

بررسی سیتوژنتیکی برخی از گونه‌های جنس شبدر (*Trifolium spp.*)، در استان آذربایجان شرقی

حمیده جوادی^۱ و سیدمحسن حسامزاده حجازی^۲

۱- مربی پژوهشی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، E-mail:javadi@rifr-ac.ir

۲- استادیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، E-mail:smhessamzadeh@rifr-ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۱۵

چکیده

گونه‌های جنس شبدر از لحاظ مورفولوژیکی و سیتوژنتیکی تنوع زیادی نشان می‌دهند. تنوع کاریوتیپی در ۱۱ گونه شبدر از منطقه شمال غرب کشور بر اساس شکل، تعداد و اندازه کروموزومها، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه کاریولوژی نمونه‌های نوک ریشه نشان داد که ۹ گونه با پایه کروموزومی ۸ و ۷ x دیپلوئید و ۲ گونه با پایه کروموزومی ۸ x تتراپلوئید می‌باشند. با اندازه‌گیری عاملهای A₁ (شاخص عدم تقارن درون کروموزومی)، A₂ (شاخص عدم تقارن بین کروموزومی)، TF% (درصد شکل کلی کاریوتیپ)، کلاس تقارن استینز (SC) و فرمول کاریوتیپی مشخص گردید که گونه‌های *T. pratense* و *T. canescens* دارای کاریوتیپ متقارن تری می‌باشند. تجزیه واریانس با طرح پایه کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای داده‌های حاصل از اندازه‌گیری هفت ویژگی کاریوتیپی (L, S, L/S, CI, DRL, TL, L+S) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در بین گونه‌ها در سطح ۱٪ بود. در مقایسه میانگین این هفت صفت نیز مشخص گردید که گونه *T. canescens* بیشترین طول بازوی کوتاه (S)، طول بازوی بلند (L) و طول کل کروموزوم (L+S) را دارد. بیشترین مقدار نسبت بازوها (L/S) در گونه *T. echinatum* بیشترین مقدار شاخص سانترومری (CI) در گونه *T. pratense* مشاهده گردید. همچنین بیشترین مقدار دامنه طول نسبی کروموزومها (DRL) در گونه *T. arvense* و بیشترین مقدار طول کل ژنوم (TL) مربوط به گونه *T. repens* و *T. ambiguum* بود. تجزیه خوشه‌ای گونه‌ها به روش Ward توانست کل گونه‌ها را در فاصله اقلیدسی ۲/۵۳ در چهار گروه قرار دهد. بیشترین فاصله اقلیدسی بین دو گونه *T. canescens* و *T. hybridum* و کمترین فاصله اقلیدسی بین دو گونه *T. phleoides* و *T. striatum* بود. بر این اساس، گونه‌هایی که در یک گروه قرار می‌گیرند، صفات کاریوتیپی مشابه داشته و در نتیجه می‌توانند در تلاقی‌های بین گونه‌ای استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: کاریوتیپ، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای و آنالیز تصویری.

مقدمه

یکی از بزرگترین جنسهای تیره بقولات (Fabaceae) بوده و از گیاهان علوفه‌ای و مرتعی با ارزش بشمار می‌رود (حسامزاده حجازی و ضیایی‌نسب، ۱۳۸۵). انتخاب گیاهان علوفه‌ای علاوه بر تأمین نیازهای غذایی

جنس شبدر (*Trifolium*) با حدود ۲۵۰ گونه علفی یکساله و چند ساله که در مناطق معتدله مرطوب مدیترانه‌ای و برخی قسمتهای سرد دنیا پیدا می‌شوند،

- ۱- شناسایی و تعیین گونه‌های موجود در منطقه شمال غرب کشور
- ۲- جمع‌آوری بذر و شناسایی دقیق آنها
- ۳- تعیین کاربوتیپ گونه‌ها، مطالعه شکل، اندازه و تعداد کروموزوم‌ها
- ۴- دسته‌بندی گونه‌ها از نظر تکامل کاربوتیپی
- ۵- تعیین گونه‌هایی که امکان تلاقی بین آنها میسر است.

مواد و روشها

به منظور بررسی تنوع کاربوتیپی در گونه‌های مختلف جنس شبدر مربوط به منطقه آذربایجان شرقی، ۱۱ گونه شبدر در مرکز تحقیقات کشاورزی استان آذربایجان شرقی مورد مطالعه سیتوژنتیکی قرار گرفت (جدول ۱). به این منظور، بذره‌های گونه‌ها پس از ضدعفونی کردن با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۵ درصد به مدت ۲ دقیقه، روی کاغذ صافی استریل داخل پتری‌دیش کشت و در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتیگراد (با ۲ درجه نوسان دمایی)، رطوبت ۷۰٪ و دوره نوری ۱۲ ساعت نگهداری شدند. پس از جوانه‌زدن، زمانی که طول ریشه به ۱/۵-۱ سانتیمتر رسید، نمونه‌گیری انجام شد و مراحل مختلف شامل پیش تیمار (با محلول ۰/۵٪ آلفا بر مونفتالین به مدت ۴ ساعت در یخچال)، تثبیت (با محلول لویتسکی: اسید کرومیک ۱٪ + فرمالین ۱۰٪ به حجم مساوی از هر کدام به مدت ۲۴ ساعت در یخچال)، هیدرولیز (با NaOH ۱ نرمال در داخل بن‌ماری ۶۰ درجه بمدت ۱۰-۸ دقیقه) و رنگ‌آمیزی (با همتاتوکسیلین بمدت ۴-۳ ساعت در دمای اتاق) روی ریشه‌ها اعمال شد. سپس اسلاید به روش اسکواش درون یک قطره اسید استیک ۴۵٪ تهیه گردید. اسلایدهای آماده شده با میکروسکوپ نوری BX50 و با لنز ۱۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. تصاویر

دام و انسان، نقش مهمی در حاصلخیزی و حفاظت خاک ایفا می‌کنند. از این رو، انتخاب گیاهان علوفه‌ای مرغوب باعث افزایش تولید، بالا رفتن عملکرد کمی و کیفی علوفه و کم شدن فشار روی مراتع گردیده و در نتیجه تولیدات دامی افزایش می‌یابد (حیدری شریف‌آباد و دری، ۱۳۸۰). در اصلاح ژنتیکی هر گونه گیاهی، داشتن اطلاعات کافی در خصوص سطح پلوئیدی و ویژگی‌های کاربوتیپی از مهمترین نیازهای اولیه اصلاحگران می‌باشد (کریمی، ۱۳۶۷). اطلاعات بدست آمده از مطالعات کروموزومی علاوه بر طبقه‌بندی گیاهان، در تعیین ارتباط بین گیاهان نیز کاربرد دارد (Skula & Mirsa, 1994; Stace, 1984). مطالعات کاربوتیپی انجام شده در جنس شبدر نشان می‌دهد که تعداد کروموزوم پایه در گونه‌های مختلف آن متفاوت است (۵، ۶، ۷، ۸) و حالت‌های پلی پلوئیدی را نیز نشان می‌دهند (Ansari et al., 1999). حتی در یک گونه نیز پایه‌های کروموزومی متفاوتی را گزارش نموده‌اند که این پدیده تنوع می‌تواند حاکی از فاکتورهای اکولوژیکی مربوط به محیط پیدایش آنها باشد (Issolah & Belguerfi, 1999). همچنین، کارهای انجام شده بر روی ۱۹ ژنوتیپ متعلق به ۱۰ گونه شبدر، پایه‌های کروموزومی متفاوت (۵، ۷ و ۸) را نشان داده است که این امر بیانگر تنوع بین گونه‌ها می‌باشد. گونه *T. repens* با $2n=4x=32$ تتراپلوئید و گونه *T. pratense* با $2n=2x=14$ دیپلوئید گزارش شده است (حسام‌زاده حجازی و ضیایی‌نسب، ۱۳۸۵). با توجه به تنوع بالای گونه‌های مختلف جنس شبدر از لحاظ تعداد کروموزوم پایه و خصوصیات سیتوژنتیکی؛ تحقیق حاضر جهت اهداف زیر انجام گرفته است.

کروموزومی با استفاده از دستگاه مانیتورینگ و با بزرگ‌نمایی $\times 2000$ تهیه شدند. برای هر گونه، ۵ صفحه متافازی (تکرار) در نظر گرفته شد. برای هر متافاز پس از تهیه کاریوتیپ در نرم افزار Photoshop، بازوهای کروموزوم‌ها و طول کل آنها با استفاده از نرم افزار MicroMeasure اندازه‌گیری و نهایتاً برای هر کاریوتیپ میانگین طول بازوی کوتاه، بازوی بلند و طول کل کروموزوم محاسبه شد. عامل‌های نسبت بازوها (Arm ratio: L/S) به روش لوان (Levan et al., 1964)، شاخص سانترومری ($CI=S/L+S$)، دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (طول نسبی کوتاهترین کروموزوم - طول نسبی بلندترین کروموزوم) ($DRL=\sum (L+S)$) و طول کل ژنوم ($TL=\sum (L+S)$) برای هر صفحه متافازی محاسبه و نهایتاً داده‌های بدست آمده از محاسبه هفت عامل کاریوتیپی (L, S, L/S, CI, L/S, S, L) آورده شد.

کلاس تقارن استبینز (SC) (Stebbins, 1971)، شاخص عدم تقارن درون کروموزومی (A_1) و بین کروموزومی (Romero & Zarco, 1980) (A_2)، شکل کلی کاریوتیپ (TF%) (Huziwara, 1962)، میزان کروماتین نسبی (تعداد کروموزوم‌ها/طول کل کروموزوم‌ها=VRC) و فرمول کاریوتیپی نیز برای هر گونه جداگانه محاسبه شد.

جدول ۱- گونه‌های مورد مطالعه شبدر

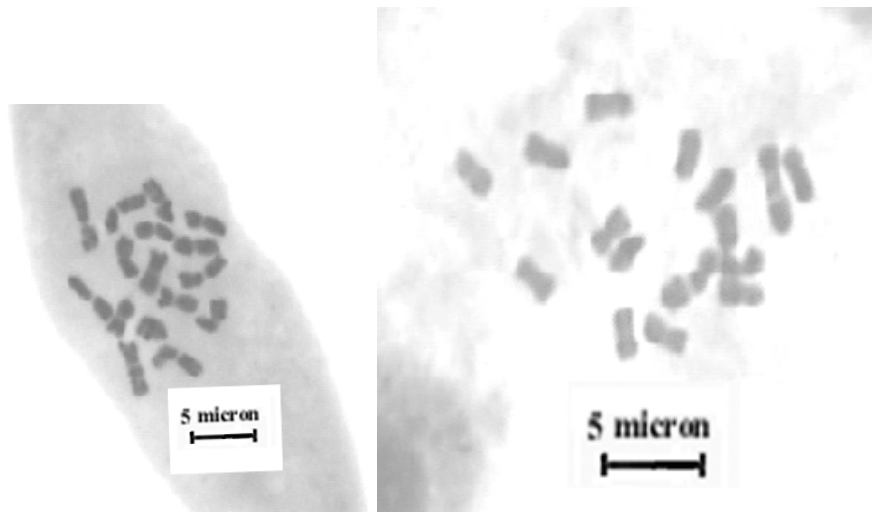
ردیف	گونه	محل جمع‌آوری	ارتفاع (متر)
۱	<i>T. canescens</i> Willd.	ارسباران - نرسیده به سه راهی عباس‌آباد	۱۲۰۰
۲	<i>T. hybridum</i> L.	کوه میشو - ورودی دره سیوان	۱۶۵۰
۳	<i>T. echinatum</i> M.B.	ارسباران - مسیر روستای وینه	۱۲۰۰
۴	<i>T. fragiferum</i> L.	کوه میشو - دره سیوان	۱۷۰۰
۵	<i>T. suffocatum</i> L.	ارسباران - نرسیده به سه راهی عباس‌آباد	۱۸۵۰
۶	<i>T. pratense</i> L.	کوه میشو - دره سیوان	۱۶۵۰
۷	<i>T. arvense</i> L.	ارسباران - نرسیده به سه راهی عباس‌آباد	۱۹۰۰
۸	<i>T. phleoides</i> P.W.	ارسباران - نرسیده به سه راهی عباس‌آباد	۱۸۵۰
۹	<i>T. striatum</i> L.	ارسباران - نرسیده به سه راهی عباس‌آباد	۱۸۵۰
۱۰	<i>T. ambiguum</i> M.B.	مشگین شهر - مراتع سیلان	۲۵۰۰
۱۱	<i>T. repens</i> L.	کوه میشو - دره سیوان	۱۶۵۰

نتایج

میتوزی گونه‌ها در شکل ۱ ارائه شده است.

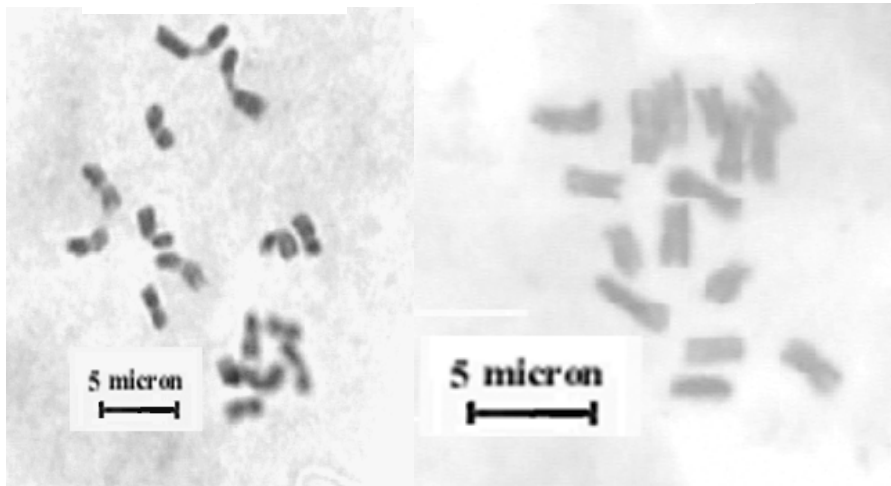
در این بررسی، مطالعه کاریولوژیکی بر اساس شکل،

اندازه و تعداد کروموزوم‌ها انجام گرفت. تصویر متافاز



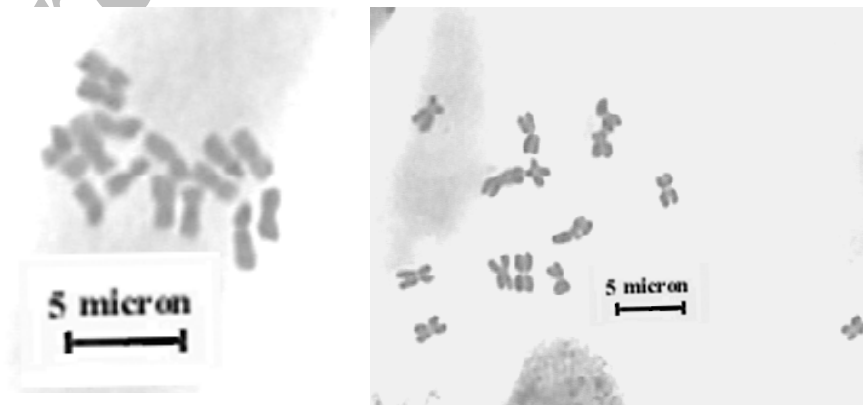
T. hybridum

T. canescens



T. echinatum

T. fragiferum

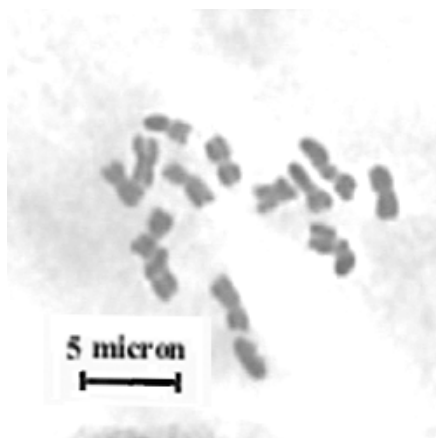


T. suffocatum

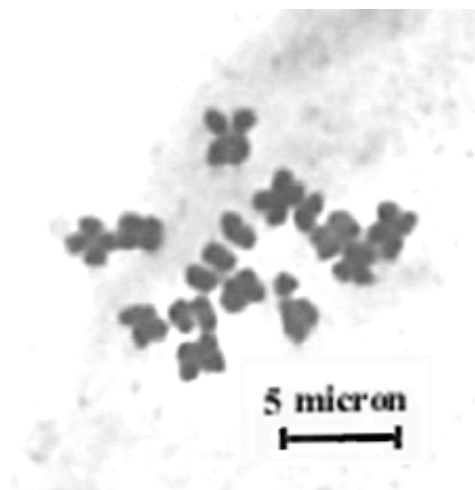
T. pratense

شکل ۱- تصاویر متافاز میتوزی در گونه‌های مورد مطالعه شبدر

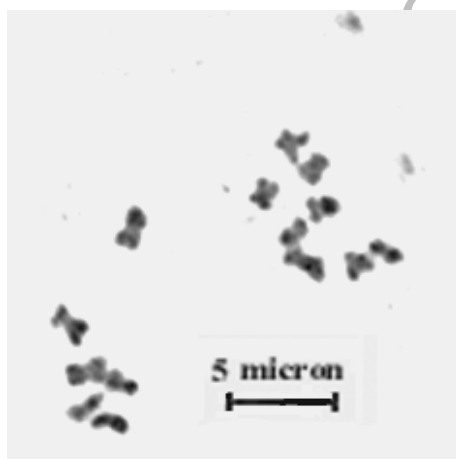
بررسی سیتوژنتیکی برخی از گونه‌های جنس شبدر...



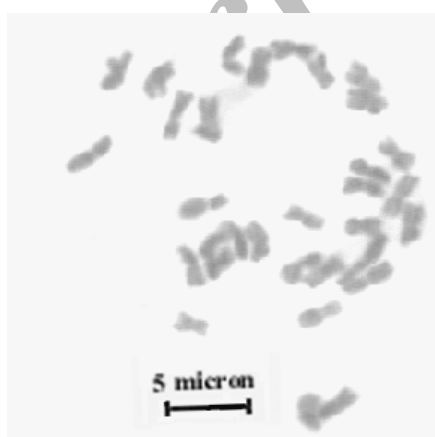
T. arvense



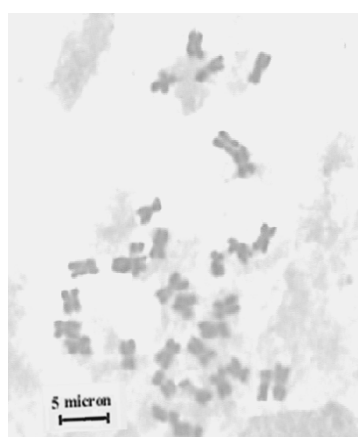
T. phleoides



T. striatum



T. ambiguum



T. repens

ادامه شکل ۱- تصاویر متافاز میتوزی در گونه‌های مورد مطالعه شبدر

در گونه‌های مورد مطالعه نه گونه با پایه کروموزومی تتراپلوئید بودند (جدول ۲).
 ۸ و $x=7$ دیپلوئید و دو گونه با پایه کروموزومی $x=8$

جدول ۲- تعداد کروموزوم پایه و سوماتیک، کلاس تقارن استینز (SC)، شاخص‌های عدم تقارن (A_1 و A_2)، درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%)، دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL)، میزان کروماتین نسبی (VRC) و فرمول کاریوتیپی در گونه‌های مورد مطالعه شبدر

گونه	دوره رویشی	2n	x	SC	A_1	A_2	TF%	DRL	VRC	فرمول کاریوتیپی
<i>T. canescens</i>	چند ساله	۱۶	۸	۱A	۰/۲۶۳۹	۰/۰۸۶۴	۳۹/۴۶۲۳	۴/۳۵	۳/۱۶۴۴	$7m+1Sm$
<i>T. hybridum</i>	چند ساله	۱۶	۸	۲A	۰/۴۴۷۳	۰/۱۴۷۹	۳۳/۱۷۷۸	۷/۴۷	۱/۹۸۸۹	$3m+5Sm$
<i>T. echinatum</i>	یک ساله	۱۶	۸	۲A	۰/۴۹۰۲	۰/۱۴۲۰	۳۲/۰۵۱۸	۵/۹۳	۲/۳۵۶۲	$7Sm+1St$
<i>T. fragiferum</i>	چند ساله	۱۶	۸	۱A	۰/۳۲۳۵	۰/۱۴۹۶	۳۷/۶۳۹۱	۶/۲۳	۲/۴۲۲۷	۸M
<i>T. suffocatum</i>	یک ساله	۱۶	۸	۱A	۰/۳۷۱۴	۰/۰۷۹۳	۳۶/۴۶۷۱	۳/۵۴	۱/۸۲۷۴	$5m+3Sm$
<i>T. pratense</i>	چند ساله	۱۴	۷	۱A	۰/۲۵۴۷	۰/۱۶۲۳	۳۹/۴۹۴۰	۷/۲۷	۲/۱۳۸۲	۷M
<i>T. arvense</i>	یک ساله	۱۴	۷	۱A	۰/۳۴۵۳	۰/۱۷۲۲	۳۷/۰۱۸۹	۸/۴۶	۲/۳۱۳۱	$6m+1Sm$
<i>T. phleoides</i>	یک ساله	۱۴	۷	۱A	۰/۳۱۱۹	۰/۱۳۳۲	۳۸/۳۷۹۳	۶/۴۸	۱/۹۵۳۶	۷M
<i>T. striatum</i>	یک ساله	۱۴	۷	۱A	۰/۳۱۱۳	۰/۱۲۵۷	۳۸/۰۱۴۳	۶/۳۰	۱/۶۸۴۸	۷M
<i>T. ambiguum</i>	چند ساله	۳۲	۸	۱A	۰/۳۶۰۶	۰/۰۷۹۸	۳۶/۵۴۱۸	۲/۰۷	۲/۱۱۵۲	$12m+4Sm$
<i>T. repens</i>	چند ساله	۳۲	۸	۱A	۰/۳۴۲۷	۰/۱۵۲۴	۳۷/۱۱۶۹	۴/۲۰	۲/۲۲۵۴	$12m+4Sm$

دلالته بر تنوع ژنتیکی کافی به منظور گزینش برای صفات مورد نظر است (جدول ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین این هفت ویژگی در جدول ۴ آورده شده است.

نتیجه تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری هفت ویژگی کاریوتیپی (L, S, L/S, CI, DRL, L+S) و نشان داد که در بین گونه‌ها از لحاظ این صفات (TL) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد که

جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی مورد مطالعه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		L+S	L	S	L/S	CI	DRL	TL
بین گونه‌ها	۱۰	۰/۷۶۹**	۰/۲۸۲**	۰/۱۴۳**	۰/۱۶۵**	۰/۰۰۴**	۱۸/۲۰**	۳۲۹/۰۱**
اشتباه آزمایشی	۴۴	۰/۱۲۵	۰/۰۵۴	۰/۰۱۳	۰/۰۳۲	۰/۰۰۱	۲/۱۱	۹/۰۶
CV%	-	۱۶/۰۸	۱۸/۵۴	۱۴/۰۸	۱۱/۵۵	۵/۶۳	۲۵/۶۲	۱۵/۰۶

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪

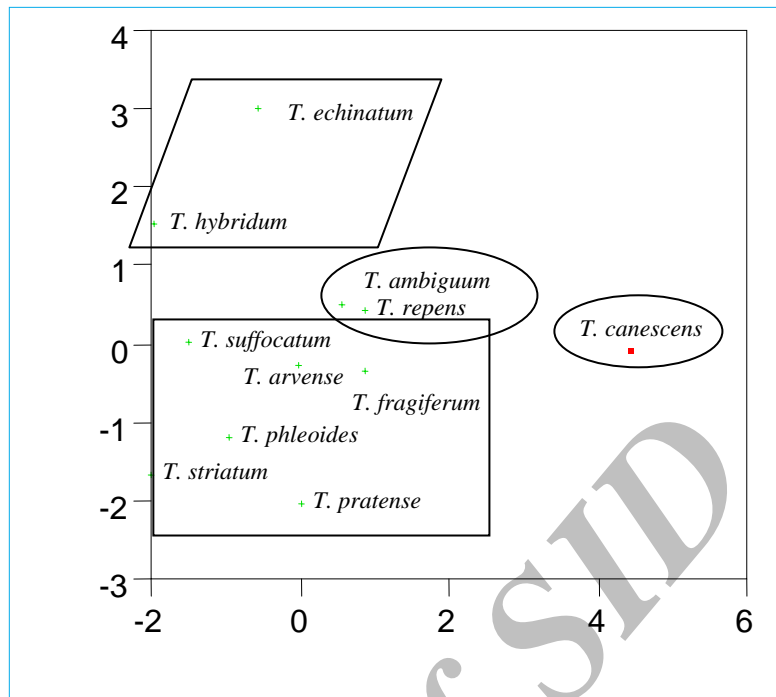
گونه	L+S	L	S	L/S	CI	DRL	TL
<i>T. canescens</i>	۳/۱۶۴ a	۱/۷۳۱ a	۱/۲۴۹ a	۱/۳۸۷ c	۰/۴۵ ab	۴/۳۵ cde	۲۵/۳۲ b
<i>T. hybridum</i>	۱/۹۸۹ bc	۱/۲۰۵ bc	۰/۶۶۰ c	۱/۸۳۸ ab	۰/۳۸ b	۷/۴۷ ab	۱۵/۹۱ cdef
<i>T. echinatum</i>	۲/۳۵۶ bc	۱/۵۰۹ ab	۰/۷۵۵ bc	۱/۹۴۵ a	۰/۳۷ b	۵/۹۳ bcd	۱۸/۸۵ cd
<i>T. fragiferum</i>	۲/۴۲۳ b	۱/۳۵۲ ab	۰/۹۱۲ b	۱/۴۸۹ c	۰/۴۳ abc	۶/۲۳ bc	۱۹/۳۸ c
<i>T. suffocatum</i>	۱/۸۲۷ bc	۱/۰۷۹ bc	۰/۶۶۶ c	۱/۶۱۲ bc	۰/۴۱ c	۳/۵۴ ef	۱۴/۶۲ def
<i>T. pratense</i>	۲/۱۳۸ bc	۱/۱۳۱ bc	۰/۸۴۴ bc	۱/۳۴۵ c	۰/۴۶ a	۷/۲۷ ab	۱۴/۹۷ def
<i>T. arvense</i>	۲/۳۱۳ bc	۱/۳۰۹ bc	۰/۸۵۶ bc	۱/۵۲۹ bc	۰/۴۲ bc	۸/۴۶ a	۱۶/۱۹ cde
<i>T. phleoides</i>	۱/۹۵۴ bc	۱/۰۹۲ bc	۰/۷۵۰ bc	۱/۴۶۳ c	۰/۴۴ abc	۶/۴۸ ab	۱۳/۶۸ ef
<i>T. striatum</i>	۱/۶۸۵ c	۰/۹۳۳ c	۰/۶۴۰ c	۱/۴۶۴ c	۰/۴۴ abc	۶/۳۰ bc	۱۱/۷۹ f
<i>T. ambiguum</i>	۲/۱۱۵ bc	۱/۲۲۰ bc	۰/۷۷۳ bc	۱/۵۸۲ bc	۰/۴۳ abc	۲/۰۷ f	۳۳/۸۴ a
<i>T. repens</i>	۲/۲۲۶ bc	۱/۲۶۸ bc	۰/۸۲۶ bc	۱/۵۳۳ bc	۰/۴۳ abc	۴/۲۰ de	۳۵/۶۱ a

