ژنتیک نوین
دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸
صفحه ۱۲ - ۱

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

جمع‌آوری و بررسی کاریولوژیکی ژرم پلاسم نیشکر وحشی (*Saccharum spontaneum* L.) ایران

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

داریوش داودی*[۱]، منصور امیدی[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 M[2], Bihamta MR[2]

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 سهیم شدن تعداد معدودی 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 کاریولوژیکی قرار گرفت. بررسی میکروسکوپی نمونه‌های اسکواش شده نشان داد که این نمونه‌ها از حیث تعداد کروموزوم در دو گروه دیپلویید و تتراپلویید (2n=4x=40 و 2n=2x=20) قرار دارند. تجزیه آماری چند متغیره نشان داد که نمونه‌های ۲۰ کروموزومی از حیث متغیرهای کروموزومی و کاریوتیپی اختلاف معنی‌دار دارند و میزان تنوع در نمونه‌های منطقه جنوب بیش‌تر از نمونه‌های منطقه شمال بود. نمونه‌های ۲۰ کروموزومی دارای طویل‌ترین کروموزوم و متقارن‌ترین کاریوتیپ بودند و نمونه‌های تتراپلویید جنوب نیز در کلاستر جداگانه‌ای قرار گرفتند. شاخص‌های کاریوتیپی نمونه‌های تتراپلویید۴۰ کروموزومی تقریبا مشابه بود و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. *S. spontaneum* دیپلویید با 2n=2x=20 یک مورد جدید است که دارای کم‌ترین تعداد کروموزوم است و تا به‌حال در این گونه شناسایی و گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تجزیه کاریوتیپ
کاریولوژی
نیشکر وحشی
Saccharum spontaneum

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

مقدمه

نیشکر به خانواده گرامینه (Poaceae)، زیرخانواده آندروپوگونه (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 چغندرقند به‌دست می‌آید، به‌طوری که ۷۰ درصد تولید جهانی شکر از نیشکر و ۳۰ درصد آن از چغندرقند استحصال می‌شود. در ایران به‌دلیل تنوع آب و هوایی هر دو محصول چغندرقند (نواحی سردسیر) و نیشکر (نواحی گرمسیر) کشت می‌شود. با این حال به‌دلیل هزینه بالای فرایند استخراج شکر از چغندرقند، کشت این محصول نه تنها در ایران بلکه در جهان محدود شده‌است به‌طوری 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 چغندرقند، روندی صعودی داشته و از ٤٠ 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 ٩٤-٩٥، ١٣٩٦) 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 (2n=80) *S. officinarum* L. و گونه وحشی (2n=40-128) *S. spontaneum* 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 پلویید 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 سنبلچه‌ها 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 ٤٠ 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 به‌طوری 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 ٤٠ تا ٨٠ کروموزوم داشته باشند. در بین منابع فلور موجود، این گونه در سواحل شنی دریای خزر مشاهده شده‌است (Gahreman 1983). در یک فلور معتبر دیگر ایران (Rechinger 1979)، اشاره‌ای به وجود این گیاه نشده‌است.

همچنین Kuwada (1915) اولین شمارش کروموزومی گونه *S. spontaneum* از ژاپن را به فرم ٢n=٦٨ گزارش نمود. بعد از آن محققین مختلف طیف وسیعی از تعداد کروموزوم را برای این گونه گزارش کرده‌اند (از ٤٠ تا ١٢٨). Panje and Babu (1960) تعداد کروموزوم‌های گزارش شده برای *S. spontaneum* را تا سال ١٩٦٠ 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 ٤٦ کلون *S. spontaneum* با تعداد کروموزوم 2n= 40-126 را مورد مطالعه

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

قرار داد. کلون‌های با تعداد کروموزوم یکسان، خصوصیات کاریومورفولوژیکی 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 موزاییسم 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 پلوییدهای حاصل از سلفینگ نشان داده است که هیبریداسیون داخل گونه‌ای طبیعی و سلفینگ مسئول یوپلوییدی و آنیوپلوییدی گسترده در *S. spontaneum* هستند (Janaki Ammal 1936; Janaki Ammal and Singh 1936; Raghavan 1953; Price 1959; Kandasami 1960; Bremer 1961; Kandasami and Rao 1963; Sreenivasan and Jagathesan 1973).

