مطالعه کروموزومی در برخی از گونه های جنس *Cirsium* در استان های خراسان رضوی و شمالی

Archive of SID

دریه امیری مقدم[1]، غلامرضا بخشی خانیکی*[2]، سید جواد قریشی الحسینی[3]

[1] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران
[2] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران- ایران
[3] استاد، گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران

چکیده

سابقه و هدف: جنس *Cirsium* یکی از سرده های خانواده کاسنی است و تا کنون 300-250 گونه آن در جهان گزارش شده است. گیاهان این سرده علفی، دو ساله یا چند ساله و پایا بوده و در افریقا، اروپا و امریکا رویش دارند. بررسی منابع نشان می دهد که تاکنون پژوهش های اندکی در مورد سیتوژنتیک این سرده در جهان به ویژه در ایران صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: در مطالعات ژنتیکی با توجه به امکانات، نمونه ها و زمان های طولانی جهت جوانه دار شدن بذرها 4 گونه *C. congestum*، *C. vulgare*، *C turkestanicum* و *C.arvense* مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور پس از جوانه دار کردن بذرها، مراحل پیش تیمار، تثبیت، هیدرولیز، رنگ آمیزی، از مریستم ریشه ای گیاهچه ها نمونه میکروسکوپی تهیه شده و پس از آن بررسی های کروموزومی شامل تعیین تعداد کروموزوم و سطح پلوییدی انجام شد.

یافته‌ها: عدد کروموزومی سوماتیکی در گونه های *C. congestum*، *C. turkestanicum* برابر با 34 کروموزوم بود (2n=34) و در گونه های *C. vulgare* و *C.arvense* برابر با 68 کروموزوم بود (2n= 68).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج حاصل از مطالعات سیتوژنتیکی، گونه های مورد مطالعه، از نظر تعداد کروموزوم در دو گروه دیپلوئید و تتراپلوئید قرار می گیرند. گروه 1- 2n=2x=34 که شامل گونه های *C. congestum* و *C. turkestanicum* است. گروه 2- 2n=4x =68 که شامل گونه های *C. vulgare* و *C.arvense* است.

کلمات کلیدی: جنس *Cirsium*، عدد کروموزومی، استان های خراسان رضوی و شمالی

مقدمه

جنس *Cirsium Adans* یکی از سرده های خانواده کاسنی است و تا کنون 300-250 گونه آن در جهان گزارش شده است. گیاهان این سرده علفی، دو ساله یا چند ساله و پایا بوده و در افریقا، اروپا و امریکا رویش دارند. برخی از گونه های این سرده دارای خواص دارویی اند و برخی نیز جزء گیاهان مرتعی می باشند (Dittrich, 1975 & 1979; Heywood, 1985). بررسی منابع نشان می دهد که تاکنون پژوهش های اندکی در مورد سیتوژنتیک این سرده در جهان به ویژه در ایران صورت گرفته است و اطلاعات سیتولوژیکی در این سرده، محدود به گزارش تعداد کروموزوم در بعضی گونه هاست. در مورد تعداد کروموزوم های گونه های مشترک با خراسان گزارشاتی به شرح جدول زیر وجود دارد (Bures et al., 2004; Ghaffari, 1999). لذا از آنجایی که دانشمندان معتقدند که کروموزوم ها از جمله صفات با ارزشی هستند که می توان بر اساس آن نحوه روند تکاملی را دریافت و سیتوتاکسونومی می تواند علاوه بر طبقه بندی، ارتباط بین گیاهان را نیز نشان دهد و همچنین از طریق مطالعه صفات سیتولوژیکی امکان مقایسه جمعیت ها نیز فراهم می شود. بر اساس این تحقیق در *C. congestum* 2n=34 می باشد. از 17 جفت کروموزوم های این گونه 13 جفت به صورت متاسانتریک، 4 جفت به صورت ساب متاسانتریک می باشد. در این گونه جفت کروموزوم شماره 6 منگوله دار تشخیص داده شده است. این گونه دارای کاریوتیپ متقارن می باشد.

