مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۶، شماره ۲، سال ۱۳۸۹

بررسی کاریوتیپی گونه های بخش Heliobrychis از جنس اسپرس(Onobrychis) موجود در ایران

Karyotypic Study on Species of Section Heliobrychis of Onobrychis in Iran

فرنگیس قنواتی[۱]، مریم تاجدینی[۲]، مهدی یوسفی[۳] وحسن امیرآبادی‌زاده[۴]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، نجف‌آباد
۳- استادیار، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، نجف‌آباد
۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱/۲۶

چکیده

قنـــواتی، ف.، تاجـــدینی، م.، یوســـفی، م.، و امیرآبـــادی‌زاده، ح. ۱۳۸۹ بررســی کـاریوتیپی گونـه هـای بخـش Heliobrychis از جـنس اسپرس(Onobrychis) موجود در ایران. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۶:** ۲۸۴ - ۲۶۹.

در این تحقیق نه گونه از بخش Heliobrychis جنس Onobrychis (اسپرس)، از مناطق طبیعی ایران جمع‌آوری و با استفاده از مریستم انتهایی ریشه، تعداد و ابعاد کروموزم‌ها در مرحله میتوز اندازه‌گیری و فرمول کاریوتیپی هر گونه تعیین شد. تعداد کروموزوم پایه در گونه‌ها بین X=۷ و X =۸ و تیپ کروموزوم‌ها نیز از نوع متاسنتریک تا ساب متاسنتریک بود. بیشترین مقدار طول ژنوم متعلق به گونه*O. scrobiculata* (۲۴/۲۶میکرون) و کمترین میانگین طول ژنوم به گونه *O. lunata* (۱۴/۷۶ میکرون) تعلق داشت. گونه *O. heliocarpa* با فرمول کاریوتیپی ۱۶m بیشترین درصد شکل کلی (۴۴/۸۵۶) و کمترین مقدار شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (۰/۲۱۸) و گونه*O. oxyptera* با فرمول کاریوتیپی ۲m+۱۴sm کمترین درصد شکل کلی (۳۲/۵۵۲) و بیشترین شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (۰/۴۸۹) را داشتند. در میان گونه‌های مورد بررسی گونه‌های *O. heliocarpa* و *O. lunata* در کلاس A قرار گرفتند و دارای کاریوتیپ‌های متقارن‌تر بودند که نشان‌دهنده ابتدایی‌تر بودن این دو گونه است. گونه *O. oxyptera* در کلاسB ۳ قرار گرفت و کاریوتیپ آن به سوی نامتقارنی و پیشرفته بودن تمایل داشت. در تجزیه به مولفه‌های اصلی، سه مولفه اول بیش از ۹۶ درصد از تنوع بین داده‌ها را توجیه کردند. در تجزیه خوشه‌ای به روش Ward بر اساس صفات کاریوتیپی گونه‌های مورد مطالعه در دو گروه مجزا قرار گرفتند. نتایج حاصل از این تجزیه برای رده‌بندی گونه‌ها و انتخاب گونه‌های نزدیک به یکدیگر برای انجام تلاقی بین گونه‌ای قابل استفاده است.

واژه‌های کلیدی: اسـپرس، بخـش Heliobrychis، گونـه‌هـا، تجزیـه آمـاری چنـد متغیـره، تعـداد کرومـوزوم، کاریوتیپ.

نویسنده مسئول: f_ghanavati83@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

جنس اسپرس (Onobrychis) به خانواده Fabaceae و طایفه Hedysareae تعلق دارد. این جنس با دارا بودن بیش از ۱۳۰ گونه یک ساله و چندساله در نواحی معتدله شمالی کره زمین گسترش دارد و مرکز تنوع آن شرق مدیترانه و غرب آسیا است. بواسیه (Boissier, 1872) این جنس را به دو بخش Euonobrychis و Sisyrosema گروه‌بندی و ۲۴ گونه را دراین دو بخش قرارداد. رشینگر (Rechinger, 1984) ۷۷ گونه را در قالب دو زیرجنس و نه بخش معرفی کرد. زیر جنس Sisyrosema شامل پنج بخش Afghanica، Anthyllium، Heliobrychis، Hymenobrychis و Insignes و زیر جنس Onobrychis دارای چهار بخش Laxiflora، Dendrobrychis ، Onobrychis و Lophobrychis است. رنجبر و همکاران (Ranjbar *et al.*, 2004, 2006, 2007) و امیرآبادی‌زاده و همکاران (Amirabadizadeh *et al.*, 2006 ,2009) نیز چند گونه از جنس Onobrychis را به عنوان گونه‌های جدید از ایران معرفی کردند. در ایران جنس Onobrychis دارای ۶۳ گونه (۱۳ گونه یک ساله و ۵۰ گونه چند ساله) است که ۲۳ گونه آن به بخش Heliobrychis تعلق دارد و ۱۷ گونه آن فقط از ایران گزارش شده‌اند. تعدادی از گونه‌های این بخش دارای ارزش علوفه‌ای بوده و در کنترل فرسایش و یا به عنوان گیاهان جلب‌کننده زنبور عسل مورد استفاده قرار می‌گیرند (Lock and Simpson, 1991؛ Mabberley, 1997؛ Yakovlev *et al.*, 1996). این گونه‌ها تنوع ژنتیکی بالایی داشته و به عنوان یک ذخیره ژنتیکی غنی و ارزشمند می‌توان از آن‌ها برای اصلاح گونه‌های زراعی استفاده کرد. انجام تلاقی بین انواع غیرزراعی با گونه زراعی اسپرس، روش مناسبی برای فائق آمدن بر نارسایی‌های اسپرس‌های زراعی و افزایش تحمل نتاج به تنش‌های محیطی، بیماری‌ها و افزایش عملکرد کمی و کیفی آن‌ها محسوب می‌شود.

ذخیره ژنی این جنس دارای سطوح پلوئیدی متفاوت دیپلوئید و تتراپلوئید با عدد پایه کروموزمی متفاوت ۷، ۸ و ۹ است. در مطالعات سیتولوژیکی که در مورد تعدادی ازگونه‌های اسپرس انجام شد تعداد کروموزوم‌های گامتی گونه *O. viciaefolia*، ۱۴ و تعداد کروموزوم‌های سوماتیکی آن ۲n=۲۸ گزارش شد (Chapman and Yuan, 1968). میرزایی ندوشن و فیاضی (Mirzaie-Nodoushan and Fayazi, 2000) ده جمعیت از گونه *O. sativa* راکه از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شده بود مورد مطالعه سیتوژنتیکی قرار داده و ضمن ارزیابی این جمعیت‌ها از نظر سطح پلوئیدی و ارائه فرمول کاریوتیپی، تعدادی از پارامترهای آماری راجهت ارزیابی تقارن کاریوتیپی جمعیت‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مورد مطالعه ارائه کردند. انصاری وهمکاران (Ansari Asl *et al.*, 2000) تعدادی از گونه‌های موجود دراستان فارس را بررسی کردند، نتایج نشان داد که گونه‌های *Onobrychis gaubae*، *O. melanotricha*، *O. sojakii* و *O. aucheri* ssp. *tehranica* با ۲n=۱۶ کروموزوم و گونه *O. ptolemiaca* با ۲n=۱۴ کروموزوم دیپلوئید و گونه‌های *O. crista-galli* و *O. aucheri* ssp. *sammophila* با ۲n=۳۲ کروموزوم و گونه *O. viciaefolia* با ۲n=۲۸ کروموزوم تتراپلوئید هستند. همچنین این مطالعه نشان داد که در جنس اسپرس دو عدد پایه ۷ و۸ وجود دارد. با بررسی کاریوتیپ چهار گونه اسپرس نشان داده شد که گونه‌های *O. aucheri* ssp. *Tehranica*، *O. scrobiculata*, *O. melanotricha* و *O. oxyptera* دارای ۱۶ کروموزوم هستند و براساس عدد پایه کروموزومی۸ = X گونه‌های دیپلوئید محسوب می‌شوند (Ansari Asl *et al.*, 2001). حاتمی ونصیرزاده (Hatami and Nasirzadeh, 2006)در پژوهش‌هایی در مورد دو زیر گونه *O. aucheri* subsp. *tehranica* و *O. aucheri* subsp. *psammophila* گزارش کردند که با توجه به خصوصیات ریخت‌شناسی و صفات کروموزومی در هر دو تاکسون مشخص می‌شود که این دو زیرگونه با یکدیگر دارای اختلاف ظاهری وکروموزومی بوده بنابراین نمی‌توان آن‌ها را به عنوان دو زیرگونه از یک گونه تلقی کرد. تنوع ژنتیکی شش جمعیت *O. altissima* بر اساس صفات مورفولوژیکی و سیتولوژیکی و رفتار کروموزوم‌ها در میوز توسط کرمیان و همکاران (Karamian *et al.*, 2008) بررسی شد. نتایج نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه همگی دارای ۲۸ کروموزوم بوده اما رفتار کروموزوم‌ها با یکدیگر متفاوت است. حسام‌زاده حجازی و ضیائی‌نسب (Hesamzadeh Hejazi and Ziaie Nasab, 2009)، ضمن بررسی ۲۱ جمعیت از ۱۴ گونه اسپرس بانک ژن منابع طبیعی ایران دریافتند که گونه *O. crista-galli* با فرمول کاریوتیپی ۲m+۶sm و گونه *O. aucheri* با فرمول کاریوتیپی۸m به ترتیب نامتقارن‌ترین و متقارن‌ترین کاریوتیپ (از نظر تقارن درون کروموزومی) هستند. در بررسی آن‌ها، گونه *O. hohenackeriana* با داشتن بیشترین تغییرات بین کروموزومی نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را داشت. در پژوهش حاضر با شمارش و اندازه گیری کروموزم‌های مرحله متافازی میتوز گونه‌های بخش Heliobrychis که بسیاری از آن‌ها انحصاری ایران هستند، ضمن تعیین کاریوتیپ تاگزون‌ها به منظور تعیین عدد کروموزومی، مطالعه شکل و اندازه کروموزوم‌ها، گونه‌های نزدیک به یکدیگر نیز برای انجام تلاقی بین گونه‌ای با استفاده از روش‌های تجزیه آماری

Archive of SID

www.SID.ir

چند متغیره، تعیین شد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی نه گونه اسپرس مربوط به بخش Heliobrychis از نظر مشخصات کروموزومی مورد مطالعه قرار گرفتند. ابتدا برای از بین بردن سختی پوسته بذر، سطح ۱۰۰ عدد از بذر هر جمعیت توسط کاغذ سمباده خراش داده شد و سپس با آب ژاول ۱۰٪ ضدعفونی شدند. بذرهای تیمار شده را در تشتک‌های پتری محتوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده و برای جوانه‌زنی به ژرمیناتور ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت که ریشه‌چه‌ها به اندازه ۱/۵-۱ سانتی‌متر رشد کردند، ریشه‌چه‌ها جدا و پس از انتقال به محلول پیش تیمار ۸- هیدروکسی کینولئین، به مدت ۳/۵ ساعت در یخچال نگهداری شدند. نمونه‌ها در ادامه پس از شستشو با آب مقطر در محلول فیکساتور لویتسکی (محلول یک به یک فرمالین ده درصد و اکسیدکرم یک درصد) قرار داده و در یخچال نگهداری شدند. پس از گذشت ۳۰-۲۴ ساعت به مدت ۳ ساعت در آب جاری شستشو و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. بعد از این مدت ریشه‌چه‌ها در محلول سدیم هیدروکسید نرمال به مدت ۱۲ دقیقه در حمام آبی ۶۰ درجه سلسیوس هیدرولیز و سپس با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. برای از بین بردن تیغه میانی و تهیه گسترش بهتر سلولی، ریشه‌چه‌ها به مدت یک ساعت در آنزیم سلولاز و پکتیناز قرار داده شدند و پس از اسکواش، ۱۰-۵ پهنه متافازی میتوز سلول‌های مریستم نوک ریشه برای هر گونه مورد مطالعه قرار گرفت.

در تمام نمونه‌های مورد مطالعه ابتدا تعداد کروموزم در هسته سلول، شمارش شد و پارامترهای کاریوتیپی نظیر طول کل کروموزوم (Total Length: TL)، مجموع طول بازوی بلند (Long Arm Length: LA)، مجموع طول بازوی کوتاه (Short Arm Length:SA)، نسبت بازوی بلند به کوتاه (Ratio of LA/SA:r-value))، و شاخص ضریب سانترومری(Centromic Index: CI) که بیانگر نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم است، توسط نرم‌افزار Micromeasure بر حسب میکرون اندازه‌گیری شد. دیگر پارامترهای کاریوتیپی مانند درصد شکل کلی (Total Form Percentage:TF%)، اختلاف درصد طول نسبی بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین کروموزوم (Differences of Relative Length: DRL%)، طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم (Relative Length of Shortest Chromosome: S%)، ضریب نامتقارن بودن درون کروموزومی (Intra Asymmetry Chromosomal Index :A1) و بین کروموزومی (Inter Asymmetry Chromosomal Index: A2) نیز محاسبه شدند. در این بررسی برای تعیین وضعیت تکاملی و مطالعه تقارن کاریوتیپی

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیت‌ها از جدول دو طرفه Stebbins استفاده شد (Stebbins, 1971). به منظور تجزیه آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات کروموزومی، تجزیه واریانس انجام شد. مقایسه میانگین صفات نیز با استفاده ازآزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح احتمال۱٪) انجام شد. برای تعیین سهم هر یک از صفات اندازه‌گیری شده در ایجاد تنوع بین جمعیت‌ها، تجزیه به مولفه‌های اصلی و برای گروه‌بندی آن‌ها تجزیه کلاستر (Ward) انجام شد. برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزارSAS استفاده شد.

نتایج و بحث

نام و رویشگاه گونه‌های بخش Heliobrychis که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند در جدول ۱ نشان داده شده است. گونه‌های *O. lunata*، *O. andalanica*، *O. heliocarpa* و *O. atropatana* انحصاری ایران هستند و برای اولین بار دراین تحقیق مطالعات کاریوتیپی آن‌ها انجام شد. تصاویر صفحه متافازی و کاریوگرام گونه‌های مورد مطالعه در شکل ۱ و ایدیوگرام مربوط به آن‌ها در شکل ۲ ارایه شده است. از نظرتعداد کروموزوم پایه، بین گونه‌ها عدد پایه کروموزومی ۷ و ۸ مشاهده شد. گونه *O. lunata* با عدد پایه کروموزومی x=۷ دارای ۲n=۲x=۱۴ کروموزوم و سایرگونه‌ها با عدد پایه کروموزومی x=۸ دارای ۲n=۲x=۱۶ کروموزوم بود و در نتیجه همگی دیپلوئید هستند. نتایج مطالعات سیتوژنتیکی توسط دیگر محققین در مورد این جنس نیز موید نتایج این تحقیق می‌باشد (حسام‌زاده حجازی و ضیائی‌نسب، ۲۰۰۹؛ Ansari Asl *et al.*, 2000، Coa, 1984؛ Goldblatt, 1992-1993). از نظر تعداد ستلایت‌ها، نیز گونه *O. lunata* بدون ستلایت، گونه *O. buhseana* دارای چهار ستلایت بود و سایر گونه‌ها دو ستلایت داشتند. این مطالعه نشان داد که هرچند گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف اسپرس دارای تعداد متفاوتی کروموزم پایه هستند ولی همگی در داشتن کروموزم‌های کوچک مشترک هستند، به عبارت دیگر در مقایسه با بسیاری از گونه‌ها و جنس‌های دیگر گیاهی میانگین طول کروموزم‌های اسپرس کوچک‌تر است. مقایسه میانگین طول ژنوم گونه‌های اسپرس نیز نشان داد که بیشترین میانگین طول ژنوم متعلق به گونه *O. scrobiculata* (۲۴/۲۶میکرون) و کمترین میانگین طول ژنوم به گونه *O. lunata* (۱۴/۷۶میکرون) تعلق داشت (جدول ۲).

با استفاده از نسبت اندازه طول بازوی بلند بر بازوی کوتاه کروموزم‌ها و براساس نظر لوان و همکاران (Levan *et al.*, 1964) فرمول کاریوتیپی گونه‌های مورد بررسی تعیین شد. ویژگی‌های کاریوتیپی گونه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که گونه‌های این جنس دارای تیپ کروموزومی متاسنتریک تا ساب متاسنتریک هستند. به طوری که تمام

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اسامی گونه‌های مورد مطالعه بخش Heliobrychis از جنس اسپرس (Onobrychis) و رویشگاه آن‌ها

Table 1. Studied species of sect. Heliobrychis of Onobrychis and their habitats

Species	Habitate
O. atropatana Boiss.	East Azerbaijan: Zonooz
O. scrobiculata Boiss.	Khorassan Razavi: Mashhad
O. oxyptera Boiss.	Fars: Shiraz, Kamfiroz, 664†
O. sojakii Rech. f.	Fars: Shiraz, Hosseinabad village
O. andalanica Bornm., Beih.	Kurdistan: Sanandaj, Abidar mountain, 1700- 1760m
O. lunata Boiss.	Kurdistan: Saghez, Malgherni, 162†
O. melanotricha Boiss.	Kerman: Khabr, 158†
O. heliocarpa Boiss.	East Azerbaijan: Shabestar, Tezej village, 335†
O. buhseana Bunge ex Boiss.	East Azerbaijan: Shabestar, Sophian, 297†

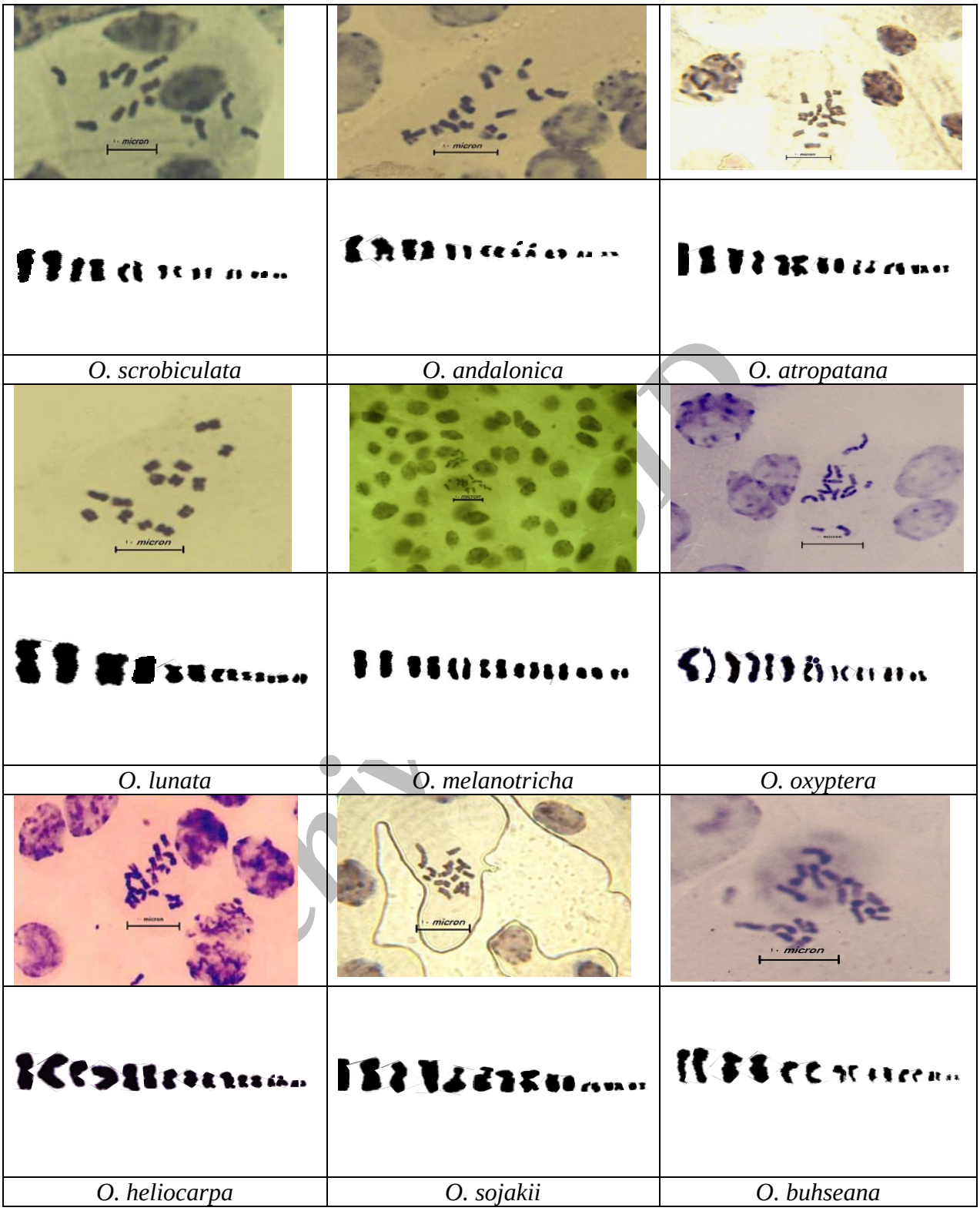
† شماره TN نمونه در بانک ژن گیاهی ملی ایران

†Number of TN in National Plant Genebank of Iran

کروموزوم‌های گونه‌های *O. lunata* و *O. heliocarpa* از نوع متاسنتریک و سایر گونه‌ها تلفیقی از متاسنتریک تا ساب متاسنتریک تعیین شد که مؤید نظر محققین قبلی است (حسام‌زاده حجازی و ضیائی‌نسب، ۲۰۰۹؛ Aboe-El-Enain, 2002). نتایج تجزیه واریانس صفات مربوط به کروموزوم‌ها نشان داد که بین گونه‌های مختلف اسپرس از نظر صفات طول کل کروموزوم، مجموع بازوهای بلند، نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه، درصد فرم کلی، شاخص عدم تقارن درون کروموزومی در سطح پنج درصد و در مورد مجموع بازوهای کوتاه گونه‌ها در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳). معنی‌دار بودن صفات کروموزومی بیانگر تنوع کاریوتیپی در بین گونه‌های مورد مطالعه است که این امر می‌تواند دلیلی بر انجام مطالعات جامع کروموزومی جهت تعیین وضعیت تکاملی و بررسی قرابت و خویشاوندی گونه‌های مختلف اسپرس باشد. از نظر میانگین طول بازوی کوتاه و طول بازوی بلند تنوع زیادی بین جمعیت‌های مختلف وجود داشت، به نحوی که

