



## مطالعه کاربوتیپ سه ژنوتیپ از گونه *Achillea millefolium* (Asteraceae) در ایران

علی مازوجی<sup>۱\*</sup>، فهیمه سلیم پور<sup>۲</sup>، طلایه پورفرزانه<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد رودهن، رودهن، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* E-mail: amazooji@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۰۳

### چکیده

بومادران (*Achillea L.*) یکی از مهم ترین جنس های دارویی تیره مرکبان (Asteraceae) است که در نقاط مختلف جهان پراکنش دارد. بومادران هزاربرگ (*Achillea millefolium*) یکی از گونه های این جنس دارای تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی زیادی در ایران است. آنالیز سیتولوژیکی سه ژنوتیپ این گونه مربوط به سه استان مختلف کشور به منظور دستیابی به سیتوتیپ های جدید انجام شد. نشان ویژگی های کروموزومی و تقارن کاربوتیپی حاکی از آن است که دوجمیت دارای کروموزوم و هگزاپلوئید است. جمعیت مربوط به استان تهران  $2n=8x=72$  کروموزوم و اکتاپلوئید می باشد. جمعیت  $Am_4$  متقارن ترین کاربوتیپ راداراست. به نظر می رسد تغییرات ساختاری کروموزومی و تغییر شرایط اکولوژیکی نقش مهمی در تنوع درون گونه ای این تاکسون دارا می باشد.

**کلیدواژه ها:** سطح پلوئیدی، شمارش کروموزومی، *Achillea millefolium*

### مقدمه

جنس عمدتاً تنوع وسیعی از نواحی بیابانی تا نواحی مرطوب، سواحل دریاها و یا ارتفاعات را شامل می شود [۲]. ۱۹ گونه از جنس بومادران در کشور ایران پراکنش دارند که از این تعداد، ۷ گونه بومی کشور می باشد [۱۵]. اقلیم مناسب این گیاه در مناطق معتدله و نیمه خشک است. بومادران هزار برