ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۴۲۲-۴۱۱

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی سیر ایران (*Allium sativum*) بر اساس خصوصیات سیتوژنتیکی و کاریوتایپی

Genetic variation of Iranian ecotypes of Garlic (*Allium sp.*) using karyotype analysis

الهام یعقوبی[۱]، سعید ملک‌زاده شفارودی*[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد.

Yaghoobi E[1], Malekzadeh-Shafaroudi S*[1]

1. MSc Student and Assistant Professor, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: malekzadeh-s@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

تنوع ژنتیکی اساس اصلاح نباتات است که از تکامل طبیعی ناشی شده است و از اجزای مهم پایداری نظام‌های بیولوژیکی می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان زراعی برای برنامه‌های اصلاح نباتات وحفاظت از ذخایر توارثی کاربرد حیاتی دارد. یکی از روشهای بررسی تنوع در ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی، انجام مطالعات سیتوژنتیکی وکاریوتایپی است، بدین منظور تعداد ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران، جمع‌آوری شدند. پس از ریشه‌دار کردن غده‌های سیر و انجام مراحل پیش‌تیمار، تثبیت، هیدرولیز و رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها، تهیه اسلاید به روش اسکواش انجام شد. در بررسی‌های میکروسکوپی تعداد پنج سلول متافازی مناسب انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار Karyotype Analysis 1.5 طول بازوهای کوتاه و بلند کروموزوم و طول کل کروموزوم‌ها اندازه‌گیری شد و سایر شاخص‌ها در نرم‌افزار Excel محاسبه شد. داده‌ها در نرم‌افزار آماری JMP_8 در قالب طرح کاملا تصادفی نامتعادل تجزیه و تحلیل شدند که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین طول بازوی کوتاه، طول بازوی بلند و طول کل کروموزوم نشان دادند. مقایسه میانگین به روش توکی بین اکوتیپ‌ها انجام شد و به منظور دسته‌بندی اکوتیپ‌ها، براساس کلیه شاخص‌های کاریوتایپی و براساس شاخص‌های ژنومی، تجزیه کلاستر به روش Ward صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که عدد پایه کروموزومی در اکوتیپ بجنورد x=۷، (۲n=۲X=۱۴) و در سایر اکوتیپ‌ها x= ۸ ، (۲n=۲X=۱۶) است، که با سایر مطالعات انجام شده بر روی گیاه سیر مطابقت داشت.تجزیه کلاستر اکوتیپ‌ها را به دو گروه متقارن و نامتقارن تقسیم نمود و مشخص شد کمترین فاصله اقلیدسی مربوط به دو اکوتیپ سمنان و طبس است. کوچکترین کروموزوم‌ها مربوط به اکوتیپ یزد و بزرگترین کروموزوم‌ها مربوط به اکوتیپ علی‌آباد است، متقارن‌ترین کاریوتایپ، اکوتیپ یزد و نامتقارن‌ترین کاریوتایپ اکوتیپ خواف شناخته شد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه کلاستر
تقارن ژنومی
کاریوگرام
کروموزوم
Garlic

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گیاه سیر با نام علمی *Allium sativum* و نام لاتین Garlic از تیره Alliaceae متعلق به راسته مارچوبه‌ای‌ها (Asparagale)، خانواده Amaryllidacea و جنس سیرها (Allium) می‌باشد. از نظر گیاه شناسی، سیر گیاهی است علفی، دائمی و دارای ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر که قسمت زیرزمینی آن متورم و مرکب از ۳ تا ۱۲ قطعه و محصور در غشاهای نازک و ظریف به رنگ خاکستری مایل به سفید، دارای برگهای باریک نواری شکل به رنگ سبز تیره همراه با گلهای کوچک صورتی رنگ است که به صورت چتر در انتهای ساقه ظاهر می‌شود. سیر گیاهی روز بلند است و برای تشکیل سیرچه‌ها به دو عامل روز و درجه حرارت نیازمند است. این گیاه نیازمند هوای معتدل تا خشک می‌باشد و نسبت به یخبندان به میزان کمی مقاوم است. سیر بعد از پیاز دومین و پرمصرف‌ترین گیاه از جنس آلیوم است که به علت داشتن مواد معدنی از اهمیت غذایی بالایی برخوردار است (Baghalian et al. 2004). سیر گیاهی دیپلوئید است که دارای ۲n=2X=۱۶ کروموزوم می‌باشد. گونه‌های خویشاوند سیر شامل پیاز، موسیر، ترەفرنگی و پیازچه در سه گروه سیتولوژیکی دیپلوئید (۲n=2X=۱۶) ، تریپلوئید (۲n=3X=۲۴) و تتراپلوئید (۲n=4X=۳۲) با عدد پایه کروموزومی x=۸ قرار دارند (Tatlnglu and Wrick 1989). یکی از روش‌های بررسی تنوع در ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی، انجام مطالعات سیتوژنتیکی و کاریوتایپی است. برای اینکه دقیقا مرزهای بین‌گونه‌ای در یک جنس مشخص شود، شمارش تعداد کروموزوم‌ها، مشاهده تشابهات کروموزومی و تهیه کاریوتایپ، ضرورت پیدا می‌کند. (Alishah and Omidi 2008). یکی از مباحث مهم در مطالعات سیتوژنتیکی، بحث تکامل کاریوتایپی است، به طور کلی عامل‌های اندازه طول کل کروموزوم‌ها، تعداد کروموزم‌ها و شکل کروموزوم‌ها به عنوان سه عامل مهم در بررسی تکامل هستند. عقیده بر این است که کاریوتایپ‌های متقارن درجه تکاملی ابتدایی‌تری نسبت به کاریوتایپ‌های نامتقارن دارند (Stebbins 1971). مشخص شده تعداد کروموزوم پایه سیر از ۶ تا ۸ تغییر می‌کند (Tatlnglu and Wrick 1989). مطالعات صورت گرفته بر روی سلول‌های متافازی گیاه سیر تعداد (۲n=2X=۱۶) کروموزوم را گزارش کرده است (Cortes et al. 1983). با این حال Sharma and Bal (1959) در دو واریته سیر (۲n=2X=۱۸) را مشاهده نمودند. در صورتیکه Banerjee (1980) و Etoh (1986)، (۲n=2X=۱۲) و (۲n=2X=۱۸) گزارش کردند (Yuzbasioglu and Unal 2004). مطالعات کاریوتایپی سیر ترکیه طول کروموزم‌های این گیاه را از ۷/۳۲ تا ۱۲/۲۰ میکرومتر و کروموزوم شماره ۵ را ساب‌متاسانتریک و بقیه کروموزوم‌ها را متاسانتریک گزارش کردند. در گزارش Wajahatullah and Vahidy (1990) کروموزوم‌های ۱ و ۲ متاسانتریک و بقیه کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک بودند. اما تفاوت در اندازه کروموزوم‌ها بین ۷/۵ تا ۱۱ میکرومتر بود. در مطالعات کاریوتایپی سیر ترکیه مشخص شد که کروموزوم‌های ۵ و ۷ دارای ساتلایت[1] با طول ۲/۳۱ و ۲/۸۷ میکرومتر بود در حالیکه محل ساتلایت‌ها در مطالعات دیگر بر روی کروموزم‌های ۶ و ۷ قرار داشت (Cortes et al. 1983; Cortes and Escalza 1986; Wajahatullah and Vahidy 1990). با توجه به اختلافات زیادی که در عدد پایه کروموزومی گیاه سیر گزارش شده به منظور شناسایی کردن عدد پایه کروموزومی اکوتیپ‌های سیر بومی ایران، اهداف ذیل در این تحقیق دنبال شده است، شمارش کروموزومی، تعیین سطح پلوئیدی اکوتیپ‌ها، مشخص کردن شکل و اندازه کروموزوم‌ها، بررسی وضعیت تکاملی اکوتیپ‌ها، نوع و میزان تقارن کاریوتایپی، مشخص نمودن فرمول کاریوتایپی و تعیین میزان قرابت اکوتیپ‌ها که با توجه به توزیع جغرافیایی آنها مورد بحث قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران شامل بجنورد، شاندیز، طبس، یزد، سمنان، قائنات، بندرانزلی، ساری، خواف، شاهرود، سبزوار و حسام‌آباد، چنار، گنج‌تپه، لالجین، علی‌آباد، گراچنالی، تویسرکان، مریانج مربوط به استان همدان جمع‌آوری شد. پس از ضدعفونی غده‌های سیر با محلول ویتاواکس دو در هزار به مدت ۵ دقیقه، سیرچه‌ها جهت ریشه‌دار شدند جدا و بر روی ارلن‌های حاوی

