فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ٢٤، شمارهٔ ٣ صفحهٔ ٢٩٢-٢٧٨ (١٣٨٧)

تجزیه ارتباط نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی AFLP در گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum* L.)

مجید شکرپور[1*]، سید ابوالقاسم محمدی[2]، محمد مقدم[3]، سید علی ضیایی[4] و عزیز جوانشیر[5]

١*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی،
پست الکترونیک: shokrpour@uma.ac.ir
٢- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
٣- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
٤- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه شهید بهشتی
٥- استاد، سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی

تاریخ دریافت: فروردین ١٣٨٧ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ١٣٨٧ تاریخ پذیرش: شهریور ١٣٨٧

چکیده

به منظور بررسی رابطه بین نشانگرهای مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی در گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L.)، ٣٢ اکوتیپ جمع‌آوری شده از نواحی مختلف کشور به همراه دو رقم خارجی بوداکالازی و CN seeds ارزیابی شدند. تجزیه همبستگی کانونیک بین ٨ صفت مورفولوژیکی و ٧ ترکیب فلاونولیگنانی تشکیل دهنده سیلیمارین نشان داد که دو متغیر اول کانونیک دارای همبستگی کانونیک قابل توجه و معنی‌دار بودند. ضرایب همبستگی کانونیک نشان داد که اکوتیپهای دارای وزن هزاردانه بیشتر و تاریخ گلدهی، ارتفاع بوته، قطر کاپیتول و عملکرد دانه کمتر دارای سیلیکریستین و سیلیبین بیشتر و سیلیدیانین کمتری بودند. به عبارت دیگر، دانه‌های درشت‌تر، سیلیبین بیشتر و سیلیدیانین کمتری داشتند. نتایج نشان داد که از ٤١٥ نشانگر AFLP، ٣٧ نشانگر مثبت با فلاونولیگنان‌ها و ٢٩ نشانگر مثبت با صفات مورفولوژیکی دارای رابطه معنی‌دار بودند. بیشترین تغییرات تبیین شده توسط نشانگرهای مثبت مربوط به تاکسیفولین (٥٤٪) و سیلیدیانین (٤٥٪) بود. بیش از ٤٠ درصد تغییرات مربوط به وزن هزاردانه، ارتفاع بوته و تاریخ گلدهی توسط نشانگرهای مثبت شناسایی شده توجیه گردید. نتایج این مطالعه حاکی از آنست که می‌توان بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و نیز داده‌های مولکولی به خوبی برخی از خصوصیات کیفی و کمی مواد مؤثره را در ماریتیغال مورد پیش‌بینی قرار داد.

واژه‌های کلیدی: ماریتیغال (*Silybum marianum* L.)، ترکیبهای فیتوشیمیایی، مورفولوژیکی، نشانگر، AFLP.

مقدمه

ماریتیغال گیاهیست با نام علمی *Silybum marianum* (L. Gaertner. syn. *Mariana mariana* L., *Carduus* L. *marianus*) که در رده‌بندی گیاهی در زیر رده Asteridae و راسته Asterales و خانواده Asteraceae قرار دارد (Rechinger, 1979). این جنس تنها دارای دو

Archive of SID

گونه به نامهای ماریانوم و ابورنئوم (*S. eburneum* Cossa & Duriea) می‌باشد (Adzet *et al*, 1993). با وجود این، نتایج یک مطالعه نشان داده است که این دو گونه در واقع یک گونه بوده و گونه دوم، حالت تغییر یافته گونه ماریانوم می‌باشد (Hetz *et al*, 1995). در سالهای اخیر استفاده از داروهای دارای منشأ گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. در این راستا ماریتیغال که از گیاهان مهم دارویی به حساب می‌آید توانسته است جایگاه مهمی را در زراعت متابولیتی و صنایع دارویی پیدا کند، به‌طوری که این گیاه از ۲۰ سال پیش در کشورهایی مانند مجارستان، لهستان و بلغارستان در مقیاس وسیع کشت و ارقام اصلاح شده آن تولید شده است (امیدبیگی، ۱۳۷۷). دانه‌های ماریتیغال حاوی فلاونولیگنان‌های ارزشمندی مانند سیلیبین (silybin)، سیلیکریستین (silychristin) و سیلیدیانین (silydianin) است که مجموع آنها تحت عنوان سیلیمارین (silymarin) شناخته می‌شوند. این فلاونولیگنان‌ها ضد مسمومیتهای کبدی هستند و در مقابل عوامل مسموم کننده از کبد محافظت می‌کنند (Murphy *et al*, 2000).

مطالعات ژنتیکی و اصلاحی در این گیاه بسیار محدود است و تنها در برخی از کشورهای اروپایی مانند لهستان (Kazmierczak & Seidler-Lozykowska, 1997) با استفاده از روشهای کلاسیک اقدام به اصلاح ماریتیغال شده است. Adzet و همکاران (۱۹۸۷) ٤٤ جمعیت اسپانیایی و ١٤ جمعیت از منشأ دیگر را از لحاظ شیمیایی و مورفولوژیکی مورد بررسی قرار دادند. تجزیه میزان سیلیمارین از طریق HPLC فاز معکوس در این جوامع نشان داد که مقادیر سیلیبین و ایزوسیلیبین نسبت عکس با میزان سیلیدیانین دارد. همچنین نمونه‌های با میزان زیاد سیلیبین، میزان سیلیمارین زیادی نیز داشتند و بنابراین از لحاظ ارزش اصلاحی مناسب به نظر رسیدند. Hetz و همکاران (۱۹۹۵) با مطالعه ترکیبهای فلاونولیگنانی در سه نسل خویش‌آمیخته گونه ماریانوم در سه سال مختلف نشان دادند که از لحاظ ترکیب فلاونولیگنان در تمام لاین‌های نسلهای خویش‌آمیخته پایداری ژنتیکی وجود دارد. حسنلو و همکاران (۱۳۸۳) با بررسی ۱۱ اکوتیپ ماریتیغال از استانهای مختلف ایران به همراه یک رقم با منشأ مجارستان اظهار داشتند که بیشترین میزان تجمع سیلیمارین مربوط به مناطق ولشت و سپس برازجان بود. Shokrpour و همکاران (۲۰۰۸) ٣٤ جمعیت ماریتیغال را از لحاظ مورفولوژیکی مورد مطالعه قراردادند. همچنین ترکیبهای فلاونولیگنانی این گیاه مورد تحقیق قرار گرفته و تنوع ژنتیکی معنی‌دار و قابل ملاحظه‌ای در درون و بین اکوتیپها گزارش شده است. Ram و همکاران (۲۰۰۵) ۱۵ نمونه ماریتیغال متشکل از ۱۰ جمعیت خارجی و ۵ جمعیت داخلی جمع‌آوری شده از منطقه جاموی هند را از لحاظ صفات مورفولوژیکی و سیلیمارین مورد مطالعه قراردادند. بیشترین ضریب تغییرات ژنوتیپی، وراثت‌پذیری و پیشرفت ژنتیکی مربوط به صفات عملکرد دانه در بوته و تعداد کاپیتول در بوته بود. همچنین در این مطالعه همبستگی مثبت معنی‌داری بین تعداد کاپیتول در بوته و تعداد شاخه در بوته و طول برگ و نیز بین عملکرد دانه و طول برگ، قطر ساقه، قطر کاپیتول و میزان سیلیمارین بدست آمد.

