

مطالعه کاربوتیپ سه جمعیت از گیاه دارویی *Silybum marianum*

احمد داداشیان ریحان^{۱*}، هوشنگ نصرتی^۲، احمد رزبان حقیقی^۳

۱. گروه زیست شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

۲. گروه زیست شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۳. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: ماریتیغال (*Silybum marianum*) گیاهی بوته‌ای خاردار و دارویی از تیره گل ستاره (*Compositae*) است که دارای ماده سیلی مارین می‌باشد و در پیش‌گیری و درمان بیماری‌های کبدی و سرطان کبد و نیز کاهش کلسترول خون سودمند است. اهمیت دارویی این گونه، مطالعه روی این گیاه را دوچندان می‌نماید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه سه جمعیت رویشی مغان، فریدون کنار و نورآباد ممسنی از گونه *Silybum marianum* از نظر کاربوتیپی مورد بررسی واقع شدند. جهت بررسی کاربوتیپی جمعیت‌های این گونه، از آلفابروموناتالین به‌عنوان پیش‌تیمار و از اکسید کروم و فرمالدئید به‌عنوان فیکساتور، و NaOH برای هیدرولیز و هماتوکسیلین جهت رنگ آمیزی استفاده شده است.

یافته‌ها: پس از مطالعه‌های میکروسکوپی و تحلیل آماری و تهیه جداول و کاربوتیپ مشخص شد همه جمعیت‌ها دیپلوئید و دارای عدد پایه کروموزومی $X=17$ بوده و کروموزوم‌ها در حد فاصل متاسانتریک و ساب متاسانتریک قرار می‌گیرند؛ بدین مفهوم که محل سانترومر در کروموزوم‌ها کمابیش میانی است.

نتیجه‌گیری: با توجه به شکل کروموزوم و موقعیت سانترومر و پارامتر TF% می‌توان نتیجه‌گیری نمود که گیاه ماریتیغال یک گیاه کم‌تر تحول یافته با کاربوتیپ متقارن می‌باشد. هم‌چنین از نظر تکاملی جمعیت نورآباد ممسنی نسبت به دو جمعیت دیگر متکامل‌تر بوده و جمعیت‌های مورد مطالعه با توجه به نتایج این تحقیق متعلق به یک گونه می‌باشند و تحول و جدایی جمعیت‌های گونه مشاهده نمی‌گردد.

واژه‌های کلیدی: کاربوتیپ، ماریتیغال، *Silybum marianum*، سیتوژنتیک

مقدمه

Silybum marianum که به فارسی خارمریم، خار مقدس، خار شیری، خار نقره‌ای، تیغ پنبه، شیشه مور و انگز گفته شده و به تازگی نام ماریتیغال برای گیاه برگزیده شده است (۱). رویشگاه اصلی این گیاه مناطق مدیترانه می‌باشد و در مناطق مختلف کشور ایران نیز می‌روید (۲). دانه‌های خشک گیاه شامل ۱ الی ۴ درصد فلاونوئیدهای سیلیمارین است. سیلیمارین (silymarin) حداقل مخلوطی از سه فلاونولیگنان شامل سیلی بین (silybin)، سیلی دیانین (silydianin)، سیلی کریستین (silychristin) است. لازم به ذکر است که

مقدار سیلی بین کمابیش ۰.۵٪، سیلی کریستین ۰.۲۵٪ و سیلی دیانین ۰.۲۵٪ است (۸).

فرآورده‌های دانه این گیاه در پایین آوردن فشار خون، رفع سردردهای یک‌طرفه (میگرن) و کهیر ناشی از آنافیلاکسی، بیماری‌های کبدی و عدم ترشح و دفع صفرا، سل ریوی به‌خصوص در مرحله پیشرفت بیماری، اختلال‌های هضمی، گشادشدگی مرضی سیاهرگ‌های یک عضو، انبساط و کشیدگی دردناک سیاهرگ‌های درون جمجمه، دریاگرفتگی اثرهای مفید ظاهر می‌نماید. مصرف فرآورده‌های این گیاه در درمان بیماری‌های کبدی که به‌صورت یرقان بروز نموده‌اند و هم‌چنین در دفع دردهای مربوط به طحال مفید می‌باشد (۳).

