

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). دانه های خشک گیاه شامل ۱ الی ۴ درصد فلاونوئیدهای سیلیمارین است. سیلیمارین (silymarin) حداقل مخلوطی از سه فلاونولینگنان شامل سیلی بین (silybin)، سیلی دیانین (silydianin)، سیلی کریستین (silychristin) است. لازم به ذکر است که

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

مقدار سیلی بین کمابیش ۵۰٪، سیلی کریستین ۲۵٪ و سیلی دیانین 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).

در گذشته عمده ترین صفت های مورد توجه گیاه شناسان، صفت های مورفولوژیکی بود. در حال حاضر با گسترش بیوسیستماتیک، تعداد زیادی صفت های مورد بررسی قرار می گیرند که طبیعت آن ها بسیار متنوع است. خصوصیت های سلولی از قبیل تعداد و شکل کروموزوم ها و هم چنین ویژگی های پروتئینی و آنزیمی، از جمله این صفت ها هستند. استفاده از وضعیت کروموزوم ها به منظور طبقه بندی گیاهان و کمک به مسائل و معضلات تاکسونومی کلاسیک در قرن اخیر مطرح و به اهمیت آن به تدریج پی برده شد. عده ای از دانشمندان معتقدند که کروموزوم ها تنها عوامل مناسبی هستند که می توان بر اساس آنها، نحوه روند تکامل را دریافت (۵).

به کمک اطلاعات کروموزومی امکان مقایسه گونه ها و جمعیت های آنها فراهم می گردد. جمعیت های متعلق به یک گونه هر یک با محیطی که در آن می رویند سازش ژنومی نشان می دهند. با افزایش اختلاف های سازش، ممکن است است واریته های جدید و حتی گونه های جدید در جوامع گیاهی به وجود آیند (۴).

هم چنین نتایج پژوهش ها در سال های اخیر نشان داده است که ترکیب های گیاهی از جمله فلاونوئیدها، موجب مهار رشد درماتوفیت ها شده اند (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 جمعیت های این گیاه با توجه مطالعه های کاربوتیپ و شکل کروموزوم صورت گرفت از سه جمعیت متفاوت استفاده گردید.

مواد و روش ها

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

بذر ها را پس ضد عفونی روی کاغذ صافی داخل پتری دیش قرار داده، در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد بذر ها را جوانه دار کرده و اجازه داده می شود ریشه ها به اندازه ۲ الی ۵ میلی متر رشد نمایند. سپس ریشه ها جدا می گردد. در این مرحله نمونه ها را به مدت ۲/۵ ساعت در داخل محلول آلفابروموفتالین و در دمای ۵ درجه سانتی گراد (داخل یخچال) قرار داده، پس از شستشو، نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در داخل محلول تثبیت که از مخلوط کردن فرمالدئید ۱۰٪ و اسید کرومیک ۱٪ به نسبت ۱ به ۱ تهیه می شود قرار گرفته و

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

سپس جهت نرم کردن دیواره سلولی از NaOH یک نرمال به مدت ۸ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار داده و پس از شستشو جهت رنگ آمیزی از محلول هماتوکسیلین آهن استفاده کرده و نمونه ها را به مدت شانزده ساعت داخل محلول رنگ آمیزی قرار داده و درون آن در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگه می گردد. پس از این مدت نمونه ها را به مدت بیست دقیقه با آب مقطر شستشو داده می شود تا رنگ های اضافی روی نمونه ها از بین برود.

سپس روی یک لام تمیز یک قطره اسید اسیتیک ۴۵٪ اضافه کرده و بعد با احتیاط یکی از نوک های ریشه را روی لام انتقال داده و دو میلی متر نوک آن را بریده و انتخاب می گردد. بقیه قسمت ها را دور ریخته و لامل را روی نمونه قرار داده و با چند ضربه له می گردد.

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

کروموزوم ها در هر جمعیت در ۵ متافاز مناسب انتخاب شده اندازه گیری شدند و سپس کروموزوم های همتای مربوط به یک متافاز به ترتیب بزرگی (از بزرگ به کوچک) کنار هم چیده شده و پس از انجام اندازه گیری های لازم، میانگین گرفته شده و آنالیز برای هر جمعیت انجام گرفت.

صفت های مورد اندازه گیری عبارتند از:

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

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٪ کم‌تر باشد نشان دهنده وجود کروموزوم هایی با سانترومر انتهایی و کاربوتیپ نامتقارن می‌باشد. به طور کلی هرچه TF% بیش‌تر، تقارن کاربوتیپ بیش‌تر و هرچه کم‌تر، کاربوتیپ نامتقارن تر می‌باشد.

یافته‌ها:

بر اساس نتایج حاصل از تصاویر تهیه شده، کاربوتیپ و جداول آماری نتیجه گرفته می‌شود این گونه دارای مشخصه‌های کروموزومی $2n=2x=34$ بوده و از نظر تعداد کروموزوم و پلوئیدی تفاوتی بین جمعیت‌ها مشاهده نشد. نتایج حاصل از سنجش تقارن کاربوتیپ که در جدول ۲ ارائه گردیده است نشان می‌دهد که از نظر فرمول کاربوتیپ، جمعیت‌ها متاسانتریک و ساب متاسانتریک هستند. از نظر مقادیر TF% نیز با توجه به این که هر چه مقدار عددی این آماره بیش‌تر باشد تقارن کاربوتیپ بیش‌تر است، جمعیت فریدون کنار با TF% (۳۸/۷۴۸۲) متقارن‌ترین کاربوتیپ و جمعیت نورآباد ممسنی با TF% (۳۵/۸۳۸۴) نامتقارن‌ترین کاربوتیپ را دارا هستند. با توجه به این که 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. 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 به طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که گیاه ماریتیغال یک گیاه کم‌تر تحول یافته با کاربوتیپ متقارن می‌باشد. از نظر تکاملی نیز با مقایسه جمعیت‌های مورد آزمایش، با توجه به این که جمعیت نورآباد ممسنی نامتقارن‌ترین کاربوتیپ را داراست می‌توان نتیجه گرفت که دارای درجه تکاملی بیش‌تری نسبت به دو جمعیت دیگر می‌باشد.

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 کوتاه‌ترین کروموزوم جمعیت.
- ۳- S/L: نسبت کوتاه‌ترین کروموزوم به بلندترین کروموزوم جمعیت.

صفات مورد اندازه‌گیری و پارامترهای مطالعه کاربوتیپ:

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

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

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

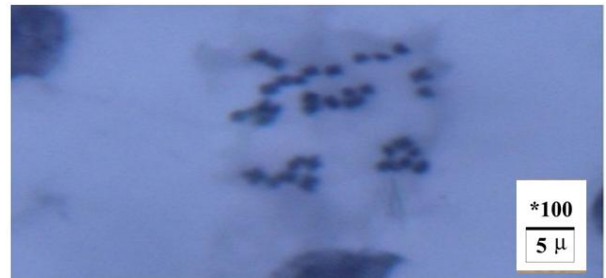
نتایج مطالعه های سیتوژنتیکی توسط دیگر محققان در مورد این گونه بیانگر سطح پلوئیدی $2n=2x=34$ و موید نتایج این تحقیق می باشد (۶،۹). هم چنین بر اساس نتایج پژوهش حاضر مشخص می‌گردد که کروموزوم های این گونه از نوع متاسانتریک و ساب متاسانتریک می‌باشند. (جدول ۲)

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 مقادیر 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.

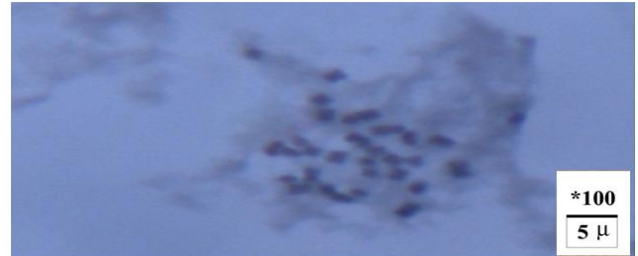
با توجه به این‌که جمعیت‌های بررسی شده TF% متغیر بین ۳۵/۸۳۸۴ و ۳۸/۷۴۸۲ را دارا هستند و تعداد کروموزوم‌های متاسانتریک بین ۶ و ۱۱ از کل ۱۷ جفت کروموزوم متغیر است و هم‌چنین با توجه به نسبت کل بازوهای بلند به کل بازوهای کوتاه بین ارقام ۱/۵۹ و ۱/۷۰ تغییر می‌کند می‌توان نتیجه گرفت کروموزوم‌ها در حد فاصل متاسانتریک 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 نهادانگان 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.



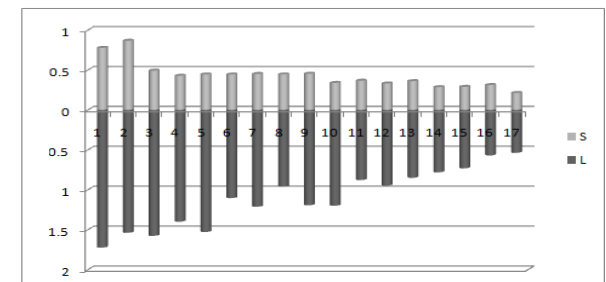
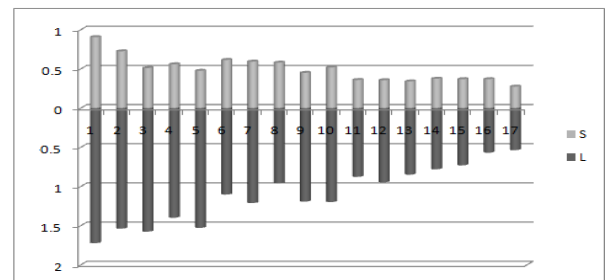
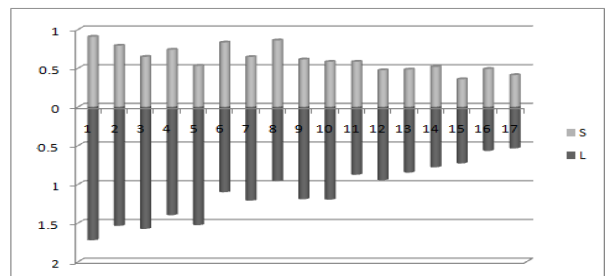
شکل ۱- تصویر میکروسکوپی از متافاز گونه ماریتیغال جمعیت مغان



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. فتحی، 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