

جمع آوری و بررسی کاربولوجیکی ژرم پلاسما نیشکر وحشی

(*Saccharum spontaneum* L.) ایران

Germplasm Collection and Karyological Evaluation of wild sugarcane (*Saccharum spontaneum* L.) in Iran

داریوش داودی^{۱*}، منصور امید^۲، محمدرضا بی‌همتا^۲

۱- استادیار، بخش تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- استادان، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

Davoodi D^{*1}, Omidi M², Bihamta MR²

1- Assistant Professor, Nanotechnology Research Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

2- Professors, Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ddavoodi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

ارقام زراعی نیشکر حاصل مجموعه محدودی از تلاقی‌ها و بک کراس‌ها بین گونه اهلی (*S. officinarum*) و گونه وحشی (*S. spontaneum*) می‌باشند. به‌علت سهم شدن تعداد محدودی از کلون‌ها در تلاقی‌های اولیه، پایه ژنتیکی ارقام مدرن هیبرید محدود است. به‌منظور توسعه منابع ژنتیکی این واریته‌ها، گونه وحشی *S. spontaneum* برای اولین بار از مناطق جنوبی و شمالی ایران جمع‌آوری شد و مورد مطالعه کاربولوجیکی قرار گرفت. بررسی میکروسکوپی نمونه‌های اسکواش شده نشان داد که این نمونه‌ها از حیث تعداد کروموزوم در دو گروه دیپلوئید و تتراپلوئید ($2n=4x=40$ و $2n=2x=20$) قرار دارند. تجزیه آماری چند متغیره نشان داد که نمونه‌های ۲۰ کروموزومی از حیث متغیرهای کروموزومی و کاربوتیبی اختلاف معنی‌دار دارند و میزان تنوع در نمونه‌های منطقه جنوب بیش‌تر از نمونه‌های منطقه شمال بود. نمونه‌های ۲۰ کروموزومی دارای طویل‌ترین کروموزوم و متقارن‌ترین کاربوتیب بودند و نمونه‌های تتراپلوئید جنوب نیز در کلاستر جداگانه‌ای قرار گرفتند. شاخص‌های کاربوتیبی نمونه‌های تتراپلوئید ۴۰ کروموزومی تقریباً مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. *S. spontaneum* دیپلوئید با $2n=2x=20$ یک مورد جدید است که دارای کم‌ترین تعداد کروموزوم است و تا به حال در این گونه شناسایی و گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تجزیه کاربوتیب

کاربولوجی

نیشکر وحشی

Saccharum spontaneum

مقدمه

نیشکر به خانواده گرامینه (Poaceae)، زیرخانواده آندروپوگون (Andropogoneae) و به جنس ساکاروم (*Saccharum*) تعلق دارد و یکی از مهم‌ترین گیاهان صنعتی تولید کننده شکر است. شکر به‌عنوان یک کالای راهبردی همواره مورد توجه دولت‌ها قرار داشته است و از دو گیاه نیشکر و چغندر قند به دست می‌آید، به طوری که ۷۰ درصد تولید جهانی شکر از نیشکر و ۳۰ درصد آن از چغندر قند استحصال می‌شود. در ایران به دلیل تنوع آب و هوایی هر دو محصول چغندر قند (نواحی سردسیر) و نیشکر (نواحی گرمسیر) کشت می‌شود. با این حال به دلیل هزینه بالای فرایند استخراج شکر از چغندر قند، کشت این محصول نه تنها در ایران بلکه در جهان محدود شده است به طوری که سطح زیرکشت چغندر قند در ایران طی دوره ۱۳۹۱-۱۳۸۰ روندی نزولی داشته و از ۱۷۱ هزار هکتار به ۱۰۱ هزار هکتار کاهش یافته، اما سطح زیر کشت نیشکر بر خلاف چغندر قند، روندی صعودی داشته و از ۴۰ هزار هکتار در سال ۱۳۸۰، به ۸۵ هزار هکتار در سال ۱۳۹۱ (Najafpour 2013) و ۹۰ هزار هکتار در سال ۱۳۹۵ (آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۴-۹۵، ۱۳۹۶) افزایش یافته است. ارقام وارداتی که در حال حاضر در ایران کشت و کار می‌شوند به‌عنوان ارقام مدرن زراعی نیشکر شناخته می‌شوند که حاصل تلاقی‌ها و بک کراس‌هایی بین گونه اهلی (*S. officinarum* L. (2n=80) و گونه وحشی (*S. spontaneum* (2n=40-128) می‌باشند (Yu et al. 2018). گونه *S. spontaneum* نسبت به *S. officinarum* از لحاظ ارتفاع ساقه کوچک‌تر، متنوع‌تر، مقاوم‌تر به بیماری‌ها، با فیبر زیاد و با بنیه قوی می‌باشد. این گونه نیز مانند گونه زراعی، یک پلی پلوئید کمپلکس با تعداد کروموزوم پایه ۸ یا ۱۰ می‌باشد (Sreenivasan et al. 1987; D'Hont et al. 1996). گونه وحشی نیشکر در مقایسه با *Saccharum* زراعی، نی‌های نازک و گل آذین باریک دارد و با ایندو خصوصیت می‌تواند از آن متمایز شود (Pursglove 1972). علاوه بر این، خصوصیات سنبله‌ها در انتهای انشعاب‌های سه‌تایی گل آذین توسط تاکسونومیست‌ها برای کمک به تشخیص این گونه از سایر گونه‌های *Saccharum* ssp. مورد استفاده قرار می‌گیرند.

عقیده بر این است که *S. spontaneum* در آسیای جنوبی تکامل یافته است. این گونه بسیار سازگارتر از *S. officinarum* است و در طیف وسیعی از شرایط و ارتفاع‌های متفاوت در مناطق گرم تا مناطق معتدل از عرض جغرافیایی ۸ درجه جنوبی تا ۴۰ درجه شمالی در سه حوزه جغرافیایی پراکنش دارد: ۱) حوزه شرقی که جزایر اقیانوس جنوبی، فیلیپین، تایوان، ژاپن، چین، ویتنام، تایلند، مالزی و برمه را شامل می‌شود، ۲) حوزه مرکزی شامل هند، نپال، بنگلادش، سریلانکا، پاکستان، افغانستان، ایران و خاورمیانه و ۳) حوزه غربی شامل مصر، سودان، کنیا، اوگاندا، تانزانیا و سایر کشورهای مدیترانه (Tai and Miller 2001; Daniels and Roach 1987; Pursglove 1972; Panje and Babu 1960).

Panje and Babu (1960) این سه حوزه را بر اساس تعداد کروموزومی تفکیک نموده به طوری که حوزه شرقی دارای 2n=80-112، حوزه مرکزی با تعداد کروموزوم 2n=40-80 و حوزه غربی دارای تعداد کروموزوم 2n=112-128 می‌باشند. بر این اساس، *S. spontaneum*‌های موجود در ایران بایستی بین ۴۰ تا ۸۰ کروموزوم داشته باشند. در بین منابع فلور موجود، این گونه در سواحل شنی دریای خزر مشاهده شده است (Gahreman 1983). در یک فلور معتبر دیگر ایران (Rechinger 1979)، اشاره‌ای به وجود این گیاه نشده است.

همچنین Kuwada (1915) اولین شمارش کروموزومی گونه *S. spontaneum* از ژاپن را به فرم 2n=68 گزارش نمود. بعد از آن محققین مختلف طیف وسیعی از تعداد کروموزوم را برای این گونه گزارش کرده‌اند (از ۴۰ تا ۱۲۸). Panje and Babu (1960) تعداد کروموزوم‌های گزارش شده برای *S. spontaneum* را تا سال ۱۹۶۰ خلاصه نموده‌اند و سایر مطالعات سیتولوژیکی که برای این گونه صورت گرفته است از این طیف خارج نبوده است (Price, 1957a, 1957b, 1959, 1964; Sreenivasan 1969;) (Sreenivasan and Sreenivasan 1984).

در تجزیه کاریوتیپ کلون‌های *S. spontaneum* با تعداد کروموزوم متفاوت، اختلاف بارزی از حیث تعداد کروموزوم‌های دارای سانترومر میانی، منطقه میانی و منطقه انتهایی وجود داشت (Nair 1968). (Srenivasan (1969, 1975) کاریوتیپ ۴۶ کلون *S. spontaneum* با تعداد کروموزوم 2n=40-126 را مورد مطالعه

نیشکر و صنایع جانبی در خوزستان شروع شده و عمدتاً بر تلاقی بین ارقام هیبرید استوار می‌باشد، به‌منظور توسعه منابع ژنتیکی این واریته‌ها، نمونه‌هایی از گونه وحشی *S. spontaneum* از برخی مناطق شمالی و جنوبی ایران جمع‌آوری شد و مورد مطالعه کارپولوژیکی قرار گرفتند. هدف از انجام این تحقیق بررسی ژرم پلاسما موجود و راه‌اندازی کلکسیون ذخایر توارثی گیاه نیشکر بود تا اطلاعات اولیه ژنتیکی به‌دست آمده در نهایت بتوانند به صورت آگاهانه در برنامه اصلاح ارقام نیشکر از طریق هیبریداسیون بین گونه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های نیشکر وحشی *S. spontaneum* از مناطق شمالی و جنوبی کشور جمع‌آوری شدند. مسیر جنوبی از میناب و کهنوج تا سروستان و بهبهان و مسیر شمالی از گرمسار و گرگان و خطه ساحلی دریای خزر تا رشت و رودبار را در بر گرفت (جدول ۱). انتخاب نمونه‌ها بر اساس خصوصیات ظاهری برگ (خطی، باریک و حاشیه زبر، شلاقی) و ساقه‌ها (فراوان و به‌خصوص توپر بودن آن‌ها) در تطابق با شاخص‌های قهرمان (۱۳۶۲) صورت گرفت. در هر محل جمع‌آوری، نمونه به‌صورت کپه‌ای برداشت شد و پس از سرزنی، ریزوم‌ها برای کشت در گلدان‌های حاوی ماسه شسته شده مورد استفاده قرار گرفتند. حدود یک ماه و نیم بعد از استقرار و رشد در گلدان، گیاه را به‌صورت کامل از گلدان درآورده و با شستشوی انتهای آن، ۱ تا ۲ سانتی‌متر از انتهای ریشه‌های تازه و سفید رنگ آن را برش داده و بلافاصله در پیش تیمار آلفا-برومونفتالن اشباع قرار داده شده و به مدت ۸ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از شستشو با آب جاری، ریشه‌های پیش تیمار شده با آب مقطر شسته شده و به مدت ۴۸ ساعت در محلول فیکساتیو ۱:۱ از اسیدکرومیک ادرصد: فرمالدئید ۱۰ درصد در یخچال قرار داده شدند. جهت اطمینان از حذف بقایای فیکساتیو، ریشه‌ها به مدت ۳ تا ۵ ساعت زیر آب جاری قرار داده شده و سپس در الکل ۷۰ درصد و در یخچال نگهداری شدند. آماده‌سازی نمونه‌ها برای مشاهدات میکروسکوپی با هیدرولیز در هیدراکسید سدیم یک نرمال به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و رنگ‌آمیزی آن‌ها در محلول هماتوکسیلین

قرار داد. کلون‌های با تعداد کروموزوم یکسان، خصوصیات کارپومورفولوژیکی مشابه و متفاوت نشان دادند و کاریوتیپ‌های آن‌ها در یکی از گروه‌های IA یا IB طبقه‌بندی (Stebbins 1971) قرار گرفتند به‌جز یک کلون که در گروه 2A قرار گرفت. تکامل کاریوتیپ در *S. spontaneum* با حداقل تغییرات در مورفولوژی کروموزوم‌ها همراه بوده است به‌طوری که غالبیت کروموزوم‌های میانی و عدم وجود کروموزوم‌های منطقه انتهایی شاهد این مدعاست. با این‌حال در سیتوتایپ‌های با تعداد کروموزوم کمتر، کروموزوم‌ها کوتاه‌تر از سیتوتایپ‌های با تعداد کروموزوم بیشتر هستند (Sreenivasan 1975).

