱ns	۰/۰۷ns	۰/۱ns	۰/۱۶ns	۰/۰۲۴ns
خطا	۱۸۲	۰/۰۹	۰/۲۳	۰/۳	۰/۱۴	۰/۰۲۳

**= معنی‌دار در سطح یک درصد ns= غیر معنی دار

جدول شماره ۵ : میانگین مربعات جدولهای تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده از روی کروموزومها در جمعیتهای دیپلوئید مورد مطالعه (۲n=۲x=۱۴). S/L نسبت طول بازوی کوتاه به طول بازوی بلند و L/S نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه می‌باشد.

منابع تغییر	درجه آزادی	بازوی کوتاه	بازوی بلند	طول کل	S/L	L/S
ژنوتیپ	۶	۳/۲۶۷**	۴/۴۵۳**	۱۵/۲۵**	۰/۲۴ns	۰/۰۳ns
کروموزوم	۶	۱۰/۶۳۷**	۶/۷۱۵**	۳۳/۹۵**	۱/۵۰**	۰/۲۸**
اثر متقابل	۳۶	۰/۱۵۵ns	۰/۰۹۱ns	۰/۱۷ns	۰/۱۹ns	۰/۰۳ns
خطا	۲۲۴	۰/۱۷۳	۰/۲۸۲	۰/۶۱	۰/۲۴	۰/۰۲

**= معنی‌دار در سطح یک درصد ns= غیر معنی دار

جدول شماره ۶: دسته بندی جمعیتهای تتراپلوئید مورد مطالعه (۲n=۴x=۲۸) بر مبنای میانگین کل صفات کاریوتیپی کروموزومها. میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در یک دسته قرار می‌گیرند.

جمعیت	بازوی کوتاه	بازوی بلند	طول کل	S/L	L/S
LR1	۱/۹۱b	۲/۷۳b	۴/۶b	۱/۵۱a	۰/۷۰a
LRP4	۲/۰۱ba	۲/۷۴b	۴/۷b	۱/۴۳a	۰/۷۳a
LM1	۱/۶۵c	۲/۴۹c	۴/۱c	۱/۵۵a	۰/۶۸a
LMP2	۲/۱۱a	۲/۹۷a	۵/۰a	۱/۵۰a	۰/۷۱a

جدول شماره ۷: دسته بندی جمعیتهای دیپلوئید مورد مطالعه (۲n=۲x=۱۴) بر مبنای میانگین کل صفات کاریوتیپی کروموزومها. میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در یک دسته قرار می‌گیرند.

جمعیت	بازوی کوتاه	بازوی بلند	طول کل	S/L	L/S
LR2	۱/۴۸c	۲/۲۲c	۳/۷۱c	۱/۶۴a	۰/۶۷a
LR3	۲/۰۳b	۲/۷۹b	۴/۸۲b	۱/۴۴a	۰/۷۳a
LRD4	۲/۰۹b	۲/۹۴b	۵/۰۴b	۱/۵۱a	۰/۷۰a
LM3	۱/۸۷b	۲/۷۱b	۴/۵۹b	۱/۴۹a	۰/۶۹a
LM4	۱/۹۶b	۲/۷۲b	۴/۶۸b	۱/۵۴a	۰/۷۲a
LM5	۲/۴۴a	۳/۳۸a	۵/۸۲a	۱/۴۶a	۰/۷۲a
LMD2	۱/۸۵b	۲/۷۱b	۴/۵۶b	۱/۵۷a	۰/۶۷a

جدول شماره ۸: مؤلفه‌های سنجش تقارن کاریوتیپی. TF% = درصد شکل کلی، DRL =اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومها، S% = طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم. TL = طول کل یک دسته کروموزومی بر حسب میکرون. S/L نسبت طول کل کوتاه‌ترین کروموزوم به طول بلندترین کروموزوم