[1] Sattelite

Archive of SID
www.SID.ir

آب شرب قرار داده شدند به گونه‌ای که ریشه همراه با قسمتی از طوقه داخل آب بودند. هنگامی که طول ریشه‌ها به اندازه یک تا دو سانتی‌متر رسید، (بین ساعات ۸ تا ۱۰صبح) ریشه‌ها از سیرچه‌ها جدا شد. برای مطالعه میتوز در سلول‌های در حال تقسیم از پیش‌تیمار کلشی‌سین با غلظت ۰/۱ درصد در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت استفاده شد (Farsi et al. 2011). پس از خارج کردن ریشه‌ها از مرحله پیش‌تیمار، ریشه‌ها شسته و با استفاده از کاغذ صافی خشک شدند. به منظور تثبیت تقسیم سلولی، ریشه‌ها در محلول کارنوی (۳ قسمت الکل اتیلیک: یک قسمت اسید استیک گلاسیال) به مدت ۱۹ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ریشه‌ها به مدت ۳ ساعت با آب شرب شستشو و آبگیری شدند. مرحله هیدرولیز با محلول یک نرمال اسیدکلریدریک، در بن‌ماری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ دقیقه صورت گرفت. پس از هیدرولیز، ریشه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با آب شرب شستشو داده شدند و توسط رنگ استوکارمن یک درصد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت رنگ‌آمیزی انجام شد. پس از تهیه اسلاید به روش اسکواش، مشاهدات میکروسکوپی توسط دو میکروسکوپ Olympus DP71 Digital Microscope Camera و Olympus DP12 Digital Microscope Camera، انجام شد. سلول‌ها با عدسی شیئی ۱۰۰ میکروسکوپ شناسایی شدند و پس از دستیابی به سلول‌های متافازی مناسب، با استفاده از دوربینی که به میکروسکوپ‌های ذکر شده متصل بود از سلول‌ها عکس گرفته شد. تعداد پنج عکس کاملا واضح از هر اکوتیپ (اکوتیپ‌های بجنورد و قائنات سه عکس و ساری چهار عکس) انتخاب شد تا جهت مراحل اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل نرم‌افزاری به برنامه‌ی Karyotype Analysis 1.5 منتقل شود، در این برنامه طول بازوهای کروموزوم‌ها اندازه‌گیری و محل سانترومر مشخص شد. سایر شاخص‌های کاریوتایپی همراه با آیدیوگرام هر اکوتیپ در نرم‌افزار Excel محاسبه شد. جهت بررسی تقارن کاریوتایپ‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Excel شکل کلی کاریوتایپ (TF%)، شاخص سانترومری (CI)، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A_1)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A_2)، شاخص نامتقارن بودن کاریوتایپ (ASK%)، شاخص شباهت اندازه کروموزومی (Rec)، ضریب عدم تقارن (AI)، شاخص تقارن کاریوتایپ (Syi) و نسبت بازوهای کوتاه به بلند به همراه سایر شاخص‌ها محاسبه شد (Kumari et al. 2011). توسط نرم‌افزار فتوشاپ کاریوگرام هر سلول تهیه شد. به منظور تجزیه آماری اطلاعات میتوزی به دست آمده، از نرم‌افزار آماری JMP_8 استفاده شد که تجزیه و تحلیل‌های انجام شده در این تحقیق شامل تجزیه واریانس در قالب طرح کاملا تصادفی نامتعادل (کلیه اکوتیپ‌ها پنج تکرار، بجنورد و قائنات سه تکرار و ساری در چهار تکرار)، محاسبه ضریب همبستگی بین شاخص‌ها، مقایسه میانگین به روش توکی و تجزیه کلاستر به روش Ward و ترسیم نمودارها بود.

در این پژوهش کلیه شاخص‌های کاریوتایپی دسته‌بندی شدند همچنین با استفاده از مدلینگ کامپیوتری داده‌ها، روابطی بین شاخص‌ها بدست آمد که در قسمت فرمول‌ها به آنها اشاره شده است و نیز تعدادی شاخص جدید جهت دسته‌بندی و تفسیر بهتر نتایج گزارش می‌شود.