امروزه برنامه‌های اصلاح ماریتیغال بر اساس گزینش فنوتیپی استوار است. با توجه به محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و متأثر بودن از عوامل محیطی، کاربرد این‌گونه نشانگرها محدود است. نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA

Archive of SID

با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرهای ناشی از عوامل محیطی، توانسته است بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی را برطرف کند. از این‌رو، تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات ظاهری و بیوشیمیایی می‌تواند گامی مؤثر در استفاده از گزینش جمعیتی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکانهای ژنی صفات کمی (QTLها) محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است (Virk *et al.*,1996). امروزه استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژنهای کنترل کننده صفات کمی، فرایند اصلاح نباتات را تسریع کرده است، به‌طوری که به جای ارزیابی صفات، گزینش غیر مستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته صورت می‌گیرد. تاکنون هیچ تحقیقی در جهت مطالعه ماریتیغال در سطح مولکولی و ارتباط آنها با صفات مورفولوژیکی و مواد مؤثره انجام نشده است. از این‌رو، این تحقیق به منظور تجزیه ارتباط جمعیت و فنوتیپ از طریق نشانگرهای مولکولی AFLP و نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

در این مطالعه ۳٤ جمعیت ماریتیغال مورد استفاده قرار گرفت که متشکل از ۳۲ اکوتیپ جمع‌آوری شده از استانهای آذربایجان شرقی، اردبیل، مازندران، گلستان، لرستان، خوزستان، بوشهر و فارس (جدول ۱) و دو رقم تجاری وارداتی به نام بوداکالازی از مجارستان و CNseeds از انگلستان بودند. این دو رقم از بخش گیاهان دارویی وزارت جهاد کشاورزی تهیه شدند. به منظور انجام ارزیابیهای فنوتیپی، جمعیتها در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایشهای زراعی در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز واقع در ۱۲ کیلومتری شرق تبریز در منطقه کرکج اجرا گردید. محل مورد نظر دارای ۱۳٦۰ متر ارتفاع از سطح دریا و در مختصات ٤٦° و ۱۷´ طول شرقی و ۳۸° و ۵´ عرض شمالی قرار گرفته است. صفات مورد اندازه‌گیری عبارت بودند از: ارتفاع بوته، قطر کاپیتول اصلی در بوته، تعداد دانه در کاپیتول، وزن دانه در کاپیتول، وزن هزاردانه، تاریخ گلدهی و عملکرد دانه.

اندازه‌گیری سیلیمارین

برای استخراج سیلیمارین، از دستگاه استخراج سوکسله با استفاده از حلالهای پترولیوم اتر و متانول طبق دستورالعملهای مربوطه (Cacho *et al.*, 1999؛ Quaglia *et al.*, 1999؛ Carrier *et al.*, 2002؛ Wallace *et al.*, 2003) استفاده شد. جهت تعیین مقدار کمی فلاونولیگنان‌های سیلیمارین از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. دستگاه مورد نظر ساخت شرکت Knauer و دارای پمپ مدل K1001، آشکارساز UV (اشعه ماورای بنفش) مدل K2501 و اتوسمپلر Marathon بود. اجزای سیلیمارین در طول موج ۲۸۸ نانومتر شناسایی شدند. ترسیم و محاسبه مربوط به پیک‌های اجزای فلاونولیگنان توسط نرم‌افزار Chromgate صورت گرفت. برای اندازه‌گیری اجزای سیلیمارین از محلول استاندارد ماریتیغال شامل محلولهای استاندارد سیلیبین (غلظتهای ۰/۰۱٦، ۰/۰۲، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و محلولهای مورد بررسی به‌طور جداگانه استفاده شد. درصد هر کدام از اجزای مربوط به سیلیمارین به‌طور جداگانه از طریق میانه‌یابی در خط رگرسیون (کالیبراسیون) محاسبه شد. همچنین میزان کل