از کاربردهای مطالعه‌های کروموزومی، استفاده از این اطلاعات در شناسایی و طبقه‌بندی گیاهان در سیستم جدید به‌عنوان بخشی از تاکسونومی جدید است. تنوع زیاد در کروموزوم‌ها، ثابت بودن تعداد کروموزوم‌ها در افراد یک گونه و تنوع تعداد، اندازه و ساختمان کروموزوم‌ها در گونه‌های متفاوت شاخص‌های مفیدی برای اهداف تاکسونومیکی هستند (۸).

نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

ایمیل: a.dadashian@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۹

پس از این مرحله نمونه‌ها را به مدت سه ساعت با آب شستشو داده و بعد از بین رفتن رنگ سبز کروم، نمونه‌ها را به مدت ۲۴ ساعت داخل الکل ۷۰٪ درون یخچال نگهداری می‌گردد.

سپس جهت نرم کردن دیواره سلولی از NaOH یک نرمال به مدت ۸ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری قرار داده و پس از شستشو جهت رنگ آمیزی از محلول همتاکسیلین آهن استفاده کرده و نمونه‌ها را به مدت شانزده ساعت داخل محلول رنگ آمیزی قرار داده و درون آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه می‌گردد. پس از این مدت نمونه‌ها را به مدت بیست دقیقه با آب مقطر شستشو داده می‌شود تا رنگ‌های اضافی روی نمونه‌ها از بین برود.

سپس روی یک لام تمیز یک قطره اسید اسیتیک ۴۵٪ اضافه کرده و بعد با احتیاط یکی از نوک‌های ریشه را روی لام انتقال داده و دو میلی‌متر نوک آن را بریده و انتخاب می‌گردد. بقیه قسمت‌ها را دور ریخته و لامل را روی نمونه قرار داده و با چند ضربه له می‌گردد.

از هر جمعیت مورد مطالعه ۵ متافاز مناسب را انتخاب نموده و جهت آنالیز نهایی آماده کرده اندازه‌گیری طول بازوهای کوتاه و بلند کروموزوم‌ها توسط نرم افزار Micro Measur انجام شد و ایدیوگرام مربوط به هرگونه با نرم افزار Excell ترسیم گردید.

کروموزوم‌ها در هر جمعیت در ۵ متافاز مناسب انتخاب شده اندازه‌گیری شدند و سپس کروموزوم‌های همتای مربوط به یک متافاز به ترتیب بزرگی (از بزرگ به کوچک) کنار هم چیده شده و پس از انجام اندازه‌گیری‌های لازم، میانگین گرفته شده و آنالیز برای هر جمعیت انجام گرفت.

صفت‌های مورد اندازه‌گیری عبارتند از:

- ۱ - طول کروموزوم: شامل طول بازوی بلند، بازوی کوتاه و ماهواره در صورت وجود در کلیه کروموزوم‌ها و متافازهای انتخاب شده
- ۲ - طول بازوی بلند: شامل طول بازوی بلند در کلیه کروموزوم‌ها و متافازهای انتخاب شده
- ۳ - طول بازوی کوتاه: شامل طول بازوی کوتاه در کلیه کروموزوم‌ها و متافازهای انتخاب شده
- ۴ - نسبت بازوها با استفاده از فرمول بازوی بلند به بازوی کوتاه برای هر کروموزوم
- ۵ - تعداد و طول ساتلیت
- ۶ - شاخص سانترومری

در گذشته عمده‌ترین صفت‌های مورد توجه گیاه‌شناسان، صفت‌های مورفولوژیکی بود. در حال حاضر با گسترش بیوسیستماتیک، تعداد زیادی صفت‌های مورد بررسی قرار می‌گیرند که طبیعت آن‌ها بسیار متنوع است. خصوصیت‌های سلولی از قبیل تعداد و شکل کروموزوم‌ها و هم‌چنین ویژگی‌های پروتئینی و آنزیمی، از جمله این صفت‌ها هستند. استفاده از وضعیت کروموزوم‌ها به منظور طبقه‌بندی گیاهان و کمک به مسائل و معضلات تاکسونومی کلاسیک در قرن اخیر مطرح و به اهمیت آن به تدریج پی برده شد. عده‌ای از دانشمندان معتقدند که کروموزوم‌ها تنها عوامل مناسبی هستند که می‌توان بر اساس آنها، نحوه روند تکامل را دریافت (۵).