براساس صفات کاریوتیپی، تجزیه خوشه‌ای به روش Ward انجام شد (شکل ۳). با برش دندروگرام در فاصله ژنتیکی ۲/۵۳ کل گونه‌ها در چهار گروه قرار گرفتند.

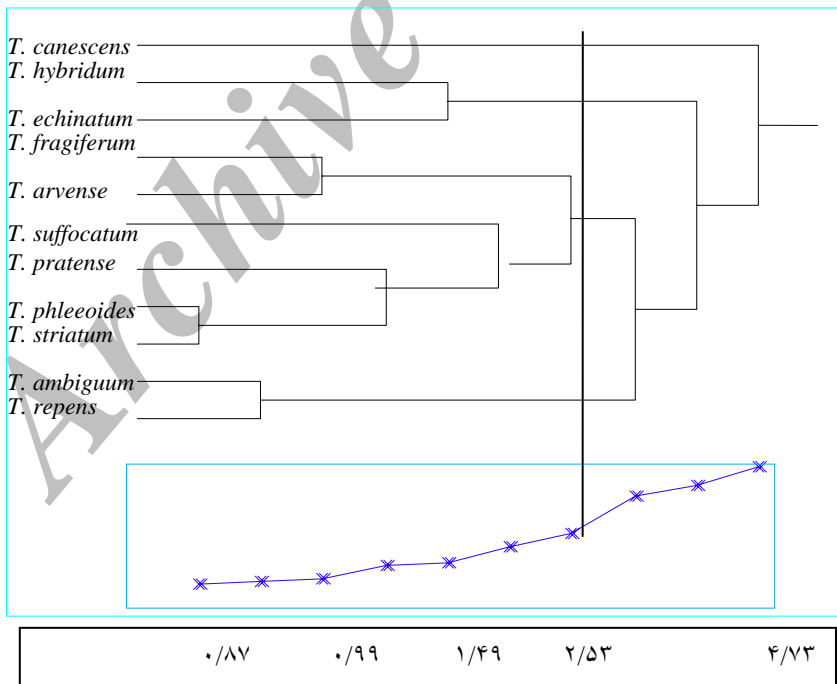
برای تعیین سهم هر یک از صفات کاریوتیپی مورد مطالعه در تنوع بین گونه‌ها، از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. نتایج آن در جدول ۵ و پلات مربوطه در شکل ۲ آورده شده است. همچنین برای گروه‌بندی گونه‌ها

جدول ۵- مقادیر ویژه، ضرایب بردارهای ویژه و درصد واریانس سه مؤلفه اصلی اول، دوم و سوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

مؤلفه سوم	مؤلفه دوم	مؤلفه اول	ویژگی کاریوتیپی
۰/۲۴۶	۰/۱۵۶	۰/۵۱۵	L+S
۰/۲۴۹	۰/۳۵۵	۰/۴۴۷	L
۰/۱۹۵	-۰/۰۵۵	۰/۵۳۶	S
۰/۰۶۱	۰/۶۳۲	-۰/۲۳۳	L/S
-۰/۰۱۰	-۰/۶۱۸	۰/۲۵۰	CI
۰/۷۲۴	-۰/۱۳۲	-۰/۱۷۹	DRL
-۰/۵۵۰	۰/۲۱۹	۰/۳۱۵	TL
۱/۴۲۵	۲/۰۳۴	۳/۲۵۹	ریشه‌های راکد
۲۰/۳۶۲	۲۹/۰۵۸	۴۶/۵۶۴	درصد واریانس
۹۵/۹۸۴	۷۵/۶۲۱	۴۶/۵۶۴	درصد واریانس تجمعی



شکل ۲- دیاگرام پراکنش گونه‌های شبدر براساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، در ویژگی‌های کاربوتیپی



شکل ۳- دیاگرام پراکنش گونه‌های شبدر حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward از نظر ویژگی‌های کاربوتیپی