آدرس نویسنده مسئول:گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
تاریخ دریافت مقاله: 1389/8/20
تاریخ پذیرش: 1389/11/13
www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

در پایان فصل رویش و زمانی که بذرها کامل شدند، (قبل از ریزش) اقدام به جمع آوری بذر گونه های مورد مطالعه، گردید. به این منظور بذر 4 گونه *C. congestum*، *C. vulgare*، *C. turkestanicum* و *C. arvense* از مناطق مختلف استان خراسان جمع آوری شد. بلافاصله بعد از جمع آوری بذرها، آن ها درون پاکت های کاغذی در جای خنک نگهداری شدند. پس از جمع آوری بذرها، آن ها برای مدت دو هفته تا یک ماه در یخچال قرار گرفتند تا یک دوره سرما را پشت سر بگذرانند. پس از این مدت، ابتدا برای جلوگیری از رشد قارچ و کپک زدگی، آن ها به مدت 2-1 دقیقه در الکل 70 درصد یا هیپوکلرات سدیم قرار گرفته و پس از شستشوی کامل با آب، آن ها را به پتری دیش هایی که در آون 180 درجه استریل شده بودند، روی دو کاغذ صافی استریل شده در آب جوش منتقل کرده و پس از اضافه کردن آب مقطر استریل تحت شرایط دمای 25 درجه و تاریکی قرار گرفتند. مدت زمان لازم برای جوانه زدن بسته به گونه بین 3 روز تا 2 هفته بود.

پس از این که ریشه ها جوانه زدند، پتری دیش ها به یخچال منتقل و به مدت 24-12 ساعت در یخچال نگهداری شدند و پس از طی این مدت دوباره تحت شرایط 25 درجه قرار گرفتند. این کار جهت تحریک سلول ها و تجمع آنزیم های ضروری برای تقسیم در سلول ها بوده تا با شدت بیشتری شروع به تقسیم کنند. جهت پیش تیمار در این بررسی از هیدروکسی کینولین و کلشی شین استفاده گردید. به این ترتیب که وقتی ریشه ها به اندازه کافی رشد کردند ساعت 8 یا 9 صبح به محلول 2 مولار کینولین منتقل و به مدت 1/5 ساعت در محل تاریک و درجه حرارت محیط نگهداری شدند.

برخی از ریشه ها نیز ساعت 10 صبح به محلول کلشی سین 0/05 در صد منتقل و به مدت 2 ساعت در محل تاریک و درجه حرارت محیط قرار گرفتند.

سپس برای تثبیت بافت، پس از خارج کردن ریشه ها از داخل مواد پیش تیمار، آن ها را با آب مقطر شستشو داد تا اثرات مواد پیش تیمار بر طرف گردد، سپس ریشه ها در محلول کارنوی به 12 الی 24 ساعت در محل تاریک و درجه حرارت محیط قرار داده، شدند. به منظور نگهداری ریشه های تثبیت به مدت طولانی، بعد از شستشوی آن ها با آب مقطر، بلافاصله به الکل اتیلیک 70 درصد منتقل شده و در یخچال با دمای 5-2 درجه نگهداری می شوند.

در اکثر روش ها بایستی ریشه های تثبیت شده را به وسیله تیمار با اسید کلریدریک هیدرولیز نمود. با هیدرولیز نمودن تغییراتی در DNAی کروموزوم ها به وجود آمده و موجب می گردد تا در مقابل رنگ آمیزی به خوبی واکنش نشان دهند. برای انجام عمل هیدرولیز به اپندورف حاوی ریشه ها، اسید کلریدریک یک نرمال اضافه گردید و در آون با دمای 60 درجه قرار داده شد. مدت زمان مناسب جهت هیدرولیز که پس از چند بار تکرار آزمایش به دست آمد بین 10 تا 15 دقیقه بود. بلافاصله پس از هیدرولیز ریشه ها را با آب مقطر شستشو داده تا اثرات اسید برطرف و ریشه ها سریعاً سرد و هیدرولیز متوقف شود.