Archive of SID

جدول ۱- نام و موقعیت جغرافیایی نمونه‌های ماریتیغال جمع‌آوری شده از ایران

تاریخ جمع‌آوری	استان	شماره نمونه	محل نمونه‌برداری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی (شمالی)	طول جغرافیایی (شرقی)
خرداد ۱۳۸۱	اردبیل	۱	پارس آباد	۳۰	۳۹° ۳۸'	٤۷° ۵۵'
		۲	قره قیه	۲٤۰	۳۸° ۳۰'	٤۷° ٤٦'
		۳	بابک	٦۰	۳۹° ۲٦'	٤۸° ۰۹'
		٤	بیله سوار	۱۰۰	۳۹° ۲۱'	٤۸° ۱۳'
		۵	روح کندی	۳۰	۳۹° ۲٤'	٤۸° ۱۳'
		٦	انجیرلو	۱۵۰	۳۹° ۱۰'	٤۸° ۰۷'
		۷	قره آغاج	٦۰۰	۳۹° ۰۱'	٤۷° ٤۰'
	آذربایجان شرقی	۸	تاتار	۳۲۰	۳۹° ۳۰'	٤٦° ۵۸'
		۹	قره‌چیلر	٤۲۰	۳۸° ۵۲'	٤٦° ۳۲'
	گلستان	۱۰	گرگان	۲۰۰	۳٦° ۵۰'	۵٤° ۲۵'
		۱۱	ناهارخوران	٤۲۰	۳٦° ٤٤'	۵٤° ۲۸'
		۱۲	آق قلا	۱۱۰	۳۷° ۰۰'	۵٤° ۲٦'
		۱۳	آزاد شهر	۱۲۰	۳۷° ۰۵'	۵۵° ۱۰'
		۱٤	گنبد	۱۲۰	۳۷° ۱٦'	۵۵° ۰۹'
		۱۵	کردکوی	۱۲۰	۳٦° ٤۷'	۵٤° ۰٦'
	مازندران	۱٦	بهشهر	۹۰	۳٦° ٤۱'	۵۳° ۳۲'
		۱۷	ساری	٤۰۰	۳٦° ۳۳'	۵۳° ۰۳'
		۱۸	قائم شهر	۲۰	۳٦° ۲۷'	۵۲° ۵۱'
		۱۹	نور	۳۰	۳٦° ۳٤'	۵۱° ۵۷'
		۲۰	محمود آباد	۲۰	۳٦° ۳۷'	۵۲° ۱٤'
		۲۱	فریدون کنار	٤۰	۳٦° ٤۰'	۵۲° ۳۱'
اردیبهشت ۱۳۸۲	خوزستان	۲۲	دزفول	۱۸۰	۳۲° ۲۲'	٤۸° ۲۳'
		۲۳	ملاثانی	۲۰	۳۱° ۳۵'	٤۸° ۵۲'
		۲٤	اندیمشک	۲۰۰	۳۲° ۲۷'	٤۸° ۲۰'
		۲۵	آبپخش	۲۰	۲۹° ۲۰'	۵۱° ۰٤'
		۲٦	حمیدیه	۰	۳۱° ۲۸'	٤۸° ۲٦'
		۲۷	بهبهان	۳۰۰	۳۰° ۳۵'	۵۰° ۱٤'
		۲۸	شوش	۸۵	۱۱° ۳۲'	٤۸° ۱٤'
		۲۹	رامهرمز	۹۰	۳۱° ۱٦'	٤۹° ۳٦'
	لرستان	۳۰	جلگه خلج	۷۸۰	۳۳° ۱۷'	٤۷° ٤۸'
	فارس	۳۱	نور آباد	۹۸۰	۳۰° ۰٦'	۵۱° ۳۱'
		۳۲	قائمیه	۸۰۰	۲۹° ۳٦'	۵۱° ۳۹'

Archive of SID

سیلیمارین از طریق مجموع تمام اجزای سیلیمارین بدست آمد (USP, 2003).

تجزیه AFLP

به منظور استخراج DNA جهت انجام تجزیه‌های مولکولی، نمونه برگی از تک بوته‌ها به‌طور جداگانه برداشت شد. برای استخراج DNA از این گیاه دارویی روش تغییر یافته CTAB مورد استفاده قرار گرفت (شکرپور و همکاران، ۱۳۸۳). در این روش، غلظت بالایی از PVP و ۲- مرکاپتواتانول در تهیه بافر استخراج بکار رفت، به‌طوری که افزودن این ترکیبها در حذف پلی‌فنلها از نمونه برگی و ممانعت از اکسیداسیون متابولیتهای ثانویه مؤثر بود. تجزیه AFLP براساس روش Vos و همکاران (۱۹۹۵) با اعمال تغییرات جزیی انجام گرفت. در این تکنیک، از آنزیمهای برشی *EcoR*I و *Tru9*I (ایزوشیزومر آنزیم *Mse*I) استفاده شد. برای تکثیر انتخابی قطعاتAFLP، ابتدا ٦٤ ترکیب آغازگر دارای ۳ باز تصادفی مورد بررسی قرار گرفت که از بین آنها ۲۷ ترکیب آغازگر دارای چند شکلی و با کیفیت مناسب برای رتبه‌دهی انتخاب شد (جدول ۲). در نهایت این ۲۷ ترکیب آغازگر برای ارزیابی جمعیتی کلیه نمونه‌ها بکار برده شد. الکترفورز قطعات حاصل از تکثیر انتخابی توسط دستگاه الکتروفورز عمودی توالی‌یاب ساخت شرکت Bio-Rad مدل Sequi-Gen GT با ابعاد شیشه ژل ۵۰×۳۸ سانتی‌متر مربع صورت گرفت. الکتروفورز با استفاده از ژل پلی‌آکریلامید ٦ درصد و با توان ثابت ۸۰ وات به مدت ۲ ساعت انجام گردید. در نهایت برای مرئی کردن قطعات تکثیر شده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

جدول ۲- ترکیبهای آغازگر مورد استفاده در تجزیه AFLP

شماره	کد	ترکیب آغازگر
۱	C1	EacaMcag
۲	C2	EacaMctt
۳	C3	EaccMctc
٤	C4	EacaMcaa
٥	C5	EacaMcat
٦	C6	EaccMctt
۷	C7	EaccMcag
۸	C8	EacaMcta
۹	C9	EacaMcac
۱۰	C10	EacaMctc
۱۱	C11	EacaMctg
۱۲	C12	EaccMcta
۱۳	C13	EaccMcaa
۱٤	C14	EaccMctg
۱٥	C15	EaccMcat
۱٦	C16	EacgMcag
۱۷	C17	EacgMctg
۱۸	C18	EacgMcat
۱۹	C19	EacgMcac
۲۰	C20	EacgMctc
۲۱	C21	EacgMcaa
۲۲	C22	EaggMcta
۲۳	C23	EaggMctc
۲٤	C24	EaggMctt
۲٥	C25	EactMcaa
۲٦	C26	EactMcac
۲۷	C27	EagcMcta

E، آغازگر *ECoRI* و M، آغازگر *MseI* است.

Archive of SID

تجزیه آماری داده‌ها

به منظور بررسی رابطه بین صفات مورفولوژیک و ترکیبهای فلاونولیگنانی ماریتیغال از تجزیه همبستگی کانونیک استفاده شد. تعیین تعداد متغیرهای کانونیک و انتخاب همبستگی‌های کانونیک مناسب بر مبنای مقادیر همبستگی‌های کانونیک تصحیح شده (Adjusted canonical correlation)، آزمون Wilks' lambda و معیار Redundancy انجام گرفت. برای محاسبات آماری نرم‌افزارهای SPSS v. 11.5 و SAS v. 8 مورد استفاده قرار گرفت. رابطه بین نشانگرهای مولکولی AFLP و ترکیبهای فلاونولیگنانی و نیز رابطه بین نشانگرهای AFLP و داده‌های مورفولوژیکی ماریتیغال در اکوتیپهای مورد مطالعه با استفاده از رگرسیون چندگانه گام به گام (Stepwise multiple regression) بررسی شد. بدین ترتیب، هر صفت کمی به عنوان متغیر وابسته و نشانگرهای AFLP به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. برای کاهش احتمال خطای نوع اول، ورود و حذف هر متغیر از مدل به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد.

