تنوع سطح پلوئیدی مانعی در دورگ‌گیری میان گونه‌ای در جنس برموس *Bromus* spp.

حسین میرزایی ندوشن[۱]، حسن مداح عارفی[۲]، فرشته اسدی کرم[۲] و آناهیتا شریعت[۲]

چکیده

ده گونه مختلف از جنس برموس جهت بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعات سیتوژنتیکی و انجام تلاقیهای میان گونه‌ای انتخاب شده و در قالب یک طرح آزمایشی مزرعه‌ای کاشته شدند. ضمن مطالعه گسترده این گونه‌ها در زمینه‌های مورد نظر، نسبت به انجام تلاقیهای میان گونه‌ای نیز اقدام شد و تعداد زیادی دورگ‌گیری در زمان مناسب صورت گرفت که به‌طور عمده فاقد نتیجه مناسب بود.

عوامل متعددی امکان استفاده از کلیه گونه‌های مورد مطالعه را در اجرای تلاقیهای میان گونه‌ای محدود می‌نمود. عدم همپوشانی دوره گلدهی این گونه‌ها در شرایط مزرعه، ریزی اجزاء گل در برخی از گونه‌ها و تنوع سطح پلوئیدی از موانع عمده در اجرای تلاقیهای میان گونه‌ای قلمداد گردید. سطوح مختلف پلوئیدی و آنیوپلوئیدی در گونه‌ها و جمعیتهای مورد مطالعه مشاهده گردید. کمترین تعداد کروموزوم و سطح پلوئیدی در گونه‌های *Bromus inermis*، *B. cappadocicus* و *B. sterilis* (۲n =۲x =۱۴) و بیشترین تعداد کروموزوم و سطح پلوئیدی در گونه *B. tomentellus*، (۲n =۸۴) مشاهده گردید. تعداد زیادی از سلولهای مورد مطالعه، سطح پلوئیدی بالا یا شکلی از آنیوپلوئیدی را داشتند. جمعیتهایی با سطوح پلوئیدی میانی نیز در میان گونه‌های مورد مطالعه مشاهده گردید. علاوه بر تفاوت در تعداد کروموزومها تفاوتهای زیادی در اندازه کروموزومها و نیز تقارن کاریوتیپی جمعیتهای مورد مطالعه مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: برموس، پلی‌پلوئیدی، دورگ‌گیری میان گونه‌ای و سیتوژنتیک

۱- مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج. E-mail: nodoushan2003@yahoo.com

۲- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران.

مقدمه

استفاده از روشهای کلاسیک چون دورگ‌گیری میان گونه‌ای در اصلاح گونه‌های مختلف گیاهی از جمله گونه‌های مختلف مرتعی از روشهایی است که هنوز کاربرد بسیار گسترده‌ای در میان بهنژادگران دارد. سالهاست که از این روش در انتقال صفات مطلوب از یک گونه به گونه دیگر استفاده می‌شود. اگرچه ظهور و رشد بیوتکنولوژی و امکان انتقال ژن از گونه‌ای به گونه دیگر از طریق مهندسی ژنتیک چشم انداز مناسبی را در کوتاه کردن طول دوره اصلاح برخی از گونه‌های گیاهی ایجاد نموده است ولی استفاده از این روش مستلزم مقدماتی است که در هر گونه و هر صفتی فراهم نیست. از این رو به نظر می‌رسد که در انتقال ویژگیهای مطلوب از یک گونه به گونه دیگر به ویژه در گونه‌های مرتعی که اغلب هنوز شناخت مناسبی از نظر نقشه ژنتیکی آنها وجود ندارد دورگ‌گیری میان گونه‌ای به عنوان تنها راه مؤثر می‌تواند مورد استفاده محققان قرار گیرد. با این حال در این راه نیز موانعی وجود دارد که عمده‌ترین آنها را می‌توان عدم سازگاری ژنومی و نیز تفاوت در سطح پلوئیدی و ویژگیهای کاریوتیپی دانست. به این ترتیب شرط مؤفقیت در اجرای طرحهای دورگ‌گیری میان گونه‌ای داشتن اطلاع کافی در این زمینه می‌باشد.

تنوع در ویژگیهای کروموزومی به طور مکرر در گونه‌های مختلف گیاهی مشاهده شده و تعداد کروموزوم از گونه‌ای به گونه دیگر و نیز از جمعیتی از یک گونه به جمعیت دیگر از همان گونه گیاهی ممکن است متفاوت باشد. یکی از انواع شایع این تنوعات، تفاوت در تعداد کروموزومهاست و حالتهای مختلف آنیوپلوئیدی، میکسوپلوئیدی و پلی‌پلوئیدی از جمله این تنوعات می‌باشند. گونه‌های مختلف جنس برومو‌س در سطح وسیعی از کشور ما پراکنده شده و دارای اهمیت زیادی از نظر تولید علوفه هستند. بیشتر این گونه‌ها از نظر ویژگیهای اکولوژیکی مورد مطالعات نسبی قرار گرفته‌اند. مطالعات سیتوژنتیکی و شناخت ویژگیهای کاریوتیپی این گونه‌ها نیز در سطح

کشور و نیز در سطح بین‌المللی صورت گرفته است. به طوری که برای هریک از گونه‌های این جنس سطوح متفاوت پلوئیدی و حتی تعداد متفاوت کروموزوم پایه ذکر گردیده است (برهان، ۱۳۷۰ و Mirzaie-Nodoushan و همکاران، ۲۰۰۰). در سطح بین‌المللی نیز گونه‌های مختلف بروموس مورد توجه محققان بوده و مطالعاتی در زمینه بررسی سطح پلوئیدی و ویژگیهای کاریوتیپی گونه‌های مختلف این جنس و سازگاری این گونه‌ها در تلاقیهای میان گونه‌ای مورد توجه قرار گرفته است. در بررسی کاریوتیپی گونه‌های بروموس توسط Oja و Laarmann (۲۰۰۲) تأکید شده است که در این جنس سطح پلوئیدی در جمعیتهای مختلف یک گونه نیز متفاوت است. Joachimiak و همکاران (۲۰۰۱) نیز به‌این نتیجه رسیدند که بسیاری از کروموزومهای گونه‌های مختلف بروموس از نظر اندازه و محل قرار گرفتن سانترومر با هم تشابهی اساسی دارند. استفاده از روش C-Banding نیز این موضوع را تأیید نموده است (Oja و Laarmann، ۲۰۰۲ و Yang و Dunn، ۱۹۹۷). بر این اساس Joachimiak و همکاران (۲۰۰۱) پیشنهاد نموده‌اند که از اندازه ماهواره‌های کروموزومی در تشخیص گونه‌ها استفاده شود.

در مطالعات گسترده‌ای که در قالب یک طرح ملی در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع صورت گرفت ویژگیهای مورفولوژیکی، ژنتیکی و سیتوژنتیکی چندین گونه از این جنس مورد بررسی قرار گرفت تا ضمن بررسی تنوع ژنتیکی موجود در برخی از جمعیتهای گونه‌های خوشخوراک این جنس با مطالعات سیتوژنتیکی و بررسی سطوح پلوئیدی گونه‌های مختلف امکان تلاقی میان گونه‌ای با اهداف اصلاحی نیز بررسی گردد.

از آنجاکه تقارن کاریوتیپی یکسان و نیز تشابه سطح پلوئیدی و تعداد کروموزومهای پایه یکسان شرط اول سازگاری دو گونه در انجام تلاقیهای میان گونه‌ای در رسیدن به اهداف اصلاحی با روشهای کلاسیک است جمعیتهای مورد مطالعه از نظر این ویژگیها

مورد مقایسه قرار گرفتند. بخشی از این نتایج در گزارشهای تکمیلی ارائه گردیده است (میرزایی ندوشن، ۱۳۸۱).

