عدد کروموزومی و اهمیت تاکزونومی آن در چهار گونه‌ی قدومه (*Alyssum* L.) در ایران

جمیل واعظی[۱]، دریه امیری مقدم[۲]، بهناز رحیمی[۳]

۱- استادیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۲- کارشناس، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۳- دانشجو، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: J.Vaezi@scu.ac.ir

چکیده

گونه‌های تیره‌ی شب‌بو (Brassicaceae) از جنبه‌های گوناگون از جمله مصارف غذایی، صنعتی و دارویی اهمیت دارند. جنس آسیایی- اروپایی قدومه (*Alyssum*) متعلق به زیرتباره‌ی Alyssinae، تبار Alyseae و تیره شب‌بو مشتمل بر ۱۷۰ گونه در جهان است. کشور ایران یکی از مراکش پراکنش این جنس با حدود ۳۶ گونه‌ی یکساله و چندساله است. در این مطالعه، عدد کروموزومی چهار گونه‌ی قدومه گزارش می‌شود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهدکه عدد پایه کروموزومی برای گونه‌های مورد مطالعه x=8 بوده و سه سطح پلوئیدی متفاوت مشاهده شد. گونه‌ی تتراپلوئید *A. turkestanicum* با ۳۲ کروموزوم (2n= 4x= 32)، گونه‌ی دیپلوئید *A. meniocoides* با ۱۶ کروموزوم (2n= 2x= 16)، گونه‌ی هگزاپلوئید *A. staffi* با ۴۸ کروموزوم (2n= 6x= 48) و گونه‌ی تتراپلوئید *A. desertorum* با ۳۲ کروموزوم (2n= 4x= 32) گزارش می‌شود.

کلمات کلیدی: قدومه، تیره شب‌بو، عدد کروموزومی، پلوئیدی، گیاه دارویی

۱. مقدمه، هدف و پیشینه تحقیق

تیره Brassicaceae از جنبه های مختلفی از جمله مصارف غذایی، صنعتی، و دارویی مهم بوده و تا کنون بررسی های زیستی و بیوشیمیایی زیادی بر روی این تیره صورت گرفته است. گیاهان تیره شب بو تقریبا همیشه یکساله، دوساله یا تعداد کمی ار آنها پایا و چند ساله هستند گاهی نیز اشکال چوبی به ویژه بوته های دارای بن چوبی شده در بین آنها دیده می شود و تحقیق پیش رو درباره ی یکی از جنس های یکساله است. بیشتر گیاهان این تیره به ویژه گونه های مربوط به جنس های *Alyssum* ، *Brassica* ، *Thlaspi* با داشتن توانایی تراکم بیش از حد فلزات سنگین شناخته شده اند و از این نظر این گیاهان برای مطالعه حائز اهمیت اند. تنوع مورفولوژیکی، سیستم های طبقه بندی، اندمیسم و توزیع این تیره توسط محققانی مورد بحث قرار گرفته است [1, 5]. مطالعات فیلوژنی مولکولی تیره نیز توسط محققین فراوانی صورت گرفته است [2, 6, 7].

مطالعات سیتوتاکسونومی نیز روی برخی گونه ها *Alyssum* انجام گرفته است. برای مثال بررسی ها نشان داده که عدد کروموزومی با محدوده ی ناحیه ای در *Alyssum* ارتباط دارد. برای مثال Dudley [3, 4] با مطالعات سیتوتاکسونومی بر روی برخی گونه ها *Alyssum* دریافت عدد کروموزومی و کاریوتایپ در گونه های *A. minus* و *A. foliosum* و *A. strigosum* متعلق به بخش *Alyssum* به صورت ۲n=۱۶ و کاریوتایپ این گونه ها نیز کاملا مشابه یکدیگر است. همچنین عدد کروموزومی در *Alyssum alyssoides* متعلق به بخش *Psilonema* به صورت ۲n= ۳۲ گزارش

گردید. مطالعات نشان داد که در گونه ی *A. siculum* که حد واسط بین دو بخش *Alyssum* و *Psilonema* است عدد کروموزومی به صورت ۲n= ۴۸ می باشد. این گونه در واقع یک آلوپلوئید میان دو بخش مذکور می باشد. Ozturk [7] نیز یک مطالعه سیتوژنتیکی بر روی برخی تاکسونهای ترکیه از جمله *Alyssum* انجام داده است. در این مطالعه عدد کروموزومی دو تاکسون از *Alyssum* به نامهای *Alyssum strigosum* subsp. *strigosum* و *Alyssum murale* subsp. *murale* به صورت ۲n= ۱۶ گزارش گردید.

از آنجائیکه کشور ایران یکی از مراکز پراکنش جنس *Alyssum* با حدود ۳۶ گونه یکساله یا چند ساله است که از نقطه نظرات گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته اند در راستای ادامه بررسی های این جنس هدف از این بررسی تعیین تعداد کروموزوم ها در چهار گونه‌ی *Alyssum desertorum, Alyssum turkestanicum, Alyssum staffi* و *Alyssum meniocoides* است.

۲. مواد و روشها

نمونه مورد استفاده در بررسی های سیتوژنتیکی می بایست بافتی با حداکثر تعداد سلول های در حال تقسیم میتوزی باشد. برای دستیابی به این سلول ها بهترین ناحیه، مریستم نوک ریشه می باشد.

ریشه های فعال را می توان از دانه های در حال جوانه زدن در یک پتری دیش جمع آوری نمود البته در مورد برخی از گیاهان مرتعی، جوانه دار کردن بذور در داخل پتری دیش بسیار مشکل می باشدو بدین سبب اقدام به کشت بذور در داخل گلدان جهت ریشه دار کردن آنها می شود و حتی ممکن است با این روش نیز نتوان شرایط مطلوب را برای جوانه زنی تامین کرد، بنابراین می بایست اقدام به جمع آوری نمونه ها به صورت میدانی نمود. یعنی در صورت کشت مزرعه ای از بذور کشت داده شده در مزرعه و در غیر این صورت می بایست نمونه ها از محل طبیعی رویشی شان جمع آوری شوند.

به منظور بررسی کاریولوژی از میان سیزده گونه‌ی یکساله سرده قدومه که درفلورا ایرانیکا در خراسان معرفی شده اند، چهار گونه گردآوری شد. به منظور مطالعه کاریولوژینمونه های مرکز هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد (FUMH) مورد بررسی قرار گرفت و همچنین تعدادی از نمونه ها در طی بهار سال ۱۳۹۰ از محیط جمع آوری شدند، که در هرباریوم دانشکده علوم نگه‌داری می شوند.

در مورد جوانه دار کردن ریشه ها در داخل پتری دیش رعایت برخی نکات کمک بسار زیادی در حصول به نتیجه مطلوب می کند. یکی از مهمترین نکات در این خصوص ضدعفونی کردن مطلوب بذور و ظروف کشت می باشد تا امکان آلوده شدن نمونه ها به حداقل ممکن کاهش یابد.

در ابتدا بذر های مربوطه را درون صافی ریخته و با یک قطره مایع ظرفشویی آنها را شستشو داده و با آب ژاول ۵ درصد ضدعفونی می کنیم و مجددا با اب مقطر بذر ها را شستشو داده و سپس به مدت ۲۴ ساعت دورن بشر های حاوی آب مقطر که نام و مشخصات مربوط به هر نمونه بر روی آنها ثبت شده می گذاریم تا آبنوشی شود. بعد بذر ها را بر روی کاغذ صافی استریل که ردون پتری دیش های استریل به صورت دولایه و مرطوب می باشند، قرار می دهیم و پتری دیش ها را درون یخچال با دمای ۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در این فاصله گاهی بذر ها جوانه زنده اند و گاهی فقط آب بیشتری جذب کرده اند بدیهی است که این مرحله فقط در مورد برخی گونه های جنس *Alyssum* مثل *Alyssum desertorum, Alyssum turkestanicum, Alyssum staffi, Alyssum meniocoides* لازم است که مرحله خفتگی انها با این روش بر طرف می شود با حذف این مرحله جوانه زنی در برخی گونه ها کماکان رخ می دهد با این تفاوت که مدت آن بجای ۴ –۳ روز به ۱۴–۹ روز فزونی می یابد. بر روی هر پتری نام و مشخصات نمونه و تاریخ کاشت آنها را یادداشت می کنیم و هر چند روز یک بار پتری ها را بررسی می کنیم تا کاغذ صافی خشک نشود و اگر بذری کپک

زده بود آن را حذف کرده و باقیمانده بذر ها را به پتری استریل جدیدی منتقل می کنیم. زمانیکه اندازه ریشه ها به حدود ۱ الی ۲ سانتی متر رسید راس ریشه را بین ساعت های ۸ تا ۱۰ صبح که سلول ها بیشترین میزان تقسیم را دارند قطع کرده و داخل محلول پیش تیمار فرار می دهیم. پیش تیمار یک مرحله ضروری مطالعه کروموزومی بوده و سبب ایجاد میتوز تغییر شکل یافته یا اصطلاحا " C- میتوز" می شود. محلول های پیش تیمار از طریق مختل کردن فعالیت ریشه های دوک از حرکت کروموزوم ها به قطبین سلول جلوگیری می کند، در این صورت کروموزوم ها در صفحه متافازی باقی مانده و مناسب ترین شرایط را برای مطالعه خواهند داشت. علاوه بر این، محلول های پیش تیمار سبب افزایش تعداد سلول های متافازی، به وسیله متوقف کردن کروموزوم ها در مرحله تشکیل صفحه متافاز، کوچک شدن طول کروموزوم ها و قابل تشخیص شدن انقباض ها، صاف و شفاف نمودن سیتوپلاسم، تسهیل در نفوذ سریع تثبیت کننده در اثر برداشتن رسوبات نامطلوب در بافت خواهند شد.

از مهمترین پیش تیمار های مورد استفتده می توان به آب یخ، کلشی سین، ۸-هیدروکسی کینولین، آلفابرومونفتالین و پارادی کلروبنزن اشاره کرد. پیش تیمار استفاده شده در این بررسی کلشی سین است که نوک ریشه های قطع شده را درون میکروتیوپ های حاوی کلشی سین ۰/۰۰۱ درصد می گذاریم و بر روی میکروتیوپ ها نام نمونه ها را یادداشت می کنیم و در جای تاریک و در دمای آزمایش گاه به مدت ۴-۳ قرار می دهیم. برای کشتن بافت ها و در عین حال حفظ ساختار درونی سلول و ثابت نمودن مراحل تقسیم سلولی، عمل تثبیت انجام می گیرد.

پس از اتمام زمان پیش تیمار، ریشچه ها، از محلول پیش تیمار بیرون آورده شده و به خوبی با آب مقطر به مدت ۵ دقیقه شستشو داده می شوند و سپس در محلول فیکساتور کارنوی (۳:۱ اتانول به اسد استیک) که درون میکروتیوپ ها ریخته شده به مدت ۱۴ تا ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی گراد، درون یخچال قرار می دهیم سپس نمونه ها را از یخچال خارج کرده و با آب مقطر شستشو می دهیم. محلول تثبیت کننده، بافت ها را می کشد و آنها را با حداقل خسارت و بهم خوردن محتویات سلولی نگه می دارد.

به طور کلی عمل هیدرولیز غلاوه بر اینکه سبب از بین بردن دیواره میانی سلول و پخش بهتر سلول ها در زمان اسکواش می شود، بدلیل عمل آبگیری خاصیت رنگ پذیری سلول ها و کروموزوم ها را نیز افزایش می دهد. برای این منظور از میکروتیوپ های حاوی اسید HCL یک نرمال منتقل کرده و به مدت ۳ الی ۵ دقیقه درون بن ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار می دهیم تا هیدرولیز شوند. سپس سریعا ریشه ها را به درون آب مقطر منتقل کرده و به مدت ۵ دقیقه درون آب مقطر می گذاریم بماند تا اثر هیدرولیز از بین برود.

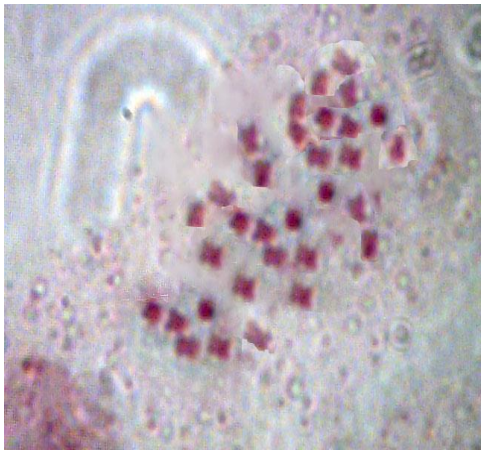
پس از عمل هیدرولیز، نمونه ها توسط کاغذ صافی خشک شده و جهت رنگ آمیزی کروموزوم ها در محلول رنگ قرار می گیرند. برای رنگ آمیزی از میکروتیوپ های نام گذاری شده حاوی رنگ استو اورسئین به مدت ۲ الی ۳ ساعت استفاده می کنیم. یک قطره اسید استیک ۴۵ درصد بر روی یک لام ریخته و به کمک یک پنس تمیز یکی از ریشه ها را از درون میکروتیوپ درآورده و بر روی قطره اسید استیک می گذاریم سپس به کمک دو عدد سوزن تشریح تمیز و ضدعفونی شده یک میلی متر راس ریشه و کمی بالاتر از آن ناحیه را اسکواش (له) می کنیم.

بعد یک قطعه لامل بر روی آن قرار داده و یک عدد دستمال کاغذی تا شده نیز روی لامل قرار داده و با انگشت شصت فشاری بر روی دستمال و لامل وارد کرده به طوری که لامل جا به جا نشود و سپس با ته یک خودکار بیک (دارای برجستگس پلاستیکی و نرم است)چند ضربه بر روی لامل می زنیم تا سلول ها کاملا له شده و سفید رنگ می شود. البته لازم به ذکر است که در صورتی که زمان هیدرولیز از زمان مناسب آن بیشتر شود منجر به پاره شدن سلول ها و ریختن کروموزوم ها به بیرون می شود. لام آماده شده را با میکروسکوپ نوری Olympus مدل B×51 با بزرگنمایی (×100)

مشاهده کرده و در صورت دیدن سلول مناسب یعنی سلولی که در مرحله آخر پروفاز است و کروموزوم های آن کاملا از یکدیگر جدا شده و قابل شمارش است عکس آن سلول گرفته می شود.

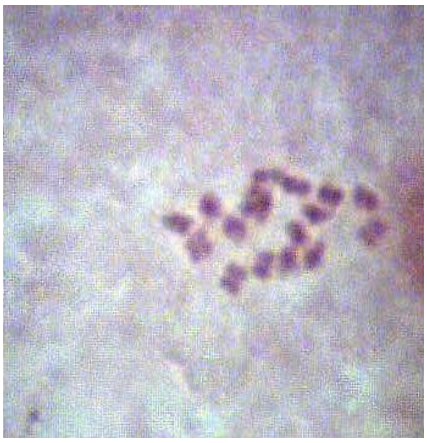
۳. نتایج و بحث

بررسی انجام شده روی چند گونه *Alyssum* نشان دهنده انواع پلوئیدی در این جنس است. نتایج حاصل از شمارش کروموزوم ها نشان دهنده تتراپلوئید بودن جمعیت گونه *Alyssum turkestanicum* است. این گونه دارای ۳۲ کروموزوم بوده که با توجه به اطلاعات قبلی که x= ۸ است، تعداد کروموزوم های پایه چهار برابر شده است (شکل ۱).



