دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۹۴-۱۸۲ (۱۳۸۸)

مقایسه ویژگی‌های کاریوتیپی جمعیت‌های یک‌ساله و چندساله گونه‌های جنس *Lolium*

فروغ شریفان[۱]، جواد مظفری*[۲]، اختر توسلی[۳] و محمدرضا عباسی[٤]

۱- کارشناس ارشد، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر ونهال، بانک ژن گیاهی ملی ایران، کرج

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر ونهال، بانک ژن گیاهی ملی ایران، کرج

پست الکترونیک: jmozafari@spii.ir

۳- دانشیار، دانشگاه الزهرا، گروه زیست‌شناسی، تهران

٤- مربی پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

به منظور بررسی دقیق‌تر خصوصیات جمعیت‌های گونه‌های چندساله جنس *Lolium* به‌ویژه گونه *L. rigidum* که در ایران گسترش دارند، صفات کاریوتیپی ۸ جمعیت از شش گونه این جنس مقایسه گردید. تعداد کروموزوم‌های پایه در همه جمعیت‌های مورد بررسی x=7 بود. در حالی که سطح پلوئیدی آنها به استثنای گونه *L. xhybridum* دیپلوئید (2n=2x=14) بود. گونه چندساله *L. xhybridum* به‌صورت تتراپلوئید مشاهده شد. بیشتر کروموزوم‌ها در همه جمعیت‌های مورد مطالعه از نوع متاسانتریک بودند. ویژگی‌های کاریوتیپی جمعیت چندساله *Lrg2* و جمعیت یکساله Lrg1 از گونه *L. rigidum* مشابه یکدیگر بود. تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها براساس خصوصیات کاریوتیپی توانست جمعیت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید را از هم متمایز سازد. جمعیت‌های دیپلوئید به دو گروه مجزا تقسیم‌بندی شدند که در آن دو جمعیت ایرانی *Lrg2* (چندساله) و *Lrg1* (یک‌ساله) از گونه *L. rigidum* در یک گروه و سایر جمعیت‌های یک‌ساله ایرانی و چندساله خارجی در گروه دیگر قرار گرفتند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که صفات کاریوتیپی تفاوت طول نسبی حداکثر و حداقل، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و طول کل کروموزوم در مؤلفه اول بیشترین سهم را در واریانس بین جمعیت‌ها داشتند. بر اساس این تجزیه دو جمعیت گونه *L. temulentum* و گونه *L. xhybridum* از سایر جمعیت‌ها جدا شدند. جمعیت چندساله *Lrg2* و یک‌ساله *Lrg1* از گونه *L. rigidum* در یک گروه و با فاصله بیشتری ازگروه دیگر که هر سه تیپ چندساله (*L. Perenne*)، دوساله (*L. multiflorum*) و یک‌ساله (*L. persicum*) و جمعیت Lrg3 گونه *L. rigidu*) را شامل می‌شد قرار گرفتند. بر اساس این نتایج ویژگی‌های کاریوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه ارتباط اختصاصی قابل توجهی با چندساله و یا یک‌ساله بودن نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: *Lolium*، کاریوتیپ، کروموزوم، سیتوژنتیک، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

جنس *Lolium* با نام فارسی چچم و نام انگلیسی Ryegrass یکی از مهمترین گراس‌های مناطق معتدله است که از نواحی مدیترانه‌ای منشأ گرفته و به‌طور گسترده‌ای در اروپا، آسیای جنوب‌غربی، آسیای میانه و شمال آفریقا گسترش یافته (Tsvelev,1989) و امروزه در

سراسر نواحی معتدله دنیا پراکنده شده است(Bennett, 1997). جنس *Lolium* دارای ۸ گونه است که بیشتر آنها از ارزش غذایی بالایی در مراتع مناطق مختلف برخوردار هستند. در کشور ایران نیز تعدادی از گونه‌های مهم جنس *Lolium* پراکنده هستند. گونه‌های شناخته شده‌ی این جنس در دنیا عبارتند از:

L. rigidom Goud., *L. multiflorum* Lam., *L. persicum* Boiss&Hohen.ex Boiss.
L. perenne L. , *L. remotum* Schrank., *L. temulentum* L.,*L. canarience* Steva.,
L. loliaceum Borg & Chavd (Zwierzykowski 1996).