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 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 کاریولوژیکی قرار گرفتند. هدف از انجام این تحقیق بررسی ژرم پلاسم 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 آب‌مقطر شسته شده و به مدت ٤٨ ساعت در محلول فیکساتیو ۱:۱ از اسیدکرومیک ۱درصد: فرمالدئید۱۰ 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 ٦۰ درجه سانتی‌گراد و رنگ‌آمیزی آن‌ها در محلول هماتوکسیلین

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

٤ درصد در ۳۲ درجه سانتی‌گراد و در طول شب انجام شد. ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده به مدت ۳۰ دقیقه در آنزیم سیتاز و دمای اطاق هضم شده و در نهایت هر نوک ریشه در قطره‌ای اسیداستیک ٤٥ درصد روی لام اسکواش شدند. برای هر نمونه حدود ۱۰ اسلاید از مخلوط بوته‌ها بررسی شد و فتومیکروگراف‌های متافازهای مناسب، با استفاده از یک میکروسکوپ NIKON E800 مجهز به دوربین دیجیتال DXM1200 با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر تهیه شدند. برای هر نمونه بین چهار تا ده صفحه متافازی به‌عنوان تکرار در نظر گرفته شد و برای کمی کردن تجزیه کاریوتیپ، اندازه‌گیری طول بازوی بلند، بازوی کوتاه و وضعیت ماهواره (Satellite) هر کروموزوم به صورت دیجیتالی با نرم‌افزار PKAP (Plant Karyotype Analysis Program) (داودی، منتشرنشده) انجام گرفت. نوع کروموزوم[1] بر اساس پیشنهاد Levan et al. (1964) تعیین شد و سایر خصوصیات کروموزومی و کاریوتیپی محاسبه شده عبارتند از:

نسبت بازوها[2] = AR: طول بازوی بلند ÷ طول بازوی کوتاه.

درصد طول نسبی کروموزوم[3] = RL٪: (طول کل کروموزوم ÷ طول کل کروموزوم‌ها) × ۱۰۰.

در صد شکل کروموزوم[4] = F% : (طول بازوی کوتاه ÷ طول کل کروموزوم‌ها) × ۱۰۰.

درصد شکل کلی[5] = TF%: (مجموع طول بازوهای کوتاه ÷ طول کل کروموزوم‌ها) × ۱۰۰.

درصد شاخص تقارن[6] = SI%: (طول کوچکترین کروموزوم ÷ طول بزرگترین کروموزوم) × ۱۰۰.

ضریب تنوع[7] = CV: (انحراف معیار÷ میانگین) × ۱۰۰.

تفاوت دامنه طول نسبی کروموزوم‌ها[8] = DRL: $\%RL_{Min} - \%RL_{Max}$.

شاخص تفرق[9] = DI: بر اساس پیشنهاد Lavania and Srivastava (1992).

کلاس کاریوتیپ[10] =: بر اساس پیشنهاد Stebbins (1971).

در نهایت جداول تجزیه کاریوتیپ و ایدیوگرام‌ها با استفاده از نرم‌افزار PKAP به‌دست آمد و تجزیه واریانس تک متغیره و چند متغیره برای داده‌های مربوط به صفات مختلف کروموزومی و کاریوتیپی با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

سلول‌های متافازی مریستم ریشه مربوط به پنج نمونه از *S. Spontaneum*های جمع‌آوری شده از منطقه جنوب و شش نمونه از منطقه شمال (جدول ۱) برای اندازه‌گیری و داده‌برداری‌های کروموزومی مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه‌گیری طول بازوهای کروموزوم‌ها در تصاویر میکروسکوپی مستلزم صرف وقت زیادی بود چون دارای فرورفتگی‌های ظاهری متعددی بودند که برای تعیین محل سانترومر و سپس اندازه‌گیری طول بازوها مشکل ساز بود. تعدد فرورفتگی‌ها را می‌توان ناشی از الگوی سایه روشن حاصل از رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها دانست که با برخی از رنگ‌های کروموزومی مثل ارسئین (Davoodi and Ahmadian, 1995) و یا هماتوکسیلین رخ می‌دهد. ماهواره یا انقباض‌های ثانویه نیز چون در تمامی تکرارهای یک نمونه قابل مشاهده نبودند همراه با طول بازوها مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. از نظر تعداد کروموزوم، نمونه‌ها به دو گروه مشخص 2n=2x=20 و 2n=4x=40 کروموزومی تفکیک شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از میناب و کهنوج دارای ٤٠ کروموزوم و سایر نمونه‌ها دارای ۲۰ کروموزوم در سلول‌های سوماتیک خود بودند. تعداد کروموزوم‌ها و خصوصیات کاریوتیپی نمونه‌های مطالعه شده در جدول ۱ آورده شده‌است.

