DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2013.3480

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۲۳۹-۲۲۶ (۱۳۹۱)

بررسی کروموزومی گونه بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) در رویشگاه‌های شمال ایران

آفاق تابنده ساروی[۱]، مسعود طبری[۲*]، حسین میرزایی‌ندوشن[۳]، کامبیز اسپهبدی[٤] و فرشته اسدی‌کرم[٥]

۱- دانشجوی دکترا، رشته جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲*- نویسنده مسؤل مکاتبات، دانشیار، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

پست‌الکترونیک: masoudtabari @yahoo.com

۳- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

٤- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، ساری

۵- کارشناس‌ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/٦/۲۱

چکیده

به‌منظور تعیین کاریوتیپ و ساختار کروموزومی گونه بلوط بلندمازو (*Quercus castaneifolia*)، از شش جمعیت از گونه مذکور در شمال کشور استفاده شد. با استفاده از مریستم ریشه، پس از اجرای مراحل پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی نمونه‌های میکروسکوپی تهیه و مطالعه شدند. نتایج نشان داد که در کلیه سلول‌های مورد بررسی هر جمعیت، تعداد کروموزوم پایه $x = ۱۲$ و همگی دیپلوئید بودند. برای بررسی تنوع بین جمعیت‌ها تجزیه واریانس و مقایسات میانگین بر اساس ۵ پارامتر مورفولوژی کروموزوم شامل طول کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت بازوی بلند به کوتاه و شاخص سانترومری انجام شد. نتایج وجود تفاوت معنی‌دار را از نظر صفات طول کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه میان جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد. فرمول کاریوتیپی در کلیه جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۲m بدست آمد. جمعیت‌های مورد مطالعه همگی از نظر دسته‌بندی کروموزومی در کلاس B استبینز قرار گرفتند که نشان‌دهنده وجود تقارن متوسط در کاریوتیپ-های مورد مطالعه می‌باشد. سایر شاخص‌های تقارن کروموزومی نیز مبین متقارن بودن نسبی کروموزوم‌ها در کلیه جمعیت‌ها بود که نشان می‌دهد این گونه از نظر تکاملی ابتدایی و تکامل نیافته است. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس پارامترهای مورفولوژی کروموزوم نیز نشان داد که در تبیین مؤلفه اول، صفات طول کروموزوم و طول بازوی بلند اهمیت بیشتری داشتند و از آنجا که مؤلفه اول به تنهایی حدود ٦٤٪ از واریانس کل را پوشش می‌دهد، می‌توان نتیجه گرفت که صفات طول کروموزوم و طول بازوی بلند بیشترین تأثیر را در تنوع داشتند. تجزیه خوشه‌ای نیز جمعیت‌های مورد مطالعه را در دو خوشه مجزا طبقه‌بندی نمود. جمعیت‌های مربوط به ارتفاعات مختلف جنگل‌های تالش در گیلان در یک خوشه و سایر جمعیت‌ها که مربوط به جنگل-های میان‌بند استان‌های مازندران و گلستان بودند، در خوشه دیگر جای گرفتند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه چند متغیره، بلندمازو، سیتوژنتیک، عدد کروموزومی، تقارن کاریوتایپ.

مقدمه

در تحقیقات به‌نژادی انجام مطالعات سیتوژنتیک از اقدامات اولیه است. زیرا تعداد کروموزوم‌ها در انتخاب روش اصلاحی مهم است (Javadi *et al.*, 2006). همچنین بررسی خصوصیات کروموزومی و مطالعات سیتوژنتیکی علاوه بر شناخت ساختار کاریوتیپی گونه گیاهی، روش مناسبی جهت بررسی تنوع بین جمعیت‌های مختلف یک گونه است. از آنجایی که ژنوم افراد حاوی اطلاعات ژنتیکی است و نتیجه بیان ژنها، بروز صفات فنوتیپی است. بنابراین تغییر در ساختمان و اندازه کروموزوم‌ها (که حامل ژن‌ها هستند) صفات فنوتیپی متفاوتی را بروز می‌دهد. مطالعات کاریوتیپی در داخل جمعیت‌های یک گونه از این نظر حائز اهمیت است که جمعیت‌های مختلف یک گونه هر یک سازش ژنومی خاص خود را با محیطی که در آن می‌رویند نشان می‌دهند (Sheidai *et al.*, 1996).

وجود اختلاف در تعداد، شکل و اندازه (ساختار کاریوتیپی) و رفتار کروموزوم‌ها هنگام تقسیم سلولی می‌تواند بیانگر اختلافات ژنتیکی باشد. به‌طورکلی، تحقیقات سیتوتاکسونومی، علاوه بر مشخص کردن ارتباط و قرابت بین جمعیت‌ها و تنوع بین آنها، می‌تواند اطلاعات با ارزشی در مورد خزانه ژنی موجود در کشور به‌منظور بهره‌گیری در بانک ژن فراهم آورد. بنابراین انجام مطالعات سیتوژنتیکی در گونه‌های گیاهی و همچنین جمعیت‌های متعلق به آنها، خصوصاً گیاهان وحشی و بومی، به دلیل فراهم نمودن اطلاعات کمی روی تاریخچهٔ تکاملی گیاه، تعیین قرابت‌های بین گونه‌ای، تعیین مشخصات کاریولوژیکی و غیره، از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است (Hesamzadeh *et al.*, 2007).

جنس *Quercus*، جنسی با گونه‌های زیاد است و تعداد کروموزوم ثابت آن ۲۴ = ۲*n* و تعداد کروموزوم پایه آن x=۱۲ بوده و به موجب آن کلیه گونه‌های آن دیپلوئید هستند (Demerico *et al.*,1995). باوجوداین ، تعداد کمی گزارش مبنی بر تفاوت سطح پلوئیدی بین گونه‌های جنس بلوط وجود دارد. ازجمله در یک مطالعه، دو پایه بلوط پدونکولاتای (*Quercus robur*) تری‌پلوئید معرفی شد که کروموزوم‌های ۲n=۳۶ را در بافت برگ داشتند (Butorina *et al.*, 1993). همچنین در مطالعه دیگری، پس از بررسی بیش از ۴۰۰ پایه از ۷ توده خالص *Q. robur* و *Q. petreae* و توده‌های مخلوط طبیعی و مصنوعی این دو گونه بلوط در آلمان شرقی فقط یک پایه تری‌پلوئید یافت شد (Naujoks *et al.*, 1995). محققان دیگری بر اساس تجزیه و تحلیل ریزماهواره و تخمین محتوای DNA گیاه روی ۴۲۱ درخت از دو گونه *Quercus robur* و *Quercus petreae* پی بردند که فقط یک پایه از هر گونه تری پلوئید بود (Dzialuk *et al.*, 2007). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تری‌پلوئیدی در مورد جنس بلوط تداوم یا سازگاری ندارد و خیلی به ندرت اتفاق می‌افتد.