نتایج

تجزیه همبستگی کانونیک بر اساس صفات مورفولوژیکی و خصوصیات مواد مؤثره

مقادیر ضرایب همبستگی کانونیک هشت صفت مورفولوژیکی ماریتیغال با هفت فلاونولیگنان تشکیل دهنده سیلیمارین (جدول ۳) نشان می‌دهد که تنها دو متغیر اول کانونیک دارای همبستگی کانونیک تصحیح شده قابل توجه (به‌ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۶۹) می‌باشند. همبستگی‌های کانونیک تصحیح شده در واقع برآوردهای نااریب تقریبی از همبستگی‌های کانونیک می‌باشند (Sharma, 1996). توان دوم همبستگی‌های کانونیک بیانگر مقدار واریانس متغیر کانونیک یک گروه است که توسط متغیر کانونیک گروه دیگر توجیه می‌شود. این مقادیر برای همبستگی‌های کانونیک اول و دوم به‌ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۶۱ بود. به عبارت دیگر، ۶۹ درصد تغییرات اولین متغیر کانونیک مربوط به صفات مورفولوژی توسط اولین متغیر کانونیک مربوط به صفات شیمیایی توجیه می‌شود. با وجود اینکه مقدار همبستگی کانونیک در متغیرهای کانونیک اول و دوم قابل توجه می‌باشد، اما آزمون Wilks' lambda نشان داد که تنها اولین ضریب همبستگی کانونیک معنی‌دار است. به نظر می‌رسد بزرگ بودن اندازه نمونه در این مطالعه باعث این امر شده باشد. این آزمون تحت تأثیر اندازه نمونه است. به عبارت دیگر، در نمونه‌های بزرگ حتی مقادیر کوچک همبستگی کانونیک معنی‌دار می‌شوند. علاوه بر این، یک همبستگی کانونیک قوی ممکن است به علت اندازه نمونه کوچک معنی‌دار نشود. معیار Redundancy به عنوان یک معیار معنی‌داری کاربردی (Practical significance) برای متغیرهای کانونیک اول و دوم مشخص کرد که به ترتیب ده و چهارده درصد واریانس صفات مورفولوژیک توسط صفات شیمیایی توجیه می‌شود. بر اساس معیار Redundancy بر خلاف آزمون Wilks' lambda حتی متغیر کانونیک دوم از اهمیت بیشتری برخوردار بود. بنابراین متغیرهای کانونیک اول و دوم برای تفسیر نتایج بکار برده شدند.

Archive of SID

جدول۳- همبستگی‌های کانونیک بین صفات مورفولوژیکی و خصوصیات ترکیبهای دارویی ماریتیغال

شماره	همبستگی کانونیک	همبستگی کانونیک تصحیح شده	توان دوم همبستگی کانونیک	Wilks' lambda
۱	۰/۸۳	۰/۷۲	۰/٦۹	۱/٦۱*
۲	۰/۷۸	۰/٦۹	۰/٦۱	۱/۳۲ns
۳	۰/۷۳	–	۰/۵۳	۰/۹۸ns
٤	۰/٤۸	۰/۳۲	۰/۲۳	۰/۵۲ns
۵	۰/۳٤	۰/۱۹	۰/۱۲	۰/۳٤ns
٦	۰/۲۰	۰/۰٦	۰/۰٤	۰/۱۸ns
۷	۰/۰۷	-۰/۰۳	۰/۰۰٦	۰/۰۷ns

ns و * به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪

ضرایب کانونیک استاندارد شده (Standardized canonical coefficient) اولین متغیر کانونیک مربوط به صفات مورفولوژی نشان داد که وزن هزاردانه و تعداد دانه در کاپیتول با اثر مثبت و وزن دانه در کاپیتول با اثر منفی سهم بیشتری در تشکیل این متغیر کانونیک داشتند (جدول ٤). مقادیر این ضرایب در اولین متغیر کانونیک مربوط به صفات شیمیایی حاکی از تأثیر زیاد و مثبت سیلیکریستین و سیلیبین B و تأثیر بزرگ و منفی سیلیبین A در تشکیل متغیر کانونیک مربوطه می‌باشد. ضرایب دومین متغیر کانونیک نیز دارای ساختاری مشابه متغیر کانونیک اول بود. با این تفاوت که در متغیر کانونیک مربوط به صفات شیمیایی تنها سیلیکریستین سهم قابل توجه و مثبتی در تشکیل متغیر کانونیک مربوطه داشته و نیز علامت ضرایب مربوط به سیلیبین A و B معکوس شده است. در اینجا تنها ضرایب کانونیک بزرگتر از یک در تفسیر روابط بین دو گروه مورد استفاده قرار گرفت.

در ارتباط با بارهای کانونیک، مقادیر بزرگتر از ۰/٤ در تفسیر نتایج به کار رفت. اولین متغیر کانونیک صفات مورفولوژی دارای همبستگی بالا و مثبت با تاریخ گلدهی، قطر کاپیتول و عملکرد دانه بود. متغیر کانونیک اول صفات بیوشیمیایی تنها دارای همبستگی منفی با سیلیبین A بود. به عبارت دیگر، اکوتیپهای با تاریخ گلدهی دیرتر، قطر کاپیتول و عملکرد دانه زیاد دارای درصد سیلیبین A کمی بودند. مقادیر بارهای کانونیک در دومین متغیر کانونیک بزرگتر از بارهای مربوط به اولین متغیر کانونیک بود، از این‌رو اهمیت بیشتری در تفسیر ارتباط بین این دو گروه صفات خواهد داشت. ساختار بارهای جفت متغیر کانونیک دوم نشان داد که اکوتیپهای دارای وزن هزاردانه زیاد و تاریخ گلدهی، ارتفاع بوته، قطر کاپیتول و عملکرد دانه کم دارای درصد سیلیکریستین، سیلیبین A وB زیاد و سیلیدیانین کم بودند. می‌توان نتیجه گرفت که دانه‌های درشت‌تر دارای سیلیبین بیشتر و سیلیدیانین کمتری بودند. همبستگی‌های بین صفات مورفولوژیک و متغیرهای کانونیک صفات بیوشیمیایی و به‌عکس، تفسیر حاصل از بارهای کانونیک را تأیید کرد.

Archive of SID

جدول ٤- ضرایب کانونیک در دو متغیر کانونیک اول (همبستگی کانونیک صفات مورفولوژیک و فلاونولیگنان‌های ماریتیغال)

	صفات	ضرایب کانونیک استاندارد شده		بارهای کانونیک		همبستگی صفت با متغیر کانونیک گروه دیگر	
		۱	۲	۱	۲	۱	۲
مورفولوژیکی	وزن هزاردانه	۱/۵۹	۱/۲۲	۰/۱۳	۰/۷٤	۰/۱۱	۰/۵۸
	تاریخ گلدهی	۰/۵۸	-۰/۲٦	۰/٦۳	-۰/۵۱	۰/۵۳	-۰/٤۰
	ارتفاع بوته	-۰/۲۰	-۰/٤۷	۰/۱۹	-۰/٦٦	۰/۱٦	-۰/۵۲
	قطر کاپیتول	۰/۲۰	۰/۰۷	۰/٤٦	-۰/٤۵	۰/۳۸	-۰/۳۵
	عملکرد دانه	۰/۲۰	-۰/۳۱	۰/۵۷	-۰/٤۷	۰/٤۷	-۰/۳۷
	وزن دانه در کاپیتول	-۱/۷۹	-۱/۲۱	۰/۱٤	۰/۱۷	۰/۱۲	۰/۱۳
	تعداد دانه در کاپیتول	۱/۷۸	۱/۲۱	۰/۳۰	-۰/۲۷	۰/۲۵	-۰/۲۱
	تعداد کاپیتول	۰/۱۹	-۰/۲۹	-۰/۱۳	-۰/۲۵	-۰/۱۱	-۰/۱۹
فلاونولیگنان‌ها	تاکسیفولین	۰/۰٦	-۰/۲۸	-۰/۰۱	۰/۱۳	-۰/۰۱	۰/۱۰
	سیلیکریستین	۱/۲۸	۱/۳۰	-۰/۰۰۰٤	۰/۸۳	۰/۰۰۰۳	۰/٦۵
	سیلیدیانین	-۰/۲٦	۰/۱۳	-۰/۰۳	-۰/٤٤	-۰/۰۲	-۰/۳٤
	سیلیبین A	-۲/۷٤	۰/۰٦	-۰/٤۷	۰/٦۸	-۰/۳۹	۰/۵۳
	سیلیبین B	۱/۲۷	-۰/۲۳	-۰/۲۷	۰/۵٦	-۰/۲۳	۰/٤۳
	ایزوسیلیبین A	-۰/۰۹	-۰/٤۵	-۰/۰٤	-۰/۱۱	-۰/۰۳	-۰/۰۸
	ایزوسیلیبین B	۰/۱٦	-۰/۱۷	۰/۳۱	-۰/۲۸	۰/۲۵	-۰/۲۱

رابطه بین داده‌های AFLP و فلاونولیگنان‌های مورد مطالعه

نتایج رگرسیون چندگانه برای هر یک از ۷ فلاونولیگنان ماریتیغال و ٤۱۵ مکان ژنی AFLP در جدول ۵ آمده است. در کل از ٤۱۵ نشانگر AFLP ، ۳۷ نشانگر رابطه معنی‌دار با تغییرات فلاونولیگنان‌های ماریتیغال داشتند. کمترین تعداد نشانگر مثبت مربوط به سیلیکریستین و سیلیبینA با سه نشانگر و بیشترین مربوط به تاکسیفولین با ۱۱ نشانگر مولکولی بود. بیشترین میزان تغییرات تبیین شده توسط نشانگرهای مثبت مربوط به تاکسیفولین (۵٤٪) و سیلیدیانین (٤۵٪) و کمترین میزان تغییرات تبیین شده توسط نشانگرها، ۱۷ درصد و مربوط به سیلیکریستین بود. تعدادی از نشانگرها دارای رابطه معنی‌دار با بیش از یک صفت بودند، به‌طوری که نشانگر C11M8 دارای رابطه مثبت با فلاونولیگنان‌های سیلیبین A و ایزوسیلیبین A بود. نشانگر C2M20 دارای ضریب رگرسیون منفی برای سیلیکریستین، سیلیبین A و B بود. بدین ترتیب، ژنوتیپهای دارای این نشانگر به علت داشتن مقادیر کم سیلیکریستین و سیلیبین از کیفیت دارویی مطلوبی برخوردار نخواهند بود. نشانگر C5M12 دارای رابطه مثبت با سیلیکریستین و ایزوسیلیبین A بود. در بین ترکیبهای آغازگر، C2 دارای رابطه معنی‌دار با چهار فلاونولیگنان بود. به‌طوری که بخشی از تغییرات تاکسیفولین (C2M1)، سیلیکریستین، سیلیبین A و B (C2M20) توسط تغییرات افراد برای نشانگرهای این ترکیب آغازگر تبیین شد.

Archive of SID

جدول ۵- ضرایب رگرسیون و ضریب تبیین تصحیح شده در رگرسیون چندگانه بین هر یک از فلاونولیگنان‌ها (متغیر وابسته) و مکانهای ژنی AFLP (متغیر مستقل)