جهت رنگ آمیزی در این تحقیق از روش های رنگ آمیزی استواورسئین و استوکارمن استفاده گردید. پس از هیدرولیز و شستشوی نمونه ها با آب، به نمونه های موجود در ایندورف رنگ استواورسئین افزوده و سپس نمونه ها در جای تاریک و دمای آزمایشگاه نگهداری شدند و پس از 24 ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. در روش رنگ آمیزی استوکارمن، نمونه ها در بشر حاوی رنگ قرار گرفته و برای مدت یک دقیقه جوشانده می شوند و سپس از آن ها نمونه میکروسکوپی تهیه می گردد. پس از رنگ آمیزی 3-2 میلی متر از نوک ریشه جدا و بر روی اسلاید میکروسکوپی (لام) و یک قطره اسید استیک 45 درصد قرار داده شد، سپس نمونه با میکروسکوپ استرئو بررسی و منطقه مریستمی آن با سوزن جدا گردید و پس از آن یک لامل روی نمونه قرار گرفته و برای این که سلول ها در یک لایه لام پخش شوند به آرامی ضرباتی با خودکاری که ته صاف و نرمی دارد بر روی لامل وارد کرده و برای گسترده شدن بیشتر سلول ها و قابل شمارش شدن کروموزوم ها لام و لامل را لابه لای یک ورق کاغذ صافی گذاشته و با انگشت فشار داده تا از نفوذ هوا بین لام و لامل جلوگیری شود در نهایت می توان به کناره های لامل در روی لام، چسب انتلان زده و اسلاید را در داخل پتری دیش مرطوب در یخچال قرار داده، تا نمونه تهیه شده برای مدت زیادی قابل مطالعه میکروسکوپی باشد. پس از عمل مونته کردن اسلایدها، آن ها را مورد مطالعه میکروسکوپی قرار می دهیم. ابتدا با درشت نمایی کم میکروسکوپ مشخص می کنیم که آیا یاخته متافازی وجود دارد یا نه؟ و در صورت مشاهده یاخته مورد نظر با روغن سدر یا ایمرسیون آن را با درشت نمایی 100 عدسی شیئی مورد بررسی قرار می دهیم. در صورت مناسب بودن از یاخته به تعداد زیاد عکس تهیه کرده که برای تهیه کاریوتایپ از عکس ها زیراکس رنگی گرفته شود. سپس به کروموزوم های آن شماره داده و با برش تصویر کروموزوم ها و مرتب کردن آن ها بر اساس طولشان از بزرگ به کوچک کاریوتایپ تهیه نمودیم. البته لازم به ذکر است که دراین تحقیق پس از آزمایش های متعدد که هر

www.SID.ir

Archive of SID

کدام از مرحله جوانه دار کردن بذرها تا مرحله تهیه لام مدت یک طول می کشید به علت تعداد زیاد کروموزوم و کوچک بودن آن ها موفق به تهیه کاریوتایپ نشده و تنها عدد کروموزومی گزارش گردید.