با توجه به تعریف کاریوتایپ که مجموعه‌ای از اختصاصات مربوط به تعداد کروموزوم‌ها و شکل کروموزوم‌ها ازجمله محل قرارگیری سانترومر و اندازه کروموزوم می‌باشد (Alishah and Omidi 2008)، دسته‌بندی جدیدی جهت تقارن کاریوتایپی در نظر گرفته شد و تقارن بر دو نوع ۱- تقارن سانترومری و ۲- تقارن اندازه کروموزومی تقسیم شد. بدین صورت، اگر کاریوتایپی از نظر محل قرارگیری سانترومر تقارن داشته به نحوی که کرموزوم‌های آن سلول اکثر متاسانتریک، ساب‌متاسانتریک و یا تلوسانتریک باشند و بازه تغییرات محل سانترومر در کروموزوم‌های سلول کم باشد دارای تقارن سانترومری است. در تقارن اندازه، اگر اکثریت کروموزوم‌های سلول یک اندازه باشند و تغییرات اندازه کروموزوم‌ها در سلول کم باشد آن سلول دارای تقارن اندازه است. جهت تشخیص تقارن‌ها، شاخص‌های کاریوتایپی بر دو نوع شاخص‌های تک کروموزومی و شاخص‌های ژنومی (بین سلولی) تقسیم شدند. و جدول‌هایی طراحی شد که مشخص می‌کند، هر شاخص بر کدام نوع تقارن (اندازه یا سانترومری) تاثیر می‌گذارد. شاخص‌های تک کروموزومی(جدول۱)، برای هرکروموزوم اندازه‌گیری می‌شوند و وضعیت درون هر کروموزوم را مشخص می‌نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

شاخص‌های ژنومی وضعیت کلی ژنوم درون یک سلول را مشخص می‌کند و به سه نوع شاخص تقارن سانترومری، شاخص تقارن اندازه و شاخص شکل تقسیم شدند. شاخص تقارن سانترومری میزان بازه تغییرات محل سانترومر در کروموزوم‌های یک سلول را گزارش می‌کند. هرچه این بازه تغییرات کوچکتر باشد، کروموزوم‌های آن سلول از نظر محل قرارگیری سانترومر، متقارن‌تر هستند (جدول۲). شاخص‌های تقارن اندازه میزان بازه تغییرات طول کروموزوم‌ها را در یک سلول گزارش می‌کند. هرچه این بازه تغییرات کوچکتر باشد، کروموزوم‌های آن سلول از نظر اندازه طول کروموزوم‌ها متقارن‌تر هستند (جدول۳). شاخص شکل کلی کروموزوم‌ها فرم و شکل کلی کاریوتایپ را بیان می‌نمایند (جدول۴). جهت بررسی تقارن کاریوتایپ‌ها از کمیت‌ها و شاخص‌های ذیل استفاده شد و همچنین چند شاخص جدید برای تفسیر بهتر نتایج ارائه می‌شود ۱- شاخص انحراف معیار طول کروموزوم‌ها ۲- شاخص انحراف معیار طولی نسبی کروموزوم‌ها، این شاخص‌ها بازه تغییرات طول کروموزوم‌ها را در سلول گزارش می‌کنند ۳- شاخص، انحراف معیار شاخص سانترومری ۴- شاخص انحراف معیار نسبت بازوی بلند به کوتاه ۵- شاخص انحراف معیار نسبت بازوی کوتاه به بلند، با توجه به تجزیه و تحلیل‌های آماری انجام شده مشخص شد انحراف معیار شاخص‌ها، دسته‌بندی بهتری را جهت مقایسه تقارن اکوتیپ‌ها ایجاد می‌کنند. در قسمت شاخص‌ها فرمول‌های اصلی به همراه فرمول‌های بدست آمده از مدلینگ کامپیوتری داده‌ها آورده شده است.

معادله (۱) شکل کلی کاریوتایپ TF%: (Kumari et al. 2011)

$$TF\% = \frac{\text{مجموع طول کل بازوهای کوتاه}}{\text{مجموع طول کل کروموزوم‌ها}} * 100$$

بر اساس مدلینگ کامپیوتری انجام شده مشخص شد TF% با ASK% و تعداد کروموزوم‌ها (n) و طول نسبی بازوهای کوتاه (s %) رابطه دارد

$$TF\% = n * \%S = 1 - Ask\%$$

معادله (۲) شاخص سانترومری : (Kumari et al. 2011)

$$CI\% = \frac{\text{طول بازوهای کوتاه کروموزم}}{\text{طول کل کروموزوم}} * 100$$

معادله (۳) شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی: (Kumari et al. 2011)

$$A1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{ql}{pi}}{N}$$

که با مدلینگ انجام شده مشخص شد با Syi و r-value رابطه دارد.

$$A1 = 1 - \frac{Syl}{100} = 1 - r.value$$

N تعداد جفت کروموزوم‌های هومولوگ، qi متوسط طول بازوهای کوچک در هر جفت کروموزوم هومولوگ و pi متوسط طول بازوهای بلند در هر جفت کروموزوم است.

معادله (۴) شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی:

$$A2 = \frac{Scl}{Xcl}$$

Scl انحراف استاندارد طول کروموزوم‌ها برای هر توده و Xcl میانگین طول کروموزوم‌ها

معادله (۵) ضریب عدم تقارن:

$$AI = \frac{CVcl * CVci}{100}$$

معادله (۶) شاخص شباهت اندازه کروموزومی:

$$Rec = \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{CLi}{LC}}{n} * 100$$

معادله (۷) شاخص نامتقارن بودن کاریوتایپ:

$$As\ k\% = \frac{\text{مجموع طول کل بازوهای بلند}}{\text{مجموع طول کل کروموزوم‌ها}} * 100$$

معادله (۸) انحراف معیار طول کروموزوم

$$\int \sigma_{L+S} = \frac{\sqrt{\sum f_i (\text{میانگین طول کروموزوم‌ها} - \text{طول هر کروموزوم})^2}}{\text{تعداد کروموزوم‌ها}}$$

معادله (۹) انحراف معیار طول نسبی

$$\int \sigma_{L+S} = \frac{\sqrt{\sum f_i (\text{میانگین طول کروموزوم‌ها} - \text{طول هر کروموزوم})^2}}{\text{تعداد کروموزوم‌ها}}$$