	ضرایب رگرسیون						
نشانگر AFLP	تاکسیفولین	سیلیکریستین	سیلیدیانین	سیلیبین A	سیلیبین B	ایزوسیلیبین A	ایزوسیلیبین B
عرض از مبدأ	۰/٦۰۸	۱/۳۷۲	۰/۹۹۲	۲/۹۲۲	۲/۹۰۹	۱/۷۹۲	۱/۸۳۷
C10M23					-۰/٤۳۰		
C10M9	-۰/۰۳۷						
C11M10	-۰/۰۵۱						
C11M13	-۰/۰۷۲						
C11M8				۰/۵٦۳		۰/۱٤۰	
C12M12			۰/۰۷۸				
C12M5	-۰/۰۳۷						
C13M4			-۰/۰۵۹				
C13M6			۰/۰۷۸				
C13M7			-۰/۱۱۳				
C14M2			۰/۱۵۱				
C16M10				۰/۷۰٦			
C16M7							۰/۱۳٦
C19M1						-۰/۱۳۱	
C19M11			-۰/۰۹۷				
C19M7		۰/۱٤۲					
C1M13					-۰/٦٤۹		
C1M16							۰/۱۸۰
C1M17					۰/٤۰٦		
C20M12						-۰/۱۰۷	
C20M2	-۰/۰۳۵						
C21M3	۰/۰۷۰						
C22M10					-۰/٤٤۸		
C22M7	۰/۰۸۷						
C25M3					۰/۵۹۰		
C25M4	-۰/۱۷۸						
C27M4	۰/۰٦۹						-۰/۲۹۳
C2M1	-۰/۰٤۵						
C2M20		-۰/۱۸۵		-۱/۱۱۵	-۰/۹۹٤		
C5M1							۰/۱۸٤
C5M12		۰/۳٤۳				۰/۳۱۵	
C5M3						-۰/۱۲۰	
C5M8							۰/۱٦٦
C6M1			۰/۰٦٤				
C7M3			۰/۱۰۰				
C8M13						۰/۱۲۹	
C8M2	۰/۰٤۱						
R^2 تصحیح شده	۰/۵٤	۰/۱۷	۰/٤۵	۰/۲۲	۰/۳٤	۰/۲۹	۰/۲۵

Archive of SID

رابطه بین داده‌های AFLP و صفات مورفولوژیک

بر اساس تجزیه رگرسیون داده‌های AFLP و صفات مورفولوژیکی، در مجموع ۲۹ نشانگر مثبت برای صفات مورفولوژیکی شناسایی شد (جدول ٦). از بین صفات مورد مطالعه، فقط برای عملکرد دانه و تعداد دانه در کاپیتول نشانگرهای مثبت وجود نداشت. مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده نشان داد که برای صفات وزن هزار دانه، تاریخ گلدهی و ارتفاع بوته بیش از ٤٠ درصد تغییرات توسط نشانگرهای مثبت شناسایی شده توجیه گردید. نشانگرهای C25M3 و C4M12 دارای رابطه معنی‌دار با وزن هزاردانه و تاریخ گلدهی، نشانگر C16M7 برای صفات تاریخ گلدهی و ارتفاع بوته و نشانگر C8M6 با صفات تاریخ گلدهی و تعداد کاپیتول به طور مشترک رابطه معنی‌دار نشان داد. وزن دانه در کاپیتول دارای کمترین میزان تغییرات تبیین شده (٤ درصد) توسط نشانگرها بود که دارای یک نشانگر مثبت با رابطه معنی‌دار در مدل مربوطه بود.

بحث

در همبستگی کانونیک بین صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، بارهای همبستگی‌های ساختاری (Loadings of structural correlations) تفسیر متفاوتی را نسبت به ضرایب کانونیک استاندارد شده ارائه کردند. این تفاوت ناشی از وجود پدیده هم‌خطی بین داده‌ها و یا کوچک بودن اندازه نمونه می‌باشد. به‌طوری که این عوامل باعث ناپایداری ضرایب کانونیک می‌شوند. قابل ذکر است که بارهای کانونیک، رابطه دو متغیره بین یک متغیر و متغیر کانونیک مربوطه با حذف اثر سایر متغیرها می‌باشند، در حالی که ضرایب کانونیک سهم هر متغیر را در تشکیل متغیر کانونیک مربوطه در حضور سایر متغیرها نشان می‌دهند. از این‌رو، Sharma (۱۹۹٦) پیشنهاد کرد که ضرایب کانونیک برای تعیین اهمیت هر متغیر در تشکیل متغیرهای کانونیک و بارهای کانونیک برای تعیین مفهوم آنها بکار برده شود. به‌طور کلی، ارتباط معنی‌دار برخی از صفات مورفولوژیکی مانند وزن هزاردانه با اجزای تشکیل دهنده سیلیمارین حاکی از آنست که می‌توان در برنامه‌های اصلاحی از گزینش غیرمستقیم برای صفات مورفولوژیکی به منظور بهبود و اصلاح صفات کیفی و دارویی ماریتیغال بهره جست. اهمیت این موضوع با توجه به پرهزینه و مشکل بودن اندازه‌گیری مواد مؤثره دارویی روشن می‌شود. همچنین با توجه به اینکه کیفیت دارویی سیلیمارین از طریق نسبت اجزای تشکیل دهنده آن مشخص می‌گردد، بایستی در هنگام گزینش به این مسئله توجه نمود. Adzet و همکاران (۱۹۸۷) با مطالعه ۵۸ جمعیت مختلف ماریتیغال اظهار داشتند که مقادیر سیلیبین و ایزوسیلیبین نسبت عکس با میزان سیلیدیانین دارد.

Archive of SID

جدول ٦- ضرایب رگرسیون و ضریب تبیین تصحیح شده در رگرسیون چندگانه بین هر یک از صفات مورفولوژیکی (متغیر وابسته) و مکانهای ژنی AFLP (متغیر مستقل)

	ضرایب رگرسیون					
نشانگر AFLP	وزن هزاردانه	تاریخ گلدهی	ارتفاع بوته	قطر کاپیتول	وزن‌دانه‌درکاپیتول	تعداد کاپیتول
عرض از مبدأ	۱/۳۳٤	۱۰۷/۷۷٤	۱۳٦/۰۳٦	٤/۷۳۷	۱/۲۷۸	۱٦/٥٦۱
C10M20						۳/۹٥٥
C11M5		-۲/۲٥۰				
C13M3			۹/٦۲۲			
C14M5			۱۱/٤٤۱			
C15M6				۰/۱۲٥		
C16M7		۱/۹۲۱	٦/۰۳۳			
C1M13				-۰/۱۹٥		
C1M18		۱/۹۰۷				
C1M23						۳/٥۲۳
C20M17			٦/۹۱۲			
C22M10	۰/۰٤٤					
C24M10			-٥/۸٦۷			
C24M11				-۰/۱۹۱		
C25M3	-۰/۰٦٦	۲/٤٦٥				
C27M9					۰/۲٤٥	
C2M18	-۰/۰٤۳					
C2M23		۲/٦٤٦				
C2M4				-۰/۱۸٤		
C3M13		۱/۹٤۱				
C3M3	-۰/۱٥۰					
C4M12	۰/۰۸۳	-۲/٦٥۷				
C4M7		۱/٥۰۹				
C7M3				-۰/۲۷۹		
C8M1	۰/۰۸۱					
C8M11			-۱۰/٦۲۰			
C8M5		-۱/٦۰۲				
C8M6		-۲/٦۳۲				-٤/۲۹۲
C9M19				۰/۲٦۰		
C9M5			-۷/۷۳۲			
R^2 تصحیح شده	۰/٤۲	۰/٥٥	۰/٤۱	۰/۲۷	۰/۰٤	۰/۱۷