در بین گونه‌های جنس بلوط در دنیا، بلندمازو (*Quercus castaneifolia* C.A. Meyer.) یکی از گونه‌های صنعتی و با ارزش‌های زیست محیطی است (Gorji-Bahri, 1987) که در جنگل‌های خزر و قفقاز انتشار داشته و در جنگل‌های شمال ایران از آستارا تا گلستان و بجنورد کشیده شده و از جلگه‌های ساحلی دریای خزر تا ارتفاعات فوقانی انتشار دارد (Sabeti, 2002). متأسفانه، در سالهای اخیر به دلایل مختلف حجم این گونه در رویشگاه‌های طبیعی در حال کاهش است. این در

حالیست که هنوز اطلاعات چندانی از توانمندی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف این گونه که در عرصه‌های نسبتا وسیعی از جنگل‌های شمال کشور پراکنده است، وجود ندارد. بنابراین به همین دلیل این تحقیق در صدد است تا با بهینه‌سازی روش ظاهرسازی کروموزوم‌ها، بهترین دستورالعمل جهت مطالعات سیتوژنتیک این گونه را مشخص کرده و کاریوتیپ کروموزومی آن را با بررسی کروموزوم‌های جمعیت‌های مختلف آن در شمال کشور تعیین نماید.

مواد و روشها

در این تحقیق شش جمعیت از گونه بلندمازو در شمال کشور(لوه گلستان، لاجیم و کلاردشت در استان مازندران، مازپشت، گردکوی و ورزمی در استان گیلان) انتخاب شدند (جدول ۱). آنگاه از هر جمعیت تعدادی پایه به طور تصادفی انتخاب و از قسمت‌های مختلف تاج هر یک مقداری بذر جمع‌آوری شد.

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه بلندمازو

رویشگاه	حوزه جنگلی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
لوه	جنگلهای لوه گرگان	٦٥٠	٥٥° ٤٠'	٣٧° ٢١'
لاجیم	جنگلهای حوزه ساری	٨٠٠	٥٣° ٠٦'	٣٦° ١٥'
کلاردشت	جنگلهای غرب مازندران	٧٠٠	٥١° ٠٥'	٣٦° ٣٥'
مازپشت	جنگلهای تالش گیلان	١٥٠	٤٩° ٠٢'	٣٧° ٣٨'
گردکوی	جنگلهای تالش گیلان	٥٥٠	٤٩° ٠٠'	٣٧° ٣٧'
ورزمی	جنگلهای تالش گیلان	٧٠٠	٤٩° ٠٥'	٣٧° ٣٩'

بذرها پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ٢٤ ساعت در آب خیسانده شدند. سپس به‌منظور جلوگیری از رشد قارچ، چند دقیقه در محلول ضدعفونی کننده هیپوکلریدسدیم (۱ درصد) قرار گرفتند. سپس در ماسه مرطوب در ژرمیناتور کشت داده شدند (Adebula & Morakinyo, 2005؛ Cardemil & perry, 2007). آنگاه نمونه‌برداری از مریستم انتهایی ریشه‌ها در ساعت‌های مختلف صبح (۸ تا ۱۰) انجام شد تا زمان مناسب نمونه‌گیری که در آن سلول‌های بیشتری در مرحله تقسیم می‌باشند مشخص گردد. در مرحله بعدی ابتدا آماده‌سازی سلول‌ها برای مطالعات سیتوژنتیک در اوایل مرحله متافاز میتوز صورت گرفت.

پس از انجام مراحل پنجگانه دستورالعمل، نمونه‌ها جهت مشاهده زیر میکروسکوپ آماده گردید. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ بررسی و از سلول‌های واقع در مرحله متافاز که کروموزوم‌های آن خوب پخش و رنگ‌آمیزی شده و قابل اندازه‌گیری بودند عکسبرداری شد. آنگاه، تعداد آنها در سلول‌های مختلف از هر جمعیت شمارش شد. لازم به ذکر است که از بین کلیه سلول‌های عکس‌برداری شده، حداقل ۳ سلول مناسب از هر جمعیت انتخاب و به‌عنوان تکرارهای این تحقیق بررسی شد.

پس از مرتب کردن کروموزوم‌ها بر روی یک صفحه در نرم‌افزار Photoshop، ابعاد کروموزوم‌ها ازجمله طول بازوی

بزرگ، طول بازوی کوچک، طول کل کروموزوم به میکرون، توسط نرم‌افزار میکرومیژر و نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه و شاخص سانترومری (CI) با استفاده از نسبت بازوی کوتاه به مجموع طول بازوها، اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس با استفاده از میانگین طول بازوهای بلند و کوتاه هر کروموزوم در هر جمعیت محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار Excel ایدیوگرام کلیه جمعیت‌های مورد مطالعه براساس طول بازوی کوتاه و بلند رسم شد. ترتیب قرار گرفتن کروموزوم‌ها در ایدیوگرام، از چپ به راست و از بزرگترین به کوچکترین کروموزوم در نظر گرفته شد. سپس به‌منظور بررسی و تشخیص تفاوت بین جمعیت‌ها از نظر صفات کروموزومی فوق، از تجزیه واریانس و مقایسات میانگین (نرم‌افزار SAS) استفاده شد.

برای بررسی تقارن کاریوتیپی نیز از شاخص‌های زیر استفاده شد:

(۱)

۱۰۰× (طول کل کروموزم‌ها/طول کوتاهترین کروموزوم)= S٪ =

طول نسبی کوتاهترین کروموزوم

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{S_i}{L_i}}{n} \qquad (۲)$$

در این رابطه A_1 شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی است که بین ۰ و ۱ متغیر می‌باشد. همچنین در این فرمول n تعداد جفت کروموزوم‌های همولوگ، S_i طول متوسط بازوهای کوچک و L_i طول متوسط بازوهای بزرگ است. طبق این رابطه، مقدار A_1 در مورد کروموزوم‌های متاسانتریک کمتر است، به‌طوری‌که اگر تمام کروموزوم‌های یک گونه از نوع متا (M) باشند، مقدار A_1 برابر صفر خواهد بود و در این حالت گونه مورد نظر بالاترین درجه تقارن کاریوتیپی را خواهد داشت.

$$A_2 = \frac{Sd}{\overline{X}} \qquad (۳)$$

در این رابطه A_2 شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی، $\overline{X}$ میانگین طول کروموزوم‌ها و Sd انحراف استاندارد طول کروموزوم‌ها برای هر گونه است. البته هرچه میزان A_2 بیشتر باشد اختلاف بین اندازه طول کروموزوم‌ها بیشتر بوده، کاریوتیپ نامتقارن‌تر و گونه تکامل یافته‌تر است (Hesamzadeh *et al.*, 2007).