بحث

وجود پایه‌های کروموزومی متفاوت دلیل بر تنوع بین گونه‌ها بوده و این موضوع قبلاً نیز به اثبات رسیده است (حسام‌زاده حجازی و ضیایی‌نسب، ۱۳۸۵). در گونه‌های دیپلوئید یک جفت و در تتراپلوئیدها دو جفت کروموزوم ماهواره‌دار مشاهده گردید که ماهواره بر روی بازوی کوتاه کروموزوم واقع بود. از نظر تیپ کروموزومی بیشتر گونه‌های مورد مطالعه دارای کروموزوم‌های متاسانتریک بوده و در جدول دو طرفه استیبیز در کلاس A قرار می‌گیرند. این موضوع نشان دهنده تقارن کاریوتیپی آنهاست، به‌استثناء گونه *T. hybridum* و *T. echinatum* که در کلاس ۲A واقع می‌شوند. این دو گونه بیشترین مقدار شاخص عدم تقارن درون کروموزومی (A_1) و نسبت بازوها (L/S)، همچنین کمترین مقدار $TF\%$ را بخود اختصاص دادند. بنابراین، همه موارد فوق نشان می‌دهند که کاریوتیپ در این دو گونه نسبت به سایر گونه‌ها نامتقارن است. فاکتورهای A_1 و $TF\%$ بعنوان عامل‌های متقارن بودن درون کروموزومی هستند که رابطه آنها با هم یک رابطه معکوس است. با توجه به این که در گونه‌های مورد مطالعه، این دو فاکتور رابطه معکوس نشان دادند، بنابراین با اندازه‌گیری یکی از دو عامل فوق، به میزان متقارن و نامتقارن بودن کروموزوم‌ها پی خواهیم برد (حسام‌زاده حجازی و ضیایی‌نسب، ۱۳۸۵). گونه‌های *T. pratense* و *T. canescens* با داشتن کمترین مقدار A_1 و $TF\%$ دارای کاریوتیپ متقارن بودند. بیشترین مقدار عدم تقارن بین کروموزومی (A_2) و اختلاف طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) در گونه *T. arvense* و کمترین مقدار این دو عامل در گونه *T. ambiguum* مشاهده شد (رابطه مستقیم A_2 با DRL). روند تغییرات دو عامل A_2

و DRL (معرف عامل‌های عدم تقارن بین کروموزومی) یک رابطه خطی و مستقیم است با توجه به این که در گونه‌های مورد بررسی این رابطه نیز مستقیم و خطی است، بنابراین اندازه‌گیری یکی از دو عامل فوق جهت تعیین تغییرات بین کروموزومی کفایت می‌کند.

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگینها، که در جدول ۴ آورده شده است، گونه *T. canescens* بیشترین طول کل، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه کروموزوم را بخود اختصاص داد و با سایر گونه‌ها اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد. گونه *T. echinatum* و *T. hybridum* بیشترین مقدار نسبت بازوها (L/S) و کمترین مقدار شاخص سانترومری (CI) را نشان دادند. در حالی که گونه *T. pratense* و *T. canescens* بیشترین مقدار CI و کمترین مقدار L/S را نشان دادند که این امر نیز بیانگر بالا بودن درجه تکاملی در دو گونه *T. echinatum* و *T. hybridum* نسبت به بقیه گونه‌هاست. بیشترین طول کل ژنوم (TL)، مربوط به دو گونه تتراپلوئید *T. repens* و *T. ambiguum* است و در بین دیپلوئیدها گونه *T. canescens* بعلت داشتن بیشترین طول کل کروموزوم، بیشترین طول ژنوم را نشان داد.

در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، بر اساس هفت صفت کاریوتیپی (L، S، L/S، CI، DRL و TL)، سه مؤلفه اول، دوم و سوم توانست بیش از ۹۵٪ از واریانس کل را توجیه کند. مقادیر بردارهای راکد براساس مؤلفه اول برای صفات طول کل کروموزوم (L+S)، طول بازوی بلند (L) و طول بازوی کوتاه (S)، بر اساس مؤلفه دوم برای صفات نسبت بازوها (L/S) و شاخص سانترومری (CI) و برای مؤلفه سوم، صفات اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) و طول کل ژنوم (TL) معنی‌دار بدست آمد.

بنابراین گزینش بر اساس اولین، دومین و سومین مؤلفه، منجر به گزینش گونه‌هایی خواهد شد که از لحاظ صفات یاد شده دارای اهمیت بالایی هستند.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت می‌کند. افرادی که در یک گروه قرار دارند از لحاظ ویژگی‌های کاربوتیپی بهم شبیهند. گونه *T. canescens* در کلاس جداگانه از بقیه گونه‌ها قرار می‌گیرد با توجه به مواردی که قبلاً یاد شد، تنها عاملی که سبب جدایی این گونه از بقیه گونه‌ها شده است، داشتن بیشترین طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و طول کل کروموزوم است و این سه صفت به‌عنوان صفات مهم در مؤلفه اصلی اول بودند. گونه *T. hybridum* و *T. echinatum* به‌دلیل داشتن بیشترین مقدار نسبت بازوها (L/S) و کمترین مقدار شاخص سانترومیری (CI) و در نتیجه، داشتن کاربوتیپ نامتقارن و تکامل یافته‌تر، از بقیه گونه‌ها جدا افتاده‌اند و دو گونه *T. ambiguum* و *T. repens* با توجه به تتراپلوئید بودن و داشتن بیشترین طول کل ژنوم در یک گروه هستند. بقیه گونه‌ها در یک کلاس جداگانه قرار می‌گیرند که در این گروه، گونه *T. suffocatum* و *T. fragiferum* با پایه‌های کروموزومی متفاوت با سایر افراد گروه، با داشتن شباهت در طول کل، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و نسبت بازوهای کروموزوم‌ها، با بقیه افراد در یک گروه واقع شده‌اند.