دو گونه از جنس *Lolium* در سطح جهانی از اهمیت کشاورزی قابل توجهی برخوردار هستند. این دو گونه عبارتند از: ری‌گرس چندساله (*L. perenne* L.) و ری‌گرس ایتالیایی (*L. multiflorum* Lam.) . هر دو گونه اغلب برای چمن‌کاری و فضای سبز مورد استفاده قرار می‌گیرند. به جز گونه‌ی *L. perenne* که گونه‌ای پایا و چندساله است، ما بقی گونه‌ها به صورت یک‌ساله یا بندرت دوساله دیده می‌شوند) Bennett, 2000). بذر گونه *L. persicum* که به آن چمن ایرانی می‌گویند در برخی کشورها برای تهیه علوفه کشت می‌شود. گونه *L. rigidum* نیز عمدتاً به صورت یک‌ساله دیده می‌شود و ارزش علوفه‌ای زیادی برای مراتع کوتاه عمر بهاری دارد. مطالعات اخیر جمعیت‌های ایرانی این گونه نشان داد که علاوه بر جمعیت‌های گسترده یک‌ساله، جمعیت‌های چندساله نیز در این گونه دیده می‌شود (Sharifan *et al.*, 2008; Sharifan, 2009)، گونه‌های جنس *Lolium* عموماً به حالت دیپلوئید (2n=2x=14) بوده و دارای عدد پایه کروموزومی ۷(x=7) می‌باشد ولی اعداد کروموزومی ۱۴ و ۱۵ و ۲۸ نیز در این جنس گزارش شده است (Zwierzykowski and Naganovski,1996; Zimmermann, 1995). مطالعات انجام شده دیگر بر روی کاریوتیپ گونه‌های جنس *Lolium* در ایران نیز وجود جمعیت‌های تتراپلوئید در گونه‌هایی مانند *L. perenne* و *L. rigidum* را نشان داد ه است Mirzaie Nodoushan & (Nadarkhani, 2000). همچنین در مطالعه دیگری شمارش کروموزومی برروی ۵ جمعیت گونه *L. multiflorum* و ٤ جمعیت از گونه *L. rigidum* (Mirzaie Nodoushan & Nadarkhani, 2001) نشان داد که هر دو سطح پلوئیدی دیپلوئید و تتراپلوئید در این گونه‌ها وجود داشته و علاوه بر آن جمعیت مخلوطی از ژنوتیپ‌های دیپلوئید و تتراپلوئید نیز دیده شده‌اند. بررسی دقیق‌تر کاریوتیپ‌ها نشان داد که گونه‌های خودگشن *L. temulentum*، *L. remotum*، *L. loliaceum* به‌دلیل داشتن فشردگی ثانوی دور از مرکز در یک گروه و گونه‌های دگرگشن *L. perenne*، *L. multiflorum* و *L. rigidum* که فشردگی ثانوی نزدیک به مرکز دارند در گروه دیگری قرار می‌گیرند (Thomas & Malik, 1966). بر اساس مطالعات Mirjalili (۲۰۰۲) در جمعیت های گونه‌های مختلف *Lolium* در ایران، الگوهای متنوعی از تقارن مشاهده شده است. بیشتر جمعیت‌ها دارای کروموزوم‌های متاسانتریک و ساب‌متاسانتریک بودند. گونه‌های دیپلوئید *L. rigidum* و *L. temulentum* از تقارن کمتری برخوردار بودند اما یک جمعیت دیپلوئید از *L. rigidum* و یک جمعیت از *L. temulentum* نیز دارای تقارن کاریوتیپی بالا بودند. تحقیق روی میزان تولید علوفه از گونه چندساله‌ی این جنس (*L. perenne*) نشان داد که ارقام تتراپلوئید عملکرد علوفه و دیرزیستی بیشتری نسبت به دیپلوئیدها دارند و دیپلوئیدها ساقه گل دهنده و بذر بیشتری تولید می‌کنند. در مورد جمعیت‌های گونه یک‌ساله

این جنس (*L. rigidum*)، نیز همین امر صادق است (Jafari *et al.*, 2000).

به‌رغم وجود تفاوت در رفتارهای اکولوژیک یک‌ساله و چندساله بودن در گونه *L. rigidum* در ایران، تفکیک آنها براساس صفات مورفولوژیک امکان‌پذیر نیست(Sharifan *etal.*, 2008; Sharifan, 2009). در همه گزارش‌های قبلی نیز گونه *L. rigidum* گونه یک‌ساله ذکر شده است(Bor, 1970; Mill,1985; Bennet, 2000).

در این تحقیق به منظور بررسی بیشتر اکوتیپ‌های متفاوت گونه *L. rigidum*، ویژگی‌های کروموزومی جمعیت‌های یک‌ساله و چندساله آن در مقایسه با دیگر گونه‌های یک‌ساله و چندساله شناخته شده جنس *Lolium* موجود در ایران و خارج از کشور مانند گونه چندساله *L. perenne*، گونه دوساله *L. multiflorum* و گونه *L. xhybridum* مطالعه گردید و جایگاه تاکسونومیک این اکوتیپ‌ها بر اساس تجزیه‌های چند متغیره و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روشها

تعداد هشت جمعیت از مراکز اصلی پراکنش گونه‌های مختلف جنس *Lolium* در ایران شامل سه جمعیت از گونه *L. rigidum* (چندساله و یک‌ساله)، یک جمعیت از هر کدام از گونه‌های *L. perenne*، *L. multiflorum*، *L. xhybridum* (هیبرید طبیعی از دو گونه *L. perenne* و *L. multiflorum*)، *L. persicum* و *L. temulentum* در این مطالعه بررسی گردید (جدول ۱). بذرهای سالم و رسیده جمعیت‌های مورد نظر تهیه گردید و جهت ضدعفونی شدن، ابتدا به مدت ۵ دقیقه در محلول ۲۰٪ حجمی آب ژاول (وایتکس) قرار داده شده و بعد به‌طور کامل با آب شسته شدند. بعد بذرها بر روی یک کاغذ صافی مرطوب در داخل پتری‌دیش گذاشته شده و در دمای اتاق درون یک جعبه (در روشنایی بسیار کم)، قرارگرفتند. پس از گذشت ۲ تا۳ روز، زمانی که طول ریشه‌چه‌ها به حدود ۱/۵–۱ cm رسید، در ساعات اولیه صبح با فاصله زمانی یک ساعت (۸ تا ۱۱)، جهت تعیین زمان مناسب تقسیم کروموزوم‌ها نوک ریشه‌ها نمونه‌گیری شدند.

ریشه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد درون محلول ۰/۰۰۲ نرمال ۸–هیدروکسی کینولین پیش‌تیمار شدند. مریستم‌های پیش‌تیمار شده، پس از خارج کردن از محلول مذکور به‌طور کامل با آب‌مقطر شست و شو داده شده و به‌منظور تثبیت مریستم‌های آن به مدت ٢٤ ساعت در محلول تثبیت کننده لویتسکی مرکب از محلول کرومیوم تری اکسید و فرمالدئید ٤٠٪ به نسبت ۱:۱، در دمای ٤ درجه قرار داده شدند. پس از خارج کردن ریشه‌ها از محلول تثبیت کننده و شست و شوی کامل با آب به مدت۳ ساعت، جهت نگهداری آنها تا زمان مناسب مطالعه، در الکل ۷۰٪ و در یخچال نگهداری شدند. ریشه‌ها با سود یک نرمال هیدرولیز شدند. بدین ترتیب که پس از خارج کردن ریشه‌ها از الکل ۷۰٪ و شست و شو با آب‌مقطر به مدت ۵ دقیقه، در سود یک نرمال که از قبل توسط حمام آب گرم دمای آن به ٦۰ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن ریشه‌ها از سود خارج شده و با آب‌مقطر به مدت ۳۰ دقیقه شست و شو داده شدند. پس از هیدرولیز و شست و شو، جهت رنگ‌آمیزی ریشه‌ها از مخلوط هماتوکسیلین ٤٪ و یک گرم سولفات آمونیوم فریک، به مدت ۱۷ ساعت در دمای ۳۰ درجه استفاده شد. بعد از رنگ آمیزی، ریشه‌ها بطور کامل و با احتیاط شسته

شده و بعد در زیر لوپ نوک ریشه‌ها بـه انـدازه حـدود ۱ میلی‌متر جدا شده و مقدار کمی آنـزیم سـیتاز بـرای حـل شدن دیواره‌های سلولی بر روی آنها ریخته شـد. بعـد بـه روش اسکواش نمونه تهیه شد. نمونه‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰ به وسیله میکروسکوپ نوری مشاهده شدند و تعـداد ۹-۵ سـلول متافـازی مناسـب از هـر جمعیـت (۵-٤ ریـشه)، انتخاب شده و از آنهـا عکـس گرفتـه شـد. پـس از تهیـه متافازهای مناسب، بـا اسـتفاده از نـرم افـزارPkap، طـول بازوی بلند (LA)، طـول بـازوی کوتـاه (SA)، طـول کـل کروموزوم (TL)، نسبت بازوی بلند بـه کوتـاه (r-value)، طول نـسبی کرومـوزوم (Relative L) و نـوع کرومـوزوم تعیین شد. همچنین برای بررسی وضعیت تقارن کاریوتیپی از جـدول دوطرفـه Stebbins اسـتفاده شـد (Stebbins, 1971). شاخص‌های اخـتلاف طـول نـسبی بزرگتـرین و کوچکترین کروموزوم (DRL)، درصد شکل کلی(TF%)، طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (S%) و ضریب تغییرات نیز محاسبه شدند. نوع کروموزوم‌ها نیز بر اسـاس روش معمول (Levan *et al.*, 1964) تعیین شـد. بـرای تعیـین سهم هر یک از صفات اندازه‌گیری شده در ایجاد تنوع بین جمعیت‌ها، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و برای گـروه‌بنـدی آنها تجزیه خوشه‌ای (Ward) بر اساس صفات کـاریوتیپی انجام شد.

جدول۱- مشخصات شناسنامه‌ای جمعیت‌های مورد بررسی کروموزومی در بانک ژن گیاهی ملی ایران

کد جمعیت	نام گونه	شماره نمونه در بانک ژن	محل جمع‌آوری	ارتفاع	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
Lrg1	*L. rigidum*	TN00050	خراسان شمالی	٥٤٠	٤٢ ٣٧	٥٥ ٥٦
Lrg2	*L. rigidum*	TN00129	آذربایجان‌غربی	١٠٦٠	٢٤ ٣٦	٣٢ ٤٥
Lrg3	*L. rigidum*	TN00123	آذربایجان‌غربی	١٠٦٠	١٠ ٣٦	٣٠ ٤٥
Lps	*L. persicum*	TN00089	لرستان	١٢٥٠	٣٧ ٣٣	٠٩ ٤٧
Ltm	*L. temulentum*	TN00112	کردستان	١٤٨٠	٠٩ ٣٦	٠٣ ٤٦
Lpn	*L. perenne*	TN00059	آلمان	–	–	–
Lmu	*L. multiflorum*	TN00060	آلمان	–	–	–
Lxh	*L. xhybridum*	TN00061	آلمان	–	–	–

نتایج

شمارش کروموزومی جمعیت‌های منتخب از هر گونه در پهنه‌های متافازی هر یک از آنها نشان داد همه گونه‌ها دارای سـت کرومـوزومی بـا پایـه هفـت(x=7) بودنـد. گونـه *L. xhybridum* تتراپلوئید و پنج گونـه مـورد بررسـی دیگـر دیپلوئید تشخیص داده شدند (شکل۱ و جـدول ۲). فرمـول کاریوتیپی جمعیت‌های مورد نظر که با استفاده از نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه تعیین شده است (Levan *et al.*, 1964) در جدول ۲ آمده است. جمعیت چندسـاله Lrg2 از گونه *L. rigidum* و جمعیت یک‌ساله Lrg1 از همـین گونـه دارای هفـت کرومـوزوم متاسـانتریک در یـک مجموعـه کروموزومی هاپلوئید خـود بودنـد، در حـالی کـه جمعیـت چندساله گونه *L. perenne* شش کروموزوم متاسـانتریک و یک کروموزوم ساب متاسانتریک را نـشان داد. همچنـین بـا

توجه به این جدول در جمعیت‌های گونه *L. multiflorum* و *L. temulentum* ۷ کروموزوم متاسانتریک مشاهده شد ولی جمعیت Lrg3 از گونه *L. Rigidum* دارای شش کروموزوم متاسانتریک و یک کروموزوم ساب‌متاسانتریک بوده و جمعیت گونه *L. persicum* پنج کروموزوم متاسانتریک و دو کروموزوم ساب‌متاسانتریک را نشان دادند. جمعیت تتراپلوئید گونه *L. xhybridum* نیز دارای ۱۳ کروموزوم متاسانتریک و یک کروموزوم ساب‌متاسانتریک بود. بیشترین طول کل کروموزوم‌ها، طول بازوی بلند، بازوی کوتاه و میانگین طول کروموزوم‌ها بـه‌ترتیب بـا مقـادیر ٦١/٢٧٤، ٣٥/٣٠١، ٢٥/٩٧٤ و ٨/٧٥ میکرون در جمعیت گونه *L. persicum* مشاهده شد و کمترین طول کل کروموزوم‌ها، طول بازوی بلند، بازوی کوتاه و میانگین طول کروموزوم‌ها به‌ترتیب با مقادیر٦/٦٢، ١٩/٩٤٦، ٢٦/٤١٢ و ٤٦/٣٥٩ میکرون مربوط به جمعیت یک‌ساله Lrg1 از گونه *L. rigidum* بود. نسبت مجموع طول بازوی بلند به بازوی کوتاه از ١/٢٥ در جمعیت گونه *L. perenne* تا ١/٣٦ در جمعیت گونه *L. persicum* متغیر بود. پارامترهای طول کل کروموزوم‌ها، مجموع طول بازوهای بلند، کوتاه و میانگین طول کروموزوم‌ها در جمعیت تتراپلوئید گونه *L. xhybridum* به ترتیب دارای مقادیر ٩٨/٩٣٣، ٥٦/٥٦٣، ٤٢/٣٧١ و ٧/٠٧ میکرون بودند. نسبت مجموع طول بازوهای بلند به بازوی کوتاه نیز در این جمعیت برابر ١/٣٣ بود.

مقایسه ویژگی‌های کاریوتیپی جمعیت چندساله Lrg2 از گونه *L. rigidum* با جمعیت‌های یک‌ساله Lrg1 و Lrg3 از همین گونه و جمعیت چندساله گونه *L. perenne* نشان داد که جمعیت مذکور (Lrg2) از نظر پارامترهای میانگین طول کروموزوم‌ها (X) و مجموع طول کل کروموزوم‌ها (T.L) تشابه بیشتری با جمعیت گونه *L. perenne* دارد ولی از لحاظ سایر پارامترها یعنی درصد شکل کلی(TF%)، طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (S%) اختلاف طول نسبی حداکثر و حداقل(D.R.L)، ضریب تغییرات(CV%) و فرمول کاریوتیپی، به جمعیت یک‌ساله Lrg1 از گونه *L. rigidum* بیش از جمعیت چندساله Lpn از گونه *L. perenne* شبیه است (جدول ٢). از لحاظ پارامترهای طول بازوی بلند، بازوی کوتاه و میانگین طول کروموزوم‌ها جمعیت چندساله *Lrg2* از گونه *L. rigidum* با هر دو جمعیت Lrg1 از گونه *L. rigidum* و جمعیت گونه *L. perenne* تفاوت کمی را نشان داد. بیشترین مقدار پارامتر S%(طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم) و کمترین مقدار پارامتر (C.V.) ضریب تغییرات، در جمعیت گونه *L. temulentum* مشاهده شد (جدول ٢).

در تجزیه خوشه‌ای به روش Ward، بر اساس ویژگی‌های کاریوتیپی، ٨ جمعیت مورد مطالعه در دوکلاد اصلی قرار گرفتند (شکل٢). در کلاد اول جمعیت تتراپلوئید گونه*L. xhybridum* و در کلاد بعدی بقیه جمعیت‌ها قرار گرفتند. کلاد دوم نیز خود شامل دوکلاد کوچکتر بود که در یکی جمعیت‌های گونه‌های *L. rigidum*، *L. persicum*، *L. perenne* و *L. multiflorum* قرارگرفتند و کلاد کوچکتر بعدی نیز شامل جمعیت یک‌ساله Lrg1، جمعیت چندساله Lrg2 از گونه *L. rigidum* و جمعیت گونه *L. temulentum* بود. دو جمعیت Lrg1 و Lrg2 کمترین فاصله ژنتیکی را داشتند. همچنین جمعیت گونه *L. multiflorum* و گونه *L. perenne* نیز با یکدیگر تشکیل یک کلاد کوچک را داده و شباهت بالایی را نشان دادند (شکل ٢).

در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی سه مؤلفه اصلی اول، دوم و سوم، در مجموع بیش از ٨٩ درصد از واریانس بین جمعیت‌ها را توجیه نمودند (جدول ٣). مؤلفه اول ٤٣/٦٢

درصد از واریانس جامعه را به خود اختصاص داد. در این مؤلفه صفات اختلاف طول نسبی حداکثر و حداقل (D.R.L)، طول بازوی کوتاه (S)، طول بازوی بلند(L) و طول کل کروموزوم (T.L) بیشترین نقش را در ایجاد تنوع بین جمعیت‌ها داشتند. در مؤلفه دوم صفات شاخص تفرق (DI)، طول نسبی کوتاهترین کروموزوم(S%) و میانگین طول کروموزوم‌ها (X) بیشترین اهمیت را در واریانس بین جمعیت‌ها داشته و در مؤلفه سوم نیز صفات نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه (L/S)، درصد شکل کلی (TF%) و میانگین طول کروموزوم‌ها(X) بیشترین تأثیر را داشتند.

در دیاگرام پراکنش گونه‌ها بر اساس مؤلفه‌های اصلی (شکل۳)، جمعیت چندساله Lrg2 از گونه *L. rigidum* با جمعیت یک‌ساله Lrg1 از همین گونه در یک گروه قرار گرفته و فاصله بسیارکمی را از یکدیگر نشان دادند، ولی با جمعیت چندساله گونه *L. perenne* با فاصله زیادی قرار گرفتند. همچنین چهار جمعیت گونه‌های *L. perenne*، *L. multiflorum*، *L. rigidum* و *L. Persicum* یک گروه مجزا را تشکیل دادند. این دیاگرام نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را به خوبی تأیید نمود.

بحث

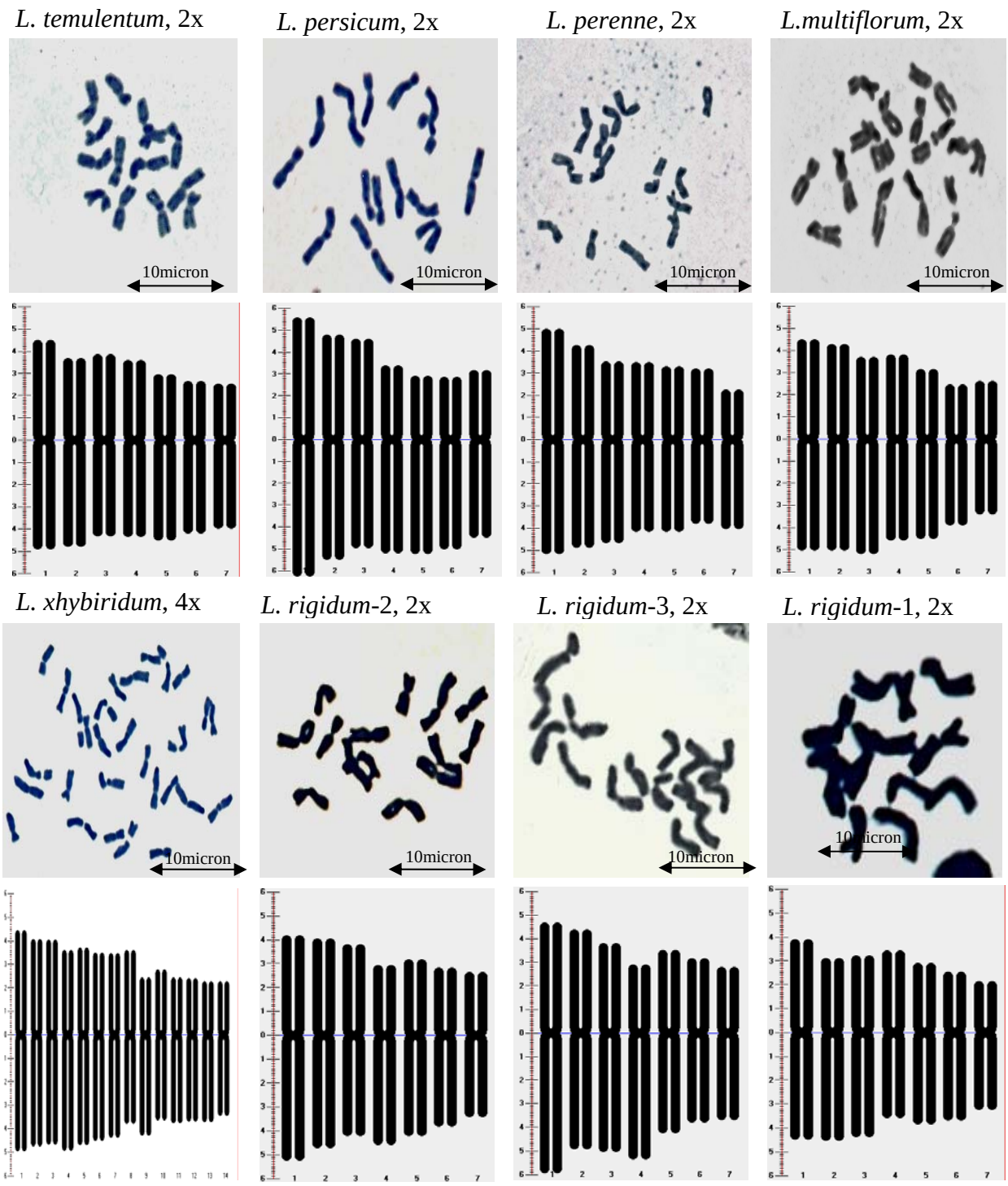
نتایج حاصل از این تحقیق پایه کروموزومی x=7 را برای تمام گونه‌های این جنس نشان داد. گونه *L. xhybridum* تتراپلوئید و سایر گونه‌ها دیپلوئید بودند. گونه *L. multiflorum* در بیشتر گزارش‌ها دیپلوئید (2n=2x=14) ذکر شده است (Hovin & hill, 1966; Evans & Macefield,1974). در حالی که در یک مطالعه دیگر نمونه‌های ژنتیکی تتراپلوئید نیز در این گونه گزارش شده است (Wu & Chen, 1991) . سطح پلوئیدی گونه *L. perenne* در مطالعات متعددی 2n=2x=14 گزارش شده است(Evans & ; Faruki,1987 Macefield,1974). این در حالی است که سطح پلوئیدی 2n=2x=14 با تعداد۲۶ تا ۳۰ کروموزوم نیز در مطالعات قبلی برای این گونه گزارش شده است (Simonsen, 1976) گونه *L. rigidum* و گونه *L. temulentum* در گزارش‌های زیادی از جمله: (Evans & Jenkins,1986; Humphries, 1978; Macefield,1974) دیپلوئید معرفی شده‌اند. گونه *L. persicum* نیز به صورت تتراپلوئید گزارش شده است (Hovin & hill, 1966). در گونه *L. xhybridum* که هیبرید بین دو گونه *L. perenne* و *L. multiflorum* است و در این تحقیق به صورت تتراپلوئید مشاهده شد در یک گزارش قبلی سطح پلوئیدی آن را دیپلوئید(2n=2x=14) نیز گزارش کرده‌اند (Spies & Voges, 1988).

بیشتر کروموزوم‌ها در تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه از نوع متاسانتریک بوده و سانترومر آنها در منطقه میانی قرار داشت (شکل ۱ و جدول ۲). این مشاهده‌ها با بررسی‌های کاریولوژیکی *Lolium* که قبلا در ایران انجام شده هماهنگ می‌باشد (Mirjalili, 2002). قرار گرفتن جمعیت‌های مورد بررسی در کلاس 1A جدول Stebbins بیانگر تقارن کاریوتیپی بالا در آنها بوده و نشان داد که در مراحل اولیه تکامل قرار دارند. مقایسه فرمول کاریوتیپی جمعیت چندساله Lrg2 از گونه *L. rigidum* با جمعیت یک‌ساله Lrg1 از همین گونه و جمعیت چندساله گونه *L. perenne* نشان داد که دو جمعیت چندساله و یک‌ساله از گونه *L. rigidum* با یکدیگر تشابه بیشتری داشته و متفاوت از جمعیت چندساله گونه *L. perenne* با شش کروموزوم متاسانتریک و یک کروموزوم

ساب‌متاسانتریک مشاهده می‌شوند. علاوه بر این شواهد کاریوتیپی، ارزیابی صفات مورفولوژیک نیز نشانگر تفاوت بین جمعیت‌های چندساله *L. rigidum* و جمعیت‌های چندساله دیگر بود (Sharifan *et al*., 2008; Sharifan, 2009). نتایج تجزیه خوشه‌ای صفات کاریوتیپی نیز نشان داد که جمعیت چندساله Lrg2 گونه *L. rigidum* با جمعیت یک‌ساله Lrg1 از همین گونه کمترین فاصله ژنتیکی را داشتنه و در یک کلاد جدا از جمعیت چندساله گونه *L. perenne* قرار می‌گیرد.

در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات D.R.L و S% به‌ترتیب در مؤلفه‌های اول و دوم از تأثیر بالایی برخوردار بودند همین مشاهده تأیید گردید. به طوری که در بای‌پلات این دو مؤلفه جمعیت چندساله Lrg2 گونه *L. rigidum* با جمعیت یک‌ساله Lrg1 از همین گونه فاصله بسیار کم و با جمعیت چندساله گونه *L. perenne* فاصله زیادی را نشان داد. به این ترتیب وجود جمعیت‌های چندساله مانند جمعیت *Lrg2* در گونه *L. rigidum* با قرابت ژنتیکی مشاهده شده تأیید گردید. صفت D.R.L در دو جمعیت گونه *L. temulentum* و گونه *L. xhybridum* از مقدار کمتری نسبت به سایر جمعیت‌ها برخوردار بود. همچنین صفت S% در جمعیت اول بیشترین مقدار و در جمعیت دوم کمترین مقدار را نسبت به سایر جمعیت‌ها داشت (جدول ۲). بنابراین جمعیت‌های این دو گونه در نمودار بای‌پلات پراکنش گونه‌ها با فاصله زیادی از جمعیت‌های دیگر قرار گرفتند (شکل ۳). در حالی که دو جمعیت گونه *L. multiflorum* و گونه *L. perenne* با فاصله بسیار کمی از یکدیگر قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای حاصل از اندازه‌گیری‌های مورفولوژیک انجام شده بر روی این جمعیت‌ها نیز تشابه بالای این دو جمعیت را نشان داد (Sharifan *etal*., 2008; Sharifan, 2009). نتایج تحقیقات Essad، (1954) نیز نشان داد که کاریوتیپ‌های *L. perenne* و *L. multiflorum* بسیار شبیه هستند. شاید بتوان خارجی بودن این دو جمعیت و یکسان بودن منشأ جغرافیایی آنها را (جدول۱) در بررسی حاضر، دلیلی بر تشابه بالای کروموزومی و مورفولوژیکی آنها نیز دانست. جمعیت گونه *L. xhybridum* که هیبریدی از دو گونه *L. perenne* و *L. multiflorum* است، از نظر پارامترهای DI (شاخص تفرق)، CV% (ضریب تغییرات)، TF% (درصدشکل کلی) و L/S (نسبت مجموع طول بازوهای بلند به کوتاه) به جمعیت گونه *L. perenne* شباهت بیشتری نشان داد. نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از بررسی‌های RAPD انجام شده بر روی این جمعیت‌ها نیز جمعیت گونه *L. xhybridum* را با فاصله ژنتیکی کمتری از جمعیت *L. perenne* و با فاصله ژنتیکی بیشتری از جمعیت *L. multiflorum* قرار داد (Sharifan, 2009).

نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد کروموزوم‌های پایه در تمام جمعیت‌های مورد بررسی x=7 و سطح پلوئیدی همه آنها به استثنای گونه *L. xhybridum* دیپلوئید(2n=2x=14) بوده و گونه *L. xhybridum* نیز به صورت تتراپلوئید مشاهده شد. درحالی‌که ویژگی‌های کروموزومی گونه *L. xhybridum* که حاصل تلاقی دو گونه *L. perenne* و *L. multiflorum* می‌باشد، شباهت بیشتری با گونه *L. perenne* نشان داد. ویژگی‌های کاریوتیپی جمعیت چندساله Lrg2 گونه *L. rigidum* نیز شباهت بیشتری به جمعیت یک‌ساله Lrg1 همان گونه نشان داد و این گونه تشابه با تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای صفات کاریوتیپی نیز تأیید گردید.



شکل ۱- کروموزوم‌های متافازی (بالا) و ایدیوگرام (پایین) بر حسب میکرومتر در جمعیت‌های مورد بررسی از گونه‌های جنس *Lolium* در بانک‌ژن گیاهی ملی ایران

جدول۲- پارامترهای سنجش تقارن کاریوتیپی در جمعیت‌های مورد مطالعه جنس *Lolium*

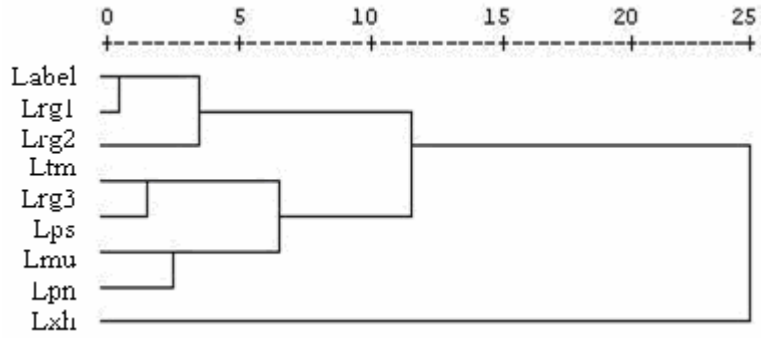
کد جمعیت	T.L	L	S	L/S	X	TF%	S%	C.V	DI	DRL	2n	C.Karyotype	F.Karyotype
Lmu	٥٣/٥٦٣	٣٠/٣٤٩	٢٣/٢١٤	١/٣١	٧/٦٥	٤٣/٣٣٩	٦١/٧٥	١٦/٩٥	٢/٥٤	٦/٥٤	١٤	1A	7m
Lpn	٥٣/٢٦٥	٢٩/٥٤٥	٢٣/٧١٩	١/٢٥	٧/٦٠	٤٤/٥٣١	٦٠/٥٠	١٥/٩١	٢/٧٧	٧/٢٦	١٤	1A	6m+1sm
Lrg1	٤٦/٣٥٩	٢٦/٤١٢	١٩/٩٤٦	١/٣٢	٦/٦٢	٤٣/٠٢٦	٦٢/٢٨	١٤/٠٤	٣/٠٥	٦/٥٢	١٤	1A	7m
Lrg2	٥١/١٩٣	٢٨/٨٨٥	٢٢/٣٧٥	١/٢٩	٧/٣١	٤٣/٥٧٤	٦٢/٧٢	١٤/٧٨	٢/٩٤	٦/٦٠	١٤	1A	7m
Lrg3	٥٥/٦٩٢	٣١/٧٠٨	٢٣/٩٨٤	١/٣٢	٧/٩٦	٤٣/٠٦٥	٥٩/٦٣	١٦/٥٧	٢/٦٠	٧/٤٤	١٤	1A	6m+1sm
Lps	٦١/٢٧٤	٣٥/٣٠١	٢٥/٩٧٤	١/٣٦	٨/٧٥	٤٢/٣٨٩	٦٣/٤٦	١٦/١٣	٢/٥٩	٦/٨٤	١٤	1A	5m+2sm
Ltm	٥٢/١٨٤	٢٩/٧٣٨	٢٢/٤٤٥	١/٣٢	٧/٤٥	٤٣/٠١١	٦٨/١٢	١٢/٣٠	٣/٤٦	٥/٥٢	١٤	1A	7m
Lxh	٩٨/٩٣٣	٥٦/٥٦٣	٤٢/٣٧١	١/٣٣	٧/٠٧	٤٢/٨٢٨	٥٩/٣٠	١٦/٨٥	٢/٥١	٣/٧١	٢٨	1A	13m+1sm

T.L: مجموع طول کروموزوم‌ها، L : مجموع طول بازوهای بلند، S : مجموع طول بازوهای کوتاه، L/S : نسبت مجموع طول بازوهای بلند به بازوهای کوتاه، X : میانگین طول کروموزومها TF% : درصد شکل کلی، S% : طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم، C.V : ضریب تغییرات، DRL : اختلاف طول نسبی حداکثر و حداقل، DI : شاخص پراکندگی

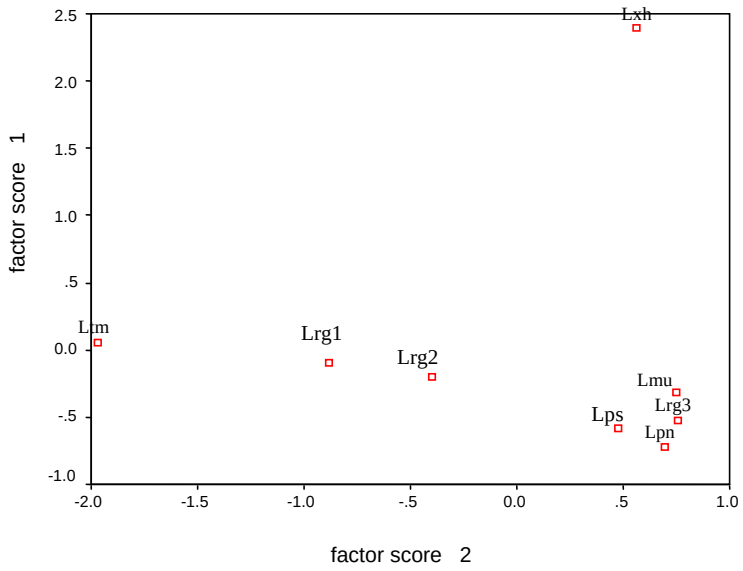
C.Karyotype : کلاس کاریوتیپ طبق جدول Stebbins، F.Karyotype : فرمول کاریوتیپی. (کد جمعیت و گونه‌های مربوطه مطابق جدول ۱ می‌باشد).

جدول۳- مقادیر ویژه، درصد واریانس انفرادی و تجمعی برای ویژگی‌های کاریوتیپی ارزیابی شده در ۸ جمعیت مورد بررسی جنس *Lolium*

صفات	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم
شاخص تفرق	-۰/۱۶۶	-۰/۹۶۲	-۰/۱۰۲
طول نسبی کوتاهترین کروموزوم	-۰/۲۴۲	-۰/۸۳۹	۰/۲۳۸
اختلاف طول نسبی حداکثر و حداقل	-۰/۹۵۴	۰/۲۰۷	-۰/۰۳۷
درصد شکل کلی	-۰/۳۲۲	۰/۱۶۱	-۰/۷۲۶
میانگین طول کروموزوم‌ها	-۰/۴۵۱	۰/۴۱۶	۰/۶۸۳
نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه	۰/۲۳۲	-۰/۳۰۷	۰/۷۲۱
طول بازوی کوتاه	۰/۸۹۲	۰/۳۶۲	۰/۲۰۲
طول بازوی بلند	۰/۸۹۴	۰/۳۴۰	۰/۲۵۹
مجموع طول کروموزوم‌ها	۰/۸۹۳	۰/۲۰۲	۰/۳۳۲
مقدار ویژه	۵/۶۷	۳/۵۲	۲/۳۸
درصد واریانس	۴۳/۶۲	۲۷/۶۳	۱۸/۲۳
درصد واریانس تجمعی	۴۳/۶۲	۷۱/۲۵	۸۹/۵۸



شکل۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward بر اساس ویژگی‌های کاریوتیپی (کد جمعیت‌ها و گونه‌های مربوطه مطابق جدول ۱ می‌باشد.)



شکل ۳- نمایش پراکندگی جمعیت‌ها براساس مؤلفه‌های اول و دوم تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (کد جمعیت و گونه‌های مربوطه مطابق جدول ۱ می‌باشد).

منابع مورد استفاده

–Bennett, J.S. 1997. A phenetic analysis and lateral key of the genus *Lolium* Gramineae). Genetic Resources and Crop Evolution, 44: 63-72.

–Bennett, J.S., 2000. Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. Genetic Resources and Crop Evolution, 47: 247-255

–Bor, N. L., 1970. Gramineae, in: Rechinger K. H. (ed) Flora Iranica, 70: 150-184. Akad-emische Druk- und Verlagsansalalt-Graz, Austria.