به کمک اطلاعات کروموزومی امکان مقایسه گونه‌ها و جمعیت‌های آنها فراهم می‌گردد. جمعیت‌های متعلق به یک گونه هر یک با محیطی که در آن می‌رویند سازش ژنومی نشان می‌دهند. با افزایش اختلاف‌های سازش، ممکن است است واریته‌های جدید و حتی گونه‌های جدید در جوامع گیاهی به وجود آیند (۴).

هم‌چنین نتایج پژوهش‌ها در سال‌های اخیر نشان داده است که ترکیب‌های گیاهی از جمله فلاونوئیدها، موجب مهار رشد درماتوفیت‌ها شده‌اند (۱۰) و نیز به طور بالقوه در درمان نفروپاتی دیابتی استفاده شود (۱۱).

در این پژوهش که با هدف تعیین تکامل، تحول و امکان جدایی جمعیت‌های این گیاه با توجه مطالعه‌های کاربوتیپ و شکل کروموزوم صورت گرفت از سه جمعیت متفاوت استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، سه جمعیت از گیاه ماریتیغال (مغان، فریدون کنار و نورآباد ممسنی) مورد بررسی قرار گرفت که بذر این گیاهان از باغ گیاه‌شناسی استان آذربایجان شرقی در تبریز تهیه گردید. مطالعه این پژوهش از نوع مطالعه کروموزوم‌ها در مرحله متافازی تقسیم میتوز انجام گرفته است.

بذرهای را پس ضدعفونی روی کاغذ صافی داخل پتری دیش قرار داده، در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد بذرهای را جوانه‌دار کرده و اجازه داده می‌شود ریشه‌ها به اندازه ۲ الی ۵ میلی‌متر رشد نمایند. سپس ریشه‌ها جدا می‌گردد. در این مرحله نمونه‌ها را به مدت ۲/۵ ساعت در داخل محلول آلفابروموفتالین و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد (داخل یخچال) قرار داده، پس از شستشو، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول تثبیت که از مخلوط کردن فرمالدئید ۱۰٪ و اسید کرومیک ۱٪ به نسبت ۱ به ۱ تهیه می‌شود قرار گرفته و

۶ - شاخص سانترومری

۷ - درصد شکل کلی کاربوتیپ (Total Form Percentage)

TF% مشخصه‌ای برای بیان وضعیت تقارن کاربوتیپ کروموزوم هاست. هنگامی که این درصد به ۵۰٪ برسد نشان دهنده قرار گرفتن سانترومرها در وسط کروموزومها و کاربوتیپ متقارن است. و هرچه TF% از ۵۰٪ کم تر باشد نشان دهنده وجود کروموزوم هایی با سانترومر انتهایی و کاربوتیپ نامتقارن می باشد. به طور کلی هرچه TF% بیش تر، تقارن کاربوتیپ بیش تر و هرچه کم تر، کاربوتیپ نامتقارن تر می باشد.

یافته‌ها:

بر اساس نتایج حاصل از تصاویر تهیه شده، کاربوتیپ و جداول آماری نتیجه گرفته می شود این گونه دارای مشخصه های کروموزومی $2n=2x=34$ بوده و از نظر تعداد کروموزوم و پلوئیدی تفاوتی بین جمعیت ها مشاهده نشد.

نتایج حاصل از سنجش تقارن کاربوتیپی که در جدول ۲ ارائه گردیده است نشان می دهد که از نظر فرمول کاربوتیپی، جمعیت ها متاسانتریک و ساب متاسانتریک هستند.

از نظر مقادیر TF% نیز با توجه به این که هر چه مقدار عددی این آماره بیش تر باشد تقارن کاربوتیپ بیش تر است، جمعیت فریدون کنار با TF% (۳۸/۷۴۸۲) متقارن ترین کاربوتیپ و جمعیت نورآباد ممسنی با TF% (۳۵/۸۳۸۴) نامتقارن ترین کاربوتیپ را دارا هستند.