Archive of SID

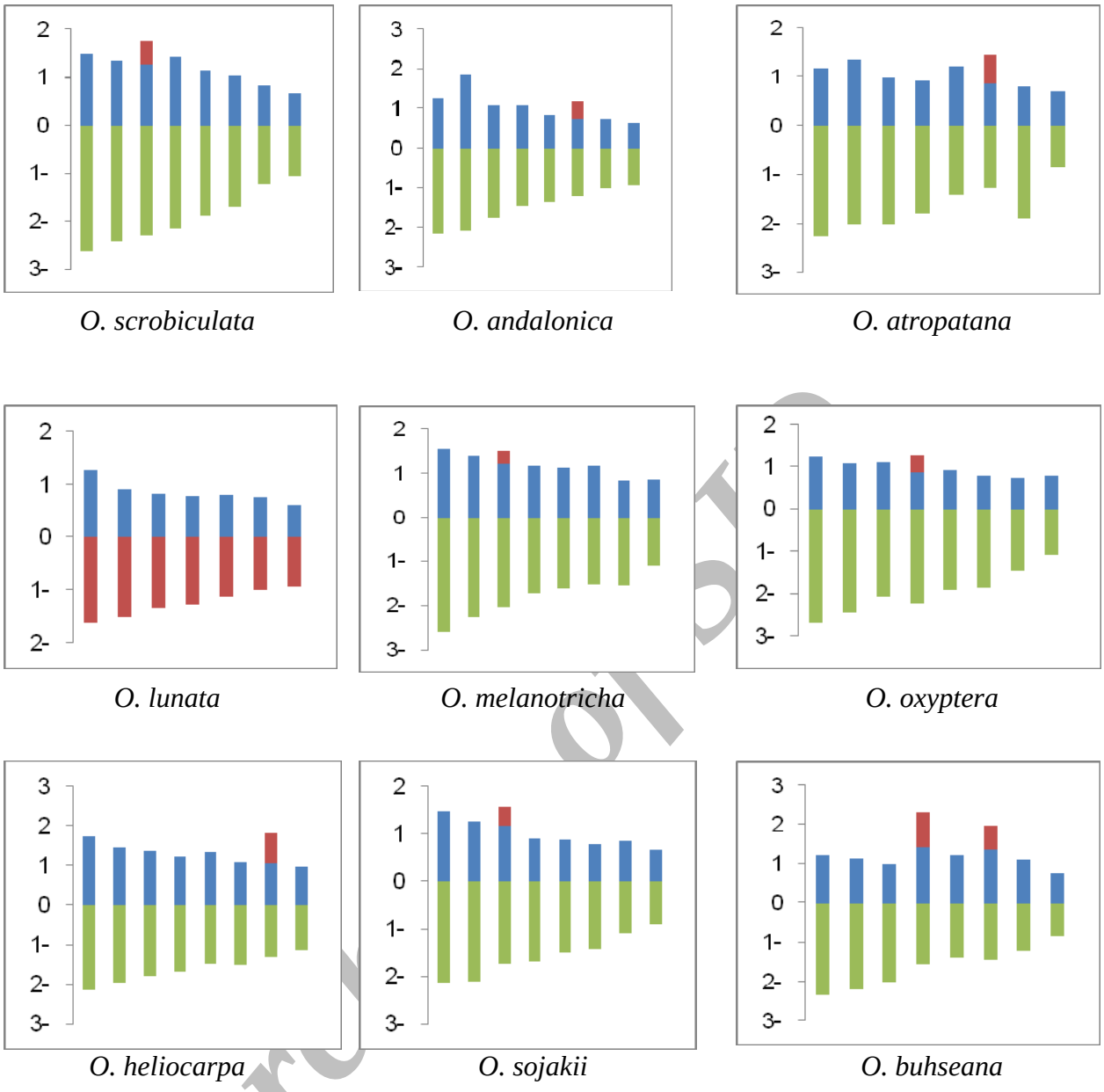
www.SID.ir



شکل۱- متافاز میتوزی به همراه کاریوگرام گونه های بخش Heliobrychis از جنس اسپرس (Onobrychis)

Fig.1. Metaphase mitosis and karyogram of different species of sect. Heliobrychis of Onobrychis

www.SID.ir



شکل ۲- ایدیوگرام گونه های بخش Heliobrychis از جنس اسپرس (Onobrychis)

Fig. .2. Idiogram of different species of sect. Heliobrychis of Onobrychis

کمترین میانگین طول بازوی کوتاه (۰/۸۳۵ میکرون) و کمترین میانگین طول بازوی بلند به گونه *O. lunata* تعلق داشت. در حالی که بیشترین میانگین طول بازوی بلند (۱/۹۶ میکرون) مربوط به گونه *O. oxyptera* و بیشترین میانگین طول بازوی کوتاه (۱/۳۹ میکرون) به گونه *O. melanotricha* تعلق داشت.

نتایج این تحقیق نشان داد که گونه *O. heliocarpa* با فرمول کاریوتیپی 16m از

www.SID.ir

جدول ۲- ویژگی‌های کروموزومی و کاریوتیپی گونه‌های مختلف بخش Heliobrychis از جنس اسپرس (Onobrychis)

Table2. Chromosome and karyotypic characteristics of different species of sect. Heliobrychis of Onobrychis

Species	2n	X	TL	TF%	S%	DRL	A_1	A_2	SC	Sat	Karyotype formula
O. atropatana	16	8	20.52	38.218	44.62	9.293	0.341	0.275	2B	2	10m+ 6sm
O. scrobiculata	16	8	24.26	37.162	41.79	9.441	0.399	0.283	1B	2	8m+ 8sm
O. oxyptera	16	8	23.53	32.552	49.76	8.769	0.489	0.240	3B	2	2m+ 14sm
O. sojakii	16	8	20.60	38.740	44.11	9.852	0.352	0.271	1B	2	8m+ 8sm
O. andalanica	16	8	19.41	39.269	46.25	9.486	0.332	0.282	1B	2	14m+ 2sm
O. lunata	14	7	14.76	40.530	53.48	9.178	0.301	0.213	1A	-	14m
O. melanotricha	16	8	23.77	39.395	46.89	9.350	0.329	0.251	1B	2	12m+ 4sm
O. heliocarpa	16	8	23.23	44.856	54.06	7.675	0.218	0.199	1A	2	16m
O. buhseana.	16	8	20.61	37.071	45.87	9.350	0.373	0.268	1B	4	6m+ 10sm

2n : تعداد کروموزوم ؛ x: عدد پایه کروموزومی؛ TL : طول کل کروموزوم ؛ TF%: درصد فرم کلی کاریوتیپ ؛ S%: طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم؛ DRL%: اختلاف دامنه طول نسبی؛ A_1: شاخص عدم تقارن درون کروموزومی؛ A_2: شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی ؛ SC :کلاس استبینز ؛ فرمول کاریوتیپی.

2n: Number of chromosomes; X: Base of chromosomes; TL: Total length of chromosome; TF%:Total form percentage ; S%: Relative length of shortest chromosome; DRL: Difference of relative length; A_1: Intra asymmetry chromosomal index; A_2: Inter asymmetry chromosomal index; SC: Stebins class.

بیشترین درصد شکل کلی (۴۴/۸۵۶) و کمترین مقدار شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (۰/۲۱۸) برخوردار بود و گونه *O. oxyptera* با فرمول کاریوتیپی ۲m+۱۴sm دارای کمترین درصد شکل کلی (۳۲/۵۵۲) و بیشترین شاخص عدم تقارن درون کروموزومی (۰/۴۸۹) بود.

گونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Stebbins (1971) از نظر کاریوتیپی نیز مورد مقایسه قرار گرفتند. در میان گونه‌های مورد بررسی گونه‌های *O. heliocarpa* و *O. lunata* بر خلاف سایر گونه‌ها که در کلاس B استبینز بودند، در کلاس A قرار گرفتند و دارای کاریوتیپ‌های متقارن تر بودند که نشان‌دهنده ابتدایی‌تر بودن این دو گونه است. گونه *O. oxyptera* در کلاس B ۳ قرار گرفت و کاریوتیپ آن به سوی نامتقارنی و پیشرفته‌بودن تمایل داشت. از طرفی با توجه به این که دو شاخص A_1 و A_2 تقارن کاریوتیپ را بیان می‌کنند، با استفاده از دیاگرام پراکنش مقادیر A_1 و A_2 در مقابل هم می‌توان میزان تقارن یا عدم‌تقارن هر کاریوتیپ را نیز بررسی کرد (Zarco, 1986). بر اساس دیاگرام پراکنش