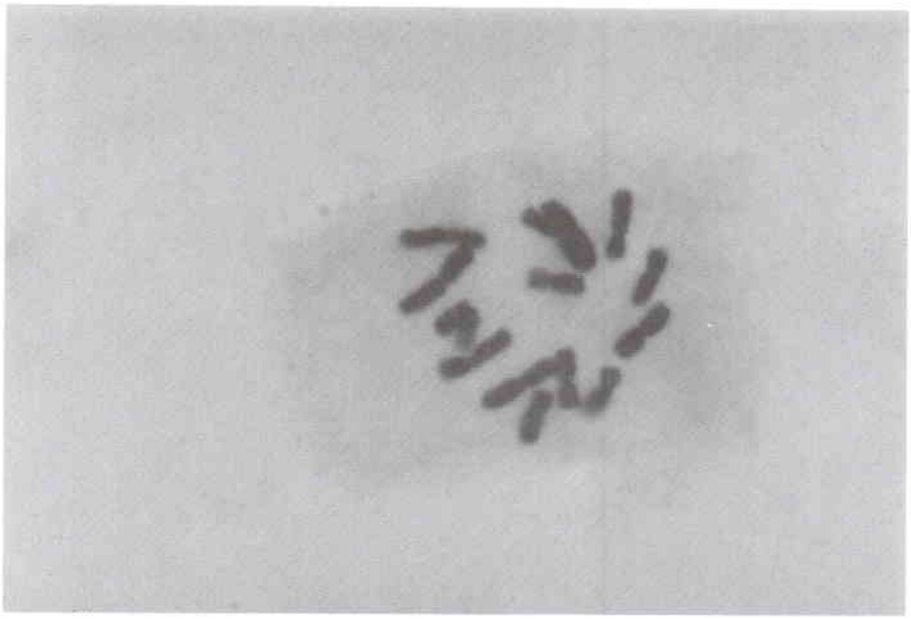
جمعیت	n	TF%	DRL	S%	TL	S/L	میانگین کل	تعداد ماهواره	فرمول کاریوتیپی
LR1	۱۴	۴۱	۴/۶۰	۴/۷۹	۶۵/۰۲	۰/۵۱	۴/۶۴	۰	۱۰m+۴Sm
LM1	۱۴	۴۱	۳/۸۱	۵/۲۴	۵۷/۹۶	۰/۵۸	۴/۱۴	۰	۱۱m+۳Sm
LMP2	۱۴	۴۱	۵/۳۵	۴/۵۱	۷۱/۱۶	۰/۴۵	۵/۰۸	۰	۱۱m+۳Sm
LRP4	۱۴	۴۲	۳/۹۵	۵/۲۷	۶۶/۵۷	۰/۵۷	۴/۷۵	۲	۱۳m+۱Sm
LR2	۷	۴۰	۸/۱	۱۰/۵	۲۵/۹۶	۰/۵۶	۳/۷۰	۱	۴m+۳Sm
LR3	۷	۴۲	۸/۷	۹/۹۹	۳۳/۷۳	۰/۵۳	۴/۸۱	۲	۶m+۱Sm
LM3	۷	۴۱	۸/۹۴	۹/۴۴	۳۲/۰۹	۰/۵۱	۴/۵۸	۱	۶m+۱Sm
LM4	۷	۴۲	۷/۶۲	۱۰/۴۹	۳۲/۷۹	۰/۵۸	۴/۶۸	۱	۴m+۳Sm
LM5	۷	۴۲	۷/۸۳	۱۰/۷۲	۴۰/۷۴	۰/۵۸	۵/۸۲	۰	۶m+۱Sm
LMD2	۷	۴۰	۷/۸۹	۹/۶	۳۱/۹۵	۰/۵۵	۴/۵۶	۰	۵m+۲Sm
LRD4	۷	۴۱	۶/۲۷	۱۱/۵۹	۳۵/۲۶	۰/۶۵	۵/۰۴	۰	۶m+۱Sm