یافته ها

به منظور مطابقت ویژگی های سیتوژنتیکی با صفات ریختی، مطالعات ریخت شناختی گونه های مختلف *Cirsium* در خراسان نتایجی را به شرح زیر به دست می دهد : در میان گونه های مورد مطالعه *C. rhizocephalum* غالباً فاقد ساقه و یا دارای ساقه ای بسیار کوتاه می باشد. سطح ساقه و برگ اکثر گونه ها معمولاً از کرک پوشیده شده است. تنوع الگوی کرک های اپیدرمی برای رده بندی در سطح تشخیص هیبریدها، گونه، سرده و خانواده صفاتی را به دست می دهند. تأکید بیشتر بر روی شکل، اندازه و طرز قرار گرفتن سلول های تشکیل دهنده کرک است. وجود و عدم وجود ساختمان غده ای بر روی کرک از نظر تاکسونومی مهم می باشد. همچنین نحوه پراکندگی کرک ها در بین تاکسون های مطالعه شده به عنوان یک صفت تاکسونومیکی قابل ارزیابی است. همان گونه که در شرح ریخت شناختی گونه ها مشاهده شد یکی از صفات مهم در رده بندی در سطح گونه ای سرده *Cirsium* وجود اشکال متفاوت کرک در سطح فوقانی و تحتانی برگ ها بود. برای مثال در گونه *C. congestum* سطح فوقانی برگ ها پوشیده از کرک های سیخ، زبر و خارمانند، نا برابر و پراکنده و تارعنکبوتی بوده و سطح تحتانی برگ ها نیز مختصراً پوشیده از کرک های تار عنکبوتی می باشد. در حالی که در گونه *C. turkestanicum* سطح فوقانی برگ ها پوشیده از کرک های زبر و خارمانند انبوه بوده و سطح تحتانی برگ ها پوشیده از کرک های تارعنکبوتی انبوه پتویی می باشد. در گونه *C. arvense* سطح فوقانی برگ ها تنها از کرک های تار عنکبوتی (کمی) پوشیده شده و در سطح تحتانی برگ ها پوشیده از کرک های تار عنکبوتی انبوه پتویی می باشد.

شکل کلی برگ ها در همه گونه ها تقریباً مشابه بوده، حاشیه پهنک سینوسی و یا دندانه دار و غالباً خار دارند و همگی ساقه آغوش و بدون دمبرگ می باشند.

از صفات دیگر متمایز کننده گونه ها می توان به شکل کپه و تعداد آن ها در رأس ساقه که معمولاً منشعب است، اشاره کرد. برای مثال در گونه *C. congestum* در رأس ساقه منشعب غالباً 10-3 عدد کپه به صورت مجتمع و فشرده به هم دیده می شوند، در حالی که در *C. Bornmulleri* و *C. turkestanicum* کپه ها در رأس ساقه منشعب منفرد اندرتاً 2 تا 3 عدد هستند و در *C. vulgare* کپه ها در رأس ساقه منشعب به صورت منفرد دیده می شوند. در *C. arvense* کپه ها در رأس ساقه منشعب به ندرت منفرد و غالباً هر چند کپه به صورت پانیکولی- دیهیمی قرار دارند.

شکل کپه ها نیز در گونه های مختلف نیز متفاوت می باشد. برای مثال کپه ها در *C. congestum* کروی یا تخم مرغی پهن و *C. arvense* تخم مرغی باریک و کشیده می باشند.

از تفاوت های بارز دیگر می توان به شکل برگک های خارجی و داخلی گریبان در گونه های مختلف اشاره کرد. تفاوت ها در شکل کلی، وجود یا عدم وجود کرک و رنگ برگک ها می باشد که از صفات مهم تاکسونومیکی برگک هستند. برای مثال در *C. congestum* برگک های سرنیزه ای باریک، تقریباً سه پهلو و هر یک منتهی به یک خار بلند ایستاده و زرد رنگ هستند، در حالی که در *C. osseticum* برگک های گریبان سرنیزه ای برگشته و سرازیر و معمولاً ارغوانی رنگ می باشد.

لازم به ذکر است که ساختار گلچه ها در گونه های مختلف تفاوت های بارزی را نشان نمی دهد. جام گل معمولاً نزدیک به میانه یا قاعده پنج قسمتی، بساک ها به هم پیوسته یا Syngenesious، در قاعده زایده دار و دارای دو دنباله دراز، میله پرچم ها آزاد و معمولاً کرک آلود، کلاله دو قسمتی و در پایین محل انشعاب حلقه وار، ضخیم و کرک پوش است. جقه (پاپوس ها) معمولاً سفید چرک، پر مانند و در اندازه های متفاوت دیده می شود.