با توجه به این که جمعیت های بررسی شده TF% متغیر بین ۳۵/۸۳۸۴ و ۳۸/۷۴۸۲ را دارا هستند و تعداد کروموزوم های متاسانتریک بین ۶ و ۱۱ از کل ۱۷ جفت کروموزوم متغیر است. هم چنین با توجه به نسبت کل بازوهای بلند به کل بازوهای کوتاه بین ارقام ۱/۵۹ و ۱/۷۰ تغییر می کند می توان نتیجه گرفت کروموزومها در حد فاصل متاسانتریک و ساب متاسانتریک قرار می گیرند؛ بدین مفهوم که محل سانترومر در کروموزومها کمابیش میانی است و به طور کلی می توان نتیجه گیری نمود که گیاه ماریتیغال یک گیاه کم تر تحول یافته با کاربوتیپ متقارن می باشد.

از نظر تکاملی نیز با مقایسه جمعیت های مورد آزمایش، با توجه به این که جمعیت نورآباد ممسنی نامتقارن ترین کاربوتیپ را داراست می توان نتیجه گرفت که دارای درجه تکاملی بیش تری نسبت به دو جمعیت دیگر می باشد.

کلیه جفت کروموزومهای مشابه با توجه به صفتها طول کروموزومها و نسبت بازوهای کروموزومی مشخص شدند سپس میانگینها محاسبه و نمودار هر نمونه ترسیم گردید. جهت تعیین تقارن کاربوتیپی جمعیتها، پارامترهای زیر مورد محاسبه و بررسی قرار گرفت:

- ۱- درصد شکل کلی (TF%=Total form percentage): نسبت مجموع طول کل بازوهای کوتاه کروموزومهای یک جمعیت به مجموع طول کل کروموزوم های آن.
- ۲- L/S: نسبت بلندترین کروموزوم به کوتاه ترین کروموزوم جمعیت.
- ۳- S/L: نسبت کوتاه ترین کروموزوم به بلندترین کروموزوم جمعیت.

صفات مورد اندازه گیری و پارامترهای مطالعه کاربوتیپ:

- ۱ - طول بازوی کوتاه کروموزوم (توسط نرم افزار Measur Micro اندازه گیری شد).
- ۲ - طول بازوی بلند کروموزوم (توسط نرم افزار Micro Measur اندازه گیری شد).
- ۳ - طول کل کروموزوم (توسط نرم افزار Micro Measur اندازه گیری شد).
- ۴ - نسبت طول بازوی بزرگ به کوچک (R-value)

این شاخص نوع کروموزومها را از نظر محل قرارگیری سانترومر معلوم می کند.

۵ - تیپ کروموزوم

تیپ کروموزومها با استفاده از نسبت بازوها (جدول ۱) براساس روش لوان و ساندبرگ ۱۹۶۵ مشخص گردید.

جدول ۱. انواع کروموزومها بر حسب محل قرارگیری سانترومر به روش لوان و ساندبرگ

نوع کروموزوم	نسبت طول بازوها	موقعیت سانترومر
متاسانتریک M	۱	نقطه ی میانی
متاسانتریک m	۱-۱/۶۹	منطقه ی میانی
ساب متاسانتریک Sm	۱/۷-۳	منطقه ی نزدیک به میانی
ساب تلوسانتریک St	۳/۰۱-۷	منطقه ی نزدیک به انتهایی
تلوسانتریک T	۷/۰۱-۳۹	نقطه ی انتهایی

جدول ۲: مقایسه مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه گونه *Silybum*

فرمول کاربوتیپی	L/S	TF%	جمعیت
11m+6sm	۱/۶۴	۳۸/۱۲۶۰	مغان
11m+6sm	۱/۵۹	۳۸/۷۴۸۲	فریدون کنار
6m+11sm	۱/۷۰	۳۵/۸۳۸۴	نورآباد ممسنی

بحث

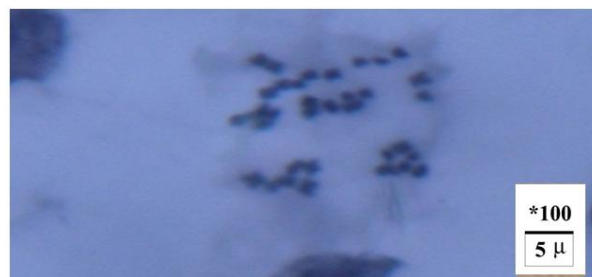
نتایج مطالعه های سیتوژنتیکی توسط دیگر محققان در مورد این گونه بیانگر سطح پلوئیدی $2n=2x=34$ و موید نتایج این تحقیق می باشد (۶،۹). هم چنین بر اساس نتایج پژوهش حاضر مشخص می‌گردد که کروموزوم های این گونه از نوع متاسانتریک و ساب متاسانتریک می‌باشند. (جدول ۲)