شکل کلی فرم (TF%) که عبارت است از: نسبت مجموع طول بازوهای کوچک به مجموع طول کل کروموزوم‌ها ضرب در صد. هنگامی که TF% برابر ۵۰ درصد شود، بیانگر این است که سانترومرها در وسط کروموزوم قرار گرفته‌اند.

اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم (DRL) که بیانگر اختلاف حداقل و حداکثر طول نسبی کروموزوم‌ها در یک کاریوتیپ است، برای مقایسات تقارن کاریوتیپی استفاده شد. هر چه مقدار این پارامتر در یک گونه یا رقم بیشتر باشد، نشان‌دهنده این است که کاریوتیپ مربوطه نامتقارن‌تر بوده و آن گونه یا رقم در درجه بالاتری از تکامل کاریوتیپی قرار گرفته‌است. دسته‌بندی کروموزوم‌های هر کاریوتیپ بر اساس روش Levan و همکاران (۱۹٦٤) انجام شد. همچنین مقایسه تقارن کاریوتایپ براساس روش Stebbins (۱۹۷۱) انجام شد.

سپس برای بررسی تنوع از نظر پارامترهای مورفولوژیکی از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. در زمینه استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و سایر روش‌های چند متغیره در

بررسی‌های کاریوتیپی، Ebadi-Almas و همکاران (۲۰۱۲) و نیز Karimzadeh و همکاران (۲۰۱۱) از این روش‌ها به‌منظور بررسی مشابهت کروموزوم‌ها استفاده نمودند. برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نرم‌افزار SAS و جهت انجام تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار JMP استفاده شد.

نتایج

تعیین و بهینه‌سازی دستورالعمل مناسب جهت رؤیت بهتر کروموزوم‌ها:

دستورالعمل مناسب جهت مطالعات سیتوژنتیک گونه بلندمازو بهینه‌سازی شد که به موجب آن نمونه‌گیری در ساعت ۸ صبح و استفاده از آلفابرومونفتالین به مدت ۲ ساعت در دمای ٤°C به‌عنوان پیش‌تیمار، محلول فارمر به مدت ۳ ساعت در دمای ٤°C برای تثبیت، اسیدکلریدریک ۱ نرمال به مدت ٦ دقیقه در دمای ٦۰°C جهت هیدرولیز و هماتوکسیلین به مدت ۱ ساعت در دمای ٦۰°C جهت رنگ‌آمیزی، بهترین نتایج را نشان داد.

نتایج بررسی میکروسکوپی، شمارش کروموزومی و تعیین کاریوتایپ

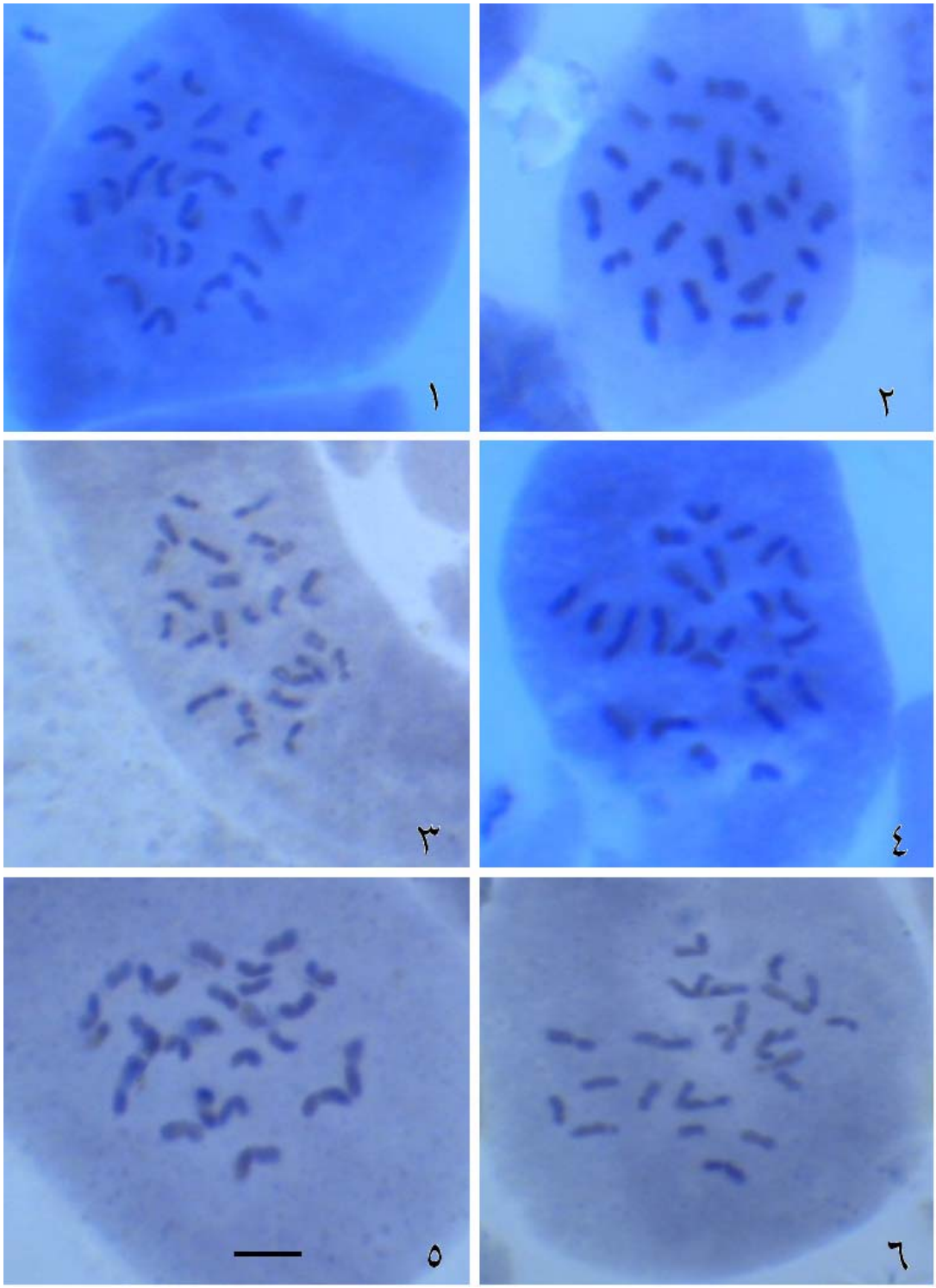
نتایج شمارش کروموزومی نشان داد که عدد کروموزومی کلیه سلول‌های مورد بررسی از هر جمعیت این گونه ٢٤ و همگی دیپلوئید بودند (شکل ۱).