بنابراین گزینش بر اساس اولین، دومین و سومین مؤلفه، منجر به گزینش گونه‌هایی خواهد شد که از لحاظ صفات یاد شده دارای اهمیت بالایی هستند.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت می‌کند. افرادی که در یک گروه قرار دارند از لحاظ ویژگی‌های کاربوتیپی بهم شبیهند. گونه *T. canescens* در کلاس جداگانه از بقیه گونه‌ها قرار می‌گیرد با توجه به مواردی که قبلاً یاد شد، تنها عاملی که سبب جدایی این گونه از بقیه گونه‌ها شده است، داشتن بیشترین طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و طول کل کروموزوم است و این سه صفت به‌عنوان صفات مهم در مؤلفه اصلی اول بودند. گونه *T. hybridum* و *T. echinatum* به‌دلیل داشتن بیشترین مقدار نسبت بازوها (L/S) و کمترین مقدار شاخص سانترومیری (CI) و در نتیجه، داشتن کاربوتیپ نامتقارن و تکامل یافته‌تر، از بقیه گونه‌ها جدا افتاده‌اند و دو گونه *T. ambiguum* و *T. repens* با توجه به تتراپلوئید بودن و داشتن بیشترین طول کل ژنوم در یک گروه هستند. بقیه گونه‌ها در یک کلاس جداگانه قرار می‌گیرند که در این گروه، گونه *T. suffocatum* و *T. fragiferum* با پایه‌های کروموزومی متفاوت با سایر افراد گروه، با داشتن شباهت در طول کل، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و نسبت بازوهای کروموزوم‌ها، با بقیه افراد در یک گروه واقع شده‌اند.

بیشترین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *T. canescens* و *T. hybridum* و کمترین فاصله ژنتیکی بین دو گونه *T. striatum* و *T. phleoides* وجود دارد.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، PCA و مقادیر A_1 و $TF\%$ ، مشخص گردید که دو گونه

منابع مورد استفاده

- حسام‌زاده حجازی، س. م. و ضیایی‌نسب، م.، ۱۳۸۵. بررسی کاربوتیپی برخی از گونه‌های جنس شبدر موجود در بانک ژن منابع طبیعی ایران، مجله زیست‌شناسی ایران، ۱۹ (۳): ۳۱۳-۲۹۹.
- حیدری شریف‌آباد، ح. و دری، م. ع.، ۱۳۸۰. نباتات علوفه‌ای (نیامداران) جلد اول. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران.
- کریمی، هادی. ۱۳۶۷. زراعت و اصلاح گیاهان علوفه‌ای. انتشارات دانشگاه تهران.
- Ansari, H.A., Ellison, N.W., Reader, S.M., Badaeva, E.D., Bernd Friebe, T.E. Miller and Williams, W.D., 1999. Molecular Cytogenetic Organization of 5S and 18S-26S r DNA Loci in White Clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Annals of Botany*. 83:199-206.
- Huziwara, Y., 1962. Karyotype analysis in some genera of *compositae*. VIII. Further studies on the chromosome of *Aster*. *Amer. J. Bot.* 49: 112-116.
- Issolah, R. and Belguerfi, A., 1999. Chromosome number within some spontaneous population of 10 *Trifolium* species in Algeria. *Caryologia*. 52:151-154.
- Levan, A., Fredga and A. Sandberg, 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Romero, Zarco, C. 1980. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, 35: 526-630.
- Skula, P. and Misra, S. P., 1994. An introduction to taxonomy of angiosperms. VIKS publishing House Put LTD, New Delhi, 256 PP.
- Stace, C.A., 1984. Plant taxonomy and biosystematics. Pitman Press, Bath, 382 PP.
- Stebbins, G.L., 1971. Chromosome evolution in higher plants. Addison-Wesley, New York, USA.

A cytogenetic study of some species of *Trifolium* in Eastern Azarbayjan province

H. Javadi¹ and S.M. Hesamzadeh Hejazi²

1- Member of Scientific Board, Research Institute of Forests & Rangelands, E-mail:javadi@rifr-ac.ir

2-Assistant Professor, Research Institute of Forests & Rangelands, E-mail:smhessamzadeh@rifr-ac.ir

Abstract

The species of *Trifolium* differ from each other based on morphology and cytogenetic characters. For study of karyotype variation, 11 species of *Trifolium* were selected from North-West in Iran and karyological study was performed on number, size and type of chromosomes. Results of karyological studies in root tip samples showed that nine species were diploid with $x=7$ or 8 and two species were tetraploid with $x=8$. Based on A_1 , A_2 , TF%, SC and formula of karyotype *T. pratense* and *T. canescens* had much symmetrical karyotype. Analysis of variance for seven karyotype characters (L, S, L/S, CI, DRL, L+S, and TL) based on randomized complete design with five replications was performed. The results showed significant differences between the species ($p<0.1$). *T. canescens* had the highest total length (L+S), long (L) and short arm characters. For arm ratio (L/S) trait, *T. hybridum* had the highest and for CI *T. pratense* showed the highest average values. Also the highest DRL value was, obtained in *T. arvense* and the highest TL value was obtained in *T. ambiguum* and *T. repens*. Cluster analysis divided the species into 4 groups. The highest metric distance was obtained between *T. canescens* and *T. hybridum*, and lowest metric distance values were obtained between *T. phleoides* and *T. striatum*. The species which located in same group have similar karyotype, so they can be used in interspecific crossing.

Keywords: Cluster analysis, principal components analysis and image analysis