از آنجائی که فاکتور TF% به‌عنوان عامل متقارن بودن کروموزومی است بنابراین با محاسبه آن می‌توان به میزان متقارن و نامتقارن بودن کروموزوم‌ها پی برد. از نظر مقدار TF% نیز با توجه به این‌که هر چه مقدار عددی این آماره بیش تر باشد تقارن کاربوتیپ بیش تر است، جمعیت فریدون کنار با TF% (۳۸/۷۴۸۲) متقارن ترین کاربوتیپ و جمعیت نورآباد ممسنی با TF% (۳۵/۸۳۸۴) نامتقارن ترین کاربوتیپ را دارا هستند.

با توجه به این‌که جمعیت‌های بررسی شده TF% متغیر بین ۳۵/۸۳۸۴ و ۳۸/۷۴۸۲ را دارا هستند و تعداد کروموزوم‌های متاسانتریک بین ۶ و ۱۱ از کل ۱۷ جفت کروموزوم متغیر است و هم‌چنین با توجه به نسبت کل بازوهای بلند به کل بازوهای کوتاه بین ارقام ۱/۵۹ و ۱/۷۰ تغییر می‌کند می‌توان نتیجه گرفت کروموزوم‌ها در حد فاصل متاسانتریک و ساب متاسانتریک قرار می‌گیرند؛ بدین مفهوم که محل سانترومر در کروموزوم‌ها کمابیش میانی است و می‌توان نتیجه‌گیری نمود که گیاه ماریتیغال یک گیاه کمتر تحول یافته با کاربوتیپ متقارن می‌باشد.

از طرفی با مقایسه نسبت کل بازوهای بلند به بازوهای کوتاه که در جمعیت‌های مغان، فریدون کنار و نورآباد ممسنی به ترتیب دارای ارقام ۱/۶۴، ۱/۵۹ و ۱/۷۰ می‌باشد، می‌توان به تفاوت فرمول کاربوتیپی، شاخص TF% و نامتقارن بودن جمعیت نورآباد نسبت به دو جمعیت قبلی پی برد.

هم‌چنین از آن‌جا که در نهاندانگان کاربوتیپ‌های نامتقارن از نظر تکاملی پیشرفته‌ترند با مقایسه جمعیت‌های مورد آزمایش، با توجه به این‌که جمعیت نورآباد ممسنی نامتقارن ترین کاربوتیپ را داراست می‌توان نتیجه گرفت که دارای درجه تکاملی بیش تری نسبت به دو جمعیت دیگر می‌باشد.



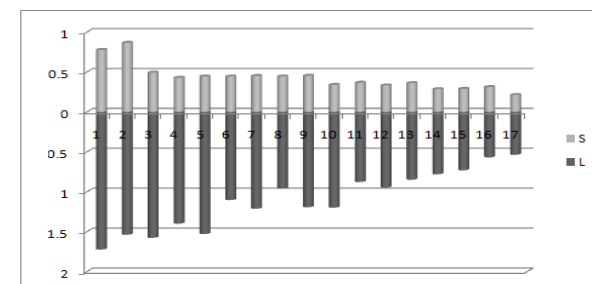
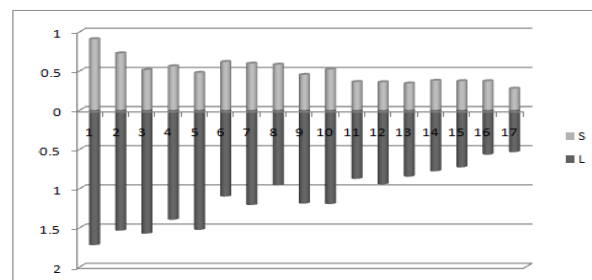
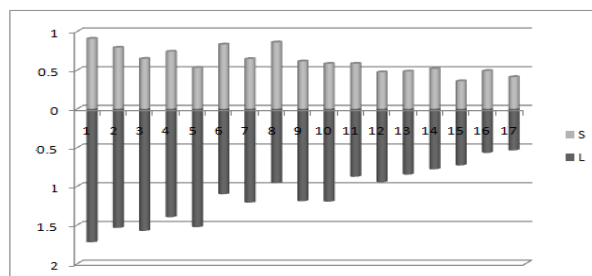
شکل ۱- تصویر میکروسکوپی از متافاز گونه ماریتیغال جمعیت مغان