به طور کلی اهداف اجرای این تحقیق را می‌توان به شرح زیر خلاصه نمود:

- بررسی سطح پلوئیدی و ویژگیهای کاریوتیپی جمعیتها و گونه‌های مختلف برروموس
- بررسی سازگاری ژنومی گونه‌های مورد نظر در انجام تلاقیهای میان گونه‌ای از نظر ویژگیهای کاریوتیپی

مواد و روشها

جمعیتهایی از ده گونه مختلف از جنس برروموس به نامهای *B. inermis, B. hankegnus, B. cappadocicus, B. biebersnil, B. sterilis, B. tomentellus, B. tomentosus, B. tectorom, B. unioloides, B. viparius* جهت انجام مطالعات سیتوژنتیکی، مورفولوژیکی و ژنتیکی انتخاب شده و در قالب یک طرح مزرعه‌ای در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کاشته شدند. ضمن انجام مطالعاتی فراگیر و گسترده این جمعیتها در زمینه‌های مورد نظر نسبت به انجام تلاقیهای میان گونه‌ای نیز اقدام شد و تعداد زیادی دورگ‌گیری در زمان مناسب صورت گرفت. به‌این منظور ابتدا زمان رسیدن گرده در ژنوتیپهای مورد نظر شناسایی گردید و بر اساس آن زمان مناسب برداشتن کیسه‌های گرده از پایه‌های مادری تعیین شد. در ادامه، تلاقیهای مختلفی میان چندین ترکیب از گونه‌های انتخابی صورت گرفت که به‌طورعمده فاقد نتیجه مناسب بود. از این‌رو بررسی سطح پلوئیدی و نیز سایر موانع موجود در دستور کار قرار گرفت که بررسی سطح پلوئیدی از عمده‌ترین آنهاست. به این منظور کلیه جمعیتها و نمونه‌های مورد نظر از حیث ویژگیهای کاریوتیپی نیز مورد بررسیهای مکرر قرار گرفتند. از آنجا که هدف از اجرای این مطالعات یافتن جمعیتهایی از گونه‌های مختلف از این جنس بود که از نظر ویژگیهای کاریوتیپی حداکثر تشابه و کمترین ناسازگاری را

با یکدیگر داشته باشند، از این‌رو تعداد زیادی از جمعیتهای گونه‌های در دسترس، مورد بررسیهای کاریوتیپی قرار گرفتند. جهت انجام مطالعات میکروسکپی ابتدا بذرها با قارچکش بنومیل ضد عفونی شده و با قرار دادن بر روی کاغذ صافی مرطوب جوانه دار شدند. پس از جوانه‌دار شدن و برداشت ریشه‌های در حال رشد، آنها را به مدت ۳ ساعت در محلول اشباع آلفا برومونفتالین قرار داده و پس از شستشوی کامل به مدت حدود یک شبانه روز در محلول فارمر تثبیت شدند. هیدرولیز ریشه‌ها با اسید کلریدریک یک نرمال در دمای شصت درجه سانتیگراد صورت گرفت. نمونه‌ها با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردیدند و با جدا کردن مریستم انتهایی نمونه‌های میکروسکپی تهیه گردیده و مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از یافتن سلولهای متافازی مناسب، تعداد کروموزومها شمارش شده و جمعیتها از حیث سطح پلوئیدی بررسی گردیدند.

نتایج

تنوع ژنتیکی وسیعی در ویژگیهای مورفولوژیکی، فنولوژیکی و نیز اجزاء عملکرد جمعیتهای مختلف مورد نظر مشاهده گردید که به سهم خود اجرای تلاقیهای میان گونه‌ای را توجیه می‌نمود. ولی عوامل متعددی امکان استفاده از کلیه گونه‌های مورد مطالعه را در اجرای تلاقیهای میان گونه‌ای محدود می‌نمود. از جمله این عوامل عدم همپوشانی دوره گلدهی این گونه‌ها در شرایط مزرعه بود. به نحوی که به عنوان مثال گونه‌های یکساله نظیر *B. tectorom* سریع به ساقه رفته و دوره گلدهی را به پایان می‌رسانند. در حالی که گونه‌های چند ساله نظیر *B. inermis* زمان طولانی‌تری را در مرحله رویشی به سر برده و بسیار دیرتر به ساقه و گل می‌روند. البته به شرط مساعد بودن سایر عوامل، ذخیره گرده این گونه‌ها و استفاده از آن در تلاقی پایه‌های مادری سایر گونه‌ها در زمان ظهور گل آذین آنها می‌تواند چاره این مشکل باشد.

ریزی اجزاء گل در برخی از گونه‌ها عامل دیگری است که به سهم خود می‌تواند در اجرای تلاقیهای میان گونه‌ای مشکل ایجاد نماید. در این خصوص گونه *B. cappadocicus* دارای گلهای بسیار ریزی است که تشخیص کیسه گرده آن در زمان رسیدن گرده با چشم غیر مسلح مشکل است. به عبارت دیگر کیسه‌های گرده این گونه در زمان اوج رسیدگی به طول تقریبی ۰/۵ میلیمتر می‌باشد (شکل شماره ۱) در حالی‌که کیسه گرده گونه‌هایی نظیر *B. tomentellus* در زمان اوج رسیدگی گرده بسیار بزرگ بوده (حدود ۵ میلیمتر) و به آسانی قابل مطالعه می‌باشند (شکل شماره ۲).

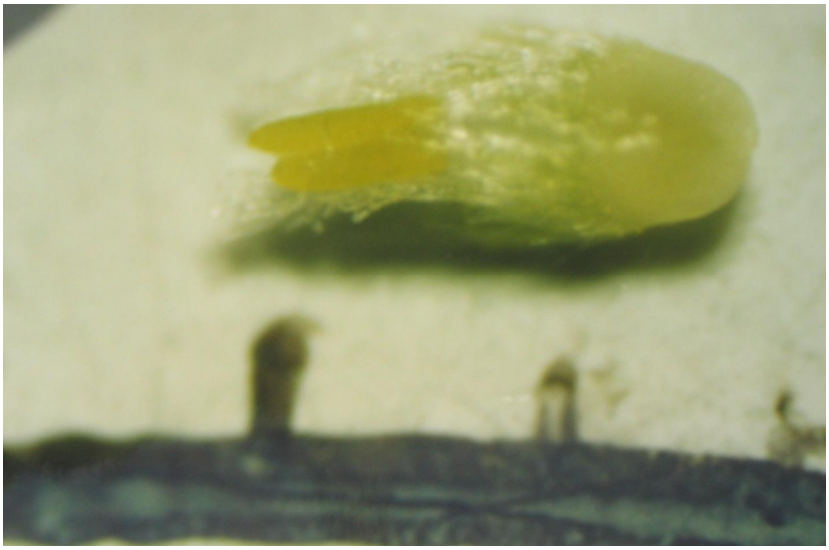
تنوع سطح پلوئیدی یکی از موانع عمده در اجرای تلاقیهای میان گونه‌ای است که در سطح وسیعی این تنوع در درون و میان جمعیتهای مختلف جنس برموس مشاهده گردید. سطوح مختلف پلوئیدی و آنیوپلوئیدی در گونه‌ها و جمعیتهای مورد مطالعه مشاهده گردید. کمترین تعداد کروموزوم و سطح پلوئیدی در گونه‌های *Bromus inermis*، *Bromus cappadocicus* و *Bromus sterilis* (۲n =۲x =۱۴) و بیشترین تعداد کروموزوم و سطح پلوئیدی در گونه *Bromus tomentellus* (۲n =۸۴) مشاهده گردید (شکل شماره ۳). البته در این گونه سلولهایی با حدود ۱۶۵ کروموزوم نیز مشاهده گردید که به دلیل فراوانی کم، پایدار تلقی نشد (شکل شماره ۴). از نظر تعداد کروموزوم در بیشتر سلولهای مورد مطالعه در جمعیتهای با سطح پلوئیدی و تعداد کروموزوم بالا تعداد کروموزوم در حدی نبود که بتوان به طور قطع یک سطح پلوئیدی مشخصی را قائل گردید. سطوح بالای پلوئیدی امری رایج در میان گونه‌های مختلف برموس بود که اطلاعات مربوط به آن مورد توجه قرار گرفت (میرزایی ندوشن و اسدی کرم، ۱۳۸۴). برخی از جمعیتهای مورد مطالعه دارای سطوح متفاوت پلوئیدی بودند. از جمله گونه *B. inermis* به رغم اینکه گفته می‌شود گونه‌ای وارداتی و اصلاح شده است و نباید تنوع چندانی از این نظر در میان جمعیتهای مورد مطالعه آن وجود داشته باشد سلولهایی با تعداد کروموزومهای ۲n=۱۴ و ۲n=۵۶ نیز در این

جمعیتها مشاهده گردید (شکل شماره ۵). این پدیده در میان جمعیتهای گونه *Bromus tomentellus* نیز مشاهده گردید. به عبارت دیگر در این گونه جمعیتهایی با تعداد کروموزومهای ۲n= ۲۸ و ۲n= ۸۴ مشاهده شد. جمعیتهایی با سطوح پلوئیدی میانی نیز در میان گونه‌های مورد مطالعه مشاهده گردید. علاوه بر تفاوت در تعداد کروموزومها تفاوتهای زیادی در اندازه کروموزومها و نیز تقارن کاریوتیپی جمعیتهای مورد مطالعه مشاهده گردید که در جای دیگر مورد بحث قرار گرفته است (میرزایی ندوشن، ۱۳۸۱). همین‌طور آنیوپلوئیدی به شکلهای مختلف در گونه‌هایی از این جنس مشاهده گردید (شکل شماره ۶).

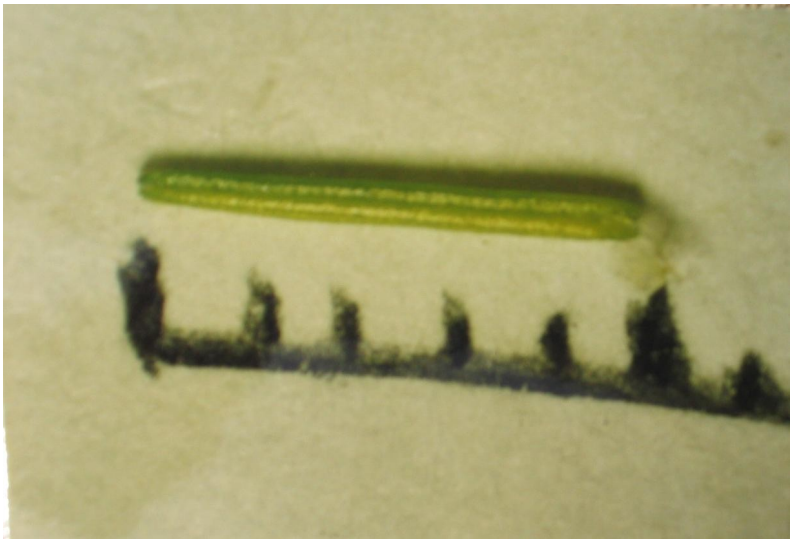
بدیهی است که در گونه‌هایی که به طور وحشی در طبیعت به سر می‌برند و سالهای متمادی است که بدون دخالت بشر زاد و ولد کرده و در معرض تحولات ژنتیکی و تطور و تکامل بوده‌اند تنوع ژنتیکی و کاریوتیپی در این سطح مشاهده گردد. همین تنوع و تفاوتهای ژنتیکی است که این گونه‌ها را قادر می‌سازد که در شرایط حاد طبیعی که گاهی بسیار فراتر از توان طبیعی این گونه‌هاست دوام آورده و از میان نروند. گونه‌هایی نظیر *B. tomentellus* که در عرصه‌های گسترده‌ای از کشور رویش دارند به نحو مؤثرتری از این تنوع برخوردارند. به نظر می‌رسد که با وجود برخورداری گونه‌هایی نظیر *B. tomentellus* از سطوح متفاوت پلوئیدی و آنیوپلوئیدی انشقاق گونه‌های جدید با ویژگیهای کاملا متفاوت از گونه اولیه بعید نباشد. به طور کلی با وجود گسترش این گونه در سطح وسیعی از کشور و برخورداری از تنوع ژنتیکی، مورفولوژیکی و کاریوتیپی گسترده، این گونه بیشتر در معرض تحولات ناشی از فرایند تکامل قرار دارد. سایر مطالعات صورت گرفته در سطح بین‌المللی نیز نتایج این تحقیق را تأیید می‌نماید. به طوری که Oja و Laarmann (۲۰۰۲) نیز به این نتیجه رسیده‌اند که در این جنس سطح پلوئیدی در جمعیتهای مختلف یک گونه نیز متفاوت است. البته به رغم ویژگیهای متفاوت کاریوتیپی و سطوح مختلف کاریوتیپی Joachimiak و همکاران

(۲۰۰۱) به این نتیجه رسیدند که بسیاری از کروموزومهای گونه‌های مختلف برروموس از نظر اندازه و محل قرار گرفتن سانترومر با هم تشابه اساسی دارند.

از گونه‌هایی نظیر *B. inermis* که گفته می‌شود گونه‌ای وارداتی است و بومی ایران نمی‌باشد انتظار نمی‌رفت که از نظر ویژگیهای کاریوتیپی تنوع چندانی نشان دهند. با این وجود جمعیتهای مختلف این گونه دو سطح مختلف پلوئیدی از خود نشان دادند. البته تنوع سطح پلوئیدی در درون جمعیتهای این گونه کمتر مشاهده گردید که احتمال قرار گرفتن این جمعیت در فرایندهای اصلاحی را تقویت می‌کند. این کمبود تنوع در ویژگیهای مورفولوژیکی جمعیتی از این گونه نیز مشاهده گردید که در جای دیگر به آن پرداخته شده است (میرزایی ندوشن و حیدری شریف آباد، ۱۳۸۴).



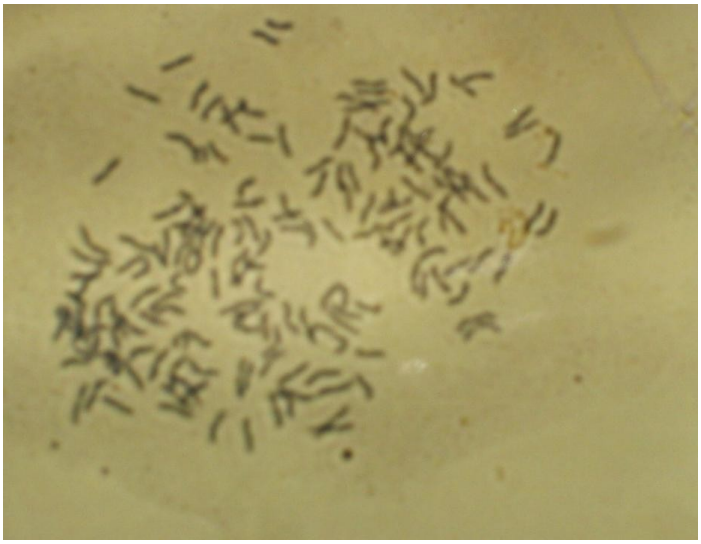
شکل شماره ۱- کیسه گرده گونه *B. cappadocicus* به همراه جنین نارس