بحث و نتیجه‌گیری

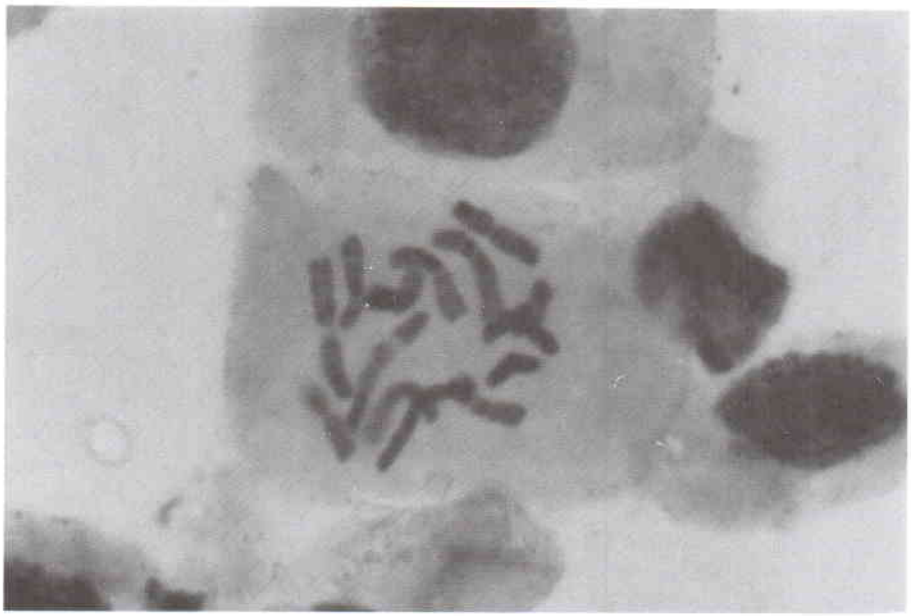
جمعیتهای تتراپلوئید: دو جمعیت تتراپلوئید مورد مطالعه و نیز ژنوتیپهای تتراپلوئید از جمعیتهای مخلوط که متعلق به دو گونه متفاوت بودند از نظر ویژگیهای مختلف کروموزومی از جمله طول بازوی کوتاه و بلند و طول کل با هم تفاوت معنی داری داشتند (جدول شماره ۴). همچنین کروموزومهای این چهار جمعیت از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری شده با هم اختلاف معنی داری داشتند. نتیجه دسته‌بندی میانگین‌ها (جدول شماره ۶) نیز نشان داد که جمعیتهای گونه *L. rigidum* از نظر کلیه صفات در یک دسته قرار گرفتند، اما جمعیت LRP4 از نظر میانگین بازوهای کوتاه با جمعیت LMP2 همپوشانی نشان می‌دهد. جمعیتهای گونه *L. multiflorum* فقط از نظر میانگین L/S و S\L در یک دسته قرار گرفتند. همان طور که مشاهده می‌شود کلیه جمعیتهای تتراپلوئید از نظر دو مؤلفه میانگین L/S و S/L در یک دسته قرار گرفتند.

جمعیتهای دیپلوئید: جمعیتهای دیپلوئید مورد مطالعه و نیز ژنوتیپهای دیپلوئید از جمعیتهای مخلوط که متعلق به دو گونه متفاوت بودند از نظر ویژگیهای مختلف کروموزومی از جمله طول بازوی کوتاه و بلند و طول کل کروموزوم با هم تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول شماره ۵). همچنین کروموزومهای این جمعیتها از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری شده با هم اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد نشان دادند. همان طور که نتیجه دسته‌بندی جمعیتهای دیپلوئید (جدول شماره ۷) نشان می‌دهد، کلیه جمعیتها از نظر سه مؤلفه طول بازوی کوتاه و بلند و طول کل در سه دسته و از نظر نسبت طول بازوی کوتاه به بلند و به عکس در یک دسته قرار گرفتند. جمعیتهای LR3، LRD4، LMD2، LM3 و LM4 از نظر هر سه مؤلفه فوق با هم در یک دسته و جمعیتهای LR2 و LM5 نیز در دو دسته جداگانه قرار گرفتند. هیچ گونه هم پوشانی در میان جمعیتها دیده نمی‌شود.

