

مطالعه کاربولوجیکی زردآلو، آلوچه و یک دورگ طبیعی داخل جنس *Prunus*

به نام "تنسگل" (*P. cerasifera* × *P. spp.*)

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۲ / پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۹

عیسی ظریفی✉: محقق سیتوژنتیک بخش تحقیقات ژنتیک و ذخایر توارثی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران (e.zarifi@areeo.ac.ir; ezarifi@yahoo.com)
رحیم قره‌شیخ بیات: استادیار پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

تعداد کروموزوم‌ها و مورفولوژی کاربوتیپ، از جمله طول کروموزوم، موقعیت سانترومر، نسبت بازوها، فرورفتگی ثانویه و خصوصیات رنگ‌آمیزی با استوایرون همتوکسیلین برای گونه‌های زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و یک دورگ طبیعی جدید به نام "تنسگل" (*P. cerasifera* × *P. spp.*) مورد بررسی قرار گرفت. مریستم نوک ریشه حاصل از بذور جوانه‌زده در دمای ۴-۶ درجه سلسیوس و نهال‌های جوان در محلول هیدروکسی کینولین دوهزارم مولار به همراه ۵۰ قطره DMSO پیش تیمار شدند. همه گونه‌ها دارای $2n=2x=16$ کروموزوم خیلی کوچک بوده و به طور یکنواخت رنگ‌آمیزی شدند. دامنه تغییر طول کروموزوم‌ها در گونه‌ها به شرح زیر بود: زردآلو (*Prunus armeniaca*) ۱/۵۰ تا ۲/۷۰ میکرومتر، آلوچه (*P. cerasifera*) ۱/۵۴ تا ۲/۷۷ میکرومتر و تنسگل ۱/۳۵ تا ۲/۸۲ میکرومتر. برای تمایز گونه‌ها، ویژگی‌های دیگر کروموزوم‌ها مانند تنوع طول کروموزوم‌ها در درون گونه‌ها، تعداد ساتلایت و اندازه آن، فرورفتگی‌ها و محل قرارگیری سانترومرها مورد استفاده قرار گرفت. شباهت‌ها و تفاوت‌های مورفولوژی کروموزوم‌ها در گونه‌ها با آنالیز کاربوجراف‌ها براساس طول نسبی کروموزوم و شاخص کروموزوم انجام شد. شباهت کروموزومی بین تنسگل (TANASGOL) و آلوچه *P. cerasifera* بیشتر مشهود است.

واژه‌های کلیدی: سیتوژنتیک، کاربوتیپ، کاربوجراف، کروموزوم، مورفولوژی

Karyological study of apricot, cherry plum and a natural hybrid in the *Prunus* genus "TANASGOL" (*P. cerasifera* × *P. spp.*)

Received: 23.12.2017 / Accepted: 09.05.2018

Eissa Zarifi✉: Researcher, Genetics and Genetic Resources Research Department, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (e.zarifi@yahoo.com; e.zarifi@areeo.ac.ir)

Rahim Gharesehkhayat: Assistant Prof., Temperate Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute (HSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Summary

Chromosome number and karyotype morphology including chromosome length, centromere position, arm ratio, secondary constriction and staining properties by aceto-iron-hematoxylin were analyzed for *Prunus* species of apricot (*Prunus armeniaca* L.), plum (*P. cerasifera* Ehrh.) and a natural new hybrid known as "TANASGOL" (*P. cerasifera* × *P. spp.*). The obtained root tips from germinated seeds at 4-6 °C and young seedlings were pretreated in hydroxyquinoline solution with 50 drops of DMSO. All species had $2n=2x=16$ very small chromosomes and were uniformly stained. The ranges of chromosome length in the three species were as follows: apricot (*Prunus armeniaca*) 1.50 to 2.70 μm, plum (*P. cerasifera*) 1.54 to 2.77 μm, and (*P. cerasifera* × *P. spp.*) "TANASGOL" 1.35 to 2.82 μm. Other features of the chromosomes, such as variation in the length of chromosomes within species, number of satellites and size, constrictions, centromere placements and karyographs were used to distinguish species. The similarities and differences of chromosomes morphology in species were analyzed by karyographs based on Relative Length (RL%) and Chromosome Index (CI). Chromosomal similarities between "TANASGOL" and plum (*P. cerasifera*) were more evident.

Keywords: Chromosome, cytogenetics, karyographs, karyotype, morphology

مقدمه

میوه‌های خزان‌کننده بوده و گونه‌های مختلف آن در سرتاسر نیمکره شمالی به صورت بومی وجود دارند.

مطالعات آنالیز کاربوتیپی روی جنس *Prunus* و گونه‌های آن نسبت به دیگر گیاهان علفی و درختی کم انجام شده و بنابر دلایلی که ذکر می‌شود، بسیار مشکل می‌باشد. گونه‌های این جنس دارای کروموزوم‌های بسیار کوچک، طول آن‌ها در سلول‌های نوک ریشه 3-1/5 میکرومتر بوده و کروموزوم‌ها از نظر مورفولوژی خیلی به هم شبیه هستند. رنگ‌پذیری کروموزوم‌ها با رنگ‌های بیولوژی رایج خیلی ضعیف بوده و کروموزوم‌ها بیشتر تمایل به چسبیدگی و روی هم افتادگی در صفحات متافاز دارند. شکل کروموزوم‌ها و فرورفتگی‌های کروموزوم‌ها غیرواضح می‌شود. جوانه‌دار کردن بذور آن‌ها نیز برای مطالعات سیتولوژی زمان بر بوده و به دست آوردن مرستم نوک ریشه مناسب و به موقع نیز سخت می‌باشد. بنابراین، وجود گزارش‌هایی از خصوصیات کاربوتیپی در این جنس نادر است. در سال‌های اخیر، تنها گزارش کاربوتیپی که از جنس *Prunus* ارائه شده، نتیجه پروژه تحقیقاتی روی 12 گونه وحشی بادام *Prunus subgenus amygdalus* L. و درخت هلو (*P. persica*) است که از مناطق مختلف اکولوژیکی ایران جمع‌آوری شده بودند (Zarifi 2013). همه گونه‌ها دارای $2n=2x=16$ کروموزوم و تیپ کروموزوم‌ها در گونه‌های مورد مطالعه بیشتر متاسانتریک و ساب‌متاسانتریک بودند.

کاربوتیپی، جنبه‌های فنوتیپی مجموعه کروموزومی یک گونه را از لحاظ تعداد، اندازه، نسبت بازو (یا موقعیت سانترومر) و دیگر ویژگی‌های برجسته کروموزوم‌های آن توصیف می‌کند (Levin 2002). در گیاهان، آنالیز سیتوتزنتیکی به طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک، تکامل، فیلوژنی، خاستگاه و سیتوتاکسونومی به کار گرفته شده است. همچنین، در تعیین استراتژی‌های اصلاح نباتات در انتقال ژن‌های مقاومت از طریق دستکاری پلی‌پلویدی استفاده می‌شود (Zarifi & Gülo lu 2016). این مطالعات، یکی از مهم‌ترین ابزارهای بهبود ژنتیک و قابل استفاده در برنامه‌های اصلاحی درختان میوه می‌باشد، به طوری که اطلاعات مربوط به تفاوت در تعداد و ساختار کروموزوم‌ها را در بین گونه‌های وحشی، ارقام اهلی شده یا کولتورها و دورگ‌ها، روشن می‌کند (Lespinasse et al. 1976, Schuster 1996).

در این تحقیق، از روش اسکوایش بهبود یافته توسط نگارندگان مقاله که برای رنگ‌آمیزی مؤثر کروموزوم‌های کوچک و بزرگ گونه‌های مختلف گیاهی و آنالیز جزئیات کامل کاربوتیپی آن‌ها کاربرد دارد، استفاده شده تا امکان شمارش

جنس *Prunus* L. بیش از 200 گونه از درختان خزان‌کننده، درختچه‌ای و همیشه سبز و با چندین عضو مختلف را داراست که تعدادی مانند هلو (*P. persica*)، زردآلو (*P. armeniaca* L.)، بادام (*P. dulcis* D.A. Webb)، آلو و گوجه (*P. domestica* و *P. salicina*, *P. cerasifera* Ehrh.) و گیلان (*P. avium*) دارای اهمیت اقتصادی میوه و محصول آجیلی می‌باشند (Chin et al. 2014).

طبقه‌بندی گیاه‌شناسی گونه‌ها در این جنس گاهی بحث‌برانگیز بوده، به جهت این که در بخشی از آن به راحتی دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای اتفاق می‌افتد (Casas et al. 1999) و تیپ‌های متعددی را ایجاد می‌کند که در نتیجه محدوده بین گونه‌ها را از بین می‌برد (Dosba et al. 1994). گونه‌های آلو در بخش مختلف تاکسونومیکی *Prunus* از هلو و بادام هستند و ممکن است وقتی به عنوان پایه پیوندی برای ارقام بادام استفاده می‌شوند، ناسازگاری نشان دهند (Kester 1970).

عدد پایه کروموزومی در جنس *Prunus* برابر 8 بوده ($x=8$) و پلی‌پلویدی نقش مهمی در روند تکامل گونه‌ها یا نژادهای جدید بازی می‌کند. دورگ‌گیری طبیعی بین‌گونه‌ای عامل پلی‌پلویدی جنس *Prunus* در طول فیلوژنی می‌باشد و از علل اصلی خود عقیمی (self-sterility) و درون عقیمی (intersterility) این جنس می‌باشد (OECD 2006). اعداد کروموزوم سوماتیکی (Rehder 1947, Zohary 1992, Tropicos.org. 2011) گونه‌های مختلف جنس *Prunus* از دیپلوید تا هگزاپلوید متغیر می‌باشد. تعداد کروموزوم‌های گونه‌های مربوط به آلو عبارتند از:

P. domestica, *P. simonii* ($2n=16$), *P. salicina* ($2n=16, 32$), *P. cerasifera*, *P. spinosa* ($2n=32, 24, 40, 48$), ($2n=48$), *P. insititia* ($2n=24, 48$), ($2n=16, 17, 24, 32, 48$), *P. americana* ($2n=16$), *P. × dasycarpa* ($2n=16$)

آلوی اروپایی که گونه *P. domestica* spp. *insititia* را شامل می‌شود، هگزاپلوید $2n=6x=48$ بوده و گونه *P. spinosa* تتراپلوید $2n=4x=32$ است، در حالی که *P. salicina* (آلوی ژاپنی) و همچنین بیشتر گونه‌های *Prunus* متعلق به این گروه از آلوها، دیپلوید $2n=2x=16$ هستند. بنابراین، بایستی وضعیت کروموزوم‌های دورگ‌های بین‌گونه‌ای مطالعه شود (Salesses, 1975, Zohary 1992, Faust et al. 1998, Rieger 2006). به طور کلی، دامنه انتشار و پراکندگی آلو بیشتر از سایر

مطالعه و صفحات خوب کروموزوم‌های متافازی با دوربین دیجیتالی عکسبرداری گردید.

پارامترهای کروموزوم‌ها در ۱۰-۵ صفحه متافازی براساس بزرگنمایی با استفاده از نرم‌افزار MicroMeasure 3.3 (Reeves 2001) انجام گردید. برای نام‌گذاری و کلاس‌بندی کروموزوم‌ها با توجه به محل سانترومر، از روش لوان و همکاران (Levan et al. 1964) استفاده شد. خصوصیات عددی کاربوتیپ گونه‌ها؛ بازوی بلند (L)، بازوی کوتاه (S)، نسبت بازوها (armratio)، میانگین طول کروموزوم‌ها، طول نسبی کروموزوم‌ها، شاخص سانترومری و خطای استاندارد با استفاده از نرم‌افزارهای آماری Excel 13 (Microsoft Excel) و SPSS v16 (http://www.ibm.com/analytics/us/en/technology/spss) محاسبه گردید.

نتیجه و بحث

بررسی‌های کروموزومی گونه‌های درختی میوه هسته‌دار زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و یک دورگ طبیعی از جنس *Prunus* (*P. cerasifera* × *P. spp.*) که به نام "تنسگل" معروف است نشان داد که تعداد کروموزوم‌های سوماتیکی آن‌ها همگی $2n=2x=16$ بودند و تفاوتی در تعداد نداشتند، ولی در مورفولوژی و تیپ کروموزوم‌ها به طور قابل توجهی تفاوت نشان دادند. این تفاوت‌ها در اندازه کروموزوم‌ها، موقعیت سانترومرها و اندازه فرورفتگی‌های ثانویه یا ساتلایت‌ها اتفاق افتاده است. در شکل ۱ و جدول‌های ۱ و ۲ به ترتیب صفحات متافازی و داده‌های کمی ویژگی‌های کروموزوم‌ها نشان داده شده است.

- زردآلو (*Prunus armeniaca* L.)

تعداد کروموزوم‌های سوماتیکی *Prunus armeniaca* $2n=2x=16$ و دیپلوئید بود (شکل ۱) که با گزارش‌های قبلی مطابقت دارد (Zohary 1992, Doroftei et al. 2010, Parveen 2015, Tropicos.org. 2011). از مورفولوژی کروموزوم‌های زردآلو، هشت جفت کروموزوم همولوگ مشخص شد. اندازه این کروموزوم‌ها متفاوت و معنی‌دار و بین ۱/۵-۲/۷۰ میکرومتر متغیر بودند (جدول ۱). زردآلو در کاربوتیپ خودش یک جفت کروموزوم خیلی کوچک و یک جفت کروموزوم خیلی بزرگ نسبت به بقیه داشت که کاملاً قابل مشاهده بود و تیپ هر دو جفت متاسانتریک بود. کروموزوم‌های ساتلایت‌دار در گونه فوق که تعداد آن‌ها دو جفت بود با رنگ‌آمیزی استوابیرون هماتوکسیلین (Zarifi & Gülo lu 2016) کاملاً قابل مشاهده

دقیق تعداد کروموزوم‌ها و پلی‌مورفیسم کاربوتیپی سه درخت میوه هسته‌دار زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و دورگ طبیعی و یا یک گونه جدید (*P. cerasifera* × *P. spp.*) که به نام "تنسگل" معروف است نیز آنالیز نتایج فراهم گردید.

روش بررسی

- مواد گیاهی

نهال‌های کوچک و جوان (حاصل شده از بذور کاشته شده در فصل پاییز در زمین) سه گونه درخت میوه هسته‌دار زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) از ایستگاه تحقیقاتی کمال شهر کرج و دورگ طبیعی (*P. cerasifera* × *P. spp.*) که به نام "تنسگل" معروف است و در مناطق شاهرود، تبریز، مشهد و کرج ایران پرورش داده می‌شود (Mirabdulbaghi et al. 2011)، برای مطالعات کاربیلوژی مورد استفاده قرار گرفت.

- مطالعه کروموزوم‌های سوماتیکی

مرحله مهم در مطالعه سیتوژنتیک گیاهان به دست آوردن سلول‌های در حال فعالیت تقسیم سلولی و قابل دسترس می‌باشد. به این منظور، بذور گونه‌های مختلف از پوسته سخت آن‌ها جدا شده و سپس با استفاده از روش ظریفی (Zarifi 2013) بذور جوانه‌دار شدند و مریستم نوک ریشه آن‌ها در مطالعه کروموزومی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، نهال‌های جوان و یکساله را به طور کامل از زمین خارج کرده و به گلدان‌های سیاه ($10 \times 10 \text{ cm}^3$) که با روش ظریفی و گول‌اغلو (Zarifi & Gülo lu 2016) تهیه شده بودند، منتقل نموده و داخل گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۶ درجه سلسیوس رشد داده شدند. از هر گونه، دو تا سه نهال که خوب رشد کرده بودند انتخاب و برای ادامه ریشه‌دهی مورد استفاده قرار گرفتند.

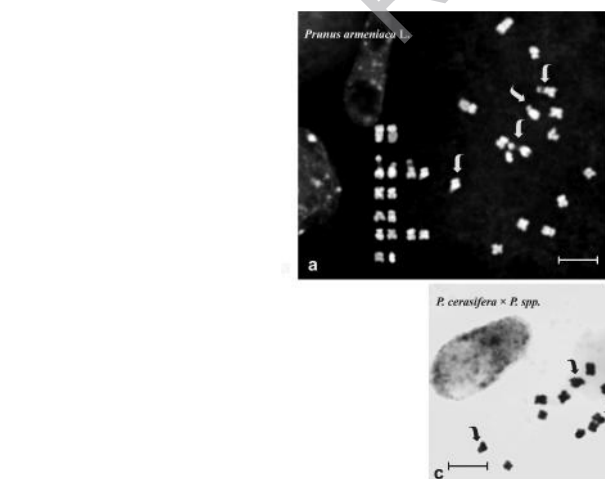
ریشه‌های به دست آمده از بذور جوانه‌زده و گلدان‌ها، در محلول ۸-هیدروکسی کینولین پیش تیمار شدند (Agayev et al. 2010). در این تحقیق، مقدار ۵۰ قطره از دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) را داخل ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول پیش تیمار اضافه کرده و ریشه‌ها تیمار شدند. سپس در محلول لویتسکی (Lewitsky) در دمای ۱۰-۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۶-۳۰ ساعت تثبیت شدند (Zarifi 2006). ریشه‌های پیش تیمار شده با Aceto-Iron-Haematoxylin در دمای ۳۴-۳۰ درجه به مدت ۲۰-۱۵ ساعت رنگ‌آمیزی شدند. نمونه‌ها با میکروسکوپ مدل Ni-U ساخت کشور ژاپن

بودند و تیپ این کروموزوم‌های ساتلایت‌دار، ساب‌متاسانتریک بود (شکل ۱). ساتلایت‌ها در انتهای بازوی کوتاه کروموزوم‌ها قرار داشتند (جفت کروموزوم‌های ۲ و ۳). کوچک بودن اندازه کروموزوم‌ها در این جنس و استفاده از روش‌های کلاسیک تا به حال این تیپ کروموزوم‌ها یا ساتلایت‌دار بودن آن‌ها را نشان نداده است که این نوع کروموزوم‌ها نشانگر سیتوژنتیکی این گونه می‌باشند. تیپ کروموزوم‌های زردآلو متاسانتریک و ساب‌متاسانتریک بود که تعداد کروموزوم‌های متاسانتریک (10 m) بیشتر از ساب‌متاسانتریک ($2 sm + 4 sm^{sat}$) بود (جدول‌های ۱ و ۲).

گونه‌های خویشاوند زردآلو *P. brigantiaca* (بریانکون از کوه‌های آلپ فرانسه)، *P. ansu*، *P. mume* (زردآلوی ژاپنی)، *P. sibirica*، *P. mandshurica* و *P. dasycarpa* (زردآلوی سیاه) می‌باشند. گونه *P. dasycarpa* به عنوان یک دورگ طبیعی بین *Prunus armeniaca* و *P. cerasifera* قیلا گزارش شده است (Layne et al. 1996, Faust et al. 1998, Hurtado et al. 2002).

آلوچه (*Prunus cerasifera* Ehrh.) - تعداد کروموزوم‌های سوماتیکی آلوچه *P. cerasifera*، $2n=2x=16$ و دیپلوئید بود (شکل ۱) که مطالعات قبلی را تایید می‌کند (Eremin & Rassvetaeva 1992, Chen 1993, Salesses & Bonnet 1993, Chen 2003, Yamamoto 2012). کروموزوم‌های این گونه نیز عمدتاً کوچک بودند و اندازه طول آن‌ها بین $2/77-1/54$ میکرومتر متغیر بودند (جدول ۱). در کاربوتیپ آن یک جفت کروموزوم متاسانتریک، به طور قابل توجهی طولانی‌تر (شماره ۱) و یک جفت کروموزوم

ساب‌متاسانتریک کوتاه‌تر از دیگران مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱). تیپ کروموزوم‌های این گونه شامل هشت کروموزوم متاسانتریک (8 m)، چهار کروموزوم ساب‌متاسانتریک (4 sm) و دو جفت کروموزوم ساتلایت‌دار بودند که کروموزوم‌هایی با تیپ‌های متفاوت داشتند و ساتلایت‌ها نیز در جفت کروموزوم‌های متفاوت قرار گرفته بودند. جفت کروموزوم شماره ۲ ساب‌تلوسانتریک ($2 st^{sat}$) و جفت شماره ۴ ساب‌متاسانتریک ($2 sm^{sat}$) بودند و اندازه ساتلایت در هر دو جفت از نظر اندازه شبیه هم بود. وجود و تعداد کروموزوم‌های ساتلایت‌دار قبلاً در این گونه گزارش نشده، ولی در این مطالعه این نوع کروموزوم‌ها به طور آشکار مشاهده شد (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱- کروموزوم‌های سوماتیکی مریستم نوک ریشه‌ای حاصل از بذور جوانه‌زده و نهال‌های جوان همراه با کاربوتیگرام آن‌ها: a. زردآلو، b. آلوچه، c. تنسگل ($2n=2x=16$) (مقیاس = ۵ میکرومتر).

Fig. 1. Somatic chromosomes of root tip meristem obtained from germinated seeds and young seedlings along with their karyogram: a. Apricot (*P. armeniaca*), b. Cherry plum (*P. cerasifera*), c. TANASGOL ($2n=2x=16$) (Bar = 5 μ m).

جدول ۱- اندازه‌گیری‌های (μm) کروموزوم‌های سوماتیکی زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و دورگ طبیعی "تناسگل" (*P. cerasifera* \times *P. spp.*) از ایران؛ L: طول بازوی بلند کروموزوم (μm)، S: طول بازوی کوتاه کروموزوم (μm)، CI: شاخص سانترومری (m: متاسانتریک، sm: ساب‌متاسانتریک، st: ساب‌تلوسانتریک)، موقعیت سانترومرها براساس روش (Levan *et al.* 1964)، Sat: ساتلایت یا قمر، L% و S%: شاخص‌هایی که سهم بازوی هر کروموزوم را نسبت به طول کل کاریوتیپ نشان می‌دهد، RL%: طول نسبی کروموزوم

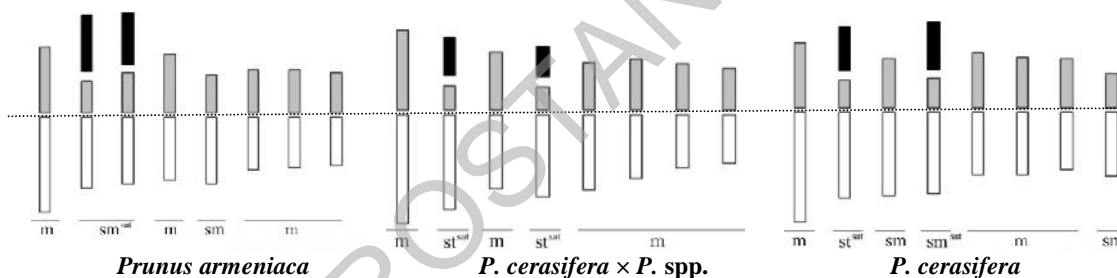
Table 1. Measurements (μm) of somatic chromosomes for apricot (*Prunus armeniaca*), plum (*P. cerasifera*) and natural hybrid or new species (*P. cerasifera* \times *P. spp.*) "TANASGOL" from Iran; L: length of long arm of chromosome (μm), S: length of short arm of chromosome (μm), CI: centromer index (m: metacentric, sm: submetacentric, st: subtelocentric); centromere type according to Levan *et al.* (1964), Sat: satellites, L% and S%: indices that express contribution of arm in each chromosome to total length of karyotype, RL%: relative length of chromosomes

<i>Prunus armeniaca</i>										
Pair No.	Total (L+S) μm	Long arm (L) μm	Short arm (S) μm	Arm ratio (AR=L/S)	CI [S*100/(L+S)]	Sat	Type	L%	S%	RL%
1	2.71 \pm 0.08	1.6 \pm 0.08	1.11 \pm 0.04	1.45 \pm 0.10	41	-	m	9.91	6.88	16.79
2	2.69 \pm 0.13	1.2 \pm 0.07	0.54 \pm 0.02	2.23 \pm 0.14	20	0.95	sm	7.43	3.35	16.67
3	2.24 \pm 0.27	1.13 \pm 0.08	0.67 \pm 0.06	1.75 \pm 0.20	32	0.87	sm	7.00	4.15	13.88
4	2.05 \pm 0.11	1.06 \pm 0.05	0.99 \pm 0.06	1.08 \pm 0.03	48	-	m	6.57	6.13	12.70
5	1.77 \pm 0.09	1.13 \pm 0.06	0.64 \pm 0.04	1.76 \pm 0.05	36	-	sm	7.00	3.97	10.97
6	1.61 \pm 0.04	0.89 \pm 0.03	0.72 \pm 0.04	1.27 \pm 0.10	44	-	m	5.51	4.46	9.98
7	1.57 \pm 0.06	0.84 \pm 0.04	0.73 \pm 0.02	1.16 \pm 0.05	46	-	m	5.20	4.52	9.73
8	1.50 \pm 0.05	0.82 \pm 0.04	0.68 \pm 0.02	1.21 \pm 0.03	45	-	m	5.08	4.21	9.29
Mean	2.02 \pm 0.08	1.08 \pm 0.04	0.76 \pm 0.03	1.49 \pm 0.06	39		m			
Total	(TC) = 16.14							53.72	37.67	
<i>P. cerasifera</i>										
Pair No.	Total (L+S) μm	Long arm (L) μm	Short arm (S) μm	Arm ratio (AR=L/S)	CI [S*100/(L+S)]	Sat	Type	L%	S%	RL%
1	2.77 \pm 0.08	1.74 \pm 0.06	1.03 \pm 0.03	1.69 \pm 0.07	37	-	m	10.81	6.40	17.22
2	2.50 \pm 0.11	1.36 \pm 0.07	0.43 \pm 0.03	3.23 \pm 0.28	17	0.71	st	8.45	2.67	15.54
3	2.09 \pm 0.07	1.32 \pm 0.05	0.77 \pm 0.04	1.73 \pm 0.08	37	-	sm	8.20	4.79	12.99
4	1.88 \pm 0.14	1.29 \pm 0.06	0.46 \pm 0.04	2.95 \pm 0.4	25	0.74	sm	8.02	2.86	11.68
5	1.86 \pm 0.05	0.98 \pm 0.02	0.87 \pm 0.04	1.14 \pm 0.05	47	-	m	6.09	5.41	11.56
6	1.77 \pm 0.05	0.98 \pm 0.05	0.79 \pm 0.01	1.24 \pm 0.06	45	-	m	6.09	4.91	11.00
7	1.68 \pm 0.07	0.9 \pm 0.05	0.78 \pm 0.03	1.16 \pm 0.06	46	-	m	5.59	4.85	10.44
8	1.54 \pm 0.07	1 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	1.88 \pm 0.08	35	-	sm	6.22	3.36	9.57
Mean	2.01 \pm 0.06	1.2 \pm 0.04	0.71 \pm 0.03	1.88 \pm 0.12	36		sm			
Total	(TC) = 16.09							59.48	35.24	
<i>P. cerasifera</i> \times <i>P. spp.</i> "TANASGOL"										
Pair No.	Total (L+S) μm	Long arm (L) μm	Short arm (S) μm	Arm ratio (AR=L/S)	CI [S*100/(L+S)]	Sat	Type	L%	S%	RL%
1	2.82 \pm 0.07	1.63 \pm 0.07	1.19 \pm 0.04	1.38 \pm 0.08	42	-	m	10.56	7.71	18.26
2	2.37 \pm 0.16	1.43 \pm 0.06	0.36 \pm 0.04	4.24 \pm 0.5	15	0.58	st	9.26	2.33	15.35
3	1.97 \pm 0.07	1.11 \pm 0.04	0.86 \pm 0.05	1.3 \pm 0.09	44	-	m	7.19	5.57	12.76
4	1.88 \pm 0.12	1.23 \pm 0.1	0.35 \pm 0.03	3.72 \pm 0.54	18	0.46	st	7.97	2.27	12.18
5	1.84 \pm 0.08	1.12 \pm 0.08	0.71 \pm 0.04	1.6 \pm 0.18	39	-	m	7.25	4.60	11.92
6	1.72 \pm 0.08	0.96 \pm 0.05	0.76 \pm 0.05	1.27 \pm 0.1	44	-	m	6.22	4.92	11.14
7	1.49 \pm 0.04	0.8 \pm 0.03	0.69 \pm 0.02	1.17 \pm 0.05	46	-	m	5.18	4.47	9.65
8	1.35 \pm 0.03	0.72 \pm 0.02	0.63 \pm 0.03	1.15 \pm 0.05	47	-	m	4.66	4.08	8.74
Mean	1.93 \pm 0.07	1.13 \pm 0.05	0.69 \pm 0.04	1.98 \pm 0.19	37		sm			
Total	(TC) = 15.44							58.29	35.95	

جدول ۲- جزئیات کاریوتیپ زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و دورگ طبیعی "تنسگل" (*P. cerasifera* × *P. spp.*) از ایران؛ فرمول کاریوتیپ (KF)، میانگین طول کروموزوم (میانگین (TL)، اندازه ساتلایت (SAT)، طول کل کروموزوم مجموعه هاپلوئیدی (TC)، دامنه اندازه کروموزومها (interval)، A1 شاخص نامتقارن درون کروموزومی (intrachromosomal asymmetry) و A2 شاخص نامتقارن میان کروموزومی (interchromosomal asymmetry) (Zarco 1986)، شاخص سانترومیری (CI)، کلاس بندی کاریوتیپها براساس درجه نامتقارنی (SC) (Stebbins 1971)، درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%) (Huziwara 1962)، ضریب تغییرات (CV%)، شاخص درجه نامتقارنی کاریوتیپ (AI) (Watanabe et al. 1999, Paszko 2006)، اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومها (DRL).

Table 2. Karyotype details of apricot (*Prunus armeniaca*), plum (*P. cerasifera*) and natural hybrid or new species (*P. cerasifera* × *P. spp.*) "TANASGOL" from Iran; karyotype formula (KF), mean length of chromosomes (TL), size of satellite (SAT), total length of haploid set chromosomes (TC), range of chromosomes size (interval), A1; intrachromosomal asymmetry and A2; interchromosomal asymmetry (Zarco 1986), centromer index (CI), symmetry class (SC) (Stebbins 1971), total form percent (TF%) (Huziwara 1962), coefficient of variation (CV%), karyotype asymmetry index (AI) (Watanabe et al. 1999, Paszko 2006), difference of range of relative length (DRL)

Species	KF	Mean (TL)	Interval	TC	CI	Sat ₁	Sat ₂	CV%	AI	A ₁	A ₂	DRL	TF%	SC
<i>Prunus armeniaca</i>	10 m + 2 sm + 4 sm ^{sat}	2.02 ± 0.08	1.50–2.70	16.14	39	0.95	0.87	22.67	0.152	0.28	0.23	7.50	37.68	2A
<i>P. cerasifera</i>	8 m + 4 sm + 2 sm ^{sat} + 2 st ^{sat}	2.01 ± 0.06	1.54–2.77	16.09	36	0.71	0.74	19.97	0.234	0.38	0.20	7.65	35.24	3A
<i>P. cerasifera</i> × <i>P. spp.</i>	12 m + 4 st ^{sat}	1.93 ± 0.07	1.35–2.82	15.44	37	0.58	0.46	22.97	0.211	0.35	0.23	9.52	35.95	2B



شکل ۲- ایدئوگرام هاپلوئیدی گونه‌های زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و دورگ طبیعی (*P. cerasifera* × *P. spp.*) "تنسگل" از ایران مربوط به کروموزوم‌های جدول ۱ و شکل ۱.

Fig. 2. Haploid ideogram of apricot (*Prunus armeniaca*), cherry plum (*P. cerasifera*) and the natural hybrid or new species "TANASGOL" (*P. cerasifera* × *P. spp.*) from Iran accordance to chromosomes of Table 1 and Fig. 1.

کرک‌دار شبیه زردآلو تولید می‌کنند، اما از زردآلوی معمولی کروی‌تر و رنگ پوست آن‌ها قرمز بسیار تیره است که روی تمام سطح طی دوران بلوغ، میوه‌هایی متفاوت ظاهر می‌شود. هسته‌ها (بذور) متفاوت هستند (Bradford & Bradford 1991).

مطالعات سیتوننتیکی و شمارش کروموزومی روی تنسگل که بومی ایران می‌باشد انجام نشده است، لذا در این پژوهش برای نخستین بار جزئیات و ویژگی‌های کروموزومی این هیبرید مطالعه گردید. تعداد کروموزوم‌های سوماتیکی مشاهده شده همانند دیگر گونه‌های مورد مطالعه $2n=2x=16$ و دیپلوئید بود (شکل ۱). کروموزوم‌های آن کوچک و بین $1/۳۵-۲/۸۲$

- تنسگل (*P. cerasifera* × *P. spp.*) یک دورگ طبیعی از جنس *Prunus*

تنسگل (TANASGOL) یک دورگ طبیعی بین آلوه‌ای (*P. salicina* Lind.) و *P. cerasifera*) و یا از دورگ بین آن‌ها که هر دو دیپلوئید هستند و زردآلو ($2n=2x=16$) ایجاد شده و در منطقه شاهرود گسترش یافته است. در حال حاضر، مهم‌ترین مناطقی که این دورگ را کشت می‌کنند عبارتند از: تبریز، شاهرود، مشهد، کرج و تهران. درختان تنسگل مقاومت و قدرت متوسطی را در خاک‌های سنگین و آهکی نشان می‌دهند. میوه‌های آن‌ها یک شکل، مدور، دارای اندازه متوسط با طعم ترش و شیرین است. از نظر ظاهر پوست، میوه‌هایی

نشاندار گزارش نشده است. موفقیت این مطالعه در مقایسه با دیگر مطالعات در نمایان ساختن کروموزوم‌های ساتلایت‌دار و دیگر خصوصیات کاربوتیپی به نمونه گیاهی مورد استفاده و عوامل بیولوژیکی مربوط نبوده بلکه با وجود این که این گونه‌ها کروموزوم‌های کوچکی دارند، اما استفاده از روش پیشرفته سیتوژنتیکی و رنگ‌آمیزی با هماتوکسلین (Zarifi & Gülo lu 2016) و تکنیک تهیه نمونه‌های میکروسکوپی، ویژگی‌های کمی و مورفولوژی کروموزوم‌ها را به دقت و به وضوح بیان کرده است (شکل‌های ۲ و ۳).

این که تنسگل (TANASGOL)، یک دورگ طبیعی حاصل کدام گونه‌ها است، مساله بحث برانگیزی را به وجود آورده، به طوری که در برخی منابع آن را یک دورگ طبیعی بین زردآلو و آلو (*P. armeniaca* × *P. domestica*) گزارش کرده‌اند (Mirabdulba *et al.* 2011) و این امر با توجه به این که تعداد کروموزوم‌های آلو را $2n=6x=48$ گزارش کرده‌اند (Rehder 1947, Zohary 1992, Tropicos.org 2011)، امکان‌پذیر نمی‌باشد، ولی تعداد کروموزوم‌های این دو گونه زردآلو و آلوچه در این تحقیق $2n=2x=16$ کروموزوم و دیپلوئید بودند و دورگ بین آن‌ها بسیار محتمل می‌باشد، ولی از نظر مورفولوژی کروموزوم‌ها، شباهت این دورگ بیشتر به آلوچه نزدیک می‌باشد. در بررسی‌های پارامترهای تقارن و عدم تقارن کاربوتیپی‌های این گونه‌ها بویژه پارامترهای جدید CV_{CI} (تغییر نسبی در شاخص سانترومری) و CV_{CL} (تغییر نسبی در طول کروموزوم) و همچنین فرمول کاربوتیپی آن‌ها نشان داد که این شباهت کروموزومی بین تنسگل و آلوچه بیشتر مشهود می‌باشد و کاربوتیپی هر دوی آن‌ها نامتقارن‌تر بوده، در حالی که در فرمول کاربوتیپی آن‌ها کروموزوم‌های ساب‌تلوسانتریک و هم‌پوشانی کاریوگراف‌ها قابل مشاهده است (شکل ۳). بنابراین، احتمال این که گونه بعدی که در این دورگ اشتراک کرده، گونه زردآلو باشد کمتر و ممکن است گونه دیگری که نزدیک به این گونه بوده و تعداد کروموزوم‌های آن $2n=2x=16$ باشد، با آلوچه دورگ مذکور را تشکیل داده باشند. لذا بهتر است تنسگل یک گونه و یا زیرگونه جدید در داخل جنس *Prunus* در نظر گرفته شود که از نظر شباهت کروموزومی به گونه آلوچه نزدیک‌تر است، زیرا گونه آلوچه بسیار محتمل‌تر و برای اثبات، نیاز به مطالعات بیشتری روی سیتوژنتیک مولکولی، مارکرهای مولکولی و دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای در شرایط کنترل شده دارد.