ترسیم ایدیوگرام هر جمعیت

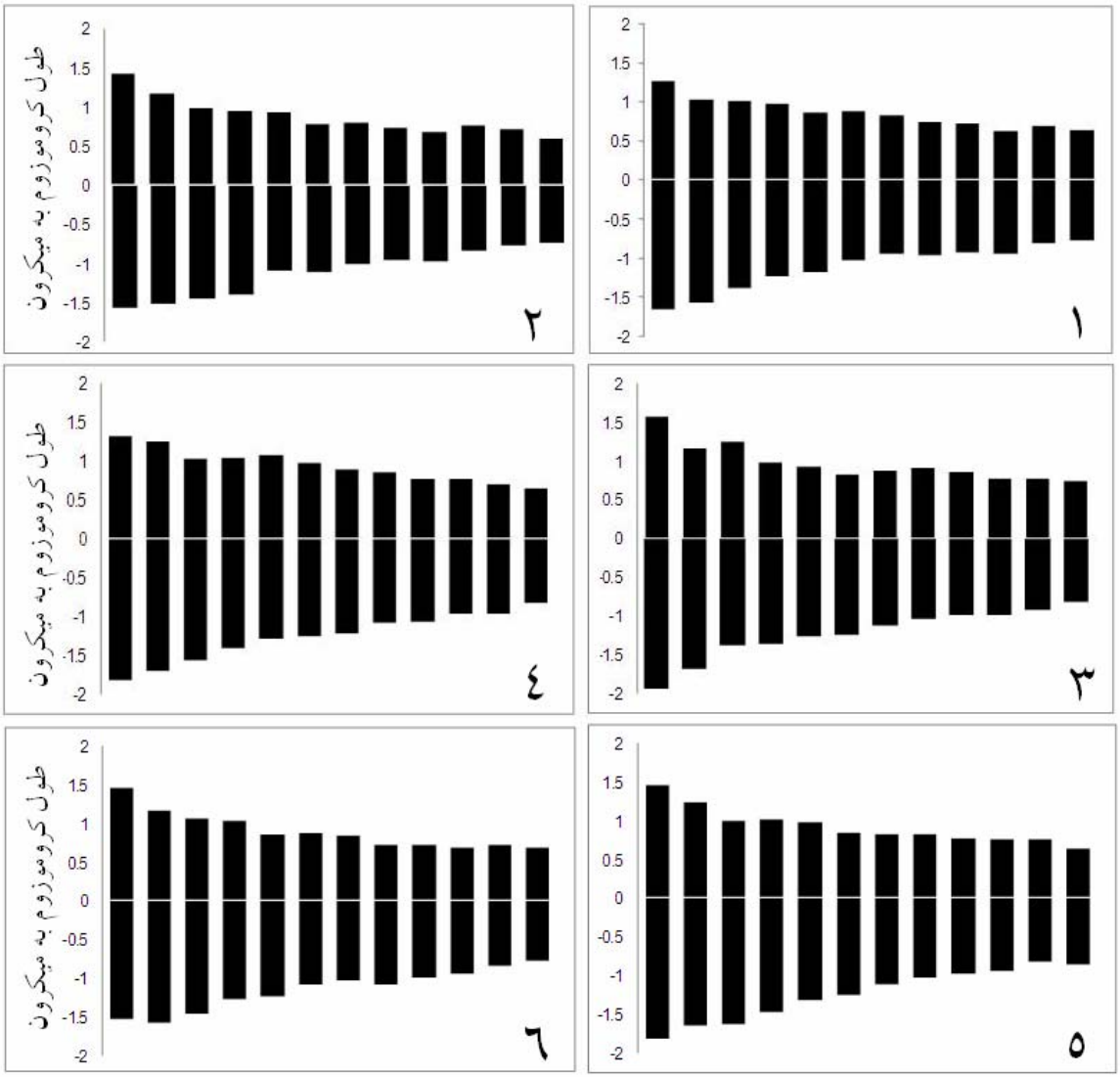
پس از اندازه‌گیری آماره‌های کروموزومی، با استفاده از میانگین طول بازوی بلند و کوتاه در هر جمعیت، ایدیوگرام کروموزومی مربوط به هر جمعیت رسم شد (شکل ۲).

تجزیه واریانس و مقایسات میانگین صفات مورفولوژی کاریوتیپ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های کاریوتیپی جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد که این جمعیت‌ها از نظر صفات طول کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌دار داشتند. اما از نظر نسبت بازوها و شاخص سانترومری تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (جدول ۲).



شکل ۱- کروموزوم‌های جمعیت‌های مورد مطالعه: ۱- جمعیت گردکوی، ۲- جمعیت مازپشت، ۳ - جمعیت کلاردشت، ٤ - جمعیت لاجیم، ٥ - جمعیت ورزمی، و ٦ - جمعیت لوه (مقیاس ارائه شده در شکل معادل ٥ میکرون است).



شکل ۲- ایدیوگرام جمعیت‌های ۱ – مازپشت، ۲ – گردکوی، ۳ - لاجیم، ٤ - کلاردشت، ٥ - لوه، و ٦ - ورزمی

دسته‌بندی میانگین جمعیت‌های مورد مطالعه از لحاظ ویژگی‌های کاریوتیپی توسط آزمون دانکن، نشان داد که جمعیت‌های استان گیلان (مازپشت، گردکوی و ورزمی) از نظر صفات طول کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه میانگین‌های کمتری را نسبت به جمعیت‌های استان‌های مازندران و گلستان (کلاردشت، لاجیم و لوه) به خود اختصاص دادند (جدول ۳).