معادله (۱۰) انحراف معیار شاخص سانترومری

$$\sigma_{CI} = \frac{\sqrt{\sum f_i (\text{میانگین} - \text{شاخص سانترومری})^2}}{\text{تعداد}}$$

معادله (۱۱) انحراف معیار نسبت بازوها

$$\sigma_{r-value} = \frac{\sqrt{\sum f_i (\text{میانگین} - \text{نسبت بازوها})^2}}{\text{تعداد}}$$

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- دسته‌بندی شاخص‌های تقارن تک کروموزومی و بازه تغییرات این شاخص‌ها

شاخص درون کروموزومی	بازه تغییرات	نحوه تاثیر در تقارن
L	---	---
S	---	---
L+S	---	---
r-value	صفرتا یک	به سمت یک میل کند(تقارن کامل = یک)
arm-ratio	بیشتر ازیک	به سمت یک میل کند(تقارن کامل = یک)
d-value	بیشتر از صفر	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل = صفر)
Ci	صفر تا پنجاه	به سمت پنجاه میل کند(تقارن کامل = پنجاه)
%L	بیشتر از صفر	---
%S	بیشتر از صفر	---
%(L+S)	بیشتر از صفر	---

جدول۲- دسته‌بندی شاخص‌های تقارن سانترومری و بازه تغییرات این شاخص‌ها

شاخص سانترومری	بازه تغییرات	نحوه تاثیر در تقارن
Cvci	بیشترازصفر	به سمت صفرمیل کند(تقارن کامل =صفر)
STD(arm.ratio)	بیشتراز صفر	به سمت صفرمیل کند(تقارن کامل =صفر)
STD(r-value)	بیشتراز صفر	به سمت صفرمیل کند(تقارن کامل =صفر)
STD(d-value)	بیشتراز صفر	به سمت صفرمیل کند(تقارن کامل =صفر)
STD(CI)	بیشتراز صفر	به سمت صفرمیل کند(تقارن کامل =صفر)

جدول۳- دسته‌بندی شاخص‌های تقارن اندازه و بازه تغییرات این شاخص‌ها

شاخص	بازه تغییرات	نحوه تاثیر در تقارن
A2	صفر تا یک	به سمت صفرمیل کند(تقارن کامل =صفر)
Rec	صفر تا صد	به سمت صد میل کند(تقارن کامل = صد)
CVcl	بیشتر از صفر	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل =صفر)
STD(R.L%)	بیشتر از صفر	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل =صفر)
STD(L+S)	بیشتر از صفر	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل =صفر)

جدول۴- دسته‌بندی شاخص‌های شکل و بازه تغییرات این شاخص‌ها

شاخص شکل	بازه تغییرات	نحوه تاثیر در تقارن
SUM(%L)	پنجاه تا صد	به سمت پنجاه میل کند(تقارن کامل = پنجاه)
SUM(%S)	صفر تا پنجاه	به سمت پنجاه میل کند(تقارن کامل = پنجاه)
TF%	صفر تا پنجاه	به سمت پنجاه میل کند(تقارن کامل = پنجاه)
Ai	بیشتر از صفر	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل = صفر)
As K%	پنجاه تا صد	به سمت پنجاه میل کند(تقارن کامل = پنجاه)
Syi	صفر تا صد	به سمت صد میل کند(تقارن کامل = صد)
VRC	بیشتر از صفر	----
DRL	بیشتر از صفر	----
S%	صفر تا صد	----
A1	صفر تا یک	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل = صفر)
A	صفر تا یک	به سمت صفر میل کند(تقارن کامل = صفر)

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه شاخص‌های کاریوتایپی مشخص کرد که بین اکوتیپ‌ها از نظر میزان و درجه تاثیر این شاخص‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد. بطوری‌که کمترین مقدار TF% مربوط به اکوتیپ بندرانزلی با ۴۲/۱۱ درصد و بیشترین مقدار آن مربوط به اکوتیپ ساری با ۴۴/۲۷ درصد است. کمترین مقدار شاخص سانترومری مربوط به اکوتیپ لالجین با ۴۱/۴۵ درصد و بیشترین مقدار آن مربوط به اکوتیپ علی‌آباد با ۴۳/۸۱ درصد است. کمترین مقدار شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی مربوط به علی‌آباد با ۰/۲ و بیشترین مقدار آن مربوط به بجنورد با ۰/۲۷ است. کمترین مقدار شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی مربوط به لالجین با ۰/۱۵ و بیشترین مقدار آن مربوط به شاندیز با ۰/۲۰ است. کمترین مقدار شاخص ضریب عدم تقارن مربوط به علی‌آباد با ۲/۰۳ و بیشترین مقدار آن مربوط به چنار با ۳/۴۱ است. کمترین مقدار شاخص شباهت اندازه کروموزومی مربوط به شاندیز با ۷۴/۴۱ درصد و بیشترین مقدار آن مربوط به مریانج با ۸۱/۶۲ درصد است. کمترین مقدار شاخص نامتقارن بودن کاریوتایپ مربوط به ساری با ۵۵/۷۳ درصد و بیشترین مقدار آن مربوط به تویسرکان با ۵۷/۸۹ درصد است. کمترین مقدار شاخص انحراف معیار طول کروموزوم‌ها مربوط به اکوتیپ یزد با ۲/۷۱ و بیشترین مقدار آن مربوط به اکوتیپ علی‌آباد با ۵/۹۱ است. کمترین مقدار شاخص انحراف معیار طول نسبی مربوط به لالجین با ۰/۹۴۳ و بیشترین مقدار آن مربوط به شاندیز با ۱/۲۵ است. کمترین مقدار شاخص انحراف معیار شاخص سانترومری مربوط به علی‌آباد با ۵/۸ و بیشترین مقدار آن مربوط به گنج‌تپه با ۸/۱۹ است. کمترین مقدار شاخص انحراف معیار نسبت بازوها مربوط به علی‌آباد با ۱۷ و بیشترین مقدار آن مربوط به شاهرود با ۲۱/۴۷ است. نتایج تجزیه واریانس انجام شده، اختلاف معنی‌داری را در سطح معنی‌داری یک درصد بین شاخص‌های طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و طول کل کروموزوم نشان داد (جدول ۵). ضریب همبستگی بین شاخص‌ها مشخص کرد که، شاخص‌های TF% با Syi و A_2 ; CVcl با VRC ، L+S و A_1 ; $STD_{(RL\%)}$ با r-value، رابطه مستقیم و مثبتی با یکدیگر دارند که محاسبه یکی از آنها جهت تشخیص نوع تقارن کفایت می‌کند. جهت دسته‌بندی ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران بر مبنای میانگین صفات پایه، مقایسه میانگین به روش توکی انجام شد (جدول۶). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها مشخص شد از نظر طول کل کروموزوم اکوتیپ علی‌آباد با طول ۳۵/۳۳ میکرومتر بیشترین ارزش میانگین را دارد که در جدول مقایسه میانگین‌ها در یک گروه جداگانه قرار گرفته است و اکوتیپ یزد با طول ۱۷/۰۴ میکرومتر کمترین میانگین طول کروموزوم را داشته و بصورت جداگانه در یک گروه قرار گرفته است البته این اکوتیپ با بسیاری از اکوتیپ‌های دیگر هم‌پوشانی نشان می‌دهد. از لحاظ صفت طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه کروموزوم به ترتیب اکوتیپ علی‌آباد دارای بیشترین میانگین و در یک گروه جداگانه قرار گرفته است و اکوتیپ یزد کمترین میانگین این دو صفت را دارد. جهت دسته‌بندی اکوتیپ‌ها سه کلاستر به روش Ward تهیه شد. ۱) کلاستر کل (کلیه شاخص‌های کاریوتایپی) ۲) کلاستر سانترومری (شاخص‌های تقارن سانترومری) ۳) کلاستر اندازه (شاخص‌های تقارن اندازه).