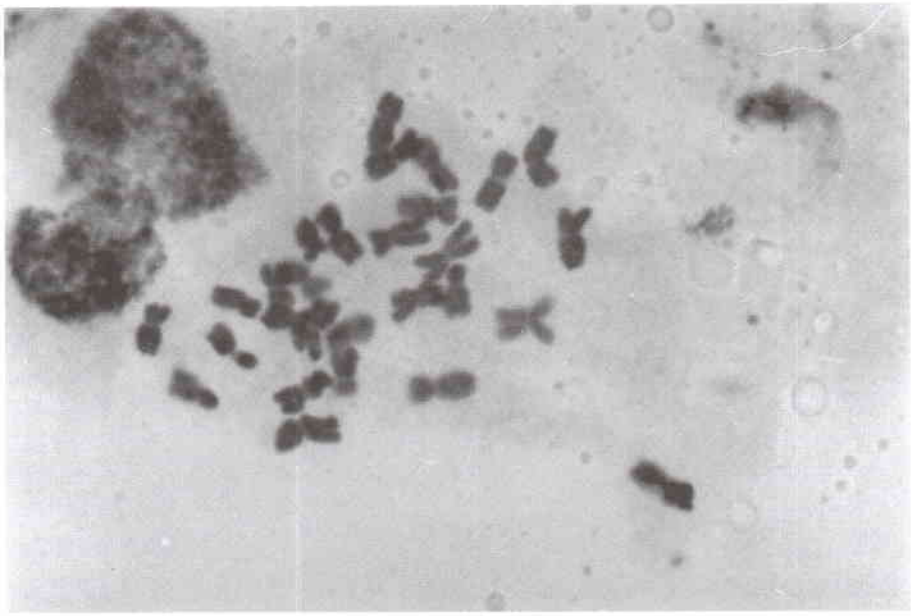
از نظر مؤلفه‌های سنجش تقارن کاریوتیپی (جدول شماره ۸) نظیر TF% هر دوازده جمعیت دارای مقادیر به نسبت برابری بودند. از آنجا که این مقادیر همگی به ۵۰ نزدیک‌تر بودند، بیشتر کروموزومهای هر جمعیت از نوع متاسانتریک می‌باشند (Huziwara، ۱۹۶۲). با توجه به مقادیر DRL نظر به اینکه مقادیر کمتر این مؤلفه حاکی از تقارن بیشتر کاریوتیپ می‌باشد، در میان جمعیتهای تتراپلوئید، جمعیت LM1 با مقدار ۳/۸۱ متقارن‌ترین و جمعیت LMP2 با مقدار ۵/۳۵ نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را داشتند. در میان دیپلوئیدها نیز جمعیت LRD4 با مقدار ۶/۲۷ متقارن‌ترین و جمعیت LM3 با مقدار ۸/۹۴ نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را داشتند.



شکل شماره ۱ :کروموزومهای متافازی جمعیت دیپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LM5)



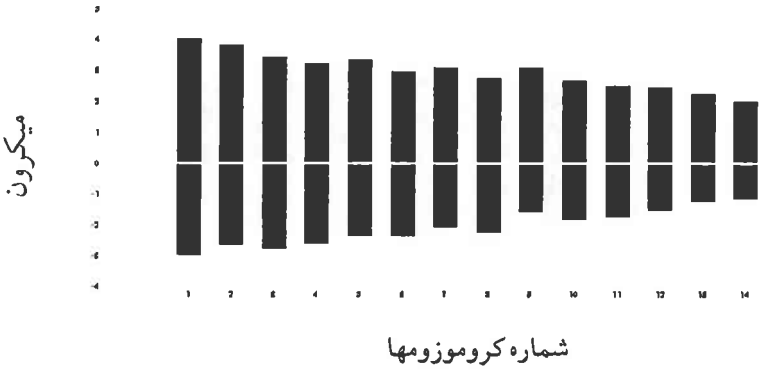
شکل شماره ۲ :کروموزومهای متافازی جمعیت دیپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LR3)