بحث

اهمیت عدد کروموزومی به عنوان یک صفت تاکسونومیک این است که احتمالاً یکی از با ثبات ترین صفات موجودات زنده می باشد. این ثبات نسبی موجب شده که در تاکسونومی، عدد کروموزومی به عنوان صفتی مهم و کاربردی معرفی می شود و از این رو تنها داده سیستماتیک زیستی است که پیوسته در فلورها و منابع همسان گزارش می شود. تمام افراد یک گونه (گرچه استثنائاتی وجود دارد) معمولاً دارای عدد کروموزومی مشابه هستند. در سطح گونه، معمولاً یک عدد پایه اصلی و نسبتاً مشخص وجود دارد. از این عدد پایه، عددهای پایه گوناگون مشتق می شوند که آنیوپلوئیدها و پلی پلوئیدها را به وجود می آورند. بررسی فهرست های کروموزومی (جدول 1) نشان می دهد که گونه های خویشاوند (گونه های یک جنس) که تعداد کروموزوم متفاوت دارند، این تفاوت ها بیشتر ناشی از پدیده پلی پلوئیدی است که در گیاهان بسیار رایج بوده و نقش عمده ای را در تکامل گیاهان دارد. تعیین سطح پلوئیدی که از مطالعات کروموزومی به دست می آید، در انجام دورگ گیری از اهمیت فراوانی

www.SID.ir

Archive of SID

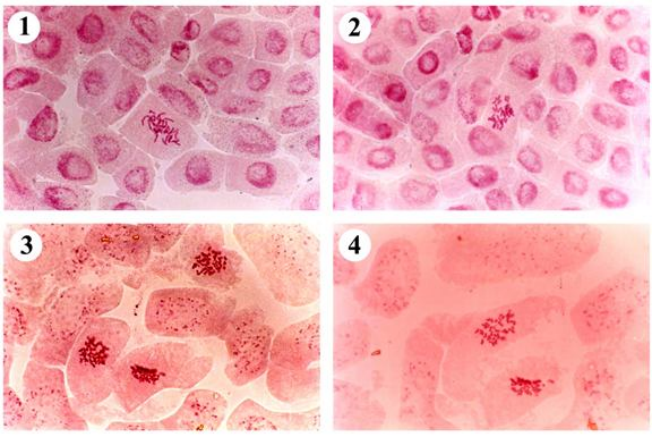
جدول1- بررسی تاریخچه سیتوژنتیکی برخی گونه های *Cirsium*

گونه	n	2n	منابع
C. ravense (L.)scop		34	Loon & Jong, 1978
C. ravense (L.)scop		34	Uhrikova, 1978
C. ravense (L.)scop		34	Skainska et. al., 1974
C. ravense (L.)scop. var. arvense		34	Mortorn, 1977
C. ravense (L.)scop.var. incanum (Fish.) Ledeb		34	Mortorn, 1977
C. ravense (L.)scop		34	Kuzmanov et. al., 1981a
C. ravense (L.)scop		34	Bir & Sidhu, 1980
C. ravense (L.)scop	17		Sidhu, 1979
C. ravense (L.)scop		34	Morton, 1981
C. ravense (L.)scop		34	Van Den Brand et. al., 1979
C. ravense (L.)scop		34	Kliphuis & Wieffering, 1979
C. ravense (L.)scop		68	Czapik, 1958
C. ravense (L.)scop		34	Podtech & Bader, 1974
C. ravense (L.)scop		34	Talavera, 1974
C. ravense (L.) scop. var. vestitum Wimm & Grab		68	Kuzmanov et. al., 1981
C. ravense (L.) scop. var. vestitum Wimm & Grab		34	Van loon & Kieft, 1980
C. ravense (L.)scop		34	Tonian, 1981a
C. ravense (L.)scop	17		Gupta & Gill, 1983
C. ravense (L.)scop		34	Arohonka, 1982
C. ravense (L.)scop		34	Dmitrieva, 1987
C. ravense (L.)scop	17		Gupta & Gill, 1989
C. ravense (L.)scop		34	Parfenov & Dmitrieva, 1988
C. ravense (L.)scop	34	68	Kuzmanov et. al., 1947
C. congestum Fish. & C. Meyer		34	Tonian, 1982
C. rhizocephalum C. Meyer		34	Tonian, 1981b
C. rhizocephalum C. Meyer var. caulescens Boiss		34	Tonian, 1981b
C. vulgare (Savi) Ten		68	Skalinska et. al., 1974
C. vulgare (Savi) Ten		68	Morton, 1977
C. vulgare (Savi) Ten. subsp. sylvaticum		68	Scrugli & Bocchieri, 1977
C. vulgare (Savi) Ten		68	Pavone et. al., 1981
C. vulgare (Savi) Ten		68	Strid & Franzen, 1981
C. vulgare (Savi) Ten		68	Tonian, 1982
C. vulgare (Savi) Ten		68	Arohonka, 1982
C. vulgare (Savi) Ten		68	Probatova & Sokolovskaya, 1984b
C. vulgare (Savi) Ten		68	Sokolovskaya & Probatova, 1984a
C. vulgare (Savi) Ten		68	Dmitrieva, 1987
C. vulgare (Savi) Ten		68	Parfenov & Dmitrieva, 1988
C. vulgare (Savi) Ten		68	Krasnikov & Lomonosova, 1990
C. vulgare (Savi) Ten		68	Holloingsworth et. al., 1992
C. vulgare (Savi) Ten		34	Kuzmanov et. al.,1997