Archive of SID

مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی دارای کاربردهای متعددی است که برخی از آنها عبارت است از امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپهای خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی الل‌های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم، تسهیل مکان‌یابی خیلی دقیق QTLها و تأیید ژنهای کاندیدای مسئول صفات کمی (Gebhardt *et al*, 2004).

تاکسیفولین فلاونوییدی است که ترکیب آن با یک ماده لیگنانی به نام کونیفریل الکل منجر به تشکیل ترکیبهای فلاونولیگنانی ماریتیغال می‌گردد (Dewick, 1997). به عبارت دیگر، تاکسیفولین پیش‌ساز اصلی بیوسنتز فلاونولیگنان‌ها است. همبستگی مثبت تاکسیفولین با کلیه فلاونولیگنان‌ها مؤید این موضوع است. با توجه به نتایج تجزیه رگرسیون، می‌توان از نشانگرهای AFLP مانند C25M4 و C22M7 برای پیش‌بینی شیمیوتیپهای ماریتیغال از لحاظ تاکسیفولین استفاده نمود. تجزیه همبستگی کانونیک برای صفات مورفولوژی و فلاونولیگنان‌ها نشان داد که اکوتیپهای دارای وزن هزاردانه بیشتر و تاریخ گلدهی، ارتفاع بوته، قطر کاپیتول و عملکرد دانه کمتر دارای سیلیکریستین و سیلیبین بیشتر و سیلیدیانین کمتری می‌باشند. بنابراین اکوتیپهای زودرس یا دارای دوره رویشی کوتاه‌تر و با اندازه یا وزن دانه بیشتر از ارزش دارویی و کیفیت مواد مؤثره بیشتری برخوردارند. این نتیجه ممکن است به علت شرایط آب و هوایی محل آزمایش (تبریز) باشد. Mohammadi و همکاران (۲۰۰۲) در تجزیه دلایل ۸ لاین اینبرد ذرت، پس از شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با عملکرد دانه، تعداد دانه در بلال و وزن ۱۰۰ دانه با استفاده از تجزیه رگرسیون چندگانه گام به گام، دو جزء اثر افزایشی و غالبیت را برای نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات برآورد کردند. آنها در مجموع ۱٤ نشانگر مثبت برای سه صفت گزارش کردند. Kraakma و همکاران (۲۰۰٤) در مطالعه ۱٤٦ رقم جو بهاره با استفاده از ۲۳٦ نشانگر AFLP، ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات عملکرد و پایداری عملکرد را تعیین کردند. رگرسیون چندگانه گام به گام نشان داد که ۱۸ تا ۲۰ نشانگر ٤۰ تا ۵۸ درصد تغییرات این دو صفت را تبیین کردند.

Virk و همکاران (۱۹۹٦) رابطه بین صفات تاریخ گلدهی و تعداد پنجه (Culm) را با نشانگرهای RAPD و ایزوزیم در ٤۷ نمونه برنج مورد مطالعه قرار دادند. رگرسیون چندگانه با استفاده از ٦۳ نشانگر RAPD و ۳۹ آلوزیم به عنوان متغیر مستقل و تاریخ گلدهی به عنوان متغیر وابسته نشان داد که ۲۹ نشانگر RAPD حدود ۹۹ درصد تغییرات را توجیه کردند. به عقیده این محققان، در صورتی که پیوستگی ژنتیکی علت اصلی رابطه بین نشانگرهای مولکولی و مکانهای ژنی کنترل کننده صفات کمی باشد، یک مزیت رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات کمی، گزینش کارایی والدین به منظور ایجاد جوامع مورد استفاده در مکان‌یابی QTLهای یک صفت معین می‌باشد. از طرف دیگر، بدون توجه به دلایل وجود این روابط، کاربرد نشانگرهای مولکولی (که کم و بیش دارای توزیع تصادفی در ژنوم هستند) به همراه تجزیه رگرسیون چندگانه، کمک قابل توجهی در استفاده از تنوع زیستی گیاهان فراهم می‌نمایند. ترکیب فنون مختلف، پیش‌بینی نمود یک گیاه در یک محیط معین را از لحاظ صفات زراعی کمی، پیش از اجرای آزمایش مزرعه‌ای میسر خواهد نمود. علاوه بر این، در صورتی که ژرم‌پلاسم یک گونه از لحاظ صفات کمی مهم برای شرایط خاص (مانند تحمل تنش) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ارزیابی گردد، داده‌های حاصل از نشانگر ابزار ارزشمندی

Archive of SID

برای پیش‌بینی ارزش ژرم‌پلاسم‌های دیگر و نیز شناسایی ماده ژنتیکی مطلوب حتی در شرایط آزمایشگاهی خواهد بود. بنابراین، این مطالعه ارزش ژرم‌پلاسم گیاهی را به عنوان ذخایر ژنهای مفید یا به عنوان منابع اطلاعات درباره صفات فنوتیپی مشخص می‌کند. همچنین با توجه به اینکه بیوسنتز متابولیتهای ثانویه از جمله فلاونولیگنان‌های سیلیمارین در گیاه به شدت تحت تأثیر شرایط اقلیمی و آب و هوایی محل رویش می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌شود بررسی خصوصیات زراعی و دارویی ماریتیغال در ترکیبی از سالها و مکانهای مختلف مورد آزمون و مطالعه قرار گیرد. همچنین با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط با نشانگرهای بیوشیمیایی یا زراعی، می‌توان گزینش افراد برتر را در مرحله گیاهچه و مستقل از اثر محیط انجام داد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از مساعدت و همکاری کارشناسان آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی دانشگاه تبریز آقای کهنمویی و خانم شکویی در انجام بخش مولکولی و از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی برای اندازه‌گیری مواد مؤثره دارویی سپاسگزاری نمایند.

