دو فصلنامه

بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی

سال پنجم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۵

بررسی کاریوتیپی چند جمعیت از گونه *Bromus inermis* در ایران

ندا قانونی[۱]، مهدی یوسفی[۲]، مسعود اسماعیلی شریف[۳*]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران

[۲] دانشیار دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران

[۳] عضو هیئت علمی بخش تحقیقات منابع طبیعی- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

چکیده

در این تحقیق تنوع کاریوتیپی هشت جمعیت از گونه *Bromus inermis* با استفاده از یاخته‌های مرستیمی نوک ریشه بذور مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هر ۸ جمعیت، ۵۶ = ۸x = ۲n است. بر اساس جدول استیبنز مشخص گردید که اغلب جمعیت‌ها در کلاس دوم قرار می‌گیرند و فقط یک جمعیت در کلاس 3B قرار گرفت که نشان دهنده نامتقارن بودن این جمعیت است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی نشان داد که بین جمعیت‌ها از لحاظ صفات اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد که حاکی از وجود تنوع در اندازه و تقارن کروموزوم‌ها در جمعیت‌های در حال بررسی می‌باشد. پارامترهای ضریب تغییرات شاخص سانترومتری (CVCI) و اختلاف دامنه طول نسبی (DRL) اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان ندادند که این نتایج نشان‌دهنده این است که صفات مورد مطالعه از لحاظ توان نمایش عدم تقارن در جمعیت‌ها دارای ارزش هستند و صفت‌های CVCI وDRL در بین صفات ضعف نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جمعیت‌ها در ۲خوشه اصلی قرار گرفتند. جمعیت‌های حیدرآباد و فزوه ۷۱ با داشتن کمترین فاصله اقلیدسی بیشترین شباهت را باهم داشتند و جمعیت‌های اردبیل و مهدی‌شهر با داشتن بیشترین فاصله اقلیدوسی دارای کمترین شباهت بودند.

واژه‌های کلیدی: بروموس اینرمیس، تنوع سیتوژنتیکی، کاریوتیپ، کروموزوم

مقدمه

بروموس اینرمیس (*Bromus inermis* Leyss.) گونه‌ای چندساله از تیره گندمیان (Poaceae) است که ارزش مرتعی و علوفه‌ای زیادی دارد و با شرایط خشکی و مناطق کم باران بسیار سازگار است (Williams *et al.*, 2010). این گونه عمدتاً در افغانستان، پاکستان، مناطق معتدله آسیا و قاره اروپا به صورت خودرو می‌روید (Bor, 1970) و در سطح وسیعی در آمریکای شمالی کشت می‌شود (Tuna *et al.*, 2006). نادری و رحیم‌نژاد (Naderi and

* **مسئول مکاتبات:** masoudesmaeilisharif@gmail.com

Rahiminejad, 2012) جمعیت‌هائی از این گونه نیز در ایران گزارش نموده‌اند.

اولین مطالعات کروموزومی حاکی از هگزاپلوئید بودن جمعیت‌های این گونه بوده است (Stahlin, 1929). اما بعداً سطوح پلوئیدی دیگری در جمعیت‌های مختلف آن در مناطق مختلف دنیا گزارش شد (Tuna *et al*., 2004). درحال حاضر این گونه دارای چهار سیتوتیپ دیپلوئیدی (۲n=۲x=۱٤)، تتراپلوئیدی (۲n=٤x=۲۸)، هگزاپلوئیدی (۲n=٦x=٤۲) و اکتاپلوئیدی (۲n=۸x=٥٦) است (Knobloch, 1943; Hill and Myers, 1948; Armstrong, 1987; Tuna *et al*., 2001; Tuna *et al*., 2004). نتایج مطالعه بیش از ۲٥٥ نمونه از این گونه در آمریکای شمالی، نشان داده است که اکثر جمعیت‌های آن اکتاپلوئید و تنها اندکی از آنها تتراپلوئید بودند و هیچ جمعیت هگزاپلوئید در بین آنها یافت نشد (Tuna *et al*., 2001). در اغلب کشورها، از جمله در آمریکای شمالی، تنها سیتوتیپ اکتاپلوئید این گونه کاربرد کشاورزی داشته و کشت می‌شود (Tuna et al., 2004).

تعیین سطوح پلوئیدی و مطالعات سیتوژنتیکی جمعیت‌های *B. inermis* از اهمیت زیادی برخوردار است (Devesa *et al*., 1990). انجام این مطالعات وجود اختلاف در شکل، اندازه و تعداد کروموزوم‌های این گونه را آشکار می‌سازد و از این طریق می‌توان به وجود تنوع ژنتیکی و موانع ژنتیکی که طی جریان ژنی بین گونه‌ها به وجود آمده است پی برد (Bennett and Leitch, 1995). به علاوه مطالعات کاریوتیپی به عنوان ابزاری مهم در بررسی تمایز گونه‌ها و جمعیت‌ها است و از این رو برای درک روابط تاکسونومیکی بین گونه‌های جنس بروموس، و جمعیت‌های *B. inermis* ضروری است (Tuna and Arumuganthan, 2006).

میرزائی ندوشن و همکاران (Mirzaii Nadoushan *et al*., 2006) قبلاً دو جمعیت اکتاپلوئید از این گونه را در ایران گزارش کرده بودند ولیکن تا کنون از دیگر سطوح پلوئیدی این گونه در ایران اطلاعاتی منتشر نشده است. هدف این تحقیق تعیین سطوح پلوییدی، تنوعات درون‌گونه‌ای و ویژگی‌های کاریوتیپی و کروموزومی هشت جمعیت این گونه است.

مواد وروش‌ها

بذور هشت جمعیت از گونه *B. inermis* از بانک ژن مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، واقع در ۲٥ کیلومتری غرب اصفهان، تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱- مکان جمع‌آوری و مشخصات ۸ جمعیت از *Bromus inermis* مورد استفاده برای بررسی کاریوتیپی.

محل جمع‌آوری	نام جمعیت	مختصات جغرافیائی		ارتفاع (متر)
		طول	عرض	
اردبیل	اردبیل	48°, 29'	38°, 23'	1500
ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه	فزوه 72	51°, 26'	32°, 36'	1613
سمنان، مهدی شهر	مهدی شهر	53°, 21'	35°, 43'	1630
سمیرم، حنا، ایستگاه شهید حمزوی	حنا	51°, 41'	31°, 09'	2330

محل جمع‌آوری	نام جمعیت	مختصات جغرافیائی		ارتفاع (متر)
		طول	عرض	
سمیرم، حیدرآباد	حیدرآباد	51°, 17'	30°, 43'	2400
فریدون شهر، چشمه لنگان	فریدون شهر	50°,07'	32°,56'	2530
ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه	فزوه 71	48°,29'	38°,23'	1500
ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه	مورچه خورت	51°,26'	32°,36'	1613

* بانک ژن مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، واقع در ۲۵ کیلومتری غرب اصفهان.

بذور توسط محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده، در ظروف پتری و روی کاغذ صافی (Top paper) مرطوب کاشته شدند. بذور موجود این پتری‌ها، به طور متوسط پس از ٤-۲ روز قرار داشتن در دمای معمولی اتاق، جوانه زدند. جهت انجام مطالعات مورد نظر، ریشه‌های به طول ۲-۱ سانتی‌متر نهال‌های حاصل، مورد آزمایشات سیتوژنتیکی قرار گرفتند. پیش تیمار در محلول آلفا برمونفتالین ۰/۰۰۲٪ انجام گرفت (Paszko, 2006). مدت پیش تیمار از ۱/۵ ساعـــت شروع شد و زمان‌های ۳، ٤ و ٥ ساعت نیز مورد آزمون قرار گرفتند که در نهایت برای جمعیت‌های مختلف زمان‌های مناسب به دست آمد. سپس ریشه‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در معرض جریان آب سرد قرار داده شدند تا اثرات باقیمانده محلول از بین برود. عمل تثبیت با محلول لویستکی به مدت ٢٤ الی ۳۰ ساعت و در دمای ٤ °C در یخچال انجام شد (Sarela *et al.*, 2007).

نمونه‌ها پس از تثبیت، برای مدت ۳ ساعت در آب جاری شستشو داده شدند. برای هیدولیز از محلول نرمال NaOH در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد و حمام بن‌ماری استفاده گردید. برای رنگ‌آمیزی از هماتوکسیلین استفاده شد. مدت زمان رنگ‌آمیزی برحسب جمعیت‌های مختلف بین ۳۰ دقیقه تا ۱/۵ ساعت متغیر بود. برای تهیه نمونه میکروسکوپی نوک ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده در یک قطره محلول اسیداستیک ٤٥٪ اسکواش شدند و با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری Nikon مشاهده گردیدند. برای عکس برداری از کروموزوم ها از سیستم مانیتورینگ استفاده شد. تصاویر کروموزومی از طریق دوربین ویدیویی Nikon به مانیتور منتقل و ضبط گردید. تصاویر تهیه شده به محیط فتوشاپ (Adobe Photoshop CS version 8.0) منتقل شده و پس از مرتب کردن، کروموزوم های هر ژنوتیپ، کاریوتیپ آنها تهیه شد. برای اندازه‌گیری کروموزوم ها تصاویر کاریوتیپ به صورت فایل Bitmap به محیط نرم افزاری Micro Measure version 3.3 منتقل شدند و به کمک این نرم افزار، از طریق مشخص کردن ابتدا و انتهای کروموزوم ها و محل سانترومر، تعدادی از ویژگی‌های کروموزومی درمحیط اکسل (Excel) محاسبه گردید و ایدیوگرام مربوط به هر جمعیت نیز رسم شد.

ویژگی‌های کروموزومی محاسبه شده شامل:

۱)طول کل کروموزوم (TL) که از مجموع طول بازوی بلند و کوتاه طبق رابطه ۱ محاسبه می‌شود.

$$TL = \sum L + \sum S$$ رابطه ۱

۲)نسبت بازوها (r- value) که بر اساس نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه طبق رابطه ۲ محاسبه شد. این نسبت برابر یک به عنوان متاسنتریک و بزرگتر از یک به عنوان ساب متاسنتریک در نظر گرفته شد.

$$AR = \frac{L}{S}$$ رابطه ۲

۳)شاخص سانترومتری (CI) که از نسبت طول بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم طبق رابطه ۳ بدست آمد. شاخص سانترومری برای هر کروموزوم بین ۰ و ۰/۵متغیر است. زمانیکه طول دو بازو با هم برابر باشد شاخص سانترومری برابر ۰/۵ و کروموزوم متاسنتریک است و در صورتیکه این شاخص برابر صفر باشد کروموزوم دارای فرم تلوسنتریک است.

$$CI = \frac{S}{L+S}$$ رابطه۳

٤)درصد طول نسبی کوتاهترین کروموزوم (S٪) که بر اساس نسبت طول بازوی کوتاه به طول کل ژنوم هاپلوئید ضربدر صد طبق رابطه ٤ محاسبه شد.

$$\%S = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^{n} TL_i} \times 100$$ رابطه ٤

۵)درصد طول نسبی بازوی بلند (L٪) که بر اساس نسبت طول بازوی بلند به طول کل ژنوم هاپلوئید ضربدر صد طبق رابطه ۵ محاسبه شد.

$$\%L = \frac{L_i}{\sum_{i=1}^{n} TL_i} \times 100$$ رابطه ۵

٦)درصد طول نسبی کروموزوم (RL٪) که نسبت طول کروموزوم به طول کل ژنوم هاپلوئید ضرب در صد می‌باشد طبق رابطه ٦ محاسبه شد.

$$\%RL = \frac{TL_i}{\sum_{i=1}^{n} TL_i} \times 100$$ رابطه ٦

۷) درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) که از نسبت مجموع طول بازوی کوتاه به طول کل ژنوم هاپلوئید ضربدرصد بدست می آید طبق رابطه ۷ محاسبه شد.

$$\%TF = \frac{\sum_{i=1}^{n} SA_i}{\sum_{i=1}^{n} TL_i} \times 100$$ رابطه ۷

۸)اختلاف طول دامنه‌های نسبی (DRL) که تفاضل کمترین و بیشترین مقدار طول نسبی کروموزوم، کروموزوم‌های هاپلوئید در مجموعه است طبق رابطه ۸ محاسبه شد.

$$DRL = \%RL_{Max} - \%RL_{Min}$$ رابطه ۸

از هر اسلاید مورد بررسی حداقل ۳ یاخته (تکرار) مناسب انتخاب و کروموزوم‌های آنها اندازه‌گیری و میانگین آنها مورد ارزیابی قرارگرفت. با استفاده از تحلیل واریانس و آزمون دانکن معنی‌دار بودن میانگین‌های بین و درون جمعیت‌ها سنجش شدند. تقارن کاریوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش استبینز (Stebbins, 1971) مورد مقایسه قرارگرفت. فرمول کاریوتیپی آنها نیز به روش لوان و همکاران (Levan et al., 1964) تعیین گردید. برای گروه‌بندی جمعیت‌ها نیز از تحلیل خوشه‌ای به روش Ward و ضریب فاصله اقلیدسی استفاده شد. آزمون‌ها و تحلیل‌های آماری با نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی میکروسکوپی و شمارش کروموزمی

تصاویر صفحات متافازی و کاریوگرام ۸ جمعیت مورد بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. تمام جمعیت‌ها اکتاپلوئید، با عدد کروموزومی ۲n=٥٦ بودند که با نتایج قبلی میرزایی ندوشن و همکاران (Mirzaii Nadoushan *et al*., 2006) بر روی دو جمعیت از این گونه در ایران مطابقت دارد. در بین جمعیت‌های مطالعه شده سطوح پلوئیدی دیگری مشاهده نشد. با توجه به اینکه تنها سیتوتیپ اکتاپلوئیدی این گونه کاربرد مرتعی و کشاورزی دارد (Tuna *et al*., 2004). بنابراین بذور گونه مورد مطالعه برای کشت علوفه‌ای و مرتعی مناسب هستند.

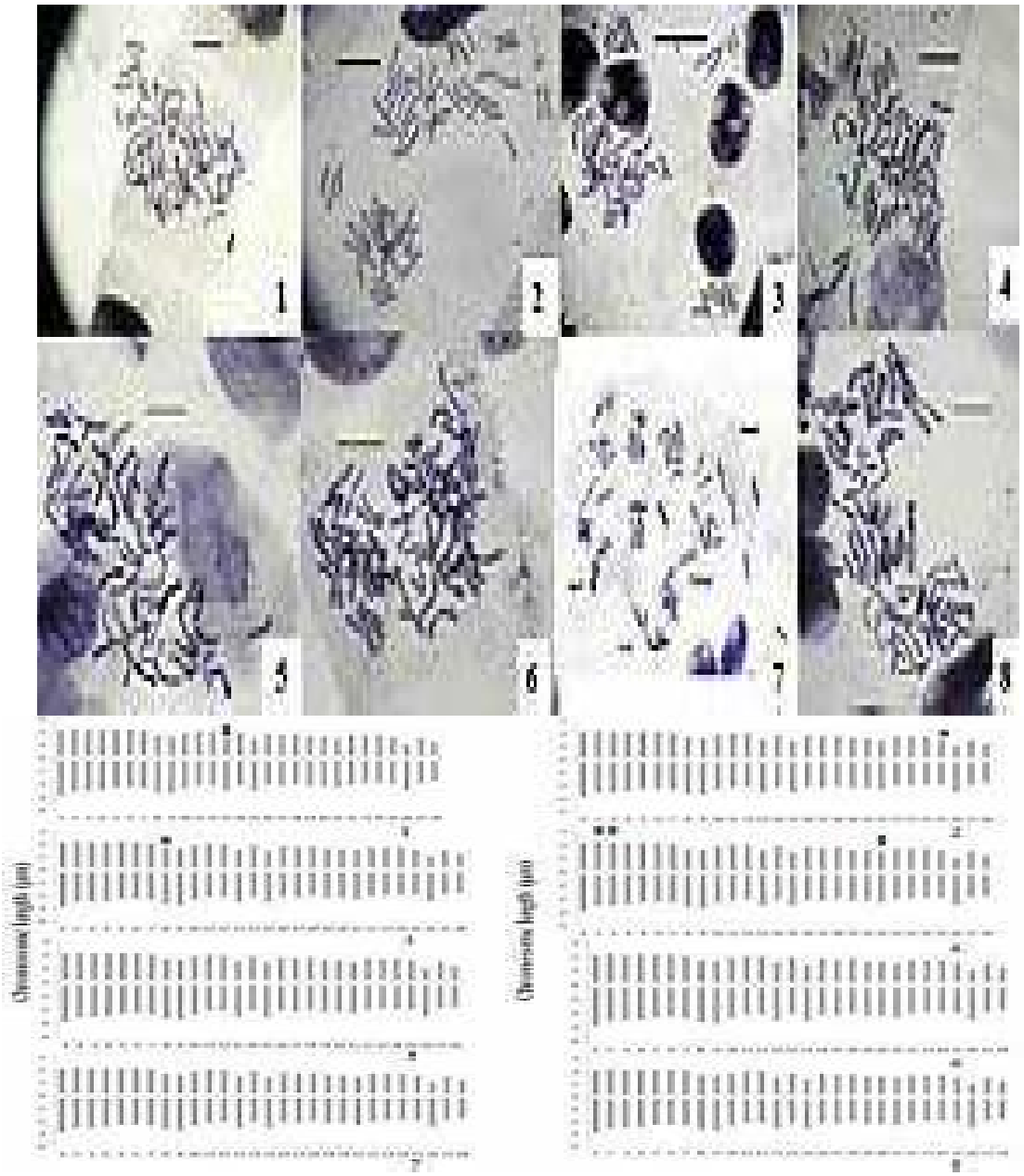
تهیه کاریوتایپ

در رابطه با نوع پلوئیدی این گونه اظهار نظرهای متفاوتی شده است. ولی اغلب پژوهشگران با بررسی کاریوتیپ گونه *B. inermis* سیتوتیپ اکتاپلوئیدی آن را به صورت اتوآلواکتاپلوئید (AAAABBBB) معرفی نموده‌اند (Armstrong, 1991; Tuna *et al*., 2004). درحالیکه برخی دیگر فرمول این سیتوتیپ را به صورت AAAABBCC دانسته‌اند (Wiliams *et al*., 2010). برای درک بهتر نوع کاریوتیپ و ژنوم این گونه استفاده از تکنیک‌های فلورسانس و FISH و GISH ضروری دانسته شده است (Wiliams *et al*., 2010).

مقایسه کاریوتایپ جمعیت های مختلف

براساس نتایج تحلیل واریانس (جدول‌های ۲ و ۳) اختلاف بین جمعیت‌های مورد مطالعه، از نظر کلیه صفات، به جز متغیر DRL، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

نتایج آزمون دانکن نیز معنی‌دار بودن اختلاف میانگین‌ها در هر گروه را در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد (جدول‌های ٤ و ٥). این نتایج نشان دهنده کارآمد بودن اکثر این صفات در نمایش عدم تقارن در بین جمعیت‌های مورد مطالعه است. میانگین طول کل ژنوم هاپلوئید در این ۸ جمعیت ۲۹/۹۹ ± ۱۰٦/۲۳ میکرومتر بود (جدول ٤). جمعیت حیدرآباد بزرگترین ژنوم هاپلوئید (۱/۱۱ ± ۱٤٤/٤۲ میکرومتر) و جمعیت مهدی شهر کوچکترین ژنوم هاپلوئید (۰/۷۱ ± ٥٤/٥۸ میکرومتر) را داشت. بزرگترین کروموزوم مربوط به زوج شماره ۱ جمعیت اردبیل (با طول ۷/۰۸ میکرومتر) و کوچکترین آن مربوط به زوج شماره ۲۸ جمعیت فزوه ۷۲ (با طول ۲/۱۷ میکرومتر) بود. اندازه کروموزم‌های گونه *B. inermis* بین ۷/۵۰ تا ۳/۲۵ میکرومتر گزارش شده است (Rychlewski, 1970) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. میانگین طول کروموزوم (TL) برای ۸ جمعیت ۱/۰۷ ± ۳/۷۹ میکرومتر بود (جدول ٤).