کمترین فاصله اقلیدسی بین اکوتیپ‌ها در کلاستر اکوتیپ‌ها بر مبنای کلیه شاخص‌های کاریوتایپی (کلاستر کل) مربوط به دو اکوتیپ سمنان و طبس بود (شکل۱).

کلاستر تقارن سانترومری اکوتیپ‌ها را به دو گروه متقارن و نامتقارن از نظر قرارگیری محل سانترومر تقسیم نمود (شکل۲). گروه اول این تقسیم‌بندی با ۱۱ اکوتیپ دارای تقارن سانترومری است و شامل اکوتیپ‌های: بجنورد، شاندیز، حسام‌آباد، مریانج، گراچنالی، ساری، بندر انزلی، سمنان، طبس، یزد و علی‌آباد می‌باشد و گروه دوم با ۸ اکوتیپ تقارن سانترومری نداشتند. کمترین فاصله اقلیدسی مربوط به چنار و تویسرکان است. تقسیم‌بندی، این کلاستر به کلاسترکل (شکل۱) شبیه است. جهت نمایش تفکیک دو گروه کلاستری، شکل‌های سه بعدی بر اساس سه شاخص برای هر سه کلاستر تهیه شد (شکل۳)، این شکل‌ها نیز توانستند اکوتیپ‌ها را به دو گروه تقسیم نمایند. این کلاستر (شکل۲)، انحراف معیار شاخص سانترومری (شکل۴) را تایید می‌کند. بر اساس تقسیم‌بندی کلاستر اکوتیپ‌ها بر مبنای شاخص‌های سانترومری (شکل۲) و انحراف معیار شاخص سانترومری (شکل۴) مشخص شد که شاخص، انحراف معیار

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۵- میانگین مربعات تجزیه واریانس صفات کاریوتایپی در اکوتیپ‌های مورد مطالعه بر پایه طرح کاملا تصادفی نامتعادل

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول بازوی بلند	طول بازوی کوتاه	طول کل کروموزوم
اکوتیپ	۱۸	۳۰/۹۱**	۱۸/۶۶**	۹۷/۰۴**
خطا	۷۱	۱/۹۸	۱/۳۳	۶/۲۰
کل	۸۹			
میانگین		۱۲/۸۷	۹/۷۱	۲۲/۵۸
ضریب تغییرات (CV)		۲۱/۷۵	۲۲/۶۵	۲۱/۹۵

** اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد

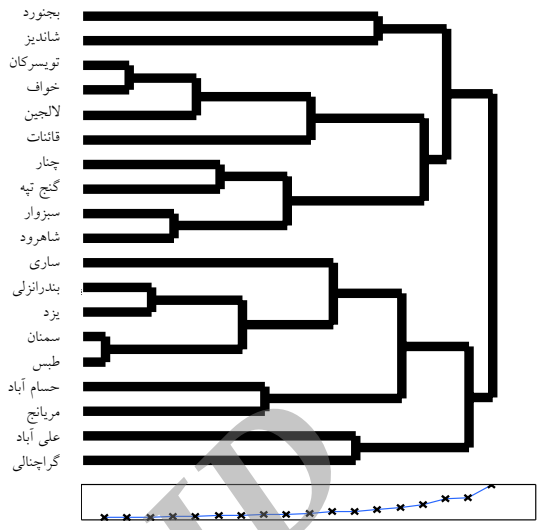
جدول۶- دسته‌بندی ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران بر مبنای میانگین صفات پایه به روش توکی

طول کل کروموزوم‌ها (واحد)		طول بازوی بلند کروموزوم (واحد)		طول بازوی کوتاه کروموزوم (واحد)	
علی آباد	a	۳۵/۳۳	a	علی آباد	۱۹/۷۴	a	علی آباد	۱۵/۵۹
گراچنالی	b	۲۸/۲۶	b	گراچنالی	۱۵/۹۴	b	گراچنالی	۱۲/۳۱
شاهرود	c	۲۶/۰۰	c	شاهرود	۱۴/۹۶	c	شاهرود	۱۱/۰۴
سبزوار	cd	۲۵/۲۸	cd	سبزوار	۱۴/۵۷	cd	سبزوار	۱۰/۷۱
گنج تپه	cd	۲۵/۱۱	cd	گنج تپه	۱۴/۴۲	cd	گنج تپه	۱۰/۶۸
چنار	de	۲۴/۴۲	de	چنار	۱۳/۹۳	cde	چنار	۱۰/۴۹
خواف	ef	۲۳/۶۵	ef	خواف	۱۳/۶۷	def	خواف	۹/۹۸
تویسرکان	fg	۲۷/۷۲	fg	تویسرکان	۱۳/۱۵	efg	حسام آباد	۹/۷۳
شاندیز	fg	۲۲/۶۵	fg	شاندیز	۱۳/۰۲	efg	شاندیز	۹/۶۴
حسام آباد	fg	۲۲/۵۰	g	لالجین	۱۲/۷۷	efg	تویسرکان	۹/۵۷
لالجین	g	۲۲/۰۶	g	حسام آباد	۱۲/۷۷	fgh	لالجین	۹/۲۹
ساری	h	۱۹/۸۷	h	قائنات	۱۱/۱۳	ghi	ساری	۸/۷۸
قائنات	hi	۱۹/۳۸	h	ساری	۱۱/۰۸	hij	قائنات	۸/۲۵
مریانج	hi	۱۹/۱۲	h	مریانج	۱۰/۹۸	ij	مریانج	۸/۱۴
طبس	ij	۱۸/۲۳	hi	بجنورد	۱۰/۳۵	ij	طبس	۷/۹۷
بندرانزلی	ij	۱۸/۱۰	i	طبس	۱۰/۲۶	ij	بندرانزلی	۷/۹۲
بجنورد	ij	۱۷/۹۱	i	بندرانزلی	۱۰/۱۸	ij	سمنان	۷/۸۵
سمنان	ij	۱۷/۸۳	i	سمنان	۹/۹۸	j	بجنورد	۷/۵۶
یزد	j	۱۷/۰۴	i	یزد	۹/۶۰	j	یزد	۷/۴۴