سیتوتایپ‌های متنوعی از نواحی مختلف برای *S. spontaneum* گزارش شده‌اند (Mehra et al. 1968; Nair 1972) و عقیده بر این است که موزایسم کروموزومی در بافت جنسی یک عامل مهم در تکامل سیتوتایپ‌های متفاوت *S. spontaneum* بوده است (Mehra and Sood 1974). مطالعه سیتولوژیکی کلن‌های به‌دست آمده از هیبریداسیون سیتوتایپ‌های مختلف و تریپلو-پلی پلوئیدهای حاصل از سلفینگ نشان داده است که هیبریداسیون داخل گونه‌ای طبیعی و سلفینگ مسئول یوپلوئیدی و آنیوپلوئیدی گسترده در *S. spontaneum* هستند (Janaki Ammal 1936; Janaki Ammal and Singh 1936; Raghavan 1953; Price 1959; Kandasami 1960; Bremer 1961; Kandasami and Rao 1973; Sreenivasan and Jagathesan 1963).

همان‌گونه که اشاره شد ارقام زراعی نیشکر که برای تولید شکر کشت و کار می‌شوند هیبریدهای بین گونه‌ای پیچیده‌ای هستند (*Saccharum* ssp) که از روش اصلاحی انتخاب رقم در جنس *Saccharum* و عمدتاً شامل تلاقی بین گونه‌های *S. officinarum* L. و *S. spontaneum* L. ایجاد شده‌اند (Cox et al. 2000). چون تعداد کمی از کلون‌های این گونه‌ها در تلاقی‌های اولیه مورد استفاده قرار گرفته‌اند، پایه ژنتیکی واریته‌های هیبرید مدرن محدود است و همین مسئله عامل پیشرفت کند اصلاح نیشکر بوده است (Berding and Roach 1987). بنابراین شناخت و مدیریت تنوع طبیعی موجود در داخل ارقام اهلی و خویشاوندان وحشی *S. officinarum* در برقراری یک برنامه مؤثر به‌منظور اصلاح این گیاه از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به اینکه اخیراً اصلاح نیشکر در مرکز تحقیقات نیشکر طرح توسعه

شاخص تفرق^۹ $DI =$ بر اساس پیشنهاد (Lavana and Srivastava 1992)

کلاس کاریوتیپ^{۱۰} = بر اساس پیشنهاد (Stebbins 1971)

در نهایت جداول تجزیه کاریوتیپ و ایدیوگرامها با استفاده از نرم افزار PKAP به دست آمد و تجزیه واریانس تک متغیره و چند متغیره برای داده های مربوط به صفات مختلف کروموزومی و کاریوتیپی با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

سلول های متافازی مریستم ریشه مربوط به پنج نمونه از *S. Spontaneum* های جمع آوری شده از منطقه جنوب و شش نمونه از منطقه شمال (جدول ۱) برای اندازه گیری و داده برداری های کروموزومی مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه گیری طول بازوهای کروموزومها در تصاویر میکروسکوپی مستلزم صرف وقت زیادی بود چون دارای فرورفتگی های ظاهری متعددی بودند که برای تعیین محل سانترومر و سپس اندازه گیری طول بازوها مشکل ساز بود. تعدد فرورفتگی ها را می توان ناشی از الگوی سایه روشن حاصل از رنگ آمیزی کروموزومها دانست که با برخی از رنگ های کروموزومی مثل ارسئین (Davoodi and Ahmadian, 1995) و یا همتوکسیلین رخ می دهد. ماهواره یا انقباض های ثانویه نیز چون در تمامی تکرارهای یک نمونه قابل مشاهده نبودند همراه با طول بازوها مورد اندازه گیری قرار گرفتند. از نظر تعداد کروموزوم، نمونه ها به دو گروه مشخص $2n=2x=20$ و $2n=4x=40$ کروموزومی تفکیک شدند. نمونه های جمع آوری شده از میناب و کهنوج دارای ۴۰ کروموزوم و سایر نمونه ها دارای ۲۰ کروموزوم در سلول های سوماتیک خود بودند. تعداد کروموزومها و خصوصیات کاریوتیپی نمونه های مطالعه شده در جدول ۱ آورده شده است.

۴ درصد در ۳۲ درجه سانتی گراد و در طول شب انجام شد. ریشه های رنگ آمیزی شده به مدت ۳۰ دقیقه در آنزیم سیتاز و دمای اتاق هضم شده و در نهایت هر نوک ریشه در قطره ای اسیداستیک ۴۵ درصد روی لام اسکواش شدند. برای هر نمونه حدود ۱۰ اسلاید از مخلوط بوته ها بررسی شد و فتومیکروگراف های متافازهای مناسب، با استفاده از یک میکروسکوپ NIKON E800 مجهز به دوربین دیجیتال DXM1200 با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر تهیه شدند. برای هر نمونه بین چهار تا ده صفحه متافازی به عنوان تکرار در نظر گرفته شد و برای کمی کردن تجزیه کاریوتیپ، اندازه گیری طول بازوی بلند، بازوی کوتاه و وضعیت ماهواره (Satellite) هر کروموزوم به صورت دیجیتالی با نرم افزار PKAP (Plant Karyotype Analysis Program) (داودی، منتشر نشده) انجام گرفت. نوع کروموزوم^۱ بر اساس پیشنهاد (Levan et al. 1964) تعیین شد و سایر خصوصیات کروموزومی و کاریوتیپی محاسبه شده عبارتند از:

نسبت بازوها^۲ $AR =$ طول بازوی بلند ÷ طول بازوی کوتاه.
درصد طول نسبی کروموزوم^۳ $RL =$ (طول کل کروموزوم ÷ طول کل کروموزومها) × ۱۰۰.
در صد شکل کروموزوم^۴ $F\% =$ (طول بازوی کوتاه ÷ طول کل کروموزومها) × ۱۰۰.
درصد شکل کلی^۵ $TF\% =$ (مجموع طول بازوهای کوتاه ÷ طول کل کروموزومها) × ۱۰۰.
درصد شاخص تقارن^۶ $SI\% =$ (طول کوچکترین کروموزوم ÷ طول بزرگترین کروموزوم) × ۱۰۰.
ضریب تنوع^۷ $CV =$ (انحراف معیار ÷ میانگین) × ۱۰۰.
تفاوت دامنه طول نسبی کروموزومها^۸ $DRL = RL_{Max} - RL_{Min}\%$

¹ Chromosome Type

² Arm Ratio

³ Relative Length Percentage

⁴ Form Percentage

⁵ Total Form Percentage

⁶ Symmetry Index Percentage

⁷ Coefficient of Variation

⁸ Difference Range of Relative Length

⁹ Dispersion Index

¹⁰ Class

جدول ۱- محل جمع آوری و خصوصیات کاربوتیپ‌های نمونه‌های *S. spontaneum* از جنوب و شمال ایران.

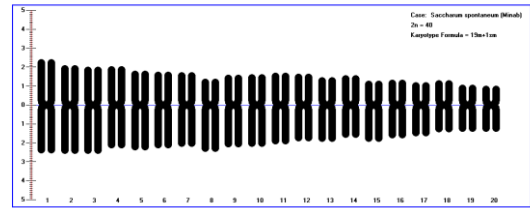
ردیف	محل جمع آوری (شهر (استان))	موقعیت جغرافیایی محل جمع آوری		*HCL					فرمول کاربوتیپی	۲n	
		(طول درجه)	(عرض درجه)	(ارتفاع از سطح دریا (m))	±SD میانگین (μm)	*TF%	*SI%	*CV			*DRL
۱	میناب (هرمزگان)	(57°)	(27°)	(65)	۶۵/۳۴±۲/۲۵	۴۳/۰۹۴	۴۴/۳۶	۲۱/۴۵	۳/۸۹	۱/۹۹	۱B
۲	رودان (هرمزگان)	(57°)	(27°)	(۲۳۵)	۴۸/۲۹±۲/۴۶	۴۳/۸۹	۶۰/۷۸	۱۵/۵۵	۵/۰۲۵	۲/۸۰	۱A
۳	کهنوج (کرمان)	(57°)	(28°)	(۵۱۰)	۸۷/۳۸±۶/۹۳	۴۲/۹۰	۴۹/۲۴	۱۷/۹۲	۳/۵۹	۲/۳۸	۱B
۴	جیرفت (کرمان)	(57°)	(28°)	(۶۸۱)	۳۳/۷۶±۳/۳۷	۴۳/۵۹	۶۵/۲۳	۱۲/۷۱	۴/۲۴	۳/۴۱	۱A
۵	نورآباد ممسنی (فارس)	(51°)	(30°)	(۹۸۱)	۲۷/۹۴±۲/۲۴	۴۴/۰۸	۵۹/۵۴	۱۵/۷۰	۵/۳۶	۲/۸۰	۱A
۶	گرمسار (سمنان)	(52°)	(35°)	(۸۷۸)	۲۴/۹۶±۱/۳۷	۴۴/۷۶	۶۱/۶۹	۱۳/۵۴	۴/۸۹	۳/۲۹	۱A
۷	گرگان (گلستان)	(54°)	(36°)	(۱۰۷)	۲۷/۸۳±۲/۱۲	۴۳/۸۹	۶۲/۸۶	۱۳/۹۹	۴/۷۵	۳/۱۲	۱A
۸	بهشهر (مازندران)	(53°)	(36°)	(-۹)	۲۵/۲۲±۰/۶	۴۴/۰۸	۶۳/۶۰	۱۴/۴۵	۴/۶۳	۳/۰۴	۱A
۹	ساری (مازندران)	(53°)	(36°)	(۴۹)	۲۸/۶۷±۰/۷	۴۳/۶۸	۵۹/۰۲	۱۴/۹۳	۵/۲۹	۲/۹۰	۱A
۱۰	سی سنگان (مازندران)	(51°)	(36°)	(۹)	۳۱/۸۵±۲/۵	۴۳/۹۵	۵۷/۱۸	۱۶/۴۸	۵/۷۳	۲/۶۵	۱A
۱۱	کیاشهر (گیلان)	(49°)	(37°)	(-۲۳)	۳۱/۸۰±۲/۱۳	۴۴/۱۱	۵۵/۶۷	۱۶/۵۶	۵/۸۷	۲/۶۵	۱A

HCL = طول کروماتین مجموعه هاپلوئید (Haploid Chromatin Length)؛ TF% = در صد شکل کل (Total Form Percentage)؛ SI = شاخص تقارن (Symmetry Index)؛ CV = ضریب تنوع (Coefficient of Variation)؛ DRL = تفاوت محدوده طول نسبی (Difference of Range of Relative Length)؛ DI = شاخص پراکندگی (Dispersion Index)؛ m = منطقه میانی (Medium region)؛ sm = (Sub medium region).

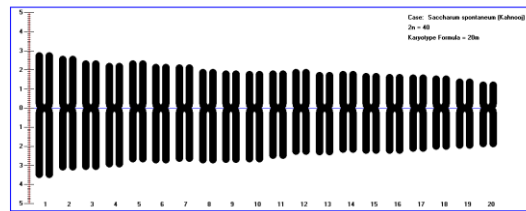
ایدیوگرام هر کاربوتیپ بر اساس داده‌های میانگین کروموزوم‌های مجموعه هاپلوئید به ترتیب از بزرگ‌تر به کوچک‌تر رسم شدند. این ایدیوگرام‌ها همراه با نمونه‌ای از صفحه متافازی مربوطه در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۲- نمونه‌ای از صفحات متافازی *S. spontaneum* جمع‌آوری شده جنوب و شمال ایران همراه با ایدیوگرام‌های مربوطه (بزرگ‌نمایی: 1000X).

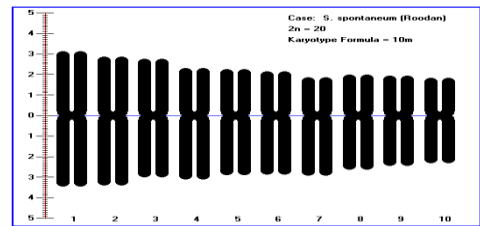
میناب



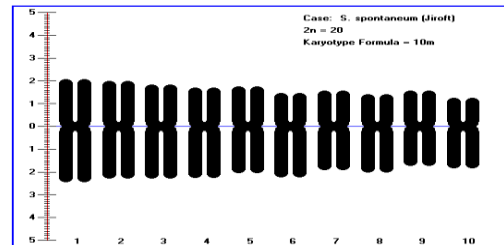
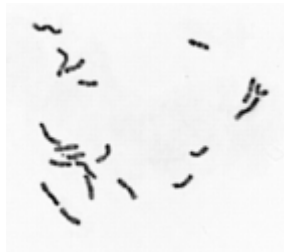
کهنوج



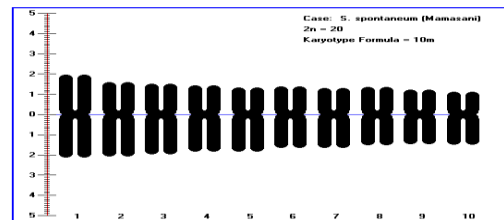
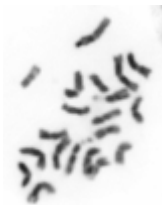
رودان



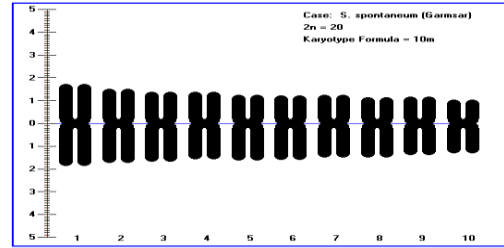
جیرفت



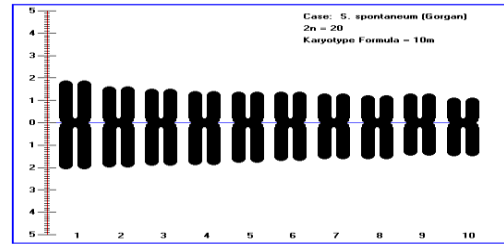
نورآباد ممسنی



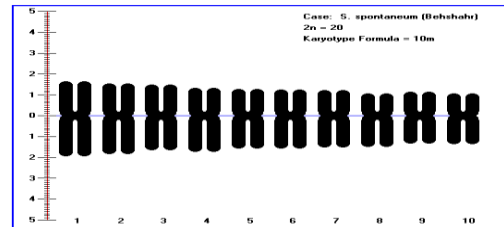
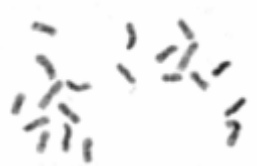
گرمسار



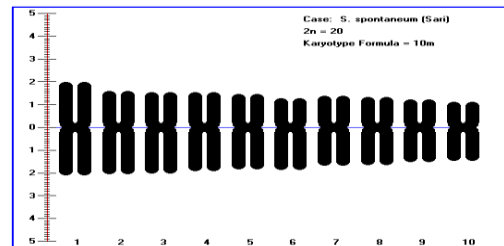
گرگان



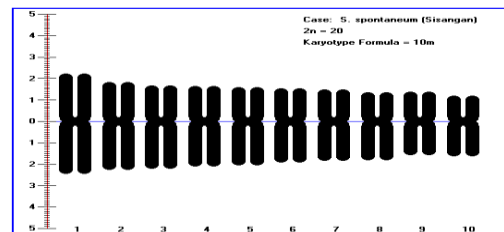
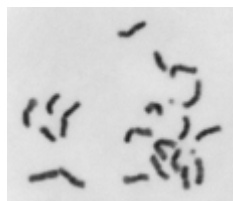
بهشهر



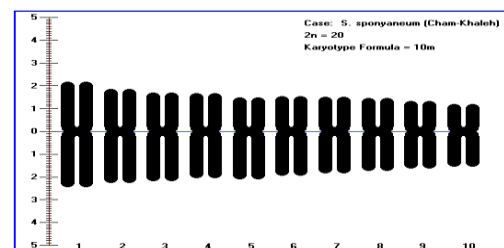
ساری



سی سنگان



کیاشهر



طول کروماتین مجموعه هاپلوئید اختلاف معنی دار داشتند (جدول ۶).

حال با توجه به این که طول بازوها و کروموزومها و بالطبع، طول کروماتین مجموعه هاپلوئید، می تواند تحت تأثیر مرحله و میزان انقباض و تیمارهای شیمیایی استفاده شده قرار گیرد، آزمونهای چند متغیره برای نسبت بازوهای ۲۰ کروموزوم مجموعه هاپلوئید این دو نمونه انجام شد که نتایج آن (جدول ۷) مؤید نتایج آزمونهای چند متغیره برای متغیرهای کاربوتیپی بود. تجزیه واریانس متغیرهای نسبت بازوها و شش متغیر کروموزومی (طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، طول کل کروموزوم، نسبت بازوها، درصد شکل و طول نسبی) نشان داد که فقط F مربوط به نسبت بازوهای کروموزوم شماره ۸ معنی دار می باشد و این اختلاف معنی دار ناشی از اختلاف معنی دار بین دو نمونه از حیث طول بازوی کوتاه این کروموزوم می باشد.

برای گروه بندی و تشخیص نمونه های مشابه بر اساس کلیه متغیرهای کروموزومی و کاربوتیپی، تجزیه کلاستر به روش Ward نیز صورت گرفت و همان گونه که در دندروگرام مربوطه (شکل ۱) مشاهده می شود، نمونه ها به صورت مشخص در دو گروه تتراپلوئید و دیپلوئید قرار گرفتند. نمونه های دیپلوئید رودان و نورآباد از جنوب، نزدیک ترین فاصله را به گروه نمونه های تتراپلوئید (یعنی کهنوج و میناب از جنوب) داشتند و به طور کلی نمونه های شمال که همگی دیپلوئید بودند، با بیشترین فاصله نسبت به نمونه های دیپلوئید و تتراپلوئید جنوب قرار گرفتند. نمونه های جمع آوری شده از شمال شباهت بیشتری به یکدیگر داشته و در کلاس های نزدیک به هم قرار گرفتند. طویل ترین طول کروماتین کروموزوم های پایه در نمونه رودان و بالاترین مقادیر پارامترهای تقارن کاربوتیپ در نمونه جیرفت (جدول ۱) موجب تمایز و تفکیک این دو نمونه از سایر نمونه ها شده و نشان دهنده تنوع کاربوتیپی نیشکر وحشی در منطقه جنوب بود. این تنوع کاربوتیپی در نمونه های منطقه جنوب را می توان ناشی از تنوع خصوصیات جغرافیایی محل های جمع آوری نمونه ها به خصوص از لحاظ ارتفاع و عرض جغرافیایی دانست و نمونه ها را به عنوان اکوتیپ های مختلف *S. spontaneum* قلمداد نمود.

محققین مختلف طیف وسیعی از تعداد کروموزوم را برای گونه *S. spontaneum* گزارش کرده اند ($2n=40-128$) و در تمامی مطالعات سیتولوژیکی که تا به حال در مورد کلون های این گونه صورت گرفته است تعداد کروموزوم های گزارش شده از این طیف خارج نبوده است (Price, 1957a, 1957b, 1959, 1964; Sreenivasan, 1969; Sreenivasan and Sreenivasan, 1984). از طرف دیگر این برای اولین بار است که جمعیت هایی از *S. spontaneum* ایران جمع آوری و مورد بررسی سیتولوژیکی قرار می گیرند. بر اساس تقسیم بندی (Panje and Babu, 1960)، *S. spontaneum* های ایران، که در حوزه مرکزی قرار دارد، بین ۴۰ تا ۸۰ کروموزوم دارند اما حضور نمونه های غالباً ۲۰ کروموزومی در این تحقیق نشان می دهد که هم از نظر طیف تعداد کروموزوم و هم از نظر تعداد کروموزوم پایه و روابط فیلوژنی آن بایستی تجدیدنظر صورت گیرد.

نتایج تجزیه کاربوتیپ نشان داد به جز نمونه های میناب و کهنوج، سایر نمونه ها دارای عدد کروموزومی $2n=2x=20$ می باشند و همگی آنها با فرمول کاربوتیپی $10m$ در کلاس ۱A تقارن کاربوتیپ بر اساس طبقه بندی (Stebbins, 1971) قرار گرفتند. در منابع دیگر نیز غالب بودن کروموزوم های نوع m در کاربوتیپ گونه های مختلف *Saccharum* اشاره شده است (Sreenivasan, 2007, Davoodi et al. 1975). بنابراین در کاربوتیپ هیبریدهای زراعی نیشکر (*S. officinarum* L.) هم که کروموزوم هایی را از *S. spontaneum* به ارث برده اند غالبیت کامل با نوع m می باشد (Davoodi et al. 2007). در نمونه های میناب و کهنوج نیز تقریباً همه کروموزومها از نوع m بوده و در کلاس IB طبقه بندی (Stebbins, 1971) قرار گرفتند. نمونه های ۲۰ کروموزومی از حیث برخی متغیرهای کاربوتیپی اختلاف معنی دار داشتند (جدول ۳) و این اختلاف بیش تر مربوط به طول کروماتین مجموعه هاپلوئید، شاخص تفرق، شاخص تقارن، و ضریب تنوع بود (جدول ۴) ولی این نمونه ها از نظر درصد شکل کلی و تفاوت دامنه طول نسبی با همدیگر اختلاف معنی داری نداشتند. شباهت کاربوتیپ در دو نمونه ۴۰ کروموزومی بیش تر بود و آزمون های معنی دار چند متغیره نیز حکایت از این داشت که این دو نمونه متعلق به یک جامعه هستند (جدول ۵) اما این دو نمونه از نظر

از طرف دیگر، در انواع مختلف تجزیه کلاسترهایی که از لحاظ نوع متغیرها در گروه نمونه‌های دیپلوئید صورت گرفت، دو نمونه نورآباد ممسنی از جنوب و گرمسار از شمال، قرابت زیادی نشان داده و در اکثر گروه‌بندی‌ها در کنار هم قرار گرفتند. روابط بین نمونه‌های $2n=20$ کروموزومی از نوع روابط اکوتیپی و رابطه این گروه از نمونه‌ها با نمونه‌های میناب و کهنوج ($2n=40$) از نوع روابط فیلوژنی بوده که نیاز به بررسی و مطالعه بیشتر دارد. در صورتی که رابطه فیلوژنی این دو گروه اثبات شود، *S.*

جدول ۳- نتایج چهار آزمون چند متغیره (اثر پیلائی، لمبدای ویلکس، اثر هتلینگ و بزرگ‌ترین ریشه روی) بین نمونه‌های $2n=20$ از حیث مجموعه متغیرهای کاربوتیپی: درصد شکل کلی، شاخص تقارن، ضریب تنوع، تفاوت محدوده طول نسبی، شاخص پراکندگی و طول کروماتین مجموعه هاپلوئید.

اثر	آماره	مقدار	F	df	خطا df	سطح احتمال
نمونه	Pillai's Trace	2.130	2.545	48.000	222.000	.000
	Wilks' Lambda	.020	4.113	48.000	161.516	.000
	Hotelling's Trace	11.147	7.044	48.000	182.000	.000
	Roy's Largest Root	8.856	40.957	8.000	37.000	.000

سطح احتمال > 0.05 نشانه معنی دار بودن تفاوت‌هاست.

جدول ۴- تجزیه واریانس متغیرهای کاربوتیپی نمونه‌های نیشکر وحشی با $2n=20$ کروموزوم.

	مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
درصد شکل کلی	Between Groups	2.053	.257	.523 ^{ns}	.831
	Within Groups	18.143	.490		
	Total	20.196	45		
شاخص تقارن	Between Groups	502.940	62.868	2.756*	.017
	Within Groups	844.107	22.814		
	Total	1347.047	45		
ضریب تنوع	Between Groups	61.448	7.681	2.199*	.050
	Within Groups	129.244	3.493		
	Total	190.692	45		
تفاوت محدوده طول نسبی	Between Groups	13.295	1.662	2.125*	.058
	Within Groups	28.942	.782		
	Total	42.237	45		
شاخص تفرق	Between Groups	2.565	.321	2.790*	.016
	Within Groups	4.253	.115		
	Total	6.818	45		
طول کروماتین مجموعه هاپلوئید	Between Groups	1457.170	182.146	28.476**	.000
	Within Groups	236.672	6.397		
	Total	1693.842	45		

سطح احتمال > 0.05 نشان‌دهنده معنی دار بودن اختلافات است.

جدول ۵- نتایج چهار آزمون چند متغیره (اثر پیلائی، لمبدای ویلکس، اثر هتلینگ و بزرگترین ریشه روی) بین نمونه های $2n=40$ از حیث مجموعه متغیرهای کاربوتیبی: درصد شکل کلی، شاخص تقارن، ضریب تنوع، تفاوت محدوده طول نسبی، شاخص تفرق و طول کروماتین مجموعه هاپلوئید.

اثر	آماره	مقدار	F	df فرضیه	df خطا	سطح احتمال
نمونه	Pillai's Trace	.941	5.300	6.000	2.000	.167
	Wilks' Lambda	.059	5.300	6.000	2.000	.167
	Hotelling's Trace	15.900	5.300	6.000	2.000	.167
	Roy's Largest Root	15.900	5.300	6.000	2.000	.167

سطح احتمال > 0.05 نشانه معنی دار بودن تفاوت هاست.

جدول ۶- تجزیه واریانس متغیرهای کاربوتیبی نمونه های نیشکر وحشی با $2n=40$ کروموزوم.

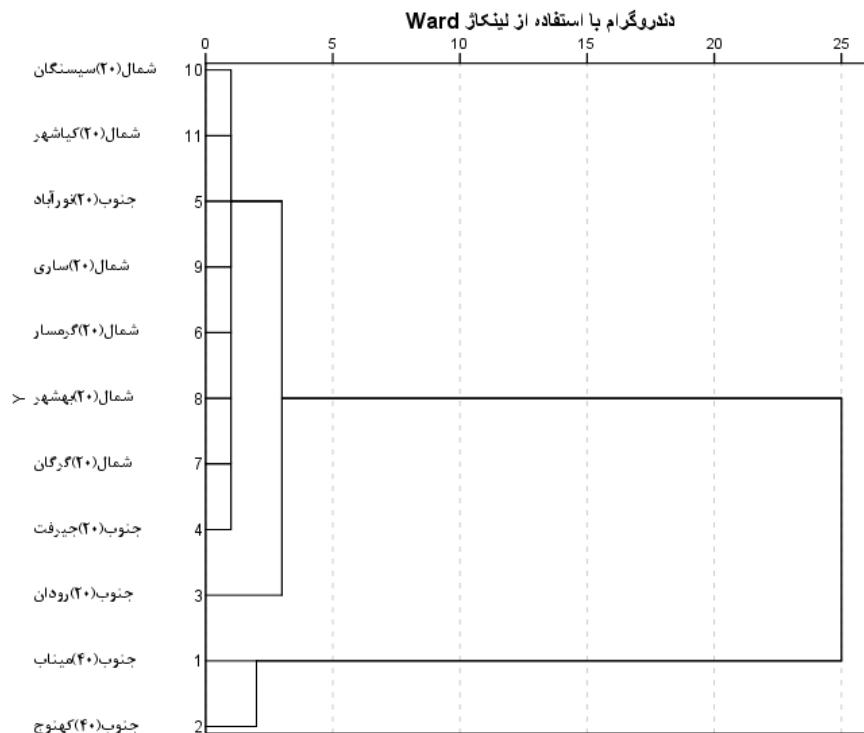
		مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
درصد شکل کلی	Between Groups	.043	1	.043	.094 ^{ns}	.768
	Within Groups	3.210	7	.459		
	Total	3.253	8			
شاخص تقارن	Between Groups	48.947	1	48.947	.620 ^{ns}	.457
	Within Groups	552.678	7	78.954		
	Total	601.624	8			
ضریب تنوع	Between Groups	18.275	1	18.275	1.716 ^{ns}	.232
	Within Groups	74.544	7	10.649		
	Total	92.819	8			
تفاوت محدوده طول نسبی	Between Groups	.175	1	.175	.242 ^{ns}	.638
	Within Groups	5.060	7	.723		
	Total	5.235	8			
شاخص تفرق	Between Groups	.284	1	.284	1.778 ^{ns}	.224
	Within Groups	1.118	7	.160		
	Total	1.402	8			
طول کروماتین مجموعه هاپلوئید	Between Groups	755.296	1	755.296	15.281 ^{**}	.006
	Within Groups	345.989	7	49.427		
	Total	1101.285	8			

سطح احتمال > 0.05 نشان دهنده معنی دار بودن اختلافات است.

جدول ۷- نتایج چهار آزمون چند متغیره (اثر پیلائی، لمبدای ویلکس، اثر هتلینگ و بزرگترین ریشه روی) بین نمونه های $2n=40$ از حیث مجموعه متغیرهای نسبت بازوهای کروموزوم های مجموعه هاپلوئید.

اثر	آماره	مقدار	F	df فرضیه	df خطا	سطح احتمال
نمونه	Pillai's Trace	.967	4.242	7.000	1.000	.358
	Wilks' Lambda	.033	4.242	7.000	1.000	.358
	Hotelling's Trace	29.693	4.242	7.000	1.000	.358
	Roy's Largest Root	29.693	4.242	7.000	1.000	.358

سطح احتمال > 0.05 نشانه معنی دار بودن تفاوت هاست.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر نمونه‌های نیشکر وحشی شمال و جنوب با استفاده از روش Ward بر مبنای داده‌های کارپوتیپی: طول کروماتین مجموعه هاپلوئید (HCL)، درصد شکل کل (TF%)، شاخص تقارن (SI)، ضریب تنوع (CV)، تفاوت محدوده طول نسبی (DRL)، شاخص پراکندگی (DI)، و داده‌های کروموزومی: طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، طول کل، طول نسبی، نسبت بازوها، و درصد فرم ۱۰ کروموزوم پایه. نام هر نمونه شامل منطقه جمع‌آوری، تعداد کروموزوم سلول سوماتیکی (در پرانتز)، و محل جمع‌آوری می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری آقایان مهندس بنی عباسی، دکتر حمدی، دکتر پرویزی، و مهندس حمودی از مرکز تحقیقات نیشکر طرح

توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان و خانم مهندس عروجلو از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Davoodi D, P Ahmadian Tehrani, M Omid, Y Aghyev, and MR Bihanta (2007). Karyological Evaluation of Five Hybrid Cultivars of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Seed and Plant Improvement Journal* 23:615-631.