[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 جمع‌آوری و خصوصیات کاریوتیپی نمونه‌های *S. spontaneum* از جنوب و شمال ایران.

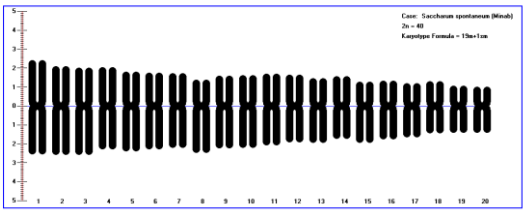
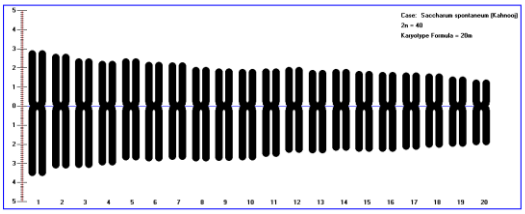
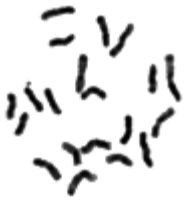
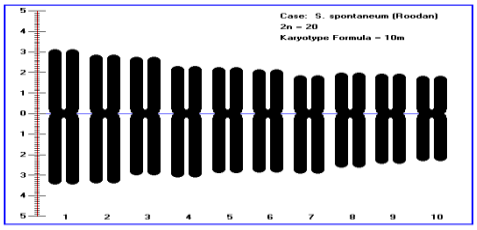
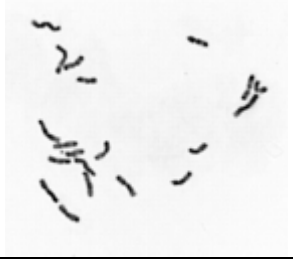
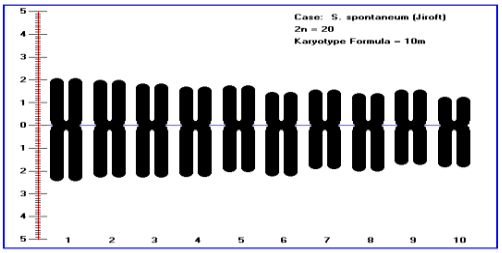
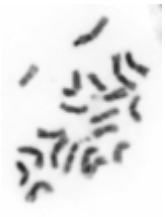
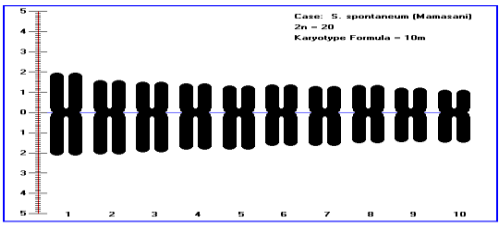
ردیف	محل جمع‌آوری (شهر (استان))	موقعیت جغرافیایی محل جمع‌آوری (طول درجه) (عرض درجه) (ارتفاع از سطح دریا m)	۲n	فرمول کاریوتیپی	*HCL SD±میانگین (µm)	*TF%	*SI%	*CV	*DRL	*DI	کلاس Class
۱	میناب (هرمزگان)	(57˚) (27˚) (٦٥)	٤٠	*۱۹m+*۱sm	٦٥/٣٤٤±٢/٢٥	٤٣/٠٩٤	٤٤/٣٦	٢١/٤٥	٣/٨٩	١/٩٩	١B
٢	رودان (هرمزگان)	(57˚) (27˚) (٢٣٥)	٢٠	١٠m	٤٨/٢٩± ٢/٤٦	٤٣/٨٩	٦٠/٧٨	١٥/٥٥	٥/٠٢٥	٢/٨٠	١A
٣	کهنوج (کرمان)	(57˚) (28˚) (٥١٠)	٤٠	٢٠m	٨٧/٣٨± ٦/٩٣	٤٢/٩٠	٤٩/٢٤	١٧/٩٢	٣/٥٩	٢/٣٨	١B
٤	جیرفت (کرمان)	(57˚) (28˚) (٦٨١)	٢٠	١٠m	٣٣/٧٦± ٣/٣٧	٤٣/٥٩	٦٥/٢٣	١٢/٧١	٤/٢٤	٣/٤١	١A
٥	نورآباد ممسنی (فارس)	(51˚) (30˚) (٩٨١)	٢٠	١٠m	٢٧/٩٤± ٢/٢٤	٤٤/٠٨	٥٩/٥٤	١٥/٧٠	٥/٣٦	٢/٨٠	١A
٦	گرمسار (سمنان)	(52˚) (35˚) (٨٧٨)	٢٠	١٠m	٢٤/٩٦± ١/٣٧	٤٤/٧٦	٦١/٦٩	١٣/٥٤	٤/٨٩	٣/٢٩	١A
٧	گرگان (گلستان)	(54˚) (36˚) (١٠٧)	٢٠	١٠m	٢٧/٨٣± ٢/١٢	٤٣/٨٩	٦٢/٨٦	١٣/٩٩	٤/٧٥	٣/١٢	١A
٨	بهشهر (مازندران)	(53˚) (36˚) (-٩)	٢٠	١٠m	٢٥/٢٢± ٠/٦	٤٤/٠٨	٦٣/٦٠	١٤/٤٥	٤/٦٣	٣/٠٤	١A
٩	ساری (مازندران)	(53˚) (36˚) (٤٩)	٢٠	١٠m	٢٨/٦٧± ٠/٧	٤٣/٦٨	٥٩/٠٢	١٤/٩٣	٥/٢٩	٢/٩٠	١A
١٠	سی سنگان (مازندران)	(51˚) (36˚) (٩)	٢٠	١٠m	٣١/٨٥± ٢/٥	٤٣/٩٥	٥٧/١٨	١٦/٤٨	٥/٧٣	٢/٦٥	١A
١١	کیاشهر (گیلان)	(49˚) (37˚) (-٢٣)	٢٠	١٠m	٣١/٨٠± ٢/١٣	٤٤/١١	٥٥/٦٧	١٦/٥٦	٥/٨٧	٢/٦٥	١A