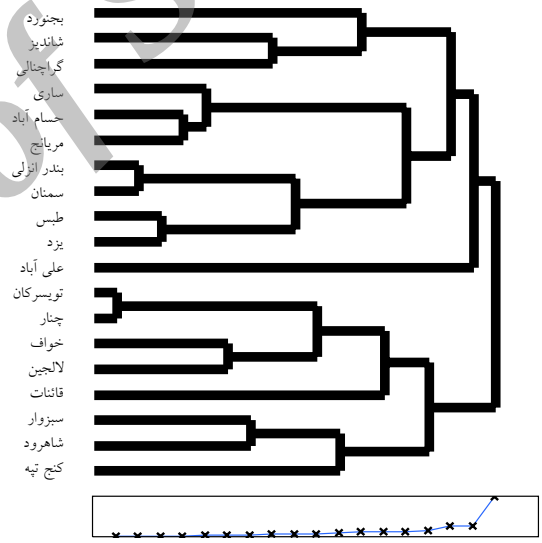
شاخص سانترومری ($STD_{(CI)}$) مهمترین و تاثیرگذارترین شاخص جهت مشخص نمودن تقارن سانترومری است. اکوتیپ علی‌آباد از نظر تقارن سانترومری، نسبت به سایر اکوتیپ‌ها متقارن‌تر و اکوتیپ گنج‌تپه نامتقارن‌ترین اکوتیپ است و سایر اکوتیپ‌ها بین این دو اکوتیپ قرار می‌گیرند. کلاستر اکوتیپ‌ها بر مبنای شاخص‌های تقارن انداره، اکوتیپ‌ها را به دو گروه متقارن و نامتقارن، از نظر اندازه طول کروموزوم‌ها تقسیم کرد (شکل۵)، در گروه اول این کلاستر ۱۱ اکوتیپ قرار گرفته‌اند که دارای تقارن اندازه می‌باشند و شامل بجنورد، ساری، بندرانزلی، سمنان، طبس، تویسرکان، حسام‌آباد، لالجین، قائنات، مریانج و یزد می‌باشند و گروه دوم با ۸ اکوتیپ عدم تقارن اندازه کروموزومی را نشان دادند.

در این کلاسترکمترین فاصله اقلیدسی بین اکوتیپ‌ها مربوط به دو اکوتیپ حسام‌آباد و تویسرکان بود. جهت دسته‌بندی اکوتیپ‌ها بر اساس کلاستر اکوتیپ‌ها بر مبنای تقارن اندازه، مشخص شد که شاخص انحراف معیار طول کروموزوم‌ها $STD_{(L+S)}$ مهمترین

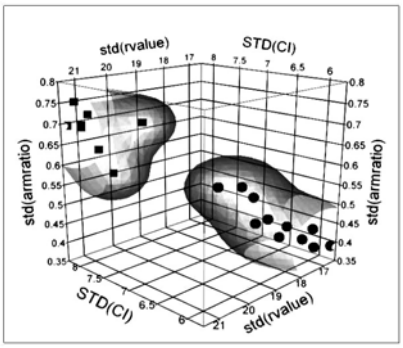
Archive of SID
www.SID.ir



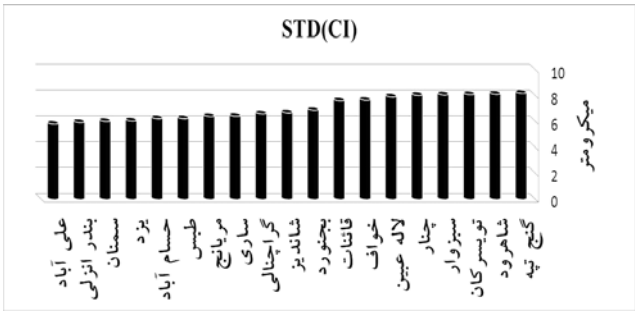
شکل۱- کلاستر بر مبنای کلیه شاخص‌های کاریوتایپی در اکوتیپ‌های سیر بومی ایران



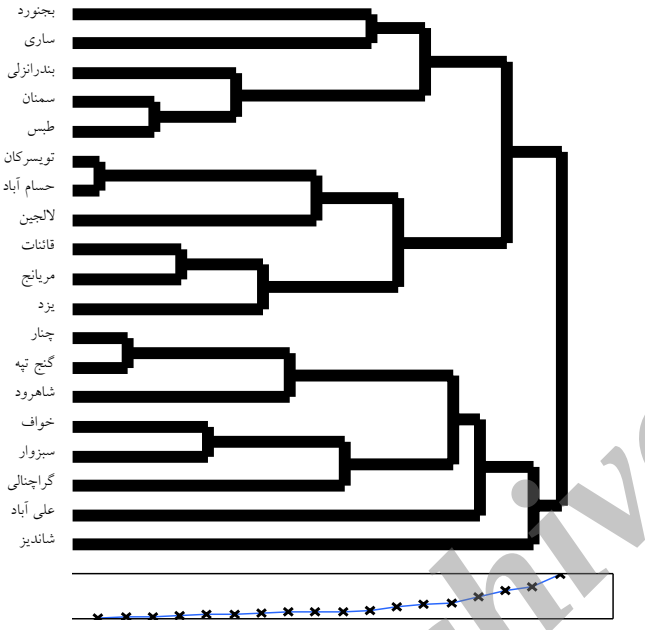
شکل۲- کلاستر اکوتیپ‌های سیر بومی ایران بر مبنای شاخص‌های تقارن سانترومری