نتایج همچنین نشان داد که جمعیت مازپشت با میانگین ۱/۹۹٤ µm و جمعیت کلاردشت با میانگین ۲/۲۳۱ µm به‌ترتیب کمترین و بیشترین طول کروموزوم را داشتند. جمعیت گردکوی نیز با میانگین ۱/۱۲۲ µm و جمعیت کلاردشت با میانگین ۱/۲۷٤ µm، به‌ترتیب کمترین و بیشترین طول بازوی بلند را به خود اختصاص دادند و جمعیت‌های مازپشت و لاجیم

به‌ترتیب با میانگین ۰/۸٦٦ µm و ۰/۹۷۷ µm کمترین و بیشترین طول بازوی کوتاه را نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژی کروموزوم‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه بلندمازو

منابع تغییر	طول کروموزوم	طول بازوی بلند	طول بازوی کوتاه	نسبت طول بازوها	شاخص سانترومری
جمعیت	۰/٤۹٤**	۰/۱۸۵**	۰/۰۸۳**	۰/۰۳۷^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}
خطا	۰/۰۳۷	۰/۰۲٤	۰/۰۱٦	۰/۰۷٤	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات	۹/۱۲	۱۳/۰۱	۱۳/٦۹	۲۰/٦۳	۱۰/٥٤

**: معنی‌دار در سطح ۱٪ ^{ns}: غیر معنی‌دار

جدول ۳- دسته‌بندی میانگین جمعیت‌های مورد مطالعه بلندمازو از نظر صفات مورفولوژی کروموزوم

جمعیت‌ها	طول کروموزوم (µm)		طول بازوی بلند (µm)		طول بازوی کوتاه (µm)		نسبت طول بازوها		شاخص سانترومری	
مازیشت	۱/۹۹٤	b	۱/۱۲۸	b	۰/۸٦٦	d	۱/۳۲٤	a	۰/٤۳٥	a
گردکوی	۲/۰۰۳	b	۱/۱۲۲	b	۰/۸۸۰	cd	۱/۳۰۱	a	۰/٤۳۹	a
لاجیم	۲/۲۱۲	a	۱/۲۳٥	a	۰/۹۷۷	a	۱/۲۸۲	a	۰/٤٤۳	a
کلاردشت	۲/۲۳۱	a	۱/۲۷٤	a	۰/۹٥۷	ab	۱/۳٦۲	a	۰/٤۳۰	a
لوه	۲/۱۹۰	a	۱/۲٥۳	a	۰/۹۳۷	abc	۱/۳٤۱	a	۰/٤۳۱	a
ورزمی	۲/۰۷۷	b	۱/۱٦٤	b	۰/۹۱٤	bcd	۱/۲۹٥	a	۰/٤۳۹	a

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین مبدأهای مختلف می‌باشد.

محاسبه شاخص‌های سنجش تقارن کاریوتیپ در هر جمعیت

درادامه شاخصه‌های تقارن کاریوتیپی شامل طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (S%)، دامنه طول نسبی کروموزوم (DRL)، شاخص A1 و A2، درصد شکل کلی (TF%)، فرمول کاریوتیپی لوان و کلاس تقارن استبینز در هر جمعیت محاسبه شد. همچنین طول کل ژنوم و طول کل بازوهای کوچک و بزرگ نیز برای هر جمعیت بدست آمد (جدول ٤). فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان در همه جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۲m بدست آمد. همه کروموزوم‌ها از نوع متاسنتریک بوده و همگی در یک سطح از تقارن کاریوتیپی قرار داشتند (جدول ٥). دسته‌بندی بر اساس روش استبینز نیز نشان داد که به غیر از جمعیت ورزمی که در کلاس۱B قرار گرفت، سایر جمعیت‌ها دارای کلاس تقارن کاریوتیپی ۲B بودند (جدول ٤).

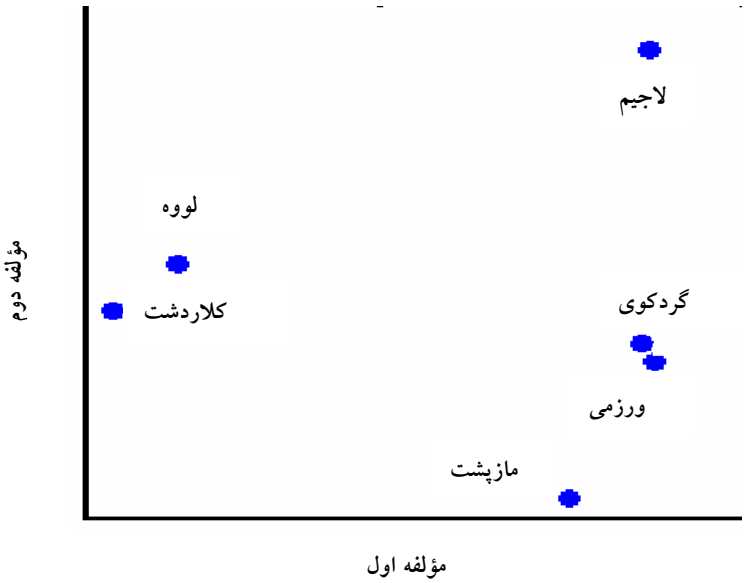
جدول ٤- مشخصات تقارن کاریوتایپی در جمعیت‌های مورد مطالعه

مبدأ	طول ژنوم	مجموع طول بازوهای بلند	مجموع طول بازوهای کوتاه	طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (S%)	فرمول کاریوتیپی (لوان)	دسته‌بندی تقارن کاریوتیپ (استبینز)	شاخص تقارن (A1)	ضریب پراکندگی پیرسون (A2)	درصد شکل کلی (TF%)	دامنه طول نسبی کروموزوم (DRL)
مازیشت	۲۳/۹۳	۱۳/٥٤	۱۰/۳۹	٦/۰۱	۱۲m	۲B	۰/۲۲٤	۰/۲٤۲	٤۳/٤۲	٦/۲۸
گردکوی	۲٤/۰٤	۱۳/٤۷	۱۰/٥٦	٥/٦۰	۱۲m	۲B	۰/۲۰۸	۰/۲٥۷	٤۳/۹٥	٦/۸٤
لاجیم	۲٦/٥٥	۱٤/۸۲	۱۱/۷۳	٥/۹۰	۱۲m	۲B	۰/۲۰۰	۰/۲٥۰	٤٤/۱۷	۷/٤۰
کلاردشت	۲٦/۷۷	۱٥/۲۹	۱۱/٤۸	٥/٦۲	۱۲m	۲B	۰/۲٤٤	۰/۲٥۰	٤۲/۸۸	٦/۱۸
لوه	۲٦/۲۸	۱٥/۰٤	۱۱/۲٤	٥/۷٦	۱۲m	۲B	۰/۲٤۳	۰/۲٦۹	٤۲/۷۸	٦/۸۱
ورزمی	۲٤/۹۳	۱۳/۹٦	۱۰/۹٦	٥/۹۰	۱۲m	۱B	۰/۲۱۳	۰/۲۳٤	٤۳/۹۹	٦/۲۲