شکل ۱- بالا: گستره متافازی (خط شاخص در تمام گستره‌ها ۱۰ میکرومتر). پائین: صفحه متافازی و کاریوگرام جمعیت‌های مورد بررسی از گونه *Bromus inermis*. جمعیت‌ها: ۱) اردبیل، ۲) فزوه۷۲، ۳) مهدی‌شهر، ٤) حنا، ٥) حیدرآباد، ٦) فریدونشهر، ۷) فزوه۷۱، و ۸) مورچه‌خورت

جدول ۲- تحلیل واریانس صفات کاریوتیپی TG، TL، L، S و r-value هشت جمعیت از گونه *Bromus inermis*

منابع تغییرات	درجه آزادی	TL	L	S	r-value L/S
جمعیت	7	2706.033*	1.110*	0.690*	0.157*
خطا	16	0.384	0.001	0.001	0.002
CV%	----	0.582	1.577	1.577	3.313

جدول ۳- تحلیل صفات کاریوتیپی CI، AR، DRL%، TF% و S% هشت جمعیت از گونه *Bromus inermis*

منابع تغییرات	درجه آزادی	CI	AR	DRL%	TF%	S%
جمعیت	7	0.002*	0.012*	0.000ns	19.536*	391.546*
خطا	16	0.000	0.000	0.000	0.370	8.358
CV%	----	1.500	2.499	7.149	1.464	6.283

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ns: فاقد اختلاف معنی‌دار، TL: طول کل کروموزوم، L: طول بازوی بلند، S: طول بازوی کوتاه، r value: نسبت طول بازوی بلند به کوتاه، Cent/Index: شاخص سانترومری، DRL%: اختلاف دامنه طول نسبی، TF%: درصد فرم کلی، S%: طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم.

جدول ٤- مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی TG، TL، L، S و r-value هشت جمعیت (2n=56) از گونه *Bromus inermis*

جمعیت	TG µm	TL µm	L µm	S µm	r-value L/S
اردبیل	139.32 a	4.97 a	2.79 b	2.22 a	1.28 f
فزوه 72	82.28 g	2.94 g	1.69 g	1.27 f	1.38 de
مهدی شهر	54.58 h	1.95 h	1.17 h	0.78 h	1.67 b
حنا	94.07 f	3.36 f	2.13 e	1.22g	1.98 a
حیدرآباد	144.42 a	5.16 a	3.07 a	2.10 b	1.52 c
فریدون شهر	110.24 d	3.94 d	2.26 d	1.68 d	1.40 de
فزوه 71	123.85 c	4.42 c	2.58 c	1.83 c	1.44cd
مورچه خورت	101.05 e	3.62 e	2.03 f	1.59 e	1.32 ef

* اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار واعداد با حروف مشابه فاقد اختلافات معنی دار هستند.

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی CI، AR، DRL%، TF% و S% هشت جمعیت (2n=56) از گونه *Bromus inermis*

جمعیت	CI	AR	DRL%	TF%	S%
اردبیل	0.44 a	0.80 a	0.03 c	44.27 a	45.11 bc
فزوه 72	0.43 bc	0.77 b	0.04 b	42.95 bc	40.82 cd
مهدی شهر	0.39 f	0.67 e	0.05 a	40.01 bc	26.57 e
حنا	0.37 g	0.61 f	0.03 c	36.46 f	38.93 d
حیدرآباد	0.41 e	0.71 d	0.02 d	40.68 de	50.12 b
فریدون شهر	0.43 cd	0.76 bc	0.02 d	42.68 c	60.27 a
فزوه 71	0.42 de	0.73 cd	0.03c	41.51 d	44.88 bc
مورچه خورت	0.44 ab	0.80 a	0.02 d	43.97 ab	61.38 a

* اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار واعداد با حروف مشابه فاقد اختلافات معنی دار هستند.