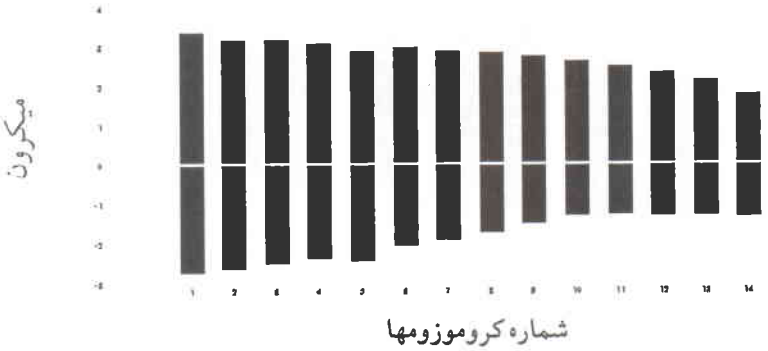
شکل شماره ۳: کروموزومهای متافازی جمعیت تتراپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LM1)

شکل شماره ۴ : کروموزومهای متافازی جمعیت تتراپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LRP4)

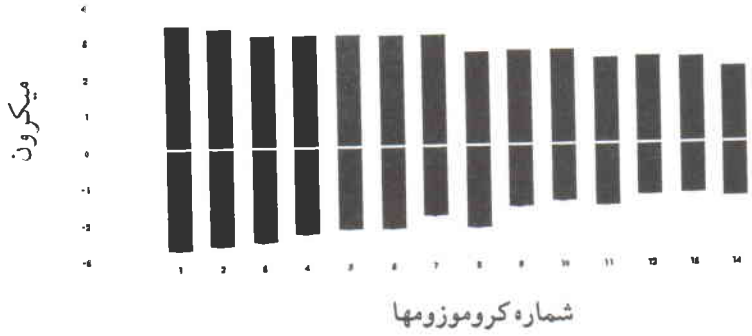
شکل شماره ۵ : ایدیوگرام جمعیت تتراپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LM1)



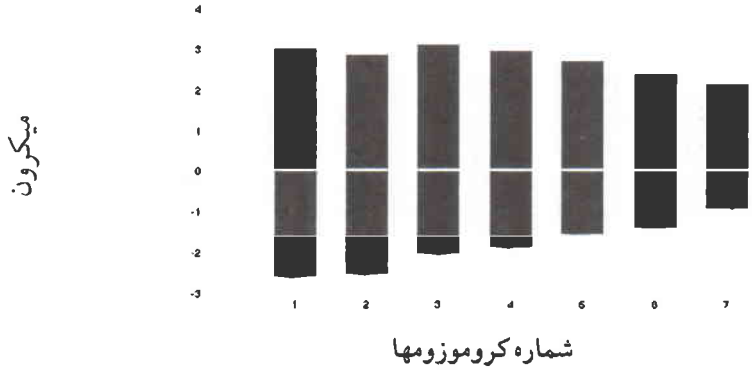
شکل شماره ۶ : ایدیوگرام جمعیت تتراپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LMP2)



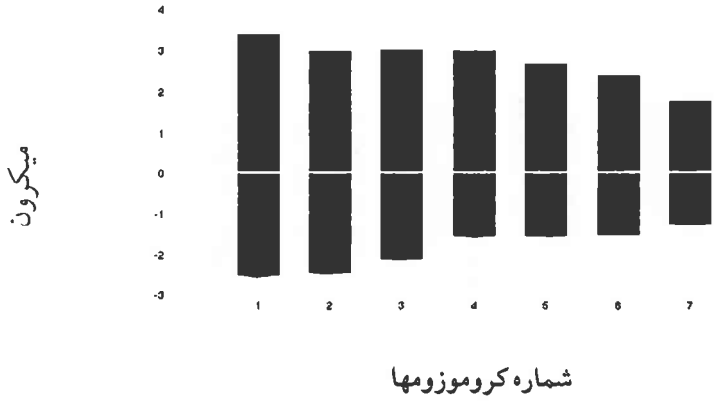
شکل شماره ۷: ایدیوگرام جمعیت تتراپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LR1)