شکل شماره ۲- کیسه گرده گونه ***Bromus tomentellus***

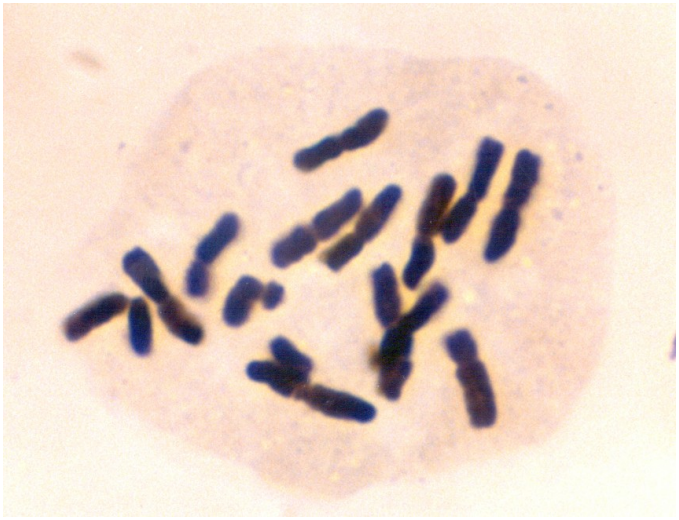
شکل شماره ۳- کروموزومهای متافازی تقسیم میتوز

در گونه ***B. tomentellus*** (۲n = ۸۴)



شکل شماره ۴- کروموزومهای متافازی تقسیم میتوز
در گونه *B. tomentellus* (۲n = ۱۵۶)

شکل شماره ۵- کروموزومهای متافازی تقسیم میتوز در گونه *B. inermis* (۲n = ۵۶)



شکل شماره ۶- کروموزومهای متافازی تقسیم میتوز در گونه *B. cappadocicus* (۲n = ۱۵)

سپاسگزاری

از مسئولان محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که امکانات اجرای این پروژه را در اختیار ما قرار دادند صمیمانه قدردانی نموده و از کلیه همکاران بخش ژنتیک و فیزیولوژی این مؤسسه که به اتفاق، فضایی گرم و تحقیقاتی را فراهم نموده و از هیچ کمکی دریغ نورزیدند کمال تشکر را داریم.

منابع

برهان، م.، ۱۳۷۰. بررسی سیتولوژیک برموسهای چند ساله البرز مرکزی. پایان نامه فوق لیسانس، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

میرزایی ندوشن، ح.، ۱۳۸۱. مطالعه ژنتیکی گراسهای مرتعی موجود در بانک ژن و بررسی امکان تلاقی میان گونه‌ای به منظور دستیابی به پتانسیلهای موجود در گونه‌های مرتعی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

میرزایی ندوشن، ح. و اسدی کرم، ف.، ۱۳۸۴. سطوح بالای پلوئیدی در گونه‌هائی از جنس برموس .*Bromus* spp. اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای کشور. کرج، ۴۱۸-۴۱۷.

میرزایی ندوشن، ح. و حیدری شریف آباد، ح.، ۱۳۸۴. ساختار ژنتیکی جمعیتی از گیاه مرتعی برموس اینرمیس (*Bromus inermis*). اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای کشور. کرج، ۴۱۵-۴۱۶.

Mirzaie-Nodoushan, H., Zebarjadi, A.R. and Karimzadeh, Gh. 2000. Karyotypic investigations of several *Bromus tomentellus* populations and their karyotypic correlations. Iran. Journ. Bot. 8: 287-298.

Joachimiak, A., Kula, A., Sliwinska, E. and Sobieszczanska, A., 2001. C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species. Acta Biol Cracov Ser Bot., 43:105-115.

Oja, T. and Laarmann, H., 2002. Comparative study of the ploidy series *Bromus sterilis*, *B. diandrus* and *B. rigidus* (Poaceae) based on chromosome numbers, morphology and isozymes. Plant Biology, 4:484-491.

Tuna, M., Gill, K.S. and Vogel, K.P. 2001. Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in diploid bromegrass (*Bromus riparius* Rehm). Crop Science, 41:831-834.

Yang, G. and Dunn, G.M. 1997. Mitotic instabilities in tetraploid, hexaploid and octaploid *Bromus inermis*. Can. J. Genetics and Cytology, 19: 550-553.