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس کلیه ویژگی‌های هر جمعیت

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از پارامترهای مورفولوژی کروموزوم نشان داد که مؤلفه اول ٦٤٪ و مؤلفه دوم ۳٤٪ از کل واریانس را پوشش دادند. این تجزیه در واقع سهم هر مؤلفه را از واریانس کل داده‌ها نشان می‌دهد (جدول ٥). نتایج همین‌طور نشان داد که در تشکیل مؤلفه اول، صفات طول کروموزوم و طول بازوی بلند اهمیت بیشتری داشتند. در تبیین مؤلفه دوم، شاخص سانترومری و نسبت بازوها نقش مهمتری نسبت به سایر صفات داشت (جدول ٥). در نتیجه چون مؤلفه اول به تنهایی حدود ٦٤٪ از واریانس کل را پوشش می‌دهد، می‌توان نتیجه گرفت که صفات طول کروموزوم و طول بازوی بلند بیشترین تأثیر را در تنوع داشتند.

با پلات دو مؤلفه اول و دوم در دستگاه مختصات، پراکنش جمعیت‌های مورد مطالعه نیز بر این مبنا مشاهده گردید (شکل ۳). به‌عنوان نمونه همانطور که در شکل مذکور مشاهده می‌شود جمعیت لاجیم در بالای دیاگرام پراکنش قرار گرفته است. چون از نظر هر دو مؤلفه مقدار عددی بیشتری را شامل می‌شد. در مقابل جمعیت‌های گیاهی کلاردشت و لوه در نقطه مقابل قرار گرفتند که حاکی از پائین بودن مقادیر این دو جمعیت از نظر این دو مؤلفه می‌باشد. جمعیت مازیشت از نظر مؤلفه اول مقدار عددی بالا ولی از نظر مؤلفه دوم مقدار عددی ناچیزی داشته است. این امر حکایت از تفاوت‌های ذاتی گسترده بین جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر ویژگی‌های کاریوتیپی دارد.



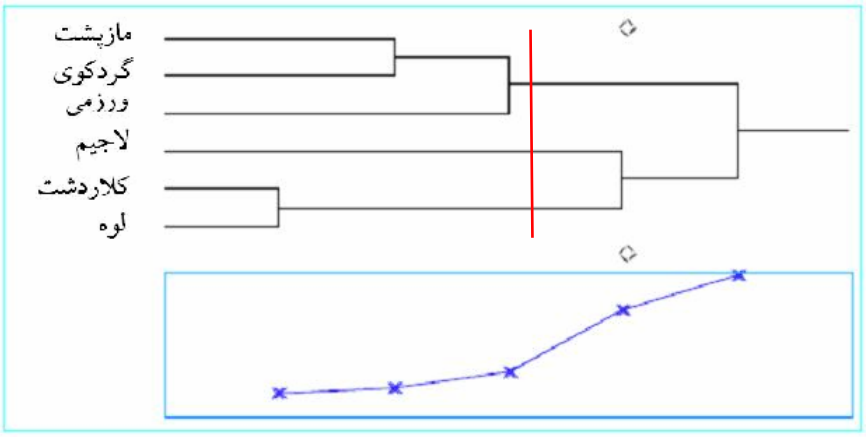
شکل ۳ – پراکنش جمعیت‌های مورد مطالعه در نتیجه پلات دو مؤلفه حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

جدول ۵- ریشه‌های مخفی و واریانس تجمعی داده‌های کروموزومی در چهار مؤلفه اول

صفات	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم	مؤلفه چهارم
طول کروموزوم	-۰/۵۳	-۰/۲۵	-۰/۰۳	-۰/۳۰
طول بازوی بلند	-۰/۵۵	-۰/۰۹	-۰/۰٤	-۰/۵۳
طول بازوی کوتاه	-۰/٤٦	-۰/٤۲	-۰/۰۵	۰/۷٦
نسبت طول بازوها	-۰/۳۵	۰/۵۸	۰/۷۲	۰/۱٦
شاخص سانترومری	۰/۲۸	-۰/٦٤	۰/٦۹	-۰/۱٦
واریانس تجمعی	۰/٦٤۲	۰/۹۷۹	۰/۹۹۹	۱/۰۰۰

تجزیه خوشه‌ای بر اساس ویژگی‌های کروموزومی

نتایج تجزیه خوشه‌ای که با استفاده از ویژگی‌های کروموزومی مورد مطالعه به روش Wards انجام شد، نشان داد، با توجه به تغییرات واریانس تشکیل خوشه‌ها (منحنی رسم شده در پایین شکل ٤) جمعیت‌های مورد مطالعه در ۲ خوشه مجزا گروه‌بندی شدند (شکل ٤). جمعیت‌های مربوط به ارتفاعات مختلف جنگل‌های تالش در گیلان در یک خوشه و سایر جمعیت‌ها که مربوط به جنگل‌های میان‌بند استان‌های مازندران و گلستان بود، در خوشه دیگر جای گرفتند.



شکل ٤- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ٦ جمعیت مورد بررسی بر اساس ویژگی‌های کروموزومی

بحث

بررسی کاریوتیپ و اجزاء کروموزوم‌های ارقام و جمعیت‌های مختلف گیاهان علفی و زراعی و برخی گونه‌های درختی بازدانه مانند تیره کاج (Sedelnikova, 2002؛Muratova & Butorina & Mozgalina, 2004) به دلایلی مانند کم بودن تعداد کروموزوم‌ها و بزرگ بودن اندازه نسبی آنها با سهولت بیشتری امکان‌پذیر بوده است. تحقیقات نشان داده است که تعداد کروموزوم‌های بیشتر مخروطیان مهم اقتصادی از n=۱۱ تا n=۱۳ متغیر بوده است. عدد کروموزومی در درختان پهن‌برگ مهم اقتصادی در دامنه‌ای وسیع‌تر از n =۷ تا n =۱۹ شامل توسکا (*Alnus* sp.)، راش (*Fagus* sp.)، ماگنولیا (*Magnolis* sp.) و چند گونه *Prunus* گزارش شده است (Wright, 1976)، به‌طوری‌که با آنچه در این تحقیق در مورد بلندمازو به‌عنوان یک گونه نهاندانه به‌دست آمده است (*n* =۱۲)، همخوانی دارد.