منابع مورد استفاده

– امیدبیگی، ر.، ۱۳۷۷. بررسی تولید سیلیمارین و سیلیبین در گیاه ماریتیغال با کشت بذور وحشی و زراعی آن. مجله علوم کشاورزی ایران، ۲۹(۲): ۴۲۰-۴۱۳.

– حسنلو، ط.، خاوری‌نژاد، ر.، مجیدی هروان، ا.، ضیایی، س. و شمس اردکانی، م.، ۱۳۸۳. مطالعه و تعیین فلاونولیگنان‌ها در میوه‌های گیاه خارمریم جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران به روشهای اسپکتروفتومتری، TLC و HPLC. فصلنامه گیاهان دارویی، ویژه‌نامه گیاه خارمریم، صفحه ۲۵-۳۲.

– شکرپور، م.، محمدی، س. و مقدم، م.، ۱۳۸۳. استخراج DNA از گیاهان دارویی: مطالعه موردی روی گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L). خلاصه مقالات دومین همایش گیاهان دارویی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران، ۸-۷ بهمن: ۱۰۹.

- Adzet, T., Coll, M.R., Iglesias, J. and Puigmacia, M., 1987. Selection and improvement of *Silybum marianum*. 1. Characterization of populations from different origins. Plant Physiology and Biochemistry, 25: 129-135.
- Adzet, T., Iglesias, J. and Martinez, F., 1993. Flavonolignans in the fruits of *Silybum* genus taxa: A chromatographic and mass spectrometric survey, Plants Medicinales et Phytotherapie, 26: 117-129.
- Cacho, M., Moran, M., Corchete, P. and Fernandez-Tarrago, J., 1999. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Journal of Plant Sciences, 144: 63-68.
- Carrier, D.J., Crowe, T., Sokhansanj, S., Wahab, J. and Barl, B., 2002. Flower head development and associated marker compound profile. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 10: 65-74.
- Dewick, P.M., 1997. Medicinal natural products, a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd, UK, 466p.
- Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P. and Schuler, K., 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding, 13: 93-102.
- Hetz, E., Liersch, R. and Schieder, O., 1995. Genetic investigations on Silybum marianum and S. eburneum with respect to leaf colour, outcrossing ratio and flavonolignan composition. Planta Medica, 61: 54-57.
- Kazmierczak, K. and Seidler-Lozykowska, K., 1997. Silma–the Polish variety of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.). Herba Polonica, 63: 195-198.
- Kraakman, A.T.W., Niks, R.E., Van den berg, P.M.M.M., Stam, P., and Van Eeuwijk, F.A., 2004. Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. Genetics, 168: 435-446.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M., Sudan, C. and Singh, N.N., 2002. A microsatellite marker based study of chromosomal regions and gene effects on

Archive of SID

marianum) fruits grown in Iran. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, In Press.
- USP, 2003. The United States Pharmacopeia and the National Formulary, United States Pharmacopeia Convention, 26, NF 21.
- Virk, P.S., Ford-Lioyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P., and Newbury, H.J., 1996. Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. In: IRRI, Rice genetics III, Proceedings of The Third International Rice Genetics Symposium, Manilla, Philippines, 16-20 October: 307-316.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van Delee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.
- Wallace, S.N., Carrier, D.J. and Clausen, E.C., 2003. Extraction of nutraceuticals from milk thistle. Applied Biochemistry and Biotechnology, 105-108: 891-903.

yield and yield components in maize. Cellular & Molecular Biology Letters, 7: 599-606.
- Murphy, J.M., Caban, M. and Kemper, K.J., 2000. Milkthistle (*Silybum marianum*). http: //www.mcpedu/herbal/default.htm
- Quaglia, M.G., Bossu, E., Donati, E., Mozzanti G., and Brandt, A., 1999. Determination of silymarin in the extract from the dried *Silybum marianum* fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 19: 435-442.
- Ram, G., Bhan, M.K., Gupta, K.K., Thaker, B., Jamwal, U. and Pal, S., 2005. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* Gaertn. Fitoterapia, 76: 143-147.
- Rechinger, K.H., 1979. Flora Iranica. Akademische Druk-U Verlagsanstalt, Craz Austria, 139a: 287-288.
- Sharma, S., 1996. Applied multivariate techniques. John Wiley & Sones, Inc., USA, 493p.
- Shokrpour, M., Mohammadi, S.A., Moghaddam, M., Ziai, S.A. and Javanshir, A., 2008. Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum*

Archive of SID

Analysis of morphologic association, phytochemical and AFLP markers in milk thistle (*Silybum marianum* L.)

M. Shokrpour[1*], S.A. Mohammadi[2], M. Moghaddam[2], S.A. Ziai[3] and A. Javanshir[4]

1*- Corresponding Author, Assist. Prof., Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Iran, E-mail: shokrpour@uma.ac.ir
2- Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
3- Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shaheed Beheshti Medical University, Tehran, Iran
4- Head of Organization of Agricultural & Natural Resources Engineering Regulation in East Azarbaijan, Iran

Received: March 2008 Revised: August 2008 Accepted: August 2008

Abstract

To investigate the relationships between morphological, phytochemical and molecular markers in milk thistle, a set of 32 ecotypes collected from Iran along with two introduced varieties, Budakalaszi and CN seeds, were evaluated. Canonical correlation analysis between 8 morphological attributes and 7 flavonolignan compounds forming silymarin revealed that first two canonical variables showed high canonical correlations. The loadings of the canonical correlations indicated that ecotypes having higher values for 1000 seed weight and lower values for flowering time, plant height, capsule diameter and seed yield would have higher silychristin and silybin and lower silydianin contents. In other words, larger seeds would have higher silybin and lower silydianin. Out of 415 polymorphic markers, 37 and 29 markers showed significant association with flavonolignans markers and morphological attributes, respectively. The informative markers showed 54 and 45% of the variation for taxifolin and silychristin, respectively. In the case of morphological traits, more than 40% of 1000 seed weight, flowering date and plant height variation were determined by informative AFLP markers. Results of the study clarified that some of qualitative and quantitative properties of essential oil in milk thistle can be well predicted by morphological and also molecular markers.

Key words: *Silybum marianum* L., phytochemical, morphologic, marker, AFLP.

Archive of SID