HCL= طول کروماتین مجموعه هاپلویید (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 کاریوتیپ بر اساس داده‌های میانگین کروموزوم‌های مجموعه هاپلویید به‌ترتیب از بزرگ‌تر به کوچک‌تر رسم شدند. این ایدیوگرام‌ها همراه با نمونه‌ای از صفحه متافازی مربوطه در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

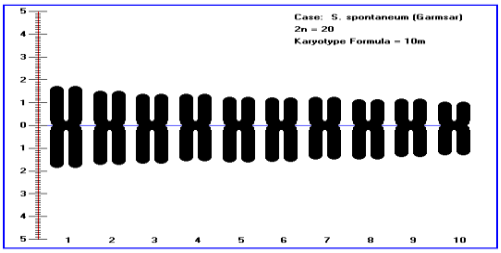
جدول ۲- نمونه‌ای از صفحات متافازی *S. spontaneum*های جمع‌آوری شده جنوب و شمال ایران همراه با ایدیوگرام‌های مربوطه (بزرگ‌نمایی: 1000X).

میناب		
کهنوج		
رودان		
جیرفت		
نورآباد ممسنی		

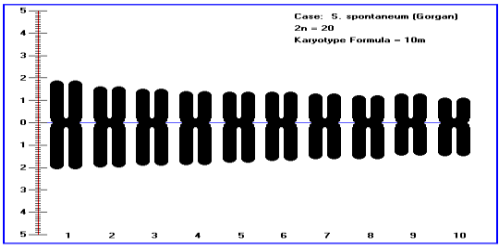
Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

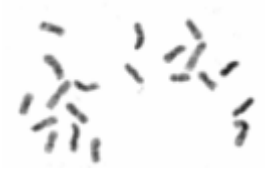
گرمسار

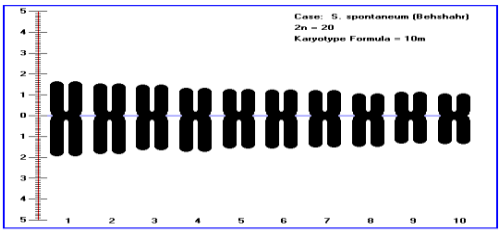


گرگان

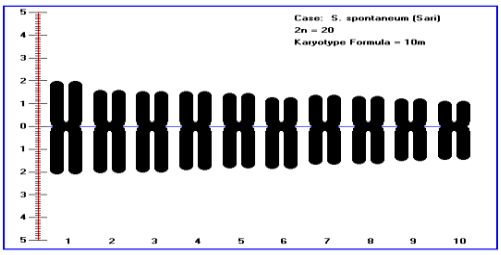


بهشهر

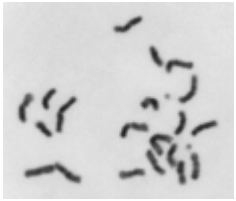


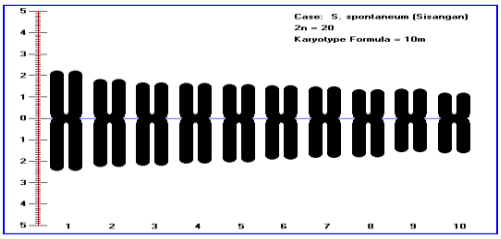


ساری

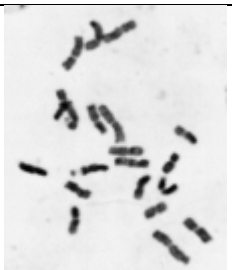


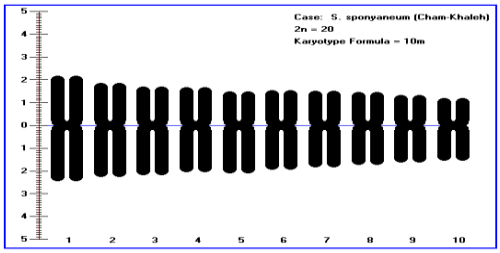
سی سنگان





کیاشهر





محققین مختلف طیف وسیعی از تعداد کروموزوم را برای گونه *S. spontaneum* گزارش کرده‌اند (2n=40-128) و در تمامی مطالعات سیتولوژیکی که تا به‌حال در مورد کلون‌های این گونه صورت گرفته است تعداد کروموزوم‌های 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 جمعیت‌هایی از *S. spontaneum* ایران جمع‌آوری و مورد بررسی سیتولوژیکی قرار می‌گیرند. بر اساس تقسیم‌بندی Panje and Babu (1960)، *S. spontaneum*های ایران، که در حوزه مرکزی قرار دارد، بین ٤٠ تا ٨٠ کروموزوم دارند اما حضور نمونه‌های غالباً ٢٠ کروموزومی در این تحقیق نشان می‌دهد که هم از نظر طیف تعداد کروموزوم و هم از نظر تعداد کروموزوم پایه و روابط فیلوژنی آن بایستی تجدیدنظر صورت گیرد.

نتایج تجزیه کاریوتیپ نشان داد به‌جز نمونه‌های میناب و کهنوج، سایر نمونه‌ها دارای عدد کروموزومی 2n=2x=20 می‌باشند و همگی آن‌ها با فرمول کاریوتیپی ١٠m در کلاس 1A تقارن کاریوتیپ بر اساس طبقه‌بندی Stebbins (1971) قرار گرفتند. در منابع دیگر نیز غالب بودن کروموزوم‌های نوع m در کاریوتیپ گونه‌های مختلف *Saccharum* اشاره شده‌است (Sreenivasan 1975, Davoodi et al. 2007). بنابراین در کاریوتیپ هیبریدهای زراعی نیشکر (*S. officinarum* L.) هم که کروموزوم‌هایی را از *S. spontaneum* به ارث برده‌اند غالبیت کامل با نوع m می‌باشد (Davoodi et al. 2007). در نمونه‌های میناب و کهنوج نیز تقریباً همه کروموزوم‌ها از نوع m بوده و در کلاس 1B طبقه‌بندی Stebbins (1971) قرار گرفتند. نمونه‌های ٢٠ کروموزومی از حیث برخی متغیرهای کاریوتیپی اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ٣) و این اختلاف بیش تر مربوط به طول کروماتین مجموعه هاپلویید، شاخص تفرق، شاخص تقارن، و ضریب تنوع بود (جدول ٤) ولی این نمونه‌ها از نظر درصد شکل کلی و تفاوت دامنه طول نسبی با همدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. شباهت کاریوتیپ در دو نمونه ٤٠ کروموزومی بیش‌تر بود و آزمون‌های معنی‌دار چند متغیره نیز حکایت از این داشت که این دو نمونه متعلق به یک جامعه هستند (جدول ٥) اما این دو نمونه از نظر طول کروماتین مجموعه هاپلویید اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ٦).