میکرومتر متغییر بودند (جدول‌های ۱ و ۲) و دو جفت کروموزوم ساتلایت‌دار در مجموعه کروموزومی آن به طور واضح مشاهده شد که تیپ هر دو کروموزوم ساتلایت‌دار (ساب‌تلوسانتریک st) شبیه هم بودند و روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های شماره ۲ و ۴ قرار داشتند که بسیار شبیه به گونه آلوچه *P. cerasifera* می‌باشد، ولی در آلوچه کروموزوم ساتلایت‌دار شماره ۴ ساب‌تلوسانتریک بود (شکل ۲ و جدول ۱). اکثر تیپ کروموزوم‌های تنسگل متاسانتریک بودند (12 m) و فقط کروموزوم‌های ساتلایت‌دار ساب‌تلوسانتریک ($4 st^{sat}$) بودند.

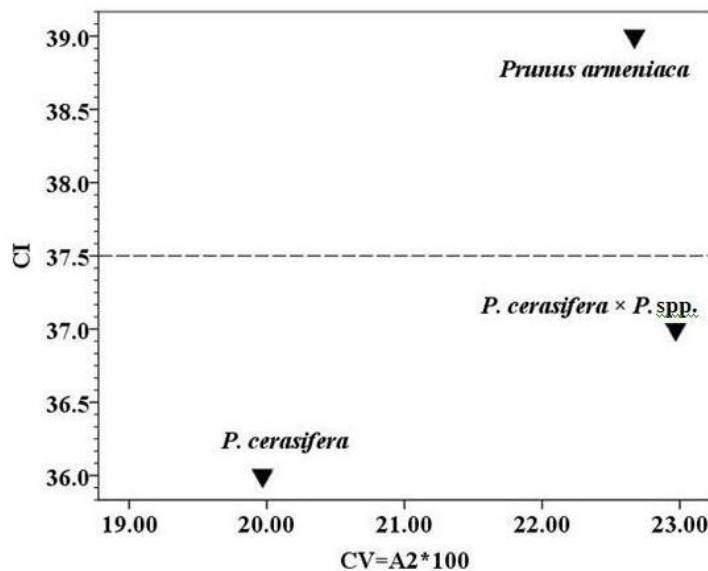
نتیجه‌گیری

ویژگی‌های کروموزومی در سلول‌های میتوز از نظر مورفولوژیکی نسبت به سلول‌های میوز خیلی پایدارتر هستند. ساختارهای مارکری کاربوتیپی مانند کروموزوم‌های ساتلایت‌دار، فرورفتگی‌ها، موقعیت و محل قرار گرفتن سانترومرها و اندازه طول بازوی کروموزوم‌ها در میتوز با دقت بیشتری نشان داده می‌شود. از این رو، آنالیز کاربوتیپی گونه‌ها اغلب در سلول‌های سوماتیکی و در مرحله میتوز انجام می‌شود.

مقایسه نتایج این مطالعه با دیگر مطالعات نشان داد که فقط در شمارش کروموزومی گونه‌های زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و دورگ طبیعی (*P. cerasifera* × *P. spp.*) به نام تنسگل توافق دارند ($2n=2x=16$)، ولی در وجود و تعداد ساتلایت در کروموزوم‌های این گونه‌ها، محل قرار گرفتن و اندازه طول کروموزوم‌ها و تیپ آن‌ها هیچ گزارشی موجود نمی‌باشد.

(Parveen 2015, Yamamoto 2012, Biswajit Das 2011, Doroftei *et al.* 2010, Salesses & Bonnet 1993, Zohary 1992, Eremin & Rassvetaeva 1992, Salesses & Bonnet 1993, Bradford & Bradford 1991, Salesses 1975, Tropicos.org. 2011).

کروموزوم‌های تنسگل (*P. cerasifera* × *P. spp.*) برای نخستین بار در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت و کاربوتیپی آن با گونه‌هایی که احتمال می‌رفت اجداد آن باشند مقایسه شد. در مجموعه کروموزومی گونه‌ها که همگی دیپلوئید ($2n=2x=16$) بودند، دو جفت کروموزوم ساتلایت‌دار ($4 sm^{sat}$)، $2 sm^{sat} + 2 st^{sat}$ و $4 st^{sat}$ به ترتیب مربوط به زردآلو، آلوچه و تنسگل مشاهده شد و اندازه طول این ساتلایت‌ها در زردآلو بزرگ‌تر از بقیه بود. ساتلایت‌ها روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های نسبتاً بزرگ گونه‌ها قرار گرفته و قبلاً اطلاعاتی از کروموزوم‌های



شکل ۳- نمودار پراکندگی زردآلو، آلوچه و دورگ طبیعی "تنسگل" براساس پارامترهای CV_{CI} و CV_{CL} .

Fig. 3. Scatter diagrams for apricot, cherry plum and "TANASGOL" based on the CV_{CL} parameter against the CV_{CI} parameter.

سپاسگزاری

این تحقیق، در راستای انجام پروژه تحقیقاتی پیشنهادی مطالعه پایه‌های بذری زردآلوی "مش مش" و دورگ طبیعی یا گونه جدید معروف به "تنسگل" به عنوان پایه‌های بذری جایگزین برای زردآلو (*Prunus armeniaca*) در بخش تحقیقات باغبانی وقت مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر (کرج) انجام گرفته است. برای اجرای بخشی از تحقیقات، از امکانات میکروسکوپی آزمایشگاه سلامت بذر و نهال مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال استفاده گردیده است. نگارندگان از خانم مهندس لیلا زارع به خاطر مساعدت‌های ایشان، قدردانی می‌نمایند.

آلوه‌های گونه *P. domestica* که به آلوه‌های اروپایی نیز معروفند، حاصل دورگ‌گیری طبیعی بین یک گونه دیپلوئید ($2n=2x=16$) با نام *P. cerasifera* می‌باشند که همان گوجه (آلوچه) معمولی است و گونه *P. spinosa* که تتراپلوئید ($2n=4x=32$) است حاصل شده‌اند. البته دورگ بین این دو گونه یک تریپلوئید خواهد بود که در اثر مضاعف شدن تعداد کروموزوم‌های آن در طبیعت، گونه *P. domestica* با $2n=6x=48$ (Salesses 1975, Zohary 1992, Faust et al. 1998, Rieger 2006).