در مطالعه میرزایی ندوشن و همکاران (Mirzaii Nadoushan, *et al*., 2006)، این مقدار برای یک جمعیت از این گونه در ایران ٤/۸ میکرومتر و برای جمعیت دیگر ۳/۸ میکرومتر گزارش شده که با میانگین طول کروموزوم برخی از جمعیت‌های مورد استفاده در این پژوهش، از جمله جمعیت‌های اردبیل و فریدونشهر، مطابقت دارد. تیونا و همکاران (Tuna *et al*., 2006) با بررسی کاریوتیپ چند

جمعیت *B. inermis* با تکنیک نواربندی C این میانگین را ۵/۲۸ میکرومتر گزارش کرده اند که اندکی بیشتر از عدد به دست آمده در این پژوهش است. این تفاوت می‌تواند ناشی از روش‌های پیش تیمار و رنگ آمیزی و نیز به این دلیل که کروموزوم‌های آن از لحاظ طول و نسبت بازوها حتی از یک یاخته به یاخته دیگر متفاوتند، باشد (Rychlewski, 1970; Armstrong, 1979). فرمول کاریوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه به روش لوان و همکاران (Levan *et al.*, 1964) نشان داد که اکثر کروموزوم‌ها از نوع متاسانتریک (m) و تعدادی نیز ساب‌متاسانتریک (sm) هستند. فقط جمعیت فریدونشهر دارای یک کروموزوم دقیقاً میانی متاسنتریک (M) بود. به طور میانگین در بین ۸ جمعیت مورد بررسی تعداد ۲۲ کروموزوم از نوع متاسانتریک، ٤ کروموزوم از نوع ساب‌متاسانتریک و ۲ کروموزوم ماهواره دار بودند. جمعیت حنا با فرمول کاریوتیپی 17m+7sm+4sat نامتقارن‌ترین و جمعیت‌های مورچه‌خورت (25m+3sm)، حیدرآباد (24m+4sm)، فریدونشهر (1M+23m+4sm) و فزوه ۷۱ (21m+7sm)، که همگی فاقد کروموزوم‌های ماهواره‌دار بودند، متقارن‌ترین جمعیت‌ها بودند. جمعیت‌های مهدی‌شهر (20m+7sm+1sat)، فزوه ۷۲ (23m+4sm+1sat) و اردبیل (25m+2sm+1sat)، هریک با داشتن یک کروموزوم ماهواره دار، از لحاظ تقارن حالت بینابینی داشتند (جدول ۲ و شکل ۱ چپ). بررسی کاریوتیپ‌ها به روش استبینز (Stebbins, 1971) مشخص نمود که چهار جمعیت (جمعیت‌های فزوه ۷۱، فریدون‌شهر، حیدرآباد و مورچه‌خورت) در کلاس 2A قرار می‌گیرند و متقارن می‌باشند (جدول ۲). سه جمعیت (جمعیت‌های اردبیل، فزوه ۷۲ و مهدی‌شهر) نیز در کلاس 2B قرار می‌گیرند و کمی نامتقارن هستند. فقط جمعیت حنا در کلاس 3B قرار می‌گیرد که نشان دهنده‌ی نامتقارن بودن آن است. جمعیت‌های نامتقارن تکامل یافته‌تر از سایر جمعیت‌ها می‌باشند (Stebbins, 1971). میرزائی ندوشن و همکاران (Mirzaii Nadoushan *et al.*, 2006) فرمول کاریوتیپی دو جمعیت از این گونه در ایران را بدون ذکر محل جمع آوری بذر، به ترتیب 27m+1sm و 28m گزارش کرده‌اند که با نتایج این پژوهش و نتایج دیگران (Tuna *et al.*, 2001) مغایرت دارد (جدول ٦).

جدول ٦- فرمول کاریوتیپی هشت جمعیت از گونه *Bromus inermis* به روش لوان و همکاران (Levan *et al.*, 1964)

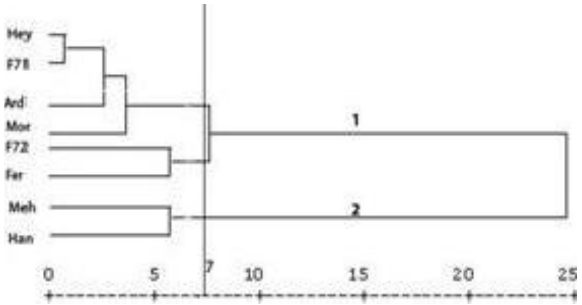
جمعیت	تعداد کروموزم	دسته کاریوتیپی استبینز	فرمول کاریوتیپی
اردبیل	2n=8x=56	2B	25 m+ 1 m^{sat}+2 sm
فزوه ۷۲	2n=8x=56	2B	23 m+ 1 m^{sat}+4 sm
مهدی‌شهر	2n=8x=56	2B	20 m+ 1 sm^{sat}+7 sm
حنا	2n=8x=56	3B	17 m+ 4 st^{sat}+7 sm
حیدرآباد	2n=8x=56	2A	24 m+ 4 sm
فریدونشهر	2n=8x=56	2A	23 m+1 M +4 sm
فزوه۷۱	2n=8x=56	2A	21 m+7 sm
مورچه‌خورت	2n=8x=56	2A	25 m+ 3 sm

با توجه به پلی‌مورفیک‌بودن جمعیت‌های این گونه (Armstrong, 1987) وجود جمعیت‌هائی تا این حد متقارن دور از انتظار نیست. تیونا و همکاران (Tuna *et al.*, 2004) با تکنیک نواربندی C کاریوتیپ چند جمعیت*B. inermis* را بررسی کردند و به‌طور میانگین در ژنوم هاپلوئید این گونه تعداد ۲۱ کروموزوم متاسانتریک، ٤ کروموزوم ساب‌متاسانتریک و ۳ کروموزوم ماهواره‌دار را گزارش نموده‌اند که به نتایج این پژوهش بسیار نزدیک است. البته این پژوهشگران خاطرنشان کرده‌اند که فقط در تعداد اندکی از یاخته‌ها هر ۳ جفت کروموزوم ماهواره‌دار باهم مشاهده شده است و دراکثر جمعیت‌ها هر یاخته فقط یک یا دو عدد از این نوع کروموزوم‌ها را داشته است.

روش c–باندینگ ماهواره‌ها، به ویژه ماهواره‌های کوچکتر را بهتر مشخص می‌کند و شاید دلیل کمتر بودن تعداد کروموزوم‌های ماهواره‌دار در این پژوهش به دلیل تکنیک به کار رفته باشد. علیرغم یکنواختی نسبی ساختاری کروموزوم‌های گونه *B. inermis*، بین جمعیت‌های مختلف آن و نیز بین افراد درون هر جمعیت اختلافات قابل توجهی دیده شد. تعداد و محل قرارگیری ماهواره‌ها در بین جمعیت‌ها متفاوت بود. به این ترتیب که در جمعیت اردبیل کروموزوم شماره ۱۳، در جمعیت فزوه ۷۲ کروموزوم شماره ۲۵، در جمعیت مهدی‌شهر کروموزوم شماره ۸، در جمعیت حنا کروموزوم‌های ۲، ۳، ۱۵ و ۲۱ دارای ماهواره بودند. تغییر محل ماهواره‌ها در جمعیت‌های مختلف احتمالاً به دلیل تغییرات در اندازه کروموزوم‌ها و جا به جایی ترتیب کروموزوم ها در کاریوگرام‌ها می‌باشد (Joachimiak *et al.*, 2001).

براساس درصد فرم کلی (TF٪)، جمعیت اردبیل به میزان ٤٤/۲۷٪ و جمعیت مهدی‌شهر به میزان ۳٦/٤٦٪ به‌ترتیب دارای کاریوتیپ متقارن و نامتقارن هستند (جدول ۵). پارامتر طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم (S%) بیشترین مقدار را به ترتیب به میزان ٦۱/۳۸٪ و ٦۰/۲۷٪ در جمعیت‌های فریدونشهر و مورچه‌خورت نشان داد که بیانگر متقارن بودن کاریوتیپ این جمعیت‌ها است و کمترین مقدار به میزان متوسط ۲٦/۵۷٪ در جمعیت مهدی‌شهر بود که نشان دهنده نامتقارن بودن کاریوتیپ آن می‌باشد (جدول ۵). اختلاف دامنه طول نسبی (DRL٪) در بین جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت‌های فریدون‌شهر، مورچه‌خورت و حیدرآباد با کمترین میزان (۰/۰۲ درصد) دارای کاریوتیپ متقارن و جمعیت مهدی‌شهر با بیشترین میزان (۰/۰۵ درصد) دارای کاریوتیپ نامتقارن است (جدول۵).

تحلیل خوشه‌ای صفات کاریوتیپی به روش Ward، جمعیت‌های مورد مطالعه را در خط فنن ۲۵، به دو گروه عمده تقسیم کرد (شکل ۲).



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تحلیل خوشه‌ای ۸ جمعیت *Bromus inermis*

با قطع دندروگرام در ۰/۷ تشابه، سه خوشه بدست آمد. خوشه اول شامل جمعیت‌های حیدرآباد، فزوه۷۱، اردبیل و مورچه‌خورت و خوشه دوم شامل

جمعیت‌های فزوه ۷۲ و فریدونشهر می‌باشد. گروه دوم شامل یک خوشه از جمعیت‌های مهدی‌شهر و حنا است. جمعیت حنا به لحاظ فرمول کاریوتیپی و جمعیت مهدی‌شهر به لحاظ اندازه‌های نسبی کروموزوم‌ها، کاریوتیپ نامتقارن دارند. سایر جمعیت‌ها متقارن یا کمی نامتقارن هستند.

مقایسه میانگین صفات در بین خوشه‌ها نشان داد عامل طول کل ژنوم و اندازه بازوها بیشترین تنوع آماری را در بین جمعیت‌ها نشان می‌دهند. این نتایج حاکی از آن است که جمعیت‌ها بر اساس این دو متغیر خوشه‌بندی شده‌اند. بیشترین شباهت و نزدیکی در جمعیت‌های حیدرآباد و فزوه ۷۱ مشاهده شد و کمترین شباهت مربوط به جمعیت‌های اردبیل و مهدی‌شهر بود. با استفاده از دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای می‌توان به میزان همولوژی و شباهت کروموزوم‌ها پی‌برد که این امر می‌تواند در تعیین والدین مناسب جهت کارهای اصلاحی مفید باشد، زیرا امکان دورگ‌گیری و تلاقی در بین جمعیت‌هایی که شباهت کروموزومی بالاتری دارند بیشتر است (Mirzaii Nadoushan *et al*., 2006). مثلاً در ماتریس فواصل اقلیدوسی، جمعیت‌های حیدرآباد و فزوه۷۱ با داشتن کمترین فاصله اقلیدوسی، دارای بیشترین شباهت و نزدیکی بوده و کمترین شباهت مربوط به جمعیت‌های اردبیل و مهدی‌شهر می‌باشد که بیشترین فاصله اقلیدوسی را با یکدیگر دارند. در مورد جمعیت‌های حیدرآباد و فزوه۷۱ می‌توان گفت این دو جمعیت دارای همولوژی بالای کروموزوم ها بوده و احتمالاً امکان تلاقی و دورگ گیری موفقیت‌آمیز بین این دو زیاد است، در حالی که جمعیت‌های اردبیل و مهدی‌شهر، به خاطر داشتن همولوژی پایین ممکن است تلاقی بین آنها باعث بروز ناهنجاری کروموزومی شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشگاه پیام نور و همکاران مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند سپاسگزاری می‌نماییم.

منابع

1- Armstrong, K.C. (1979) A and B genome homologies in tetraploid and octaploid cytotypes of *Bromus inermis*. Can J Genet Cytol 21:65–71.
2- Armstrong, K.C. (1987) Chromosome numbers of perennial *Bromus* species collected in the USSR. Can. J. Plant Sci. 67: 267-269.
3- Armstrong, K.C. (1991) Chromosome evolution in *Bromus*. p. 363–317. In T. Tsuchiya and T.K. Gupta (ed.) Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, Evolution. Part B. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
4- Bennett, M.D., Leitch, I.J. (1995) Nuclear DNA amounts in angiosperms. Ann. Bot. 76: 113- 176.
5- Bor, N. (1970) Graminae, in; Rech. f. (ed.), 1963-2005. Flora Iranica. vol. 70, Graz, Autria.
6- Devesa, J.A., Ruiz, T., Tormo, R., Unoz, A.M., and Viera, M.C. (1990) Contribucional conocimiento cariolgico de las Poaceae en Extremadura II. Boletin Sociedade Broteriana, 63: 153-205.
7- Hill, H.D., Myers, W.M. (1948) Chromosome number in *Bromus inermis* leyss. J. Am. Soc.Agron. 40: 466-469.
8- Joachimiak, A., Kula, A., Sliwinska, E. and Sobies, A. (2001) C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. Acta Biol Cracov Ser Bot. 43: 105- 115.

9- Knobloch, I.W. (1943) Morphological variation and cytology of *Bromus inermis*. Bull. Torrey Bot. Club 70: 467- 472.
10- Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A.A. (1964) Nomenclature for centromericposition on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
11- Mirzaii Nadoshan, H., Dehghan Shoar, M., Maddah Arefi, H. and Asadi, F. (2006) Karyotypic characteristics of several *Bromus* species, International Journal of Agriculture & Biology, 6: 20-28. In Farsi with English abstract.
12- Naderi, R. and Rahiminejad, M.R. (2012) Some comments on the species of *Bromus* sec. *Bromus* (Poaceae) in Iran. Iran J. Bot. 18 (2): 226-230. In Farsi with English abstract.
13- Paszko, B. (2006) A critical review and new proposal of karyotype asymmetry indices. Pl. Syst 258: 39-48.
14- Rychlewski, J. (1970) Karyology of three species of the genus *Bromus*. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot. 13:23–35.
15- Sarela, J. M., Peterson, P.M., Keane, R.M., Cayouette, J. and Graham, S.W. (2007) Molecular phylogenetics of *Bromus* based on chloroplast and nuclear DNA sequence data. Aliso, 23: 379- 396.
16- Stahlin, A. (1929) Morphologische and zutologische untersuchungen and Graminea,Wiss. Arch.Landwirtsch. , Abt. A1: 330- 398.
17- Stebbins, G.L. (1971) Chromosomal evolution in higher plants.Edvard Arnold publisher Ltd. London.216 pp.
18- Tuna, M. and Arumuganthan, K. (2006) Cytogenetic and Nuclear DNA content characterization of diploid *Bromus* erectus and *Bromus* variegates, crop Breeding, Genetic & Cytology, 46: 637 – 641.
19- Tuna, M., Vogel, K.P., Arumuganathan, K., Gill, K.S. (2001) DNA content and ploidy determination of bromegrass germplasm accessions by flow cytometry. Crop Sci. 41:1629–1634.
20- Tuna, M., Vogel, K.P., Kulvinder, S., Gill, K.S. and Arumuganathan, K. (2004) C-banding analyses of *Bromus inermis* genomes. Crop Sci. 44: 31–37.
21- Williams, W.M., Stewart, A.V. and Williamson, M.L. (2010) Wild crop relatives: Springer –Verlaag, Berlin, Hedelberg. 1-14.