حال با توجه به این‌که طول بازوها و کروموزوم‌ها و بالطبع، طول کروماتین مجموعه هاپلویید، می‌تواند تحت تأثیر مرحله و میزان انقباض و تیمارهای شیمیایی استفاده شده قرار گیرد، آزمون‌های چند متغیره برای نسبت بازوهای ٢٠ کروموزوم مجموعه هاپلویید این دو نمونه انجام شد که نتایج آن (جدول ٧) مؤید نتایج آزمون‌های چند متغیره برای متغیرهای کاریوتیپی 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 ٨ معنی‌دار می‌باشد و این اختلاف معنی‌دار ناشی از اختلاف معنی‌دار بین دو نمونه از حیث طول بازوی کوتاه این کروموزوم می‌باشد.

برای گروه‌بندی و تشخیص نمونه‌های مشابه بر اساس کلیه متغیرهای کروموزومی و کاریوتیپی، تجزیه کلاستر به روش Ward نیز صورت گرفت و همان گونه که در دندروگرام مربوطه (شکل ١) مشاهده می‌شود، نمونه‌ها به‌صورت مشخص در دو گروه تتراپلویید و دیپلویید قرار گرفتند. نمونه‌های دیپلویید رودان و نورآباد از جنوب، نزدیک‌ترین فاصله را به گروه نمونه‌های تتراپلویید (یعنی کهنوج و میناب از جنوب) داشتند و به‌طور کلی نمونه‌های شمال که همگی دیپلویید بودند، با بیش‌ترین فاصله نسبت به نمونه‌های دیپلویید و تتراپلویید جنوب قرار گرفتند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از شمال شباهت بیش‌تری به یکدیگر داشته و در کلاس‌های نزدیک به‌هم قرار گرفتند. طویل‌ترین طول کروماتین کروموزوم‌های پایه در نمونه رودان و بالاترین مقادیر پارامترهای تقارن کاریوتیپ در نمونه جیرفت (جدول ١) موجب تمایز و تفکیک این دو نمونه از سایر نمونه‌ها شده و نشان‌دهنده تنوع کاریوتیپی نیشکر وحشی در منطقه جنوب بود. این تنوع کاریوتیپی در نمونه‌های منطقه جنوب را می‌توان ناشی از تنوع خصوصیات جغرافیایی محل‌های جمع‌آوری نمونه‌ها به‌خصوص از لحاظ ارتفاع و عرض جغرافیایی دانست و نمونه‌ها را به‌عنوان اکوتیپ‌های مختلف *S. spontaneum* قلمداد نمود.

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

از طرف دیگر، در انواع مختلف تجزیه کلاسترهایی که از لحاظ نوع متغیرها در گروه نمونه‌های دیپلویید 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 صورتی‌که رابطه فیلوژنی این دو گروه اثبات شود، *S. spontaneum*هایی با 2n=20 کروموزوم برای اولین بار معرفی می‌شود. از طرف دیگر، تعداد کروموزوم پایه در *S. spontaneum*، ۸ یا ۱۰ ذکر شده‌است (Sreenivasan et al. 1987; D'Hont et al. 1996) بنابراین شناخت نمونه‌های دیپلویید (2n=16 یا 2n=20) می‌تواند در تبیین روابط فیلوژنی گونه زراعی *S. officinarum* با سایر گونه‌های جنس *Saccharum* مفید واقع شود.

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

اثر	آماره	مقدار	F	dfفرضیه	dfخطا	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 معنی‌دار بودن تفاوت‌هاست.

جدول ٤- تجزیه واریانس متغیرهای کاریوتیپی نمونه‌های نیشکر وحشی با 2n=20 کروموزوم.

		مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	F	سطح احتمال
درصد شکل کلی	Between Groups	2.053	8	.257	.523^{ns}	.831
	Within Groups	18.143	37	.490		
	Total	20.196	45			
شاخص تقارن	Between Groups	502.940	8	62.868	2.756*	.017
	Within Groups	844.107	37	22.814		
	Total	1347.047	45			
ضریب تنوع	Between Groups	61.448	8	7.681	2.199*	.050
	Within Groups	129.244	37	3.493		
	Total	190.692	45			
تفاوت محدوده طول نسبی	Between Groups	13.295	8	1.662	2.125*	.058
	Within Groups	28.942	37	.782		
	Total	42.237	45			
شاخص تفرق	Between Groups	2.565	8	.321	2.790*	.016
	Within Groups	4.253	37	.115		
	Total	6.818	45			
طول کروماتین مجموعه هاپلویید	Between Groups	1457.170	8	182.146	28.476**	.000
	Within Groups	236.672	37	6.397		
	Total	1693.842	45			

سطح احتمال < 0.05 نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلافات است.