–Essad, S., 1954. Contribution a la systematique du genere *Lolium*. Ann. Amelior. Plant, 3: 325-351

–Evans, M. and Macefield, B., 1974. Effects of B chromosomes homoeologus pairing in *Lolium multiflorum*×*Lolium perenne* species hybrids, Chromosoma, 45: 369-378

–Faruki, N., 1987. Studies in Libyan grasses: chromosome number and some interesting features, Ann. Bot., 45: 75-102

–Hovin, A.W. and Hill, D., 1966. B chromosomes, their origin and relation to meiosis in inter specific *Lolium* hybrids. Amer. Jour. Bot., 53: 702-708

–Humphries, C. J., 1978. Chromosome numbers of Phanerogams from Morocco and Algeria. Bot, Not., 131: 391-404

–Jafari, A. Madah Arefi and H. Abdi, N., 2000. Initial assessment for ploidy levels and maturity effects on productivity in 29 genotypes of perennial ryegrass(*Lolium perenne*). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 5: 125-157

–Jenkins, G., 1985. Synaptonemal complex formation in hybrids of *L.temulentum* × *L.perenne*: II. Triploids. Chromosoma, 92: 387-390

–Koul, K. K. and Gohil, R. N., 1991. Cytogenetic studies on some Kashmir grasses, VIII: tribe Agrostideae, Festuceae and paniceae. Cytologia, 56: 437-452

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

–Malik, C.P. and Thomas, P.T., 1966. Karyotypic studies in some *Lolium Festuca* species. Caryologia, 19: 167-196.

–MirJalili, A., 2002. Study on taxonomy and cytotaxonomy of genus *Lolium*. PhD thesis, Isfahan University, Iran.

–Mirzaie-Nodoushan, H. and Nadarkhani, H., 2000. Karyotipic investigations in tetraploid Populations of *Lolium*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 4: 87-116

–Mirzaie-Nodoushan and H. Nadarkhani, H., 2001. Karyotipic investigations in several populations of *Lolium multiflorum* and *L. rigidum*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 8: 65-86

–Mobayen, S., 1979. Flora of Iran, volume 1. Tehran University Publications, Tehran, 603p .

–Naylor, B. and Rees, H., 1958. Chromosome size in *Lolium temulentum* and *L. perenne* . Nature, 181: 854-855.

–Naylor, B., 1960. Species differentiation in the genus *Lolium*. Heredity, 15: 219-253

–Parsa, A., 1950. Flore de l'Iran. Vol: V. Publication Du Ministere De l' Education, Museum D'Historie Naturele De Tehran.

–Sharifan, F. Abbasi, M. Mozaffari, J. and Tavassoli, A., 2008. Genetic diversity in agronomic and morphological traits in *Lolium* collection of the National Plant Gene-Bank of Iran. 10th Iranian Congress of Crop Sciences. 18-20 Aug, 2008, Kara, Iran, P: 221-222.

–Sharifan, F., 2009. Study on phylogenetic relationships of *Lolium* species in Iran, using morphological, chromosomal and molecular characteristics. MSc thesis. Azzahra University, Tehran, Iran .

–Simonsen, Y., 1976. Genetic variation in diploid and autotetraploid populations of *Lolium* perenne. Hereditas, 84: 133-156

–Spies, V. and Voges, B., 1988. Chromosome studies on African plants. Bothalia, 18: 114-119

–Stebbins G. L., 1956. Taxonomy and evolution of genera with special reference to family gramineae. J. Evolution, 10: 235-245.

–Taylor, I. and Evans, M., 1977. The genotypic control of homoeologous chromosome assosiation in L.temulentum × L.perenne. Chromosoma, 62: 57-67

–Tsvelev, N.N., 1989. The system of grasses and their evolution, Bot. Rev., 55: 141-204

–Wu, D. and Chen, L., 1991. The karyotype analysis of oryzon ryegrass and its three lines. J. Shanghai Agricultural College, 9: 253-259

–Zwierzykowski, Z. and Naganowski, B., 1996. Taxonomy, Cytogenetics and phylogenetic relationship in the *Lolium Festuca* complex (Poaceae): I. *Lolium*, a review. Fragmenta Floristica et Geobotanica, 41: 521-536.

Comparative karyotypic analysis of annual and perennial populations of *Lolium*

F. Sharifan[1], J. Mozafari[2*], A. Tavassoli[3] and M.R. Abbasi[4]

1. M.Sc., National Plant Gene-Bank of Iran, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, I.R.Iran.
2 –Corresponding author, Assoc. Prof., National Plant Gene-Bank of Iran, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, I.R.Iran
E-Mail: jmozafari@spii.ir
3 - Assoc. Prof., Al-Zahra University, Tehran, I.R.Iran.
4 - M.Sc., Agricultural and Natural Resources Research Center, Mashhad, I.R.Iran.

Received: 02.06.2009 Accepted:22.11.2009

Abstract

Karyotypic characteristics of eight populations from six *Lolium* species were comparatively analyzed to provide more insight on annual and perennial ecotypes of the genus, particularly, in *Lolium rigidum* grown in Iran. The number of base chromosomes was X=7 for all populations examined. The ploidy level, however, was 2n=2x=14, with the exception of *L. xhybridum* which was tetraploid (2n=4x=28). Chromosomes in all populations were mostly metacentric. Karyotypic traits of the perennial ecotype of *L. rigidum*, showed greater similarity to the annual ecotype of the same species. Cluster analysis of karyotypic traits separated the tetraploid population from diploid populations. The diploid populations were divided into two distinct groups in which Lrg2 (perennial) and Lrg1 (annual) populations of *L. rigidum*, were grouped together and perennial populations of foreign origin formed a separate group. Principal components analysis (PCA) showed that the traits including difference between maximum and minimum relative length, long arm´s length, short arm´s length and total length of the chromosomes in the first component contributed the most to the variance among the populations. The byplot of the two major components, PC1 and PC2, separated annual and perennial populations of *L. temulentum* and *L. xhybridum*, respectively, from other populations which were divided into two distinct groups. Perennial and annual populations of *L. rigidum* grouped together. This group was located with a considerable distance from the group consisting of populations from all three ecotypes: perennial (*L. perenne*), biennial (*L. multiflorum*) and annual (*L. persicum* and *L. rigidum*). Based on the results presented here no specific relationship was observed between karyotypic characteristics and annual or perennial type of plants in the genus *Lolium*.

Keywords: *Lolium*, karyotype, chromosome, principal components analysis, cluster analysis