References

- Agayev, Y.M., Zarifi, E. & Fernández, J.A. 2010. A study of karyotypes in the *Crocus sativus* L. Aggregate and origin of cultivated saffron. *Acta Horticulturae* 850: 47-54.
- Biswajit, D. 2011. *Prunus* diversity-early and present development: A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 3(14): 721-734.
- Blažek, J. 2007. A survey of the genetic resources used in plum breeding. *Acta Horticulturae* 734: 31-45. Available at: http://www.actahort.org/books/734/734_2.htm.
- Bradford, N.G. & Bradford, L.G. 1991. Plum-Apricot Hybrid Tree (Royal Velvet Plum-Cot). Available at: <http://www.google.com.sl/patents/USPP7431>.
- Casas, A.M. & Igartua, E., Balaguer, G., Moreno, M.A. 1999. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica* 110(2): 139-149.
- Chen, R.Y. 1993. Chromosome Atlas of Chinese Fruit Trees and Their Close Wild Relatives, Beijing: International Academic Publishers.
- Chen, R.Y. 2003. Chromosome Atlas of Major Economic Plants Genome in China, Vol. 3. *In*: Chromosome

- Atlas of Garden Flowering Plants in China. Science Press, Beijing.
- Chin, S.-W., Shaw, J., Haberle, R., Wen, J. & Potter, D. 2014. Diversification of almonds, peaches, plums and cherries-Molecular systematics and biogeographic history of *Prunus* (*Rosaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76(1): 34–48.
- Doroftei, E., Arcu, M., Trandafirescu, M. & Moldoveanu, M.A. 2010. Cytological characteristics of pollen and pollen germination process at *Prunus armeniaca* L. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 15(1): 353–357.
- Dosba, F., Bernhard, R. & Zanetto, A. 1994. Importance des ressources génétiques des *Prunus*. *Académie d'Agriculture de France* 80: 45–57.
- Eremin, G.V. & Rassvetaeva, E.G. 1992. Polymorphism of chromosome numbers in *Prunoideae* Focke. *Tezisy III Soveshchanie po Kariologii Rastenii*. Pp. 21–22.
- Faust, M., Suranyi, D. & Nyujto, F. 1998. Origin and Dissemination of Apricot. Pp. 225–266. *In: Janick, J.* (ed.). *Horticultural Reviews*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Inc.
- Hurtado, M.A., Romero, C., Vilanova, S., Abbott, A.G., Llácer, G. & Badenes, M.L. 2002. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 105(2–3): 182–191.
- Huziwara, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of *Compositae*. VIII. Further studies on the chromosomes of *Aster*. *American Journal of Botany* 49(2): 116.
- Kester, D.E. 1970. Graft incompatibility of almond seedling populations to Marianna 2624 plum. *Horticulture Science* 5: 349.
- Layne, R.E.C., Baily, C.H. & Hough, L.F. 1996. Apricots. Pp. 79–111. *In: Janick, J. & Moore, J.N.* (eds). *Fruit Breeding, Tree and Tropical Fruits*. John Wiley & Sons.
- Lespinasse, Y., Alston, F.H. & Watkins, R. 1976. Cytological techniques for use in apple breeding. *Annals of Applied Biology* 82(2): 349–353.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52(2): 201–220.
- Levin, D.A. 2002. *The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution* Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press.
- Mirabdulbaghi, M., Zarghami, R. & Azghandi, A.V. 2011. Propagation of Tanasgol, a natural plum-apricot hybrid (*Prunus domestica-armenia*) developed in Iran. *Trends in Horticultural Research* 1(1): 27–31.
- OECD, 2006. *Safety Assessment of Transgenic Organisms*, OECD Publishing. Available at: <https://goo.gl/w7PNSn> [Accessed Dec. 1, 2017].
- Parveen, I. 2015. Cytogenetic, morphological and pollen compatibility studies of some indigenous and exotic cultivars of apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown in Kashmir. Thesis, University of Agricultural Sciences & Technology of Kashmir.
- Paszko, B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution* 258(1–2): 39–48.
- Reeves, A. 2001. MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome* 44(3): 439–443.
- Rehder, A. 1947. *Manual of Cultivated Trees and Shrubs*. 2nd edn. The Macmillan Company, New York.
- Rieger, M. 2006. Peach (*Prunus persica*). Pp. 311–325. *In: Introduction to Fruit Crops*. Haworth Food & Agricultural Products Press, New York.
- Salesses, G. 1975. Some information on the plum cytogenetics and the origin of *Prunus domestica*. *Acta Horticulturae* 48: 59–66.
- Salesses, G. & Bonnet, A. 1993. Meiotic behaviour of hybrids between *Prunus cerasifera*, *P. spinosa* and *P. persica*: An approach to the peach-plum genome relationship. *Cytologia* 58(3): 257–262.
- Schuster, M. 1996. Cytogenetics in fruit breeding. Preparation methods for mitotic chromosomes. *Gartenbauwissenschaft* 61(6): 273–275.

- Stebbins, G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. London: Edward Arnold Ltd.
- Tropicos.org. 2011. IPCN Chromosome Reports: 16–17.
- Watanabe, K., Yahara, T., Denda, T. & Kosuge, K. 1999. Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plant Research* 112(2): 145–161.
- Yamamoto, M. 2012. Recent progress on studies of chromosome observation in deciduous fruit trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 81(4): 305–313.
- Zarco, C.R. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35(3): 526.
- Zarifi, E. 2006. Cytogenetics and evolution of karyotype in wormwood, *Artemisia vulgaris* L. *Seed and Plant Improvement Journal* 22(1): 1–12.
- Zarifi, E. 2013. Karyosystematic study of domestic and wild species of Almond genus (*Prunus* L. subgenus *Amygdalus* L.) in Iran. Research Project Report (2-011-120000-25-85145). Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Department of Plant Genetics and National Plant Gene Bank of Iran, Karaj, Iran.
- Zarifi, E. & Gülo lu, D. 2016. An improved Aceto-Iron-Haematoxylin staining for mitotic chromosomes in Cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Caryologia* 69(1): 67–72.
- Zohary, D. 1992. Is the European plum, *Prunus domestica* L., a *P. cerasifera* Ehrh. × *P. spinosa* L. allopolyploid? *Euphytica* 60(1): 75–77.

ROSTANIHIA