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ - تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی در گونه‌های مختلف بخش Heliobrychis از جنس اسپرس (Onobrychis)

Table3. Analysis of variance for the karyotypic characteristics of different species of sect. Heliobrychis of Onobryvhis

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS											
			TL	SA	LA	CI	r-value	TF%	S%	DRL%	A_1	A_2	P	q
Species	گونه گیاهی	7	26.770^{**}	7.61^{*}	13.2300^{**}	0.250^{ns}	10.56^{**}	31.91^{**}	52.81^{ns}	1.17^{ns}	0.016^{**}	0.002^{ns}	0.482^{ns}	0.124^{ns}
Error	خطا	16	5.840	2.06	2.0500	0.118	0.93	3.10	29.02	1.63	0.001	0.001	0.229	0.077
Total	کل	23												
%CV	ضریب تغییرات		0.003	0.01	0.0005	0.090	0.00	0.00	0.14	0.68	0.000	0.060	0.090	0.190

ns ، * و ** : به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد.

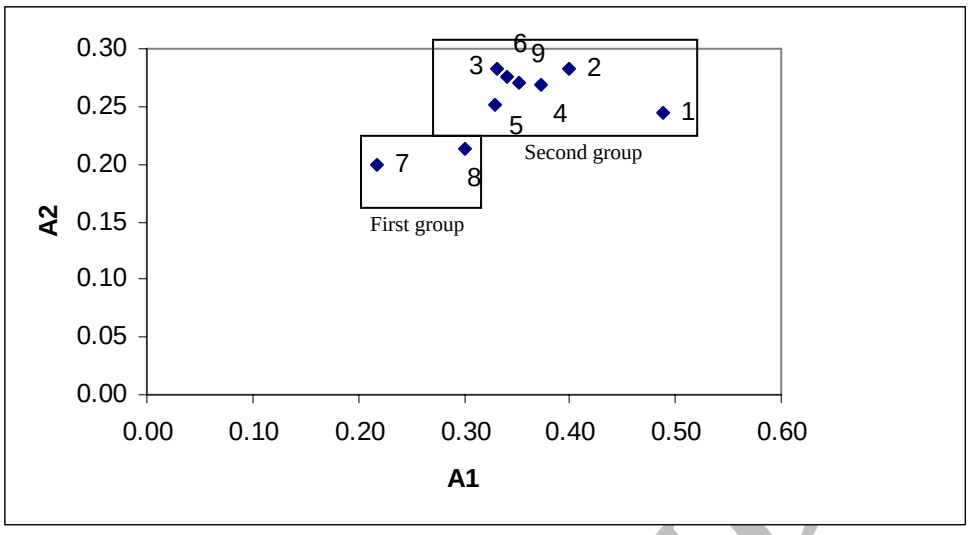
ns, * and **: Not significant, significant at 5% and 1% probability levels, respectively .

TL : طول کل کروموزوم ؛SA : مجموع بازوهای کوتاه ؛ LA : مجموع بازوهای بلند ؛ CI : شاخص سانترومری؛ r-value : نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه ؛ TF%: درصد فرم کلی ؛ S%: طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم؛ DRL%: اختلاف دامنه طول نسبی؛ A_1: شاخص عدم تقارن درون کروموزومی؛ A_2: شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی ؛ p : طول بلندترین کروموزوم؛ q: طول کوتاهترین کروموزوم.

TL: Total length of chromosome; SA: Sum of short arms; LA: Sum of long arms; CI: Centromic index; r- value: Ratio of long arm to short arm; TF%:Total form percentage ; S%: Relative length of shortest chromosome; DRL: Differenccce of relative length; A_1: Intra asymmetry chromosomal index; A_2: Inter asymmetry chromosomal index; p: Length of longest chromosome; q : Length of shortest chromosome.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- نمودار پراکنش گونه‌های بخش Heliobrychis جنس اسپرس (Onobrychis) بر اساس دو فاکتور A_1: شاخص عدم تقارن درون کروموزومی و A_2 : شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی: ۱: *O. oxtptera* ، ۲: *O. Scrobiculata*، ۳: گونه *O. andalonica*، ۴: *O. buhseana* ، ۵: *O. melanotricha*، ۶: *O. atropatana*، ۷: *O. heliocarpa*، ۸: *O. lunata* و ۹: *O. sojakii*

Fig. 3. Graph of distribution of different species of Heliobrychis of Onobrychis based on A_1: Intra asymmetry chromosomal index and A_2: Inter asymmetry chromosomal index: 1: *O. oxyptera* 2: *O. scrobiculata*, 3: *O. andalanica*, 4: *O. buhseana*, 5: *O. melanotricha*, 6: *O. atropatana*, 7: *O. heliocarpa*, 8: *O. lunata* and 9: *O. sojakii*

گونه‌ها در شکل ۳، گونه‌ها در دو دسته قرار گرفتند. دسته اول دارای مقادیر کمتر A_2 بودند که این مطلب نشان‌دهنده متقارن‌تر بودن کاریوتیپ آن‌ها است. دو گونه *O. heliocarpa* و *O. lunata* در این دسته قرار گرفتند. سایر گونه‌ها در دسته دوم قرار گرفتند که نشان‌دهنده نامتقارن‌تر بودن این گونه‌ها است.

برای تعیین نقش هر یک از صفات کاریوتیپی مورد مطالعه در تنوع بین گونه‌ها، تجزیه به مولفه‌های اصلی بر پایه میانگین دوازده صفت انجام شد. بر این اساس صفات مورد مطالعه به سه مولفه تقسیم شدند که در مجموع ۹۶/۸۱ درصد از تنوع بین داده‌ها را توجیه می‌کرد. بار عامل‌ها در مولفه اول نشان داد که مجموع طول بازوها، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و طول بلندترین وکوتاه‌ترین کروموزوم دارای بیشترین مقدار هستند، به عبارت دیگر این مولفه بیشتر تحت تاثیر صفات مرتبط با اندازه کروموزوم‌ها است. در مولفه دوم شاخص‌هایی که بر تقارن کاریوتیپی نقش دارند، دارای بیشترین مقدار بودند. در بررسی مولفه سوم، شاخص طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم از مقادیر بیشتری برخوردار بود (جدول۴). نتایج این بررسی با نتایج حسام‌زاده حجازی و ضیائی‌نسب (۲۰۰۹) در مورد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴- تجزیه مولفه‌های اصلی صفات کاریوتیپی گونه‌های مختلف بخش Heliobrychis
Table 4. Principal component analysis of karyotypic characteristics of different species of sect. Heliobrychis of Onobrychis