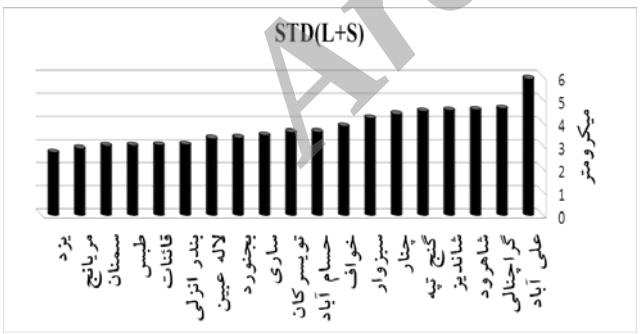
شکل۳- اسکاتر پلات سه بعدی بر اساس سه شاخص تقارن سانترومری در اکوتیپ‌های سیر بومی ایران



شکل ۴- نمودار مقایسه انحراف معیار شاخص سانترومری $STD_{(Ci)}$ بین ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران



شکل۵- کلاستر اکوتیپ‌های سیر بومی ایران، برمبنای شاخص‌های تقارن اندازه



شکل۶- نمودار مقایسه انحراف معیار طول کروموزوم $STD_{(L+S)}$ ، بین ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران

شاخص است (شکل۶). عکس سلول متافازی، کاریوگرام و آیدیوگرام هر اکوتیپ در شکل شماره ۷ آورده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه شکل ۷

شکل ۷- سلول متافازی، کاریوگرام و آیدیوگرام ۱۹ اکوتیپ سیر بومی ایران

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۷- میانگین برخی شاخص‌های کاریوتایپی، تعداد کروموزوم و فرمول کاریوتایپی

اکوتیپ	2n	STD (CI)	STD (L+S)	Rec	Ai	A2	A1	CI	STD (RL%)	TF%	Karyotype formula
بجنورد	14	6.90	3.35	76.28	3.11	0.19	0.27	41.50	1.17	42.19	10m4sm
ساری	16	6.42	3.46	77.63	2.64	0.17	0.20	43.69	1.09	44.27	12m+4sm
بندر انزلی	16	5.93	3.05	78.73	2.17	0.17	0.22	43.11	1.05	43.60	12m+4sm
تویسرکان	16	8.10	3.59	79.35	2.92	0.16	0.26	41.45	0.99	42.11	12m+2sm+2st
چنار	16	8.04	4.37	78.31	3.41	0.18	0.24	42.33	1.13	43.02	12m+2sm+2st
حسام آباد	16	6.23	3.60	79.20	2.34	0.16	0.24	42.55	1.00	43.08	12m+4sm
خواف	16	7.66	3.85	80.30	3.01	0.16	0.26	41.50	1.02	42.20	2M+10m+2sm+2st
سبزوار	16	8.08	4.20	80.22	3.29	0.17	0.26	41.72	1.04	42.35	12m+2sm+2st
سمنان	16	6.01	3.00	79.38	2.20	0.17	0.21	43.41	1.05	43.94	14m+2sm
شاندیز	16	6.69	4.54	74.41	3.11	0.20	0.25	41.85	1.25	42.37	12m+4sm
شاهرود	16	8.12	4.56	80.56	3.32	0.18	0.25	41.94	1.10	42.51	10m+4sm+2st
طبس	16	6.23	3.00	78.71	2.45	0.17	0.22	43.14	1.04	43.74	12m+4sm
علی آباد	16	5.80	5.91	79.54	2.03	0.17	0.20	43.81	1.05	44.16	14m+2sm
قائنات	16	7.61	3.03	80.72	2.67	0.16	0.25	41.99	0.97	42.51	12m+2sm+2st
گراچنالی	16	6.61	4.62	80.66	2.50	0.16	0.22	43.03	1.02	43.47	14m+2sm
گنج تپه	16	8.19	4.49	78.54	3.03	0.18	0.25	41.76	1.12	42.61	12m+2sm+2st
لالجین	16	7.91	3.32	80.84	2.94	0.15	0.27	41.45	0.94	42.12	10m+4sm+2st
مریانج	16	6.40	2.89	81.62	2.16	0.15	0.25	42.29	0.94	42.66	12m+4sm
یزد	16	6.05	2.71	80.31	2.28	0.16	0.22	43.25	1.00	43.64	14m+2sm

نتیجه‌گیری

مشخص شد به جز اکوتیپ بجنورد که تعداد کروموزوم آن ۲n=2X=۱۴ بود، کلیه اکوتیپ‌ها ۲n=2X=۱۶ کروموزومی بودند. این نتایج با مشاهدات محققین دیگر مطابقت داشت (Levan 1935; Mensinkai 1939; Cottes et al. 1983; Wajahatullah and Vahidy 1990). با این حال در برخی گزارش‌ها تعداد کروموزوم سیر ۱۸ یا ۱۲ معرفی شده است (Sharma and Bal 1959; Banerjee 1980; Etoh 1986). در این تحقیق کروموزوم‌های ۱ تا ۵ متاسانتریک و کروموزوم‌های ۶، ۷ و ۸ ساب‌متاسانتریک بودند در حالیکه در مطالعات کاریوتایپی سیر ترکیه مشخص شد کروموزوم شماره ۵ ساب‌متاسانتریک می‌باشد و بقیه کروموزوم‌ها متاسانتریک هستند. در صورتیکه Wajahatullah and Vahidy (1990) گزارش کردند کروموزوم-های یک و دو متاسانتریک هستند و بقیه کروموزوم‌ها ساب‌متاسانتریک هستند. کوچک‌ترین کروموزوم‌ها در اکوتیپ یزد با طول ۱۷/۰۴ و بزرگترین کروموزوم‌ها در اکوتیپ علی‌آباد با طول ۳۵/۳۳ میکرومتر مشاهده شد. در حالیکه در سیر ترکیه طول کروموزم‌های این گیاه از ۷/۳۲ تا ۱۲/۲۰ گزارش شده است (Yuzbasioglu and Unal 2004). در این تحقیق مشخص شد، متقارن‌ترین اکوتیپ یزد و نامتقارن‌ترین اکوتیپ خواف است. چنین به نظر می‌رسد اکوتیپ‌هایی که در نواحی گرمسیری رشد می‌کنند کروموزوم‌های کوچکتری بوده و از نظر تقارن سانترومری و تقارن اندازه در گروه متقارن جای می‌گیرند و در مراحل ابتدایی تکامل قرار دارند مانند اکوتیپ‌های یزد، طبس، سمنان و اکوتیپ‌هایی که در نواحی کوهستانی و سردسیر رشد می‌کنند دارای کروموزوم‌های بزرگتری بودند مانند اکوتیپ‌های علی‌آباد، گراچنالی، گنج‌تپه، چنار و از نظر تقارن اندازه کروموزومی در گروه نامتقارن جای می‌گیرند که نشان‌دهنده تکامل‌یافته‌تر بودن آنهاست. اکوتیپ‌های یزد، ساری، بندرانزلی، سمنان و طبس