Ghahraman A (1973). *Flora of Iran*. Publication of Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR).

Berding N and BT Roach (1987). Germplasm collection, maintenance, and use. p. 143-210. *In* D. J Heinz (ed.) *Sugarcane improvement through breeding*. Elsevier, New York.

Bremer G (1961). Problems in breeding and cytology of sugar cane. II. The sugar cane breeding from a cytological viewpoint. *Euphytica* 10: 121-133.

Cox M, M Hogarth, G Smith (2000). Cane breeding and improvement. *In* "Manual of cane growing", M Hogarth, P Allsopp, eds. Bureau of Sugar Experimental Stations, Indooroopilly, Australia. pp 91-108.

Daniels J and BT Roach (1987). *Taxonomy and evolution*. *In*: *Sugarcane Improvement through breeding* (Heinz DJ, ed.) Elsevier, Amsterdam, pp. 7-84.

Davoodi D, P Ahmadian (1995). A new pattern of chromosome banding in plants (OR-banding); *Proceedings of 12th International Chromosome Conference*; San Lorenzo de El Escorial; Madrid; Spain.

D'Hont A, L Grivet, P Feldmann, S Rao, N Berding, JC Glaszmann (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp) by molecular cytogenetics. *Molecular Genetics and Genomics* 250: 405-413.

Janaki Ammal, EK (1936). Cytogenetic analysis of *Saccharum spontaneum* L I. Chromosome studies in some Indian forms. *Indian Journal Agricultural Science* 6: 1-8.

- Janaki Ammal, EK and TSN Singh (1936). A preliminary note on a new *Saccharum-Sorghum* hybrid. *Indian Journal Agricultural Science* 6: 1105-1106.
- Kanasami PA (1960). Economic characters or triploids of *Saccharum spontaneum* L and their utilization in sugarcane breeding. *Science Culture* 25: 491-492.
- Kanasami PA and KSS Rao 1963. Artificially synthesized forms as an indication of the probable origin of certain naturally occurring forms of *Saccharum spontaneum* L. *Indian Journal Of Sugarcane Research And Development* 8: 25-31.
- Kuwada Y 1915. Ueberdichrosomenzahl von *Zea mays* L. *Bot. Mag. Tokyo* 29:83-89.
- Lavana UC and S Srivastava (1992). A simple parameter of dispersion index that serves as an adjunct to karyotype asymmetry *Journal Biosci* 1992: 179-182.
- Levan A, K Fredga and AA Sandberg (1964). Nomenclature for centromic position on chromosomes. *Heredites* 52: 201-220.
- Mehra, PN, PK, Kholsa BL, Kohli and JS, Koonar (1968). Cytological studies in the North Indian grasses (part I). *Res. Bull. Punjab. University n.s.* 19: 157-230.
- Mehra PN, OP Sood (1974). Floating chromosomal populations in *Saccharum spontaneum* L. *Cytologia* 39: 681-696.
- Nair MK (1968). Cytotaxonomical studies in the genus *Saccharum* and related genera. *Cytogenetics of S. officinarum* L. *S. spontaneum* L. and *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. Madras University, Dissertation.
- Nair MK (1972). Cytogenetics of *Saccharum*. III. Karyotype. analysis and meiosis in *S. spontaneum*. *Nucleus* 15: 107-117.
- Panje RR, CN Babu (1960). Studies of *Saccharum spontaneum* distribution and geographic association of chromosome numbers. *Cytologia* 25:150-152.
- Price S (1957a). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. II. Geographic distribution and chromosome numbers in *S. robustum*. *Cytologia* 22:40-52.
- Price S (1957b). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. III. Chromosome numbers in interspecific hybrids. *Botanical Gazette* 118:146-159.
- Price S (1959). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. V. Chromosome numbers in *Saccharum*, *Erianthus*, *Narenga*, and *Sclerostachya* from Thailand and Vietnam. *Cytologia* 24: 342-347.
- Price S (1964). Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. IX. Further F_1 hybrids from *Saccharum officinarum* ($2n=80$) x *S. spontaneum* ($2n=96$). *Indian Journal Of Sugarcane Research And Development* 8: 131-133.
- Purglove JW (1972). *Tropical crops: Monocotyledons*. Longman Scientific and Technical, New York.
- Raghawan TS, 1953. Some aspects of sugarcane breeding in relation to its cytogenetical peculiarities. *Proc. Indian Academy Science* 3: 94-98.
- Rechinger KH (1979). *Flora Iranica*(No. 139). Akademische Druk U.: Verlagsanstalt Graz. Austria. 892pp.
- Sreenivasan TV, BS Ahloowalia, and DJ Heinz (1987). *Cytogenetics*. In: Heinz DJ (ed.) *Sugar Cane Improvement*.
- Sreenivasan TV and J Sreevivasan (1984). Cytology of *Saccharum* complex from New Guinea, Indonesia and India. *Caryologia* 37: 351-358.
- Sreenivasan TV (1975). Cytogenetical studies in *Saccharum spontaneum* L. *Proc. Indian Academy Science* 81: 131-144.
- Sreenivasan, TV (1969). Cytogenetic studies in *Saccharum* and allied genera. Madras University, Dissertation.
- Sreenivasan TV and D Jagathesan 1973. Cytogenetic studies in interspecific hybrids of *Saccharum spontaneum* L. *Nucleus (Calcutta)* 16:44-48.
- Stebbins GL (1971). *Chromosomal Evaluation in Higher Plants*. London: Edward Arnold Publisher Ltd., 216p.
- Stebbins GL 1958. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. *Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biology* 23:365-378.
- Tai PYP, JD Miller (2001). A core collection for *Saccharum spontaneum* L. from the world collection of sugarcane. *Crop Science Society of America* 41: 879-885.
- Yu F, P Wang, X Li, Y Huang, Q Wang, L Luo, Y Jing, X Liu, Z Deng, J Wu, Y Yang, R Chen, M Zhang and L Xu (2018) Characterization of chromosome composition of sugarcane in nobilization by using genomic in situ hybridization. *Molecular Cytogenetics* 11:35.