www.SID.ir

Archive of SID

برخوردار می باشد، زیرا هر سطح پلوئیدی جدید، خزانه ژنتیکی جدیدی را به دست می دهد. همان گونه که از نتایج و تصاویر مشخص می شود، گونه های مورد مطالعه از نظر تعداد و اندازه کروموزوم تفاوت هایی را نشان می دهد. اختلاف در اندازه کروموزوم گونه ها نشان دهنده اختلافات موجود در انواع محصولات ژنی یا پروتئینی آن ها است و اختلاف در تعداد کروموزوم گونه ها نشان دهنده اختلافات موجود در آرایش ژن یا مضاعف شدن ژن و یا هر دو است. همان طور که قبلاً اشاره شد بررسی سیتوژنتیکی 4 گونه *Cirsium* شامل: *C. congestum*، *C. vulgare*، *C. turkestanicum* و *C. arvense* انجام گرفت و از مرحله متافاز میتوز گونه ها عکس تهیه شد (شکل 1).



شکل1 - مرحله متافاز میتوز در گونه های: 1- *C. congestum*، 2- *C. turkestanicum*، 3- *C. vulgare* و 4- *C. arvense*.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعات سیتوژنتیکی، گونه های مورد مطالعه، از نظر تعداد کروموزوم در دو گروه دیپلوئید و تتراپلوئید قرار می گیرند.

گروه1- 2n=2x=34 که شامل گونه های *C. congestum* و *C. turkestanicum* است.

گروه2- 2n=4x=68 که شامل گونه های *C. vulgare* و *C. arvense* است.

تشکر و قدردانی

از تمامی همکاران در گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد کمال تشکر را داشته و از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه مشهد قدردانی می نمائیم.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Bures P, Wang YI-F, Horova L and Suda J. Genome size variation in central European species of Cirsium (Compositae) and their natural hybrids. Annals of Botany, 2004; 94 (3): 353-363.

2- Dittrich M. Systematic survey of the Cynareae. The biology and chemistry of Compnsitae-A Joint International sysmposium, Abstracts and Reports, 1975; 414-444.

3- Dittrich M. Compositae III- Cynareae in Rechinger. Flora Iranica, 1979; 139.

4- Gerald B, Peter H Raven and Donald W. Chromosome numbers in some North American species of the genus Cirsium. III. Western United States, Mexico, and Guatmala. Brittonia, 1975; 27(4): 297-304.

5- Ghaffari SM. Chromosome studies in Iranian Asteraceae. Iran J Bot, 1999; 8(1)91-104.

6- Heywuod VH. Flowering plants of the world.Oxford univ press, 1985; England.

www.SID.ir