مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۷۱۷-۷۰۷)

تجزیه و تحلیل سیتوژنتیکی چند گونه اسپرس (*Onobrychis* spp.) از منطقه مرکزی ایران

محمدمهدی مجیدی[۱]* و ابوالقاسم اکبریان[۲]
۱، ۲، استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۱ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۹)

چکیده

جنس اسپرس دارای گونه‌های مرتعی و زراعی متعددی در ایران است که به شرایط متنوع آب و هوایی کشور، سازگار شده‌اند. در این تحقیق تعداد ۷ نمونه اسپرس به‌همراه یک نمونه یونجه یکساله (جهت مقایسه)، به‌منظور تجزیه و تحلیل کاریوتیپی مورد بررسی قرارگرفت. با مطالعه کروموزوم‌های متافازی مریستم ریشه روی نمونه‌ها، کاریوتیپ و آیدیوگرام آنها ترسیم گردید. نتایج نشان داد که گونه‌های *O. melanotricha* (سمیرم)، *O. melanotricha* (فریدن) به همراه دو گونه زراعی *O. sativa* (اراک و بروجن)، با ۲n=۲۸ کروموزوم و گونه *O. sativa* (نجف‌آباد) با ۲n=۳۲ کروموزوم تتراپلوئید بوده و سایر گونه‌ها با ۲n=۱۴ کروموزوم، دیپلوئید می‌باشند، همچنین در جنس اسپرس دو عدد پایه ۷ و ۸ مشاهده گردید. بررسی تقارن بین کروموزومی به روش استیبنز نشان داد که گونه‌های *O. melanotricha* (سمیرم)، *O. melanotricha* (فریدن) و *O. sativa* (نجف‌آباد) در کلاس B (عدم تقارن) و سایر گونه‌ها در کلاس A (دارای تقارن) قرار گرفتند. تجزیه واریانس براساس صفات کروموزومی، بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گونه‌ها از لحاظ اغلب صفات بود. در تجزیه خوشه‌ای برمبنای صفات کاریوتیپی، گونه‌ها براساس نوع و سطح پلوییدی در سه گروه متمایز قرار گرفته و کمترین فاصله بین دو گونه *O. melanotrich* (سمیرم) و *O. melanotricha* (فریدن) و بیشترین فاصله بین *O. melanotricha* (فریدن) و *O. sativa* (بروجن) مشاهده شد. بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، دو مؤلفه اول و دوم در مجموع بیش از ۸۵ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند به‌طوری‌که مؤلفه اول بر خصوصیات مرتبط با اندازه کروموزوم‌ها و مؤلفه دوم بر موقعیت سانترومر تأکید داشت.

واژه‌های کلیدی: **اسپرس، تجزیه خوشه‌ای، تقارن کروموزومی، کاریوتیپ، مؤلفه‌های اصلی.**

مقدمه

جنس اسپرس با نام علمی *Onobrychis* از خانواده *Fabaceae*، دارای گونه‌های یک‌ساله و چندساله است که بین آنها از نظر مورفولوژی وکاریولوژی تنوع وجود دارد (Hesamzadeh Hejazi & Ziaei Nasab, 2009). اسپرس از گیاهان با ارزش مرتعی و علوفه‌ای می‌باشد که در ایران نیز تنوع قابل ملاحظه‌ای دارد. این گیاه دارای دو زیرجنس است که در فلات ایران زیرجنس *Onobrychis* دارای ۲۹ گونه و زیرجنس *Sisyrosema* دارای ۴۸ گونه می‌باشد. این گونه‌ها با شرایط متنوع آب

* نویسنده مسئول: محمد مهدی مجیدی تلفن: ۰۹۱۳- ۳۰۶۱۱۷۲ E-mail: majidi@cc.iut.ac.ir

و هوایی ایران، سازگار شده و از ذخایر ارزشمند ژنتیکی در تحقیقات به‌نژادی محسوب می‌شوند(Karimi, 1997). بیشتر گونه‌های جنس اسپرس در نواحی شمال‌غربی آسیا از جمله در دو کشور ایران و ترکیه گسترش یافته است که این نواحی را به‌عنوان مرکز اصلی تنوع ژنتیکی این جنس معرفی می‌کنند (Irfan et al., 2007). اسپرس از نظر تولید علوفه زراعی و مرتعی در کشور ما حائز اهمیت می‌باشد، این گیاه اولین لگوم دائمی است که در بهار شروع به رشد مجدد می‌کند و به‌طورکلی رشد آن در اوائل بهار و اواخر پاییز بیشتر از یونجه است، از این‌رو کشت اسپرس در مناطق سرد کاربرد بیشتری دارد (Omidi, 1988). این گیاه از لحاظ زراعی دارای ویژگی‌های با ارزشی از جمله داشتن ریشه اصلی عمیق می‌باشد که مقاومت بسیار زیادی به خشکی در گیاه ایجاد می‌کند و در بهبود حاصلخیزی خاک نیز تأثیر بسزایی دارد (Elena, 2006).

مطالعه کاریوتیپ گونه‌های مختلف از گام‌های نخستین، اما اساسی در تحقیقات سیتوژنتیک به شمار می‌آید که به منظور طبقه‌بندی گیاهان، تأیید داده‌های سیستماتیک و کمک به حل مشکلات تاکسونومی کلاسیک از اوایل قرن گذشته مطرح و به‌تدریج به اهمیت آنها پی برده شد، به‌طوری که بعدها برای تعیین روابط خویشاوندی بین گونه‌های یک جنس نه تنها تعداد کروموزوم‌ها بلکه اطلاعاتی نظیر اندازه، مورفولوژی، محل سانترومر و رفتارکروموزوم‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت (Hatami & Nasirzadeh, 2008; Stebbins, 1971). اطلاعات سیتوژنتیکی اساس بسیاری از تحقیقات اصلاحی و ژنتیکی را تشکیل می‌دهد، به‌عنوان مثال به‌نژادگر گیاهی با مطالعه سیتوژنتیکی گونه‌ها می‌تواند تصمیم بگیرد که در یک برنامه تلاقی بین‌گونه‌ای، از کدام یک از گونه‌ها استفاده نماید تا نتاج بارور تولید کند (Oladzad, 2008). به نژادگران با استفاده از اطلاعات و دستورزی‌های سیتوژنتیکی قادر خواهند بود مواد اصلاحی را طبقه‌بندی نموده و به طراحی برنامه‌های اصلاحی نظیر نقشه‌یابی ژنها با استفاده از پایه‌های سیتوژنتیکی، القای تنوع ژنتیکی (جهش) و ترکیب مواد (دورگ‌گیری و نوترکیبی) بپردازند (Belay & Tesemma, 1997).

مطالعات در زمینه سیتوژنتیک اسپرس اندک و پراکنده بوده و عمدتاً به بررسی برخی گونه‌های منطقه‌ای پرداخته شده است. اولین مطالعه کروموزومی اسپرس در سال ۱۹۶۱ روی گونه *O. crista-galli* از جنوب شرقی مدیترانه صورت گرفت که عدد کروموزومی آن ۱۴ بود (Darlington & Wylie, 1961). بعدها مطالعات سیتولوژی در گونه *O. cornata* نشان داد که این گونه دیپلوییدبوده و تعداد کروموزوم‌های آن ۱۴ می‌باشد (Goldblat & Johnson, 1995). انصاری در مطالعه سیتوژنتیکی روی ۱۰ گونه اسپرس، اعلام نمود که زیرگونه subsp *teheranica* دیپلوئید با ۲n=۲x=۱۶ و زیرگونه subs *psammophila* تتراپلوئید با ۲n=۴x=۳۲ می‌باشند (Ansari-Asl, 2001). شمارش و بررسی کروموزومی بر روی۶ گونه مختلف اسپرس نشان‌دهنده عدد پایه کروموزومی x=۷ و x=۸ بود و این جنس دارای تیپ کروموزومی متاسانتریک تا ساب متاسانتریک و دامنه طول کروموزومی ۱/۶ تا ۲/۶ میکرومتر بود (Abou-EL-Enain, 2002). بررسی‌های دیگر نشان می دهد که گونه‌های *O. radiata*، *O. bobrovii*، *O. majorovii* و *O. vassilzenko* دیپلوئید و دارای ۱۴ کروموزوم می‌باشند (Magulaev, 1996). همچنین بررسی‌های صورت گرفته در گونه *O. altissima* نشان داد این گونه با پایه کروموزومی x =۷ تتراپلوئید می‌باشد (Ornduff,1966).

اسپرس به لحاظ تولید علوفه در بسیاری از نقاط کشور دارای اهمیت می‌باشد؛ با این وجود برخی خصوصیات نامطلوب نظیر دیرزیستی ناکافی و حساسیت به سفیدک سطحی مانع از توسعه کشت‌کار و رقابت آن با سایر لگومهای علوفه‌ای مرسوم می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که برخی از گونه‌های وحشی اسپرس دارای ویژگی‌های خاصی از نظر مقاومت به بیماری‌ها می‌باشند که از این لحاظ درون گونه زراعی تنوع کافی وجود ندارد (Majidi & Arzani, 2004). بنابراین تلاقی بین‌گونه‌ای می‌تواند منجر به ایجاد تنوع کافی از نظر این صفات گردیده و راه برای انتخاب ارقام مقاومت‌تر و پرمحصول‌تر فراهم آورد. بر این اساس مطالعه سیتوژنتیکی گونه‌های وحشی متداول منطقه و مقاوم به بیماری‌ها و تعیین قرابت سیتوژنتیکی آنها با گونه‌های

اهلی، اولین گام برای نیل به این هدف اصلاحی می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی سیتوژنتیکی برخی گونه‌های زراعی و وحشی جنس *Onobrychis*، تهیه کاریوتیپ، تجزیه و تحلیل خصوصیات کروموزومی و تعیین قرابت گونه‌ها اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جوانه‌دار کردن بذور

بذور هفت نمونه مورد بررسی مستقیما توسط خود نگارندگان در سال ۱۳۸۷ از طریق دانشگاه صنعتی اصفهان جمع‌آوری گردید و توسط اساتید و متخصصین گیاهشناسی دانشکده کشاورزی شناسایی گردید. جدول ۱ اسامی گونه‌ها و محل جمع‌آوری آنها را نشان می‌دهد.

جدول ۱- فهرست گونه‌های اسپرس و محل جمع‌آوری آنها برای مطالعه سیتوژنتیکی

ردیف	نام گونه	محل جمع‌آوری
۱	*O. sativa*	اراک
۲	*O. sativa*	بروجن
۳	*O. melanotricha*	فریدن
۴	*O. melanotricha*	سمیرم
۵	*O. sintenisii*	سمیرم
۶	*O. sintenisii*	فریدن
۷	*O. sativa*	نجف‌آباد

جوانه‌زنی طبق تعریف انجمن متخصصین رسمی تجزیه بذر[1] عبارت از توانایی بذر جهت تولید یک گیاه طبیعی در شرایط مساعد می‌باشد (Gonzlez-Benito et al., 2004). برای انجام آزمایش جوانه‌زنی، ابتدا دو لایه کاغذ صافی که با حرارت استریل شده‌اند را داخل ظروف پتری که قبلاً به مدت ۱۰ ساعت در درجه حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد ضدعفونی شده بودند، قرار داده شدند. بذور را با استفاده از هیپوکلریت سدیم (مایع سفیدکننده) یک درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی کرده و بعد از شستشو با آب مقطر، تعداد ۴۰ بذر روی کاغذ واتمن کاشته و با اضافه کردن مقدار کافی آب مقطر، به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و پس از اینکه طول ریشه‌چه‌ها به اندازه ۱ تا ۲ سانتی‌متر (۲ الی ۳ روز بسته به گونه) رسید برای تهیه نمونه کروموزومی استفاده گردیدند.

1. Association of Official Seed Analysis

تهیه نمونه کروموزوم

اساس روش کار در این پژوهش بر مبنای روش سوم Agayev (1996) با تغیراتی برای بهینه سازی در مورد اسپرس بود که به شرح زیر می‌باشد. نمونه‌ها ساعت ۸ صبح از انکوباتور خارج شده و در شرایط محیط آزمایشگاه قرار گرفتند و حدود ساعت ۱۱-۱۰ صبح در محلول پیش تیمار قرار داده شدند. به منظور پیش‌تیمار، از محلول ۱ درصد آلفا برمونفتالین استفاده شد به طوری که بلافاصله پس از تهیه محلول کاری، بذور جوانه زده را در محلول قرار داده و به مدت ۴-۶ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس، بذور به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با آب مقطر شستشو و وارد مرحله تثبیت گردید. در مرحله تثبیت، از محلول لیویتسکی[2] (مخلوط اسید کروم ۱٪ و فرمالدئید ۱۰٪ به نسبت ۱:۱) استفاده گردید. این محلول بصورت تازه آماده و در لوله‌های آزمایش ۲۰ میلی‌متر تا ارتفاع ۱/۵ سانتی‌متری دهانه لوله ریخته شد و بذور در داخل آن قرار گرفت آنگاه به مدت ۳۶ ساعت در دمای یخچال به صورت مورب (برای تماس بیشتر) نگهداری گردید. پس از این مدت بذور به مدت ۳ ساعت با آب شهر شستشو داده شد. برای اینکه بتوان نمونه‌ها را به مدت طولانی‌تری نگهداری نمود تا در فرصت مناسبی مطالعه شوند پس از انجام مرحله تثبیت و شستشو، نمونه‌ها در اتانول ۷۰٪ و در حرارت ۳ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری گردید. هنگام مطالعه نمونه‌ها، پس از خارج کردن از الکل، به مدت ۱۵ دقیقه بذور با آب مقطر شستشو و سپس ریشه‌ها از بذور جدا گردید. در مرحله هیدرولیز، از اسید کلریدریک یک نرمال به مدت ۸ تا ۱۲دقیقه در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد در داخل بن‌ماری استفاده شد. بلافاصله پس از هیدرولیز، ریشه‌ها ۳۰ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شد. در مرحله رنگ‌آمیزی از استوکارمن هماتوکسیلین به مدت ۱۵ ساعت استفاده گردید و پس از اسکواش اقدام به تهیه نمونه میکروسکوپی شد.

2. liewitsky

مطالعات میکروسکوپی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از مشاهده سلولهای متافازی مناسب، از هر گونه ۱۰ سلول متافازی مناسب انتخاب و از آنها عکس گرفته شد. در ادامه ابتدا تعداد کروموزوم‌های هرگونه شمارش و کاریوتیپ آنها با استفاده از نرم‌افزار Micromeasure تهیه شد و سپس خصوصیات کاریوتیپی از قبیل درصد شکل کلی کاریوتیپ (%TF)[1]، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت بازوی بلند به کوتاه، طول نسبی و درصد شکل کروموزوم‌ها[2] یا شاخص سانترومری (CI)[3] که بیانگر نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم است، و پارامتر اختلاف درصد طول نسبی بزرگترین و کوچک‌ترین کروموزوم (DRL) برای هر گونه محاسبه گردید. با استفاده از اطلاعات فوق سطح پلوییدی هر گونه مشخص وکاریوتیپ آن به صورت آیدیوگرم رسم گردید. مقایسه کاریوتیپ گونه‌ها با استفاده از جدول دو طرفه Stebbins (1971) و فرمول کاریوتیپی گونه‌ها توسط روش .Levan et al (1964) مشخص گردید. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جهت شناسایی تعدادی از مؤلفه‌ها که بخش قابل توجهی از تنوع را توجیه کند، به کار گرفته شد (Johnson & Wichern, 2001). برای گروه‌بندی گونه‌ها و نمونه‌های مختلف از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA استفاده شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح بلوک های کامل تصادفی با تکرار نامتعادل (بین ۱۰ تا ۱۵ نمونه در هر نمونه) و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute, 2001) و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گردید.

1. Total form percentage
2. Form percentage
3. Centromer Index

نتایج

تصاویر صفحه متافازی به همراه کاریوگرام گونه‌های مورد بررسی در شکل ۱ و آیدیوگرام مربوط به آنها در شکل ۲ ارائه شده است. مقایسه میانگین ویژگی‌های کاریوتیپی گونه‌ها نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. بر این اساس از لحاظ تعدادکروموزوم پایه بین گونه‌ها، عدد پایه کروموزومی ۷ و ۸ مشاهده شد به طوری‌که گونه *Onobrychis sintenisii* (سمیرم و فریدن)، با ۲n=۱۴ کروموزوم، دیپلوئید بوده و گونه‌های *O. melanotricha* (سمیرم و فریدن) و *O. sativa* (اراک و بروجن)، با ۲n=۲۸ کروموزوم و گونه *O. sativa* (نجف‌آباد) با ۲n=۳۲ کروموزوم، تتراپلوئید می‌باشند.

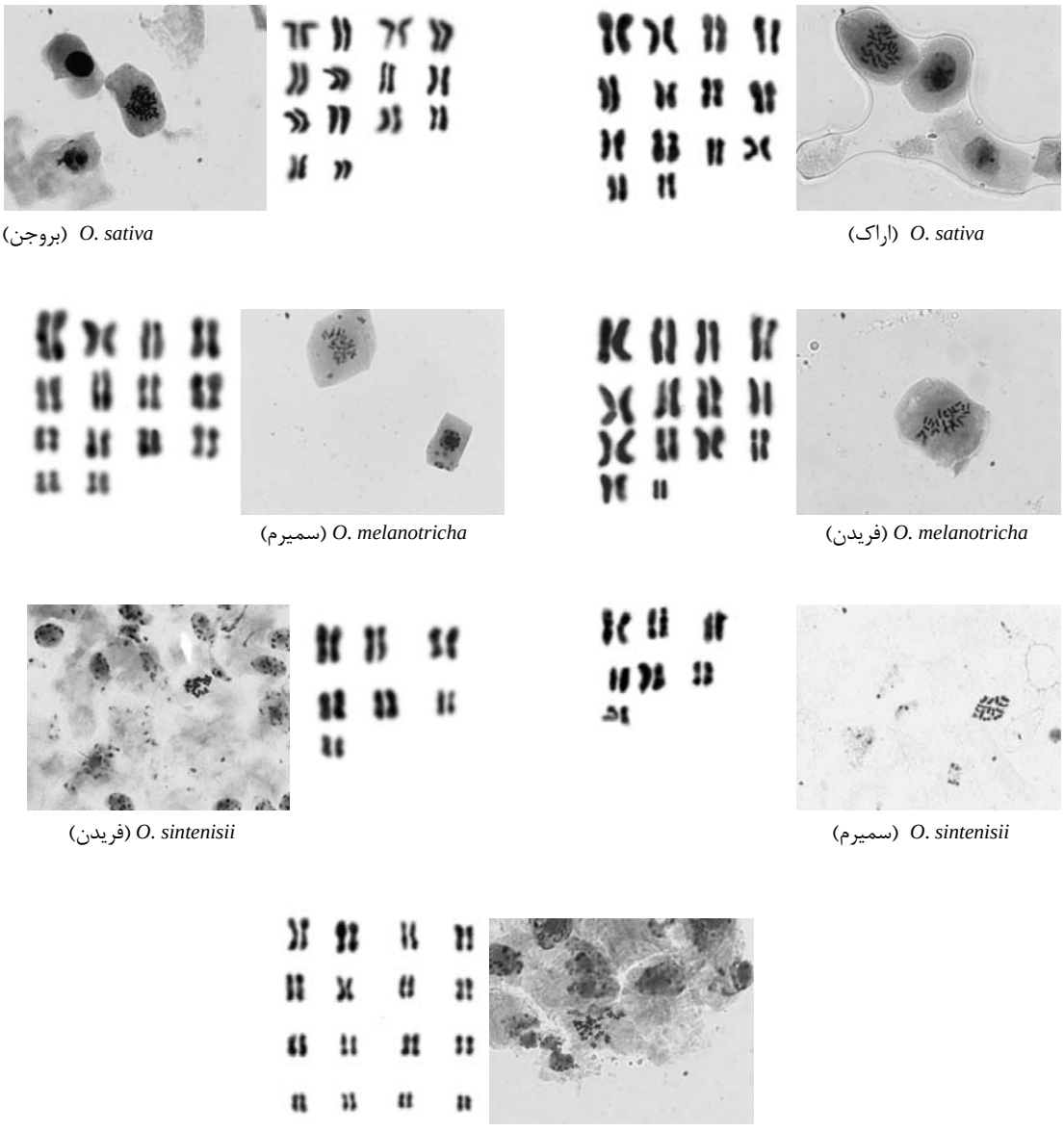
نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات کاریوتیپی (جدول ۲)، نشان داد که بین گونه‌ها از لحاظ اغلب صفات اندازه‌گیری شده در سطح ۱٪ و از لحاظ نسبت بازوها و شاخص سانترومری در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد که این امر بیانگر وجود تنوع قابل ملاحظه در ویژگی‌های کروموزومی گونه‌های مورد بررسی می‌باشد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، صفات طول کل کروموزوم، طول بازوی کوتاه و طول بازوی بلند دو نمونه از گونه *O. sativa* (اراک و بروجن) دارای بیشترین و *O. sintenisii* (سمیرم) دارای کمترین مقادیر بودند و لذا در گروه‌های جداگانه و دور از هم قرار گرفتند (جدول ۳). از نظر نسبت بازوها، دو نمونه از گونه *O. melanotricha* (سمیرم و فریدن) در مقایسه با سایر گونه‌ها از مقادیر بیشتری برخوردار بودند و این امر بیانگر عدم تقارن درون کروموزومی دراین گونه می‌باشد. نتایج تجزیه کاریوتیپی هر یک از گونه‌ها به صورت جداگانه توضیح داده می‌شود (جداول مربوطه نشان داده نشده است).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی اندازه‌گیری شده در گونه‌های اسپرس مورد مطالعه

منابع تغییرات	درجه آزادی	صفات کاریوتیپی					
		TL	RLC	LA	SA	AR	CI
ژنوتیپ	۶	۴/۱۳**	۱۱۶/۴۹**	۱/۵۹**	۰/۹۶**	۰/۰۵*	۰/۰۰۲*
اشتباه	۷۸	۰/۳۷	۳/۴۶	۰/۱۱	۰/۰۸	۰/۰۲	۰/۰۰۰۷
ضریب تغییرات		۱۹/۵۶	۲۱/۸	۲۱/۱۲	۲۰/۵۸	۱۱/۶	۶/۱۷

* و ** به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

TL: طول کل کروموزوم، RLC: درصد طول نسبی کروموزوم، LA: طول بازوی بلند، SA: طول بازوی کوتاه،AR: نسبت بازوها (نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه)، CI: شاخص سانترومری (نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم).



O. sativa (اراک) *O. sativa* (بروجن)

O. melanotricha (فریدن) *O. melanotricha* (سمیرم)

O. sintenisii (سمیرم) *O. sintenisii* (فریدن)

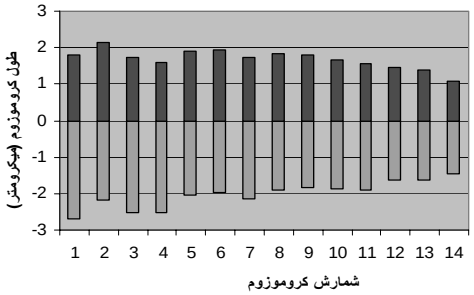
O. sativa (نجف‌آباد)

شکل ۱- متافاز میتوزی به همراه کاریوگرام گونه‌های اسپرس مورد مطالعه

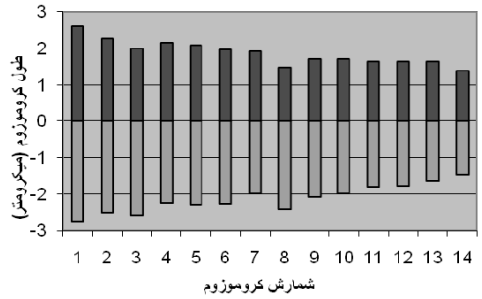
جدول۳- مقایسه میانگین ویژگی‌های کاریوتیپی درگونه‌های اسپرس مورد بررسی

گونه	منشاء	خصوصیات کاریوتیپی†				
		TL	LA	SA	AR	CI
O. sativa	اراک	۴/۰۰ a	۲/۱۳ a	۱/۸۷ a	۱/۱۴ b	۰/۴۷ a
O. sativa	بروجن	۳/۷۱ab	۲/۰۲ ab	۱/۶۹ a	۱/۱۱ b	۰/۴۶ ab
O. melanotricha	فریدن	۳/۰۷ cd	۱/۷۴ bc	۱/۳۴ b	۱/۳۰ a	۰/۴۴ b
O. melanotricha	سمیرم	۳/۳۹ bc	۱/۷۷ bc	۱/۶۲ a	۱/۱۹ a	۰/۴۸ a
O. sintenisii	سمیرم	۲/۵۲ e	۱/۳۴ e	۱/۱۸ c	۱/۱۵ b	۰/۴۷ a
O. sintenisii	فریدن	۲/۷۵ d	۱/۴۶ cd	۱/۲۹ b	۱/۱۳ b	۰/۴۷ a
O. sativa	نجف‌آباد	۲/۸۰ d	۱/۴۸ cd	۱/۳۲ b	۱/۱۴ b	۰/۴۷ a

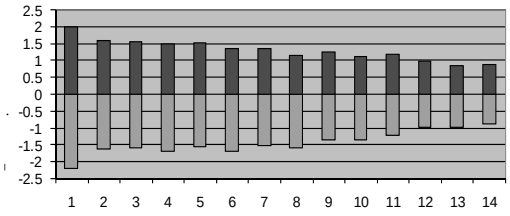
TL: طول کل کروموزوم، RLC: درصد طول نسبی کروموزوم، LA: طول بازوی بلند، SA: طول بازوی کوتاه، AR: نسبت بازوها (نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه)، CI: شاخص سانترومری (نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم). † برای هر صفت میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱ درصد تفاوت آماری معنی‌داری ندارند.



O. sativa (بروجن)

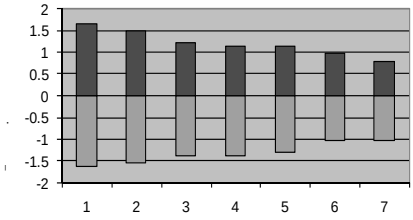


O. sativa (اراک)

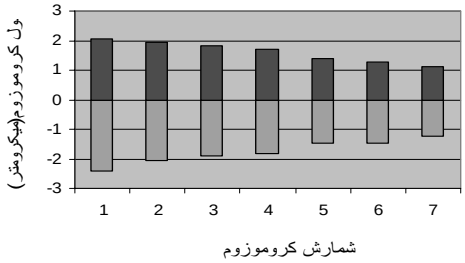


O. melanotricha (سمیرم)

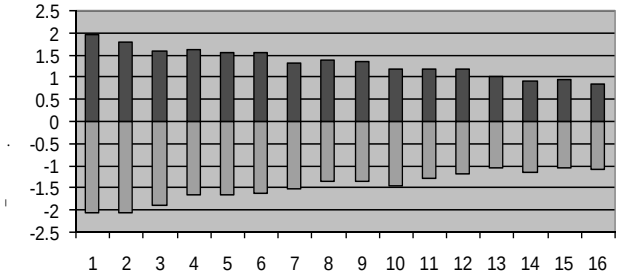
O. melanotricha (فریدن)



O. sintenisii (فریدن)



O. sintenisii (سمیرم)



O. sativa (نجف‌آباد)

شکل ۲- آیدیوگرام گونه‌های اسپرس مورد مطالعه در بررسی سیتوژنتیکی

نتایج تجزیه کاریوتیپ گونه‌های دیپلوئید

Onobrychis sintenisii (سمیرم)

میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم در این گونه به‌ترتیب ۴/۴۸ و ۲/۳۸ میکرومتر و مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۲۳/۷۰ میکرومتر بود. میانگین طول کروموزوم‌ها ۳/۳۹ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه در این نمونه برابر با ۱/۰۹ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) این گونه ۴۷/۸ درصد به‌دست آمد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۵۳ درصد و تفاوت دامنه

طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۵ بود. بر اساس دسته‌بندی استیبنز (۱۹۷۱)، نمونه *Onobrychis sintenisii* (سمیرم) در کلاس تقارنی 1A دسته‌بندی گردید و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان و همکاران (۱۹۶۴)، 7m تعیین شد که بیانگر موقعیت سانترومری میانی کروموزوم‌های آن بود.

O. sintenisii (فریدن)

در این گونه مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۱۷/۶۵ میکرومتر و میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم به‌ترتیب ۳/۲۸ و ۱/۸۱ میکرومتر بود. میانگین طول کروموزوم‌ها ۲/۵۲ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه در این نمونه برابر با ۱/۱۵ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) ۴۶/۹ درصد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۵۵/۱ درصد و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۸/۳۵ بود. بر اساس دسته‌بندی استبینز (۱۹۷۱)، نمونه *O. sintenisii* (فریدن) در کلاس تقارنی 1A دسته‌بندی گردید و فرمول کاریوتیپی براساس روش Levan et al. (1964)، 1M+6m بود که بیانگر موقعیت نقطه میانی و ناحیه میانی سانترومر کروموزوم‌های این نمونه می‌باشد.

تجزیه کاریوتیپ گونه‌های تتراپلوئید

O. melanotricha (سمیرم)

این گونه دارای میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم به‌ترتیب ۴/۲۱ و ۱/۷۶ میکرومتر و مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۳۸/۵۱ میکرومتر بود. میانگین طول کروموزوم‌ها ۲/۷۵ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه در این نمونه برابر با ۱/۱۳ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) این گونه ۴۷ درصد به‌دست آمد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۴۱/۷ درصد و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۶/۳۷ بود. بر اساس دسته‌بندی استیبنز (۱۹۷۱)، نمونه *O. melanotricha* (سمیرم) در کلاس تقارنی 1B دسته‌بندی گردید که دارای کاریوتیپ نامتقارن است و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش Levan et al. (1964)، 5M+9m تعیین شد که بیانگر موقعیت نقطه میانی و ناحیه میانی سانترومر کروموزوم‌های این نمونه می‌باشد.

O. melanotricha (فریدن)

میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم در این گونه به‌ترتیب ۳/۷۵ و ۱/۵۱ میکرومتر و مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۴۳/۰۳ میکرومتر بود. میانگین طول کروموزوم‌ها ۳/۰۷ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه در این نمونه برابر با ۱/۳۰ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) ۴۳/۵ درصد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۴۰/۲ درصد و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۵/۲۱ بود. بر اساس دسته‌بندی استبینز (۱۹۷۱)، نمونه *O. melanotricha* (فریدن) در کلاس تقارنی 1B دسته‌بندی گردید که دارای کاریوتیپ نامتقارن است و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان و همکاران (۱۹۶۴)، 2M+12m تعیین شد که نشان داد سانترومر در کروموزوم‌های این نمونه دارای موقعیت نقطه میانی و ناحیه میانی می‌باشد.

O. sativa (اراک)

در این نمونه میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم به‌ترتیب ۵/۳۷ و ۲/۸۴ میکرومتر، مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۵۶/۰۶ میکرومتر، میانگین طول کروموزوم‌ها ۴ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه برابر با ۱/۱۴ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) این گونه ۴۶/۸ درصد به‌دست آمد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۵۲/۹ درصد و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۴/۵۱ بود. بر اساس دسته‌بندی استبینز (۱۹۷۱)، نمونه *O. sativa* (اراک) در کلاس تقارنی 1A دسته‌بندی گردید و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان و همکاران (۱۹۶۴)، 5M+9m تعیین شد که بیانگر موقعیت نقطه میانی و ناحیه میانی سانترومر کروموزوم‌های این نمونه می‌باشد.

***O. sativa* (بروجن)**

میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم به ترتیب ۴/۴۹ و ۲/۵۵ میکرومتر، مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۵۱/۹ میکرومتر، میانگین طول کروموزوم‌ها ۳/۷۱ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه در این نمونه برابر با ۱/۲۱ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) در این

گونه ۴۵/۵ درصد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۵۶/۹ درصد و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۳/۷۳ بود. بر اساس دسته‌بندی استبینز (۱۹۷۱)، نمونه *O. sativa* (بروجن) در کلاس تقارنی 1A دسته‌بندی گردید و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان و همکاران (۱۹۶۴)، 4M+10m تعیین شد، بنابراین سانترومر در کروموزوم‌های این نمونه دارای موقعیت نقطه میانی و ناحیه میانی می‌باشد.

***O. sativa* (نجف‌آباد)**

این گونه دارای میانگین طول بزرگترین و کوتاه‌ترین کروموزوم به‌ترتیب ۴/۰۲ و ۱/۹۰ میکرومتر، مجموع طول کل کروموزوم‌های کاریوتیپ (TCL) ۴۴/۸۳ میکرومتر، میانگین طول کروموزوم‌ها ۲/۸۰ میکرومتر و میانگین نسبت بازوی بلند به کوتاه ۱/۱۴ میکرومتر بود. درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF٪) این گونه ۴۷/۱ درصد به‌دست آمد، شاخص تقارن (S٪) برابر با ۴۷/۳ درصد و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL) برابر با ۴/۷۳ بود. بر اساس دسته‌بندی استبینز (۱۹۷۱)، نمونه *O. sativa* (نجف‌آباد) در کلاس تقارنی 1B دسته‌بندی گردید و فرمول کاریوتیپی بر اساس روش لوان و همکاران (۱۹۶۴)، 3M+13m تعیین شد که نشان داد سانترومر در کروموزوم‌های این نمونه دارای موقعیت نقطه میانی و ناحیه میانی می‌باشد.

در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، دو مؤلفه اول و دوم، در مجموع بیش از ۸۰ درصد از واریانس کل خصوصیات اندازه گیری شده بین گونه‌ها را توجیه نمودند به طوری‌که در مؤلفه اول صفات طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه حائز بالاترین ضرایب بردارهای ویژه و بیشترین نقش در تبیین این مؤلفه بودند، از این رو می‌توان این مؤلفه را اندازه کروموزوم نام‌گذاری کرد. در مؤلفه دوم نیز صفات مرتبط با موقعیت سانترومر دارای بیشترین اهمیت در توجیه این مؤلفه بودند (جدول ۴).

براساس نتایج تجزیه کلاستر به روش UPGMA گونه‌های مورد مطالعه درفاصله حدو ۹ به سه گروه مجزا تفکیک شدند. به طوری که ۲ گونه زراعی اسپرس (دارای ۲۸ کروموزوم) در کلاستر اول (پایین) و دو گونه *O. sintensii* در کلاستر دوم گروه‌بندی شدند (شکل ۳). در کلاستر سوم دو نمونه گونه *O. melanotericha* به همراه گونه زراعی دیگر (دارای ۳۲ کروموزوم) قرار گرفتند. بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی (نشان داده نشده) کمترین فاصله بین دو گونه *O. melanotricha* (سمیرم) و *O. melanotricha* (فریدن) و بیشترین فاصله بین *O. melanotricha* (فریدن) و *O. sativa* (بروجن)، مشاهده شد.

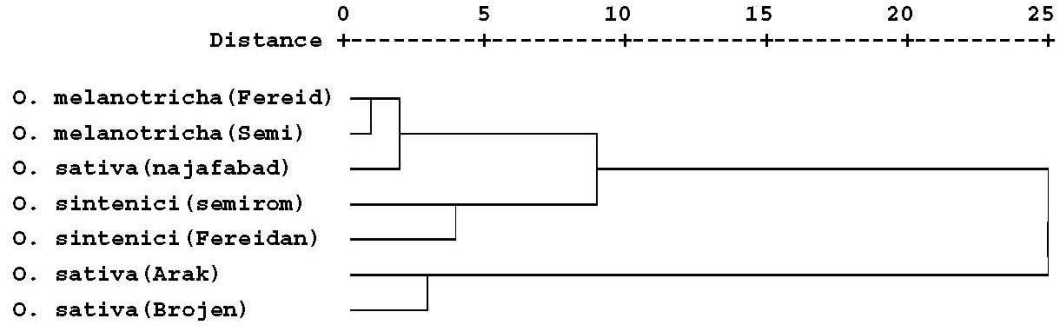
جدول ۴- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های در بررسی خصوصیات سیتوژنتیکی گونه‌های اسپرس

صفات	مؤلفه ۱	مؤلفه ۲
TL	۰/۴۲	۰/۱۳
RLC	-۰/۳۱	۰/۲۲
LA	۰/۴۹	۰/۱۱
SA	۰/۳۸	۰/۳۰
AR	۰/۱۹	-۰/۵۲
CI	-۰/۲۱	۰/۵۵
DRL	-۰/۰۳۵	۰/۵۹
S	-۰/۴۲	۰/۰۶
مقادیر ویژه	۴/۳۲	۲/۲۲
درصد واریانس	۰/۵۲	۰/۳۱
درصد واریانس تجمعی	۰/۵۲	۰/۸۳

TL: طول کل کروموزوم، RLC: درصد طول نسبی کروموزوم، LA: طول بازوی بلند، SA: طول بازوی کوتاه، AR: نسبت بازوها (نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه)، CI: شاخص سانترومری (نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم)، DRL: اختلاف دامنه درصد طول نسبی بزرگترین و کوچکترین کروموزوم، S: شاخص تقارن.

بحث

تنوع قابل ملاحظه از نظر سطوح پلوییدی و ویژگی‌های کاریوتیپی در گونه‌های اسپرس حاکی از آن است که این گونه‌ها در معرض پروسه‌های تکاملی مدیدی بوده و قادر به حضور و پایداری در شرایط متنوع محیطی می‌باشند. تفاوت در سطوح پلوییدی و عدد پایه کروموزومی در جنس اسپرس (x=۷ و x=۸) حتی در گونه اهلی، در تأیید با سایر گزارشات (Abou-EL-Enain, 2002; Goldblat & Johnson, 1995) انجام تلاقی بین گونه‌ای با اهداف اصلاحی را به موارد خاص محدود می‌نماید. وجود تفاوتهای معنی‌دار در صفات کروموزومی حاکی از تنوع کاریوتیپی بالا بین گونه‌های مورد بررسی می‌باشد که نشان می‌دهد انجام مطالعات



شکل ۳- دندروگرام حاصل‌از تجزیه کلاستر به‌روش UPGMA بر اساس خصوصیات کاریوتیپی گونه‌های اسپرس مورد مطالعه

سیتوژنتیکی می‌تواند جهت تعیین وضعیت تکاملی و بررسی خویشاوندی گونه‌های مختلف مؤثر باشد. از نظر میانگین طول بازوی کوتاه و طول بازوی بلند تنوع زیادی بین جمعیت‌های مختلف وجود داشت به‌طوری‌که بیشترین میانگین طول بازوی کوتاه (۲/۸۴µm) و طول بازوی بلند (۵/۳۷µm) به گونه *O. sativa* (اراک) تعلق داشت. از لحاظ وضعیت تقارن کروموزومی، با توجه به مقادیر درصد شکل کلی و شاخص تقارن، گونه *O. melanotricha* (فریدن)، با کمترین مقدار درصد TF و درصد S، در کلاس ۱B قرار گرفت و بنابراین از نامتقارنترین کاریوتیپ و گونه *O. sativa* (بروجن) با بیشترین مقدار درصد TF و درصد S، در کلاس ۱A قرار گرفته و از متقارن‌ترین کاریوتیپ برخوردار بود. استقرار گونه‌های *O. melanotricha* (سمیرم)، *O. melanotricha*، (فریدن) و *O. sativa* (نجف‌آباد) در کلاس ۱B از جدول دو طرفه استبینز(۱۹۷۱)، بیانگر تغییرات شدید بین کروموزومی و عدم تقارن بین کروموزومی در کاریوتیپ گونه‌های مذکور است.

تجزیه به‌مؤلفه‌های اصلی (جدول۴) منجر به شناسایی ۲ مؤلفه اصلی شد که مؤلفه اول، به شدت تحت تأثیر صفات طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه در جهت مثبت و شاخص تقارن در جهت منفی بود. به‌طوری که مشاهده می‌شود صفات مرتبط با طول کروموزوم در این مؤلفه بیشترین نقش را دارند که می‌توان این مؤلفه را مرتبط با اندازه کروموزوم دانست. در مؤلفه دوم نیز صفات شاخص سانترومری و تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها دارای بیشترین اهمیت در توجیه این مؤلفه بودند بنابراین این مؤلفه را می‌توان موقعیت سانترومر نامید به طوری که با انتخاب بر اساس این مؤلفه گونه‌های دارای وضعیت تکاملی مشابه انتخاب خواهندشد. در مطالعه‌ای روی گونه‌های دیپلوئید جنس اسپرس نیز در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، دو مؤلفه اول و دوم بیش از ۹۸ درصد از تنوع بین داده‌ها را توجیه کرد به طوری که در مؤلفه اول، صفات طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند و طول بازوی کوتاه و مؤلفه دوم نیز صفات نسبت بازوها و شاخص سانترومری بیشترین تأثیر را داشتند (Hesamzadeh & Ziaei-Nasab, 2009).

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس خصوصیات کروموزومی، گونه‌های مورد بررسی را در سه گروه مجزا قرار داد. وضعیت تکاملی گونه‌های مختلف به‌وسیله خصوصیات تقارن کاریوتیپی نحوه گروه‌بندی را تأیید می‌کند. به طوری که بررسی پارامترهای تقارن کاریوتیپ نشان داد کمترین میزان شاخص تقارن مربوط به گروه سوم (۴۳/۰۶٪) در مقایسه با گروه دوم (۵۴/۰۱٪) و سوم (۵۴/۹٪) حاصل از تجزیه کلاستر بود که با توجه به آن می‌توان نتیجه گرفت گونه‌های *O. sativa* (اراک) و *O. sativa* (بروجن)، دارای کاریوتیپ متقارن‌تری هستند و کروموزوم‌ها از لحاظ طول تشابه بیشتری دارند. همچنین گونه *O. melanotricha* (فریدن) دارای حداقل نسبت کوتاه‌ترین به بلندترین کروموزوم (شاخص تقارن) با مقدار ۰/۴ بود که در نتیجه این گونه دارای کمترین تقارن کاریوتیپی در بین گونه‌های مورد مطالعه است. گونه‌های *O. sativa* (اراک و بروجن)، دارای حداقل اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها بودند که با توجه به اینکه مقادیر کمتر این مؤلفه حاکی از تقارن بیشتر کاریوتیپ است بنابراین نتایج این مؤلفه نیز مبین آن است که گونه‌های *O. sativa* (اراک و بروجن)، دارای

بیشترین تقارن کاریوتیپی هستند.

در مجموع نتایج نشان داد که بین گونه‌های اهلی و وحشی اسپرس و گونه یونجه از لحاظ خصوصیات کاریوتیپی، تنوع زیادی وجود داشت که حاکی از تفاوت در واکنش به انتخاب طبیعی و وجود فرایندهای تکاملی مختلف در آنها می‌باشد. استقرار گونه‌های *O. sativa* (اراک) و *O. sativa* (بروجن)، در یک گروه جداگانه و دور از سایرگونه‌ها، بدلیل اختلاف دامنه طول نسبی کروموزوم و موقعیت سانترومرآنها در مقایسه با سایرین می‌باشد. دو گونه *O. melanotricha* (فریدن) و *O. sativa* (بروجن)، با توجه به این خصوصیات کروموزومی، دارای کمترین قرابت و نزدیکی بودند که احتمالاً انجام تلاقی بین این دو گونه از موفقیت چندانی برخوردار نخواهد بود. با توجه به اینکه هنوز منابع ژنتیکی ناشناخته زیادی در گونه‌های وحشی خویشاوند اسپرس وجود دارد پیشنهاد می‌گردد این گونه‌ها جمع‌آوری و از لحاظ تنوع ژنتیکی، سیتوژنتیکی، خصوصیات فنوتیپی و تلاقی‌پذیری با گونه‌های زراعی مورد مطالعه قرار گیرند تا بتوان در مسیر برنامه‌های به‌نژادی جهت انتقال ژنهای مفید آنها به گونه‌های زراعی از طریق تلاقی بین گونه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

REFERENCES

1. Abou-EL-Enain, M. M. (2002). Chromosomal criteria and their phylogenetic implications in the genus *Onobrychis* Mill, Sect. *Lophobrychis* (Leguminosae) with special reference to Egyptian species. *Bot J Lin Soc*, 139, 409-414.
2. Agayev, Y. M. (1996). *Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. Fourth inanian congress in crop production and breeding sciences*. Key-note papers, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
3. Ansari-Asl, F. (2001). *Cytogenetic studies of Onobrychis genus in Fars province*. M. Sc. thesis. Karaj Islamic Azad Univ, Tehran, Iran.
4. Belay, G. & Tesemma, T. (1997). Interspecific hybridization in wheat and possibilities of its future utilization in wheat improvement in Ethiopia. *Ethiop J Agric Sci*, 12, 9-16.
5. Darlington, C. D. & Wylie, A. P. (1961). *Chromosome atlas of flowering plants*. George Allen & Unwin LID. London. 519 P.
6. Duke, S. H. & Douglas, C. D. (1981). Root respiration, nodulation, and enzyme activities in Alfalfa during cold acclimation. *Crop Sci*, 21, 489-495.
7. Elena, T. (2006). Citological aspects of the Onobrychis genus. *Bulet Usamv*, 62, 154-158.
8. Goldblat, P. & Johnson, D. E. (1995). Index to plant chromosome numbers. *Missouri Botanical Garden*. U.S.A. 40, 155.
9. Gonzlez-Benito, M. E., Albert, M. J., Iriondo, J. M., Varela, F. & Pérez-Garca, F. (2004). *Seed germination of four thyme species after conservation at low temperatures at several moisture contents*. Page: 247-254. ISTA. Online – International Seed Testing Association.
10. Hatami, A. & Nasirzadeh, A. R. (2008). Change in rank position of two *onobrychis* subspecies according to morphological and karyotypic studies in Fars province. *Pajouhesh and Sazandegi*, 75, 186-191. (In Farsi).
11. Hesamzadeh Hejazi, S. M. & Ziaei Nasab, M. (2009). Cytogenetic study on several populations of diploid species of *Onobrychis* in natural gene bank of Iran. *Plant Breed and Genet Res*, 16, 158-171.
12. Irfan, E., Turgut-balik, D., Sahin, A. & Kursat, M. (2007). Total electrophoretic band patterns of some Onobrychis species growing in turkey. *J Agric & Environ Sci*, 2, 123-126.
13. Johnson, R. A. & Wichern, D. (2001). *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice Hall Inter. Inc. New Jersey, USA.
14. Karimi, H. (1997). *Agronomic and breeding of forage plants*. Tehran Univ Press, 414 pp. (In Farsi).
15. Levan, A., Fredga, K. & Sanberg, A. (1964). Nomenclature forcentromeric position on chromosome. *Hereditas*, 52, 201–220.
16. Li, G.Y., Tanner, G. J., Delves, A. C. & Larkin, P. J. (1993). Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (Alfalfa, Lucerne) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (Sainfoin). *Theor Appl Genet*, 87, 455-463.
17. Magulaev, A. Y. (1996). Chromosome numbers, distribution and some taxonomic problems of Onobrychis species of subgenus Hymenobrychis (Fabaceae) from northern caucasus. *Botaniche Skiizh*, 80, 55-59.
18. Majidi, M. M. & Arzani, A. (2004). Induced Mutation by Ethyle Methane Sulfonate (EMS) in Sainfoin. *J Agric Sci Tech*, 18, 167-180.

19. Oladzad, A. (2008). *Morphological and cytogenetic studies in Triticum boeticum of Iran*. M. Sc. thesis. Isfahan Univ of Tech, Isfahan. Iran.
20. Omidi, M. (1988). *Invitro culture of Onobrychis*. M. Sc. thesis. Isfahan Univ of Tech, Isfahan 84156-83111, Iran.
21. Ornduff, R. (1966). *Index to plant chromosome Numbers for 1965*. Rengnum Veg.50 Int. Bur. Plant Tax. Nom., Utrecht, Netherlands.
22. SAS Institute. (2001). *SAS/STAT user's guide*. SAS Institute Inc. Cary.
23. Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold Publisher LDT, London, 216 pp.