شکل ۲- تصویر میکروسکوپی از متافاز گونه ماریتیغال جمعیت فریدون کنار



شکل ۳- تصویر میکروسکوپی از متافاز گونه ماریتیغال جمعیت نورآباد ممسنی



شکل ۴- مقایسه ایدیوگرام جمعیت های گونه *Silybum marianum*

به ترتیب (جمعیت مغان، جمعیت فریدون کنار، جمعیت نورآباد ممسنی)

نتیجه گیری

- ۱- بر اساس شمارش کروموزومی توسط محققین قبلی و هم- چنین نتایج این تحقیق مشخص شد که جمعیت های مورد مطالعه این گونه دارای ۳۴ کروموزوم می باشد.
- ۲- جمعیت های مورد مطالعه این گونه همه دیپلوئید و عدد پایه کروموزومی $X=17$ را دارا می باشد.
- ۳- با توجه به شکل کروموزوم و موقعیت سانترومر و پارامتر $TF\%$ می توان نتیجه گیری نمود که گیاه ماریتیغال یک گیاه کم تر تحول یافته با کاربوتیپ متقارن می باشد.
- ۴ - از نظر تکاملی جمعیت نورآباد ممسنی نسبت به دو جمعیت دیگر متکامل تر می باشد.
- ۵ - جمعیت های مورد مطالعه با توجه به نتایج این تحقیق متعلق به یک گونه می باشند و تحول و جدایی جمعیت های گونه مشاهده نمی گردد.
- ۶- مقایسه مشخصات کروموزومی جمعیت های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.
- ۷- مقایسه ایدیوگرام جمعیت های مورد مطالعه در شکل ۴ نشان داده شده است.

سپاسگزاری

از تمامی همکاران محترم گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر به خصوص مسئولین آزمایشگاه های زیست شناسی تشکر و قدردانی می نمایم.

منابع

۱. ابدال مشهدی، ع. فتاحی، ق. ۱۳۸۱. بررسی اثر سطوح مختلف تراکم بر عملکرد و میزان روغن و از گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum*) در شرایط آب و هوایی اهواز. مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۵۴. ص ۱۴ تا ۱۸
۲. امید بیگی، ر، ۱۳۷۷، بررسی تولید سیلیمارین و سیلی بین در گیاه دارویی ماریتیغال با کشت بذر زراعی و وحشی آن. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۹، شماره ۲، صفحه ۴۱۳ الی ۴۲۰
۳. زرگری، ع. ۱۳۷۲. گیاهان دارویی، جلد سوم چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران
۴. مقدم، م. محمد شوطی، ا. آقای سربزه، م. ۱۳۷۳، آشنایی با روشهای آماری چند متغیره. انتشارات پیشتاز علم تبریز
۵. میرزایی ندوشن، ح. مهرپور، ش. رضایی، م. ورشوند، س. ۱۳۸۱، مطالعات مقدماتی کاربوتیپ جمعیت هایی از گونه *Aloe littoralis*. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگل ایران، شماره ۹، صفحه ۴۹ تا ۷۳
6. Asghari-Zakaria, R., Kazemi, H., Aghayev, Y.M., Valizadeh, M. and Moghaddam, M., 2002. Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in *Henrardia persica* (Boiss.) C.E. Hubb. *Caryologia* 55(4): 289-293.
7. John, C.K. 1989; cytological studies in the genus *alsicarpus*. Neck. Phd Thesis. Poona university India.
8. Jane, M. caban, M. and kathi, J. Kemper, M.D. 2000. Milkthistle (*Silybum marianum*). Revised February 16. 1-24 Longwood Herbal Task Force
9. Kamel, E.A., 2004. Cytotaxonomical investigations of the Egyptian Compositae (Asteraceae): I- Cardueae and Cichorieae. *Compositae Newslett.* 41: 9-28.
10. Sharma B, Kumar P, In vitro antifungal potency of some plant extracts against *Fusarium oxysporum*, *Int, J. Green pharm*, 2009, 3; 63-65
11. Soto C, Pérez J, García V, Uría E, Vadillo M, Raya L "Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus." *Phytomedicine.* 2010 Dec 1; 17(14): 1090-4