Archive of SID
www.SID.ir

دارای تقارن سانترومری متاسانتریک و تقارن اندازه بودند، که نشان می‌دهد این اکوتیپ‌ها در مراحل ابتدایی تکامل قرار دارند. اکوتیپ‌های چنار، سبزوار، شاهرود، گنج‌تپه و خواف نسبت به سایر اکوتیپ‌ها دارای کاریوتایپ نامتقارن‌تری بودند و در درجه بالاتری از تکامل قرار می‌گیرند. اکوتیپ‌های تویسرکان، چنار، خواف، قائنات، سبزوار و گنج‌تپه دارای فرمول کاریوتایپی یکسانی بودند و همچنین دو اکوتیپ شاهرود و لالجین دارای فرمول کاریوتایپی یکسانی بودند و در گروه نامتقارن‌ترین اکوتیپ‌ها قرار گرفتند. علی‌آباد و گراچنالی با دارا بودن بیشترین میانگین شاخص‌های پایه، دارای تقارن سانترومری متاسانتریکی ولی فاقد تقارن اندازه بودند. پس از این دو، اکوتیپ‌های شاهرود، سبزوار، گنج‌تپه، چنار و خواف قرار دارند و هیچ‌گونه تقارنی را نشان ندادند. در تجزیه و تحلیل انجام شده، شاخص سانترومری (Ci) توانست دسته‌بندی بهتری را نسبت به جدول لوان برای نام‌گذاری نوع کروموزوم‌ها ایجاد کند و انحراف معیار شاخص‌ها، دسته‌بندی بهتری را برای تعیین نوع تقارن ایجاد کرد. شاخص‌های $STD_{(L+S)}$ و $STD_{(RL\%)}$ جهت مشخص کردن تقارن اندازه و شاخص $STD_{(Ci)}$ جهت تقارن سانترومری، بهترین شاخص و بعد از آن شاخص‌های $STD_{(d\text{-}value)}$ ، $STD_{(arm\text{-}ratio)}$ ، $STD_{(r\text{-}value)}$ پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی نویسندگان مقاله را از حوزه معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، جهت حمایت از این پایان‌نامه دانشجویی اعلام می‌داریم.

منابع

Alishah A, Omidi M (2008) Laboratory methods in plant cytogenetics. Tehran University Press. (InFarsi)

Baghalian K, Ziaee A, Naghavi M, Naghdibady HS (2004) Evaluation of garlic ecotypes Iranian culture allicin content and botanical characteristics. Medicinal Plant Journal 4 :50-59 (In Farsi).

Banerjee N (1980) Chromosome studies in some species of Allium. Proceeding Journal of Indian Science Congress 23: 35- 67.

Cortes F, Gonzalez G , Hazen MJ (1983) C-banding and sister chromatid exchanges inthree species of the genus Allium (*A. cepa, A. ascalonicum and A. sativum*). Journal of Caryologia 36:203-210.

Cortes F, Escalza P (1986) Analysis of different banding patterns and late replicating regions in chromosomes of *Allium cepa, A. sativum* and *A. nigrum*. Journal of Genetica 71: 39-46.

Farsi M, Ghabooli M, Mahmoodnia M (2011) Plant cytogenetics. Mashhad University Press, Mashhsd, Iran. (InFarsi)

Hesamzadeh M, Ziaei M (2006) Karyological study of some species of Trifolium genus Iran. Iranian Biology Journal 3:300-313.

Kumari G, Gunjan B, Krishna R (2010) Karyotype studies in dominant species of Aloe from eastern India. Center of Advanced Study in Botany, Banaras Hindu University, Varanasi- 221005, India. Journal of Caryologia 63: 41-49.

Levan A (1935) Cytological studies in Allium. The chromosome morphology of some diploid species of Allium. Hereditas 20:289-330.

Marlykynti H, Surendra KM, Satyawada R (2011) Karyological studies in ten species of Citrus(Linnaeus, 1753) (Rutaceae) of North-East India. Journal of Comparative Cytogenetics 4: 277-287.

Mauricio A, Loreto C, García N, Carlos M (2010) Karyotypic studies in the Chilean genus Placea (*Amaryllidaceae)*. Journal of Gayana Botanica 67: 198-205.

Mensinkai SW (1939) Cytogenetic studies in the genus Allium. Journal of Genetics 5:39-45.

Peruzzi L , Leitch IJ, Caparelli KF (2009) Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. Journal of Annals of Botany 103: 459-475.

SeifEl-Nasr H, GadEl-Hak K, Kasem Z, Ahmed Asmaa S (2011) Growth and Cytogenetical Properties of Micro-propagated and SuccessfullyAcclimatized Garlic (*Allium sativum L.*) Clones with a Modified Shoot Tip Culture Protocol. Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants 3: 115-129.

Stebbins GL (1971) Choromosomalevolutin in higher plant .Edward Arnold publisher LDT, London, 216pp.

Tatlnglu T, Wrick G (1989) Genetisch zuchterische unter suchung am schnittlavch (*Allium Schoenoprasumm* L.) Gartenbavwissens chaft 45-67.

Wajahatullah MK , Vahidy AA (1990) Karyotyping and localization of nucleolar organizer regions in Garlic, *Allium sativum L*. Journal of Cytologia 55: 501-504.

Yuzbasioglu D, Unal F (2004) Karyotiping, C-and Nor banding of *Allium Sativum* in turkey. Pakistan Journal of Botany 36: 343-349.

Archive of SID
www.SID.ir