در خصوص مطالعه سیتوژنتیکی نهاندانگان، گزارشی از شمارش کروموزوم‌های سه گونه از جنس کهور (*Prosopis*) ارائه شده است؛ که شامل اعداد کروموزومی دو گونه *Prosopis farcta* و *Prosopis cineraria* برای اولین بار از ایران با سطح دیپلوئیدی ۲n=۲۸ و اولین گزارش از عدد کروموزومی *Prosopis koelziana* با سطوح دیپلوئیدی و تتراپلوئیدی می‌باشد (Zaeefi *et al.*, 2001). همچنین مطالعه سیتوژنتیک بر روی سه گونه از جنس گون *Astragalus* (*elegans, A. cancellatus, A. aznabjurtieus*) نشان داد که هر سه گونه با ۲n=٤x=۳۲ با پایه کروموزومی x=۸ تتراپلوئید می‌باشند (*et al.*, 2006 Javadi).

اما آنچه که از بررسی تعداد کروموزوم‌ها در این تحقیق بدست آمد، با آنچه که در مورد هشت گونه دیگر این جنس در اروپا (*Q. coccifera, Q. crenata, Q. cerris, Q. macrolepis, Q. trojana, Q. frainetto, Q. dalechamp, Q. virgiliana*) و همچنین بلوط‌های مناطق مدیترانه‌ای و تروپیکال گزارش شد (Aykut *et al.*, 2008 ;Chokchaichamnankit *et al.*, 2007 ;Demerico, *et al.*, 1995) همخوانی داشته و این مسئله را تأیید می‌نماید که تعداد کروموزوم‌های ثابت جنس بلوط ۲n=۲٤ است. تعداد کروموزوم پایه آن x=۱۲ بوده و به موجب آن کلیه درختان این گونه دیپلوئید هستند و به‌طورکلی پلی‌پلوئیدی در گونه‌های جنس بلوط نادر است (Demerico, *et al.*, 1995؛ Butorina, *et al.*, 1993؛ Naujoks, *et al.*, 1995 ؛

Dzialuk, *et al*., 2007). همچنین مطالعه کاریوتیپ هشت گونه فوق نشان داد که تشابه مورفولوژیکی زیادی بین کاریوتیپ این هشت گونه وجود دارد (Demerico, *et al*., 1995). کروموزوم‌های بدنی گونه‌های بلوط بررسی شده کوچک بودند و میانگین طول‌های کروموزومی دامنه‌ای از ۰/۹۷–۳/۷۵ µm داشتند. تحلیل‌های کاریوتیپ نشان داد که گونه‌های بررسی شده مشابه بودند، فقط گونه‌های منفرد مقداری تفاوت در شاخص‌های تقارن بین و درون کروموزومی نشان دادند. این محققان همچنین اعلام نمودند که همه گونه‌ها یک ساختار متقارن متوسط را برای کاریوتیپ پایه بلوط با تغییرات تقارنی در بعضی از جفت‌های کروموزومی نشان دادند که نتیجه آرایش دوباره در طول تکامل است. گونه‌هایی مثل *Q. dalechampii* و *Q. virgiliana* سطح عدم تقارن نسبتاً بالاتری را در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان دادند. بیشتر گونه‌های بررسی شده در این تحقیق، کاریوتیپ‌هایی با برتری کروموزوم‌های m داشتند، طوری‌که کلیه کروموزوم‌ها در گونه‌های مختلف m و sm بودند و در این بررسی کروموزوم ts یافت نشد. این یافته‌ها با نتایج بدست‌آمده از این تحقیق در خصوص ساختار متقارن و تشابه نسبی مورفولوژیکی کاریوتیپ جمعیت‌های مختلف بلوط بلندمازو همخوانی دارد.

بررسی کاریوتیپ ۱۸ گونه از ۳ جنس خانواده *Fagaceae* ازجمله جنس بلوط در شمال تایلند (Chokchaichamnankit *et al*., 2007) نیز نشان داد که کروموزوم‌های متافازی نسبتا کوچک بودند و همگی m و sm بودند. نسبت بازوهای اندازه‌گیری شده وجود تفاوت بین گونه‌های مورد بررسی را آشکار ساخت. آنها در پایان اعلام نمودند که کاریوتیپ گونه‌های بلوط آزمایش شده در این تحقیق اساساً از گونه‌های اروپایی متفاوت بودند. به‌طوری‌که گونه‌های اروپایی به طور آشکاری تعداد بیشتری کروموزوم sm داشتند و آنها عنوان نمودند که این تفاوت بین کاریوتیپ بلوط‌های تروپیکال و معتدله منشأ تکاملی دارد. همین‌طور کاریوتیپ ٤ گونه بلوط در ترکیه (*Q. coccifera, Q. petraea, Q. infectoria* و *Q. libani*) نیز نشان داد که کاریوتیپ همه گونه‌ها فقط شامل جفت کروموزوم‌های m بود. البته طول کروموزوم‌ها نیز در این تحقیق بین ۰/۸۱ µm تا ۲/۱۸ µm متغیر بود (Aykut *et al*., 2008). بر اساس این تحقیقات، بلوط‌های مناطق تروپیکال نسبت به بلوط‌های اروپا متقارن‌تر بوده و بلوط-های ترکیه متقارن‌تر از هر دو موارد قبلی گزارش شدند که این محققان علت را به روند تکامل مربوط دانستند.

بر اساس تحقیق حاضر که برای اولین بار در دنیا بر روی کاریوتیپ بلوط بلندمازو انجام شد، کاریوتیپ این گونه نسبت به همه گونه‌های مطالعه شده این جنس، ساختار متقارن‌تری نشان داد. به‌طوری‌که در جمعیت‌های مورد مطالعه، همگی کروموزوم‌ها m بودند و ساختار متقارن‌تری را حتی نسبت به گونه‌های بلوط ترکیه نشان دادند که مبین این است که این گونه از نظر تکاملی ابتدایی‌تر بوده و در مراحل اولیه تکامل قرار دارد. بر این اساس و توجه به این مسئله که بلندمازو از نظر تکاملی قدیمی‌تر از بلوط‌های اروپا می‌باشد (گونه بلندمازو به دوران سوم و بلوط‌های اروپا به دوران چهارم زمین‌شناسی تعلق دارند)، این نظریه مطرح می‌شود که ممکن است بلوط‌های اروپا طی عبور از مراحل تکامل از گونه بلندمازو مشتق شده باشند.