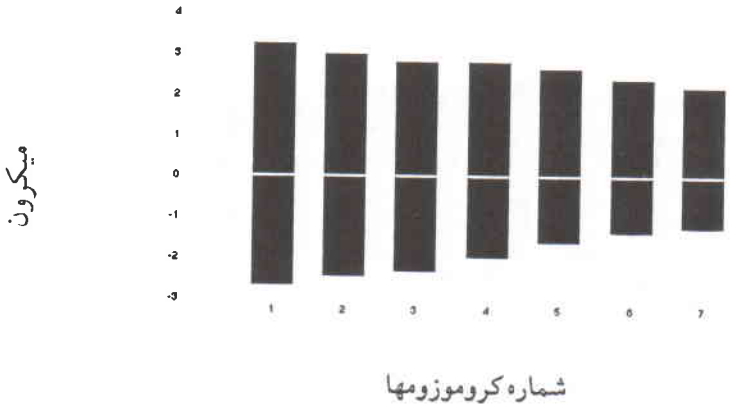
شکل شماره ۸: ایدیوگرام جمعیت تتراپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LRP4)



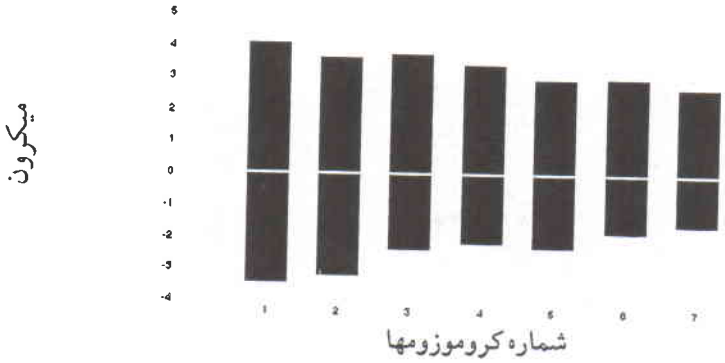
شکل شماره ۹: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LMD2)



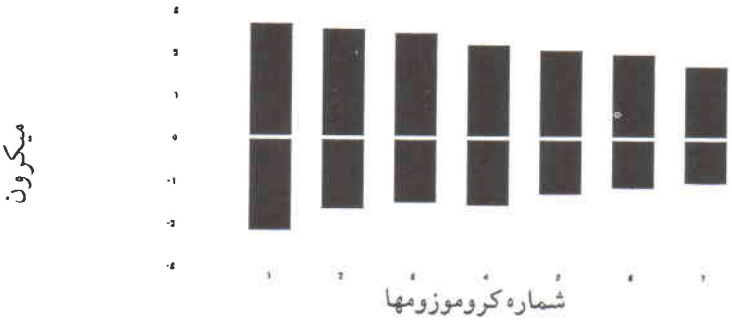
شکل شماره ۱۰: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LM3)



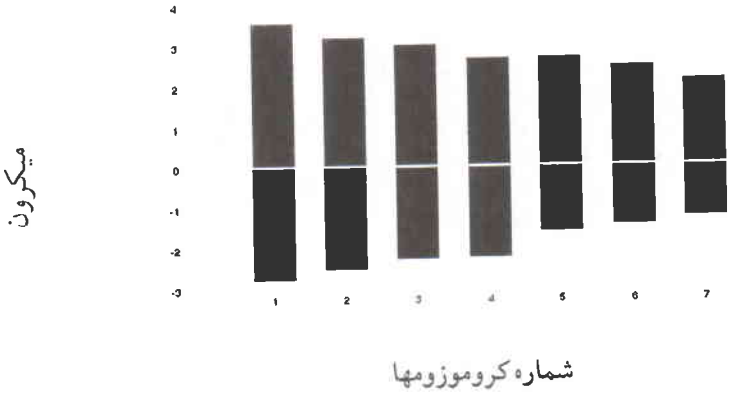
شکل شماره ۱۱: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LM4)