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

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

اثر	آماره	مقدار	F	فرضیه df	خطا df	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 معنی‌دار بودن تفاوت‌هاست.

جدول ٦- تجزیه واریانس متغیرهای کاریوتیپی نمونه‌های 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 هاپلویید	Between Groups	755.296	1	755.296	15.281**	.006
	Within Groups	345.989	7	49.427		
	Total	1101.285	8			

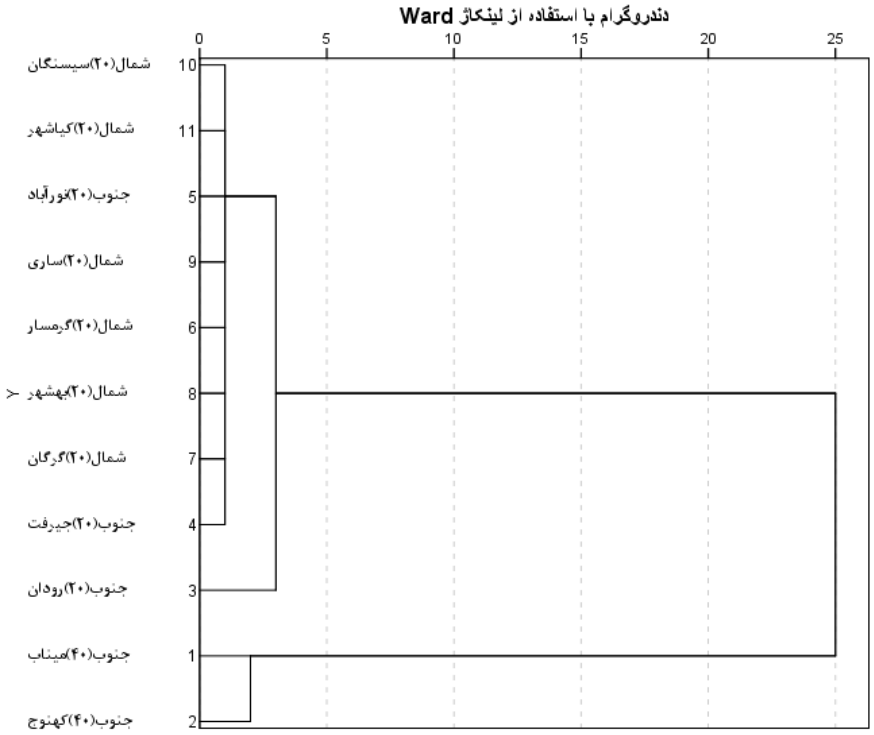
سطح احتمال < 0.05 نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلافات است.

جدول ۷- نتایج چهار آزمون چند متغیره (اثر پیلای، لمبدای ویلکس، اثر هتلینگ و بزرگ‌ترین ریشه روی) بین نمونه‌های 2n=40 از حیث مجموعه متغیرهای نسبت بازوهای کروموزوم‌های مجموعه هاپلویید.

اثر	آماره	مقدار	F	فرضیه df	خطا df	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 معنی‌دار بودن تفاوت‌هاست.

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر نمونه‌های نیشکر وحشی شمال و جنوب با استفاده از روش Ward بر مبنای داده‌های کاریوتیپی: طول کروماتین مجموعه هاپلویید (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 Omidi, Y Aghyev, and MR Bihamta (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 Scorial; 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.

Downloaded from mg.genetics.ir at 2:31 +0430 on Saturday June 19th 2021

Janaki Ammal, EK and TSN Singh (1936). A preliminary note on a new Saccharum-Sorghum hybrid. Indian Journal Agricultural Science 6: 1105-1106.

Kanadasami PA (1960). Economic characters or triploids of Saccharum spontaneum L and their utilization in sugarcane breeding. Science Culture 25: 491-492.

Kanadasami 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. Uberdichromosomenzahl von Zea mays L. Bot. Mag. Tokyo 29:83-89.

Lavania 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). Nomencalture 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.

Pursglove 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 lranica(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.