سپاسگزاری

در پایان از جناب آقای مهندس صادق پورمرادی (کارشناس محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع

طبیعی استان مازندران) و سرکار خانم مهندس فریبا علیزاده که در مراحل مختلف این تحقیق نگارندگان را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Adebola, P.O. and Morakinyo, J.A., 2005. Chromosome numbers of four Nigerian species of *Cola* Schott and Endlicher (Sterculiaceae). Silvae Genetica, 54: 42-44.
- Aykut, Y., Uslu, E. and TekinBabac, M., 2008. Karyological studies of four *Quercus* L. species in Turkey, Caryologia, 61:397-401.
- Butorina, A.K., 1993. Cytogenetic study of diploid and spontaneous triploid oaks, *Quercus robur* L. Annales des Sciences Forestieres, 50:144–150.
- Butorina, A.K. and Mozgalina, I.G., 2004. Specific cytogenetic characteristics of *Pinus cretaceae* and *Pinus sylvestris*. Russian Journal of Ecology, 35:156–160.
- Cardemil, J.E. and Perry, C.B., 2007. Comparative analysis of karyotypes from the Strezelecki ranges race of the complex *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* and a population in Central-Southern Chile. Silvae Genetica, 56:158-162.
- Chokchaichamnankit, P., Chulalaksananukul, W., Phengklai, C. and Anamthawat-Jonsson, K., 2007. Karyotypes of some species of *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuong forest in Chiang Mai province, northern Thailand, Thai For. Bul. (Bot.), 35:38-44.
- Demerico, S., Bianco, P. and Schirone, B., 1995. Karyotype analysis in *Quercus* spp. Silvae Genetica, 44: 66-70.
- Dzialuk, A., Chybichi, I., Welc, M., Sliwinska, E. and Burczyk, J., 2007. Presence of triploids among oak species. Annals of Botany, 99:956-964.
- Ebadi-Almas, D., Karimzadeh, Gh. and Mirzaghaderi, Gh., 2012. Karyotypic variation and karyomorphology in Iranian endemic ecotypes of *Plantago ovata* Forsk. Cytologia, 77: 1–9.
- Gorji-Bahri, Y., 1987. Quantitative and qualitative study of *Quercus* stands in forest of Kheyroodkenar (Noshahr), M.Sc. thesis of Tehran University, 47 pp (In Farsi).
- Hesamzadeh Hejazi, S.M. and Ziaei Nasab, M., 2007. Cytogenetic study on several species of *Hedysarum* in natural gene bank of Iran. Rangelands and Forest Plant Breeding and Genetic Research, 15:85-94 (In Farsi).
- Javadi, H., Razban Haghighi, A. and Hesamzadeh Hejazi, S.M., 2006, Study of karyotype in three *Astragalus* species. Pajouhesh & Sazandegi, 73:131-135 (In Farsi).
- Karimzadeh, Gh., Danesh-Gilevaei M. and Aghaalikhani, M., 2011. Karyotypic and nuclear DNA variations in *Lathyrus sativus* (Fabaceae). Caryologia, 64: 42-54.
- Levan, A., Fredga K. and Sandberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52:201-220.
- Naujoks, G., Hertel, H. and Ewald, D., 1995. Characterization and propagation of an adult triploid pedunculata oak (*Quercus robur* L.). Silvae Genetica, 44: 282-286.
- Sabeti, H., 2002. Forests, trees and shrubs of Iran, Yazd University Press, Yazd, Iran. 806 pp.
- Sedelnikova, T. S., and Muratova, E.N., 2002. Specific karyological features of Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour.) in Western Siberian Bogs. Russian Journal of Ecology, 33:303–308.
- Sheidai, M., Masoumii, A.R. and Pakravan, M., 1996. Karyological studies of some *Astragalus* taxa. The Nucleus, 39: 111-113.
- Stebbins, G.L., 1971. Chromosome evolution in higher plants. Edward Arnold Publisher. L.T.D. London, PP 216.
- Wright, W.J., 1976. Introduction to Forest Genetics. Academic Press, INC, New York, USA, 463 pp.
- Zaeefi, M., Nazeri, V., Asadi, M. and Pourseyedi, P., 2001. Chromosome counting of *Prosopis* species in Iran. Iranian Journal of Botany, 9: 239-244.

Karyotypic analysis on *Quercus castaneifolia* of north of Iran

A. Tabandeh[1], M. Tabari[*2], H. Mirzaie-Nodoushan[3], K. Espahbodi[4] and F. Asadi-corom[5]

1– PhD student, College of Natural Resources, Tarbiat Modares University of Noor, I.R.Iran
2*-Corresponding author, Assoc. Prof., College of Natural Resources, Tarbiat Modares University of Noor, I.R.Iran, Email: masoudtabari@yahoo.com
3- Prof., Forests and Rangelands Research Institute of Tehran, I.R.Iran
4- Assist. Prof., Research Center of Agriculture and Natural Resources of Mazandaran, Noor, I.R.Iran
5– M.Sc. Forests and Rangelands Research Institute of Tehran, I.R.Iran

Received: 01.05.2012 Accepted: 11.09.2012

Abstract

Six populations of *Quercus castaneifolia* collected from north of Iran, were examined for karyotype analysis. Microscopic samples were prepared and studied, using their root meristem after pretreatment, fixation, hydrolysis and staining stages. Results showed that the basic chromosome number of all populations was x = 12 and all of them were diploid. The populations' differences were investigated using variation analysis and their means were compared based on 5 chromosomal parameters: total length of the chromosomes (TL), long arm (L), short arm (S), arm ratio (AR) and centerometric index (CI). The results showed significant variation among the populations in TL, L and S. Karyotipic formula for all of the populations was 12m. The karyotypes were classified in class B of Stebbins classification. The asymmetric parameters defined moderate asymmetry in all of the studied karyotypes. Principal components analysis based on karyotypic parameters showed that TL and L play the most important role in the first component. The first component contained more than 64% of total karyotypic variation. Cluster analysis classified the populations into two classes. The Gilan province populations was assigned to one cluster and Lo’ve, Lajim and Kelardasht populations allocated to another one.

Key words: Chromosome number, Cytogenetic, Karyotypic asymmetry, *Quercus castaneifolia*, Multivariate analysis.