شکل شماره ۱۲: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. multiflorum* نمونه (LM5)



شکل شماره ۱۳: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LR2)



شکل شماره ۱۴: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LR3)

شکل شماره ۱۵: ایدیوگرام جمعیت دیپلوئید از گونه *L. rigidum* نمونه (LRD4)

منابع

میرزایی ندوشن، حسین و هاجر ندرخانی، ۱۳۷۹. مطالعه کاریوتیپی جمعیتهای تتراپلوئید لولیوم. تحقیقات ژنتیکی گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، شماره ۴: ۱۱۶-۸۷.

Deniz, B., and A. Tufan, 1997. Cytogenetic studies on diploid hybrids between annual ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and perennial ryegrass (*Lolium perenne L.*). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 21: 585-592.

Deniz, B., 1997. Meiotic behaviour in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and their triploid hybrids. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 21: 557-563.

Gennur, M.N., S.N. Kadopa, A.F. Habib, J.V. Goud, 1988a. Karyomorphological in Asiatic Cotton, I. Karyotypic analysis of species and races of Asiatic Cottons based on chromatin content, Cytologia, 53: 97-106.

Gennur, M.N., S.N. Kadopa, A.F. Habib, J.V. Goud, 1988b. Analysis of species and races of Asiatic Cottons based on nucleolar chromosome and symmetry of karyotype, Cytologia, 53: 107-114.

Huziwara, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of *Compositae*, VIII. Further studies on the chromosome of the *Aster*. American Journal of Botany 49: 116-119.

Levan, A., K. Fredga, A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201-220.

Mathew, A. and P.M. Mathew, 1982. Studies on the south Indian *Compositae* III karyomorphology of nine spesies of Blumea. Cytologia, 47: 135-162.

Romero-Zarco, C., 1968. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon, 36: 526-530.

Stebbins, G. L., 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edvard Arnold Publisher. Ltd, London.

Tai, W., and H. Ikonen, 1988. Incomplete bivalent pairing in dihaploids of *Brassica napus* L. Genome., 30: 450-457.

Karyotypic investigations in several populations of *Lolium multiflorum* and *L. rigidum*.

H. Mirzaie-Nodoushan[1] *and H. Nadarkhani*[2]

Abstract

Application of *Lolium* germplasm in breeding of available *Lolium* species requires sufficient information about different aspects, including various karyotypic characteristics. For this reason, nine populations of *Lolium multiflorum* and *L. rigidum* species, randomly taken from Natural Resources Gene Bank, were investigated for karyotypic characteristics. Five metaphase cells were studied from each population for several karyotypic characteristics, including long and short arm length, by which total length of the chromosomes, long arm to short arm and short arm to long arm ratios were calculated. The number and locations of the possible sattelites were also identified. Using several available estimation formula, karyotypic asymmetry of the populations were also investigated. Using Levan ratios, karyotypic formula of the populations and species were also determined.

Amongst the studied populations, two populations were tetraploid, five populations were diploid and two populations were a mixture of tetraploid and diploid genotypes. Several populations had one to two satellites on their chromosomes. Most of the observed chromosomes of the populations were metacentric, in which the centromers were located

1 - Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran.

2 - Payam Noor University graduate student, Tehran, Iran.

in median region. Based on one of the karyotypic asymmetry measurment parameters, DRL, within the tetraploid populations, two populations of *L. multiflorum* showed the most symmetric and asymmetric karyotypes. Within the diploid populations, a population of *L. rigidum* species showed the most symmetric and a population of the *L. multiflorum* species showed the most asymmetric karyotype.

Key Words: *Lolium*, Karyotype, Cytogenetics, Polyploid, and Karytypic asymmetry.