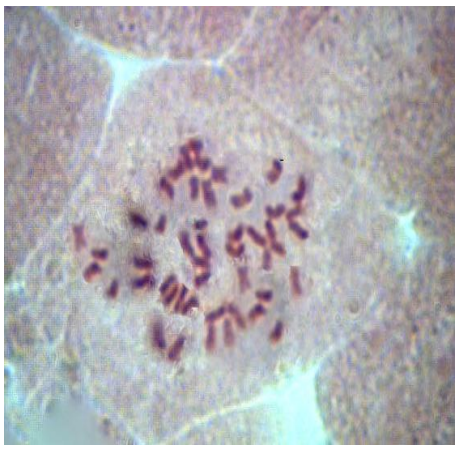
شکل ۱. تصویر کروموزوم درون سلول سوماتیک جمعیت *Alyssum turkestanicum*

بر طبق مشاهدات در سلول های سوماتیک گونه *Alyssum meniocoides* ۲n=۱۶ است که با توجه به x= ۸ نشان دهنده سطح دیپلوئیدی است (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر کروموزوم درون سلول سوماتیک جمعیت *Alyssum meniocoides*

نتایج حاصل از شمارش کروموزوم های *Alyssum staffi* نیز سطح دیگری از پلوئیدی را نشان داد. تعداد کروموزوم ها در این گونه ۴۸ عدد است که با توجه به x= ۸ نشان دهنده شش برابر شدن کروموزوم ها است (شکل ۳).



شکل ۳. تصویر کروموزوم درون سلول سوماتیک جمعیت *Alyssum staffi*

تعداد کروموزوم ها در گونه *Alyssum desertorum* برابر با ۳۲ است که با توجه به x= ۸ این یک گونه تتراپلوئید است (شکل ۴).

شکل ٤. تصویر کروموزوم درون سلول سوماتیک جمعیت *Alyssum desertorum*

۴. نتیجه‌گیری و پیشنهادات

تعداد کروموزوم در سلولهای سوماتیک گیاهان تیره‌ی شب‌بو از تغییرات گسترده‌ای برخوردار است. در مطالعه‌ی حاضر، چهار گونه‌ی قدومه، سه سطح متفاوت پلوئیدی را نشان می دهند. این تغییرات نشان دهنده‌ی بروز پدیده‌های متعدد سیتوژنتیکی در این جنس و حتی تیره است که احتمالاً با مکانیسم‌های پلی‌پلوئیدی و هیبریداسیون همراه بوده است. این پدیده‌ها در جنسهای دیگر این تیره مانند *Arabidopsis*، *Capsella* و *Brassica* نیز مشاهده و اثبات شده است. تحقیق بر روی کاریولوژی و نیز تهیه کاریوتایپ تمام گونه‌های قدومه موجود در ایران پیشنهاد می‌گردد.

۵. قدردانی

این تحقیق با استفاده از بودجه پژوهانه (93/3/02/27171) مؤلف اول صورت گرفته و بدین وسیله مؤلفین از کمک‌ها و مساعدت های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند.

۶. مراجع

1. *Al-shehbaze I.and beilstein M. A,2006, systematic and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overwiew- plant Systematic and Evolution, 256:89-120*

2. *Beilstein M.A.,Al-shehbaze I.and Kellogg E.A.,2006, Brassicaceae phylogeny and trichum evolution, American journal of botany, 93:607-610.*

3. *Dudley T.R.,1964, Alyssum turdidum: a new specie from iran, Gret Nturalist,1.*

4. *Dudley T.R.,1965,Alyssum(cruciferae) introduced in north America, Reprinted from Rodora,70.*

5. *Hedge I.C.,1968, Alyssum , in Rechinger K.H., editor. Ed. FL. Iranica , Vol.57. Akedemische. Druck-u verla.*

6. *Koch M ., Al-shehbaze I. and mommenhoff k.,2003, molecular systematic, evaluation and population biology in the mustard family (Brassicaceae),Annual Missouriy botanical Garden,90:151-171.*

7. *Ozturk M., Martin E.,Duran A., Ozdemir A.,2006, A cytogenetical study on some plants texa in nizip region, Turkish journal of botony,33:35-44.*

8. *Schulz, O.E.,1936, Cruciferae. In : Engler, A., Prantl, K.(Eds.), Die natü rlichen Pflanzen Familen, vol.17B. VERLAG VON Wilhelm Engelmann Leipzig, pp. 227-658.*