Parameter	First component	Second component	Third component
DRL%	-0.361	0.226	0.837
TF%	-0.019	-0.950	-0.298
S%	-0.228	-0.164	-0.955
A1	0.098	0.939	0.290
A2	0.071	0.264	0.940
P	0.968	0.166	0.053
Q	0.764	-0. 075	-0.614
TL	0.979	0.183	0.064
LA	0.771	0.572	0.266
SA	0.837	-0.465	-0.254
CI	0.578	-0.736	0.259
r-VAL	0.257	0.916	0.250
Cumulative variance	36.440	69. 140	96.810

TL : طول کل کروموزوم ؛SA : مجموع بازوهای کوتاه ؛ LA : مجموع بازوهای بلند ؛ CI : شاخص سانترومری؛ r-value : نسبت طول بازوی بلند به بازوی کوتاه ؛ TF%: درصد فرم کلی ؛ S%: طول نسبی کوتاه‌ترین کروموزوم؛ DRL%: اختلاف دامنه طول نسبی؛ A_1: شاخص عدم تقارن درون کروموزومی؛ A_2: شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی ؛ p : طول بلندترین کروموزوم؛ q: طول کوتاهترین کروموزوم.

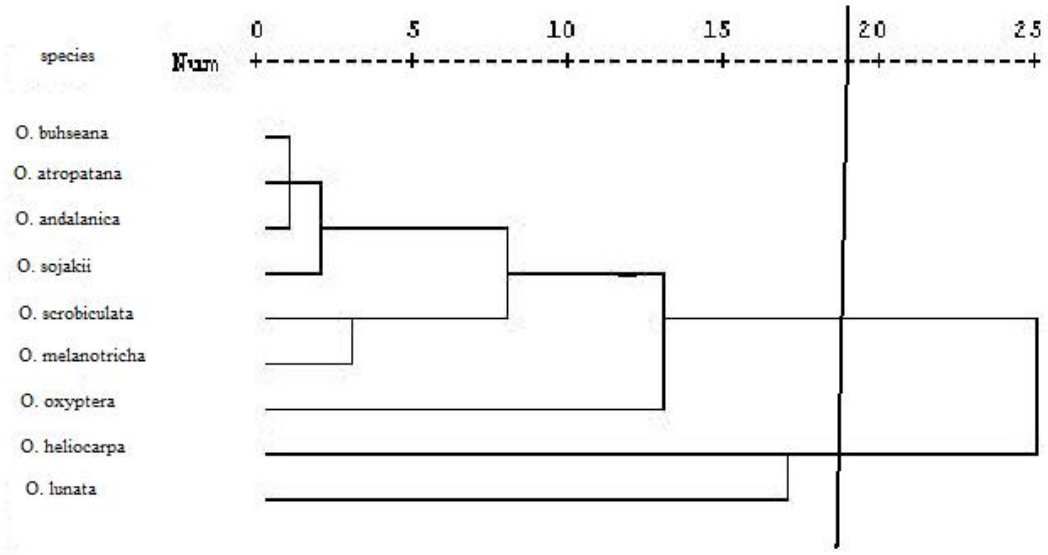
TL: Total length of chromosome; SA: Sum of short arms; LA: Sum of long arms; CI: Centromic index; r-value: Ratio of long arm to short arm; TF%:Total form percentage ; S%: Relative length of shortest chromosome; DRL: Differenccce of relative length; A_1: Intra asymmetry chromosomal index; A_2: Inter asymmetry chromosomal index; p: Length of longest chromosome; q : Length of shortest chromosome.

گونه‌های دیگری از اسپرس مطابقت دارد.

به منظور گروه‌بندی گونه‌ها تجزیه خوشه‌ای به روش Ward انجام شد (شکل۴). بر این اساس گونه‌های مورد مطالعه در دو گروه مجزا قرار گرفتند. گروه اول شامل گونه‌های *O. lunata* و *O. heliocarpa* بود و گونه‌های دیگر درگروه دوم قرار گرفتند. مشخصه بارز گروه اول نسبت به گروه دوم، داشتن A_1 کوچک‌تر و میزان درصد شکل کلی بالاتر بود. این دو گونه برخلاف گونه‌های دیگر فاقد کروموزوم‌های ساب متاسنتریک بودند و تنها کروموزوم‌های متاسنتریک داشتند. نتایج حاصل از این گروه‌بندی، نتیجه به دست آمده از دیاگرام پراکنش جمعیت‌ها بر اساس دو شاخص A_1 و A_2 را نیز تایید می‌کند. با توجه به گروه‌بندی گونه‌ها بر اساس خصوصیات کروموزومی بیشترین شباهت بین گونه‌های *O. buhseana* و *O. atropatana* و کمترین قرابت و نزدیکی بین گونه‌های *O. oxyptera* و *O. heliocarpa* وجود داشت، که بدون شک

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۴ - دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای گونه‌های بخش Heliobrychis از جنس اسپرس (Onobrychis) بر اساس ویژگی‌های کاریوتیپی

Fig. 4. Dendrogram of cluster analysis of different species of sect. Heliobrychis of Onobrychis based on karyotypic characteristics

انجام تلاقی بین این دو گونه از موفقیت چندانی برخوردار نخواهد بود.

گونه‌های بخش Heliobrychis از نظر مورفولوژیکی بسیار به همدیگر شباهت دارند و شناسایی آن‌ها از یکدیگر به سختی انجام می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، مشخص شد گونه‌هایی که از نظر مورفولوژی به یکدیگر شبیه هستند، از نظر ویژگی‌های کروموزومی با یکدیگر متفاوت هستند. تشخیص دو گونه *O. lunata* و *O. sojakii* نیز که از نظر ویژگی‌های ظاهری بسیار مشکل است، از نظر ویژگی‌های کروموزومی به راحتی قابل تشخیص هستند. این دو گونه از نظر عدد پایه کروموزومی، فرمول کاریوتیپی، کلاس تقارن استیبنز، میانگین طول کل ژنوم با یکدیگر تفاوت دارند. گونه *O. lunata* دارای عدد پایه کروموزومی x=۷ بوده و دارای ۲x =۱۴ کروموزوم، فرمول کاریوتیپی ۱۴m است و در کلاس ۱A استبنز قرار دارد، در حالی که عدد پایه کروموزومی در گونه *O. sojakii* ، x=۸ بوده و دارای ۲x =۱۶ کروموزوم با فرمول کاریوتیپی ۸m+۸sm و در کلاس ۱B استیبنز قرار دارد. طول کل ژنوم در گونه *O. sojakii* نسبت به گونه *O. lunata* بیشتر است. به طور کلی در بین گونه‌های مورد بررسی گونه *O. lunata* کمترین طول کل ژنوم را داشت. علاوه بر این ،از نظر مقادیر درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%)، شاخص عدم تقارن درون کروموزومی (A_1)، شاخص عدم تقارن بین کروموزومی (A_2) نیز دو گونه با یکدیگر اختلاف داشتند. در این مطالعه ویژگی‌های

Archive of SID
www.SID.ir

کاریوتیپی گونه *O. lunata* که بومی ایران است، برای اولین بار تعیین شد و نتایج نشان داد که این گونه کاملاً با سایر گونه‌های این بخش متفاوت است. شمارش تعداد کروموزم‌ها و اندازه‌گیری ابعاد آن‌ها و تعیین اختلاف‌های احتمالی بین کروموزم‌های گونه‌های مختلف می‌تواند به عنوان ابزاری در تعیین احتمال موفقیت در انجام تلاقی‌های بین گونه‌ای به کار گرفته شود. (Lemmi *et al*., 1995) و مطالعات سیتوژنتیکی لازم است تا نتایج حاصل از دورگ‌های بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید به مرحله ثبات و پایداری لازم از نظر ویژگی‌های کاریوتیپی برسد. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند برای رده‌بندی گونه‌های بخش Heliobrychis که اکثراً بومی ایران هستند و انتخاب گونه‌های نزدیک به یکدیگر برای انجام تلاقی بین گونه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.

References

Abou-El-Enain, M. M. 2002. Choromosomal criteria and their phylogenetic implication in the genus Onobrychis Mill sect. Lophobrychis (Leguminosae), with special reference to Egyptian spesies. Botanical Jornal of the Linnean Society 139: 409-414.

Amirabadizadeh, H., Abbasi, M., and Ranjbar, M. 2006. A new species of Onobrychis sect. Heliobrychis (Tribe Hedysareae) from Iran. Iranian Journal of Botany 12: 187-190.

Amirabadizadeh, H., Ghanavati, F., Abbassi, M., and Ranjbar, M. 2009. A new species of Onobrychis Sect. Afghanicae (Fabaceae) from Iran. Iranian Journal of Botany 15: 45-50.

Ansari Asl, F., Ahmadian, P., and Nasirzadeh, A. 2000. Cytological study of Onobrychis germplasm in Tehran province. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 36-56.

Ansari Asl, F., Nasirzadeh, A., and Hatami, A. 2001. Collection, identification and determination of genetic resources of *Onobrychis* genus in Fars province. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 6(2): 131-140.

Boissier, E. 1872. Onobrychis. In: Flor Orientalis Genevae Basilease & Lagundi. Pages: 526-553.

Archive of SID

www.SID.ir

Cao, Z. Z. 1984. Study of the karyotype of *Onobrychis vicifolia*. Zhongguo Caoyuan Grassland of China 1: 54-55.

Chapman, S. R., and Yuan, M. 1968. Cytological and morphological variation in breeding stocks of *Onobrychis*. A Preliminary Report. Montana State University, Bulletin 627:93-96.

Goldblatt, P. 1992-1993. Index to Plant Chromosome Numbers for 1992-1993. Monographs in Systematic Botany, Vol. 58. Botanical Garden, Saint Lois Missori.

Hatami, A ., and Nasirzadeh, A.R. 2006. Change in rank position of two *Onobrychis* subspecies according to morphological and karyotypic studies in Fars province. Pajouhesh & Sazandegi 75: 186-191.

Hesamzadeh Hejazi, S.M., and Ziaei Nasab, M. 2009. Cytogenetic study on several populations of diploid species of *Onobrychis* in natural gene bank of Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research16(2): 158-179.

Karamian, R., Hadadi, A., and Ranjbar, M. 2008. Morphological and cytological study on different populations of *Onobrychis altissima* in Iran. Proceedings of the 15th National & International Conferance of Biology. University of Tehran. Tehran. Iran. 250pp.

Lemmi, G., Lorenzetti, S., and Negri, V. 1995. The annual medic collection of the Instito de Miglioramento Genetico vegetale of the University of Perugia. Herba 8: 43-52.

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

Lock, J. M., and Simpson, K. 1991. Legume of the West Asia: A Check-list. Royal Botanical Gardens, Kew, UK. 452pp.

Mabberley, D. J. 1997. The Plant Book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants, 2nd.ed. Cambridge, UK. 342pp.

Mirzaie-Nodoushan, H., and Fayazi, M. A. 2000. Selection indices in some sainfoin (*Onobrychis sativa*) population. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 5: 14-18.

Archive of SID

www.SID.ir

Ranjbar, M., Amirabadizadeh, H., Karamian, R., and Ghahremani, M. A. 2004. Notes on Onobrychis sect. Heliobrychis (Fabacea*e*) in Iran. Willdenowia 34:187-190.

Ranjbar, M., Karamian, R., and Johartchi, M. R. 2006. Notes on the taxonomy of Hedysarum (Fabaceae) in Iran. Annual Botany Fennici 43:152-155.

Ranjbar, M., Karamian, R., Tolui, Z., and Amirabadizadeh, H. 2007. *Onobrychis assadii* (Fabaceae)a new species from Iran. Annual Botany Fennici 44:481-484.

Rechinger, K. H. 1984. Papilionaceae. pp. 387- 464. In: Rechinger, K. H. (ed.) Flora Iranica 157.

Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edwards Arnold (Publisher) Ltd., London. UK. 216 pp.

Yakovlev, G. P., Sytin, A. K., and Roskov, J. R. 1996. Legumes of Northern Eurasia, A checklist Royal Botanical Garden, Kew, UK. 542pp.

Zarco, R. C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 36: 526-530.

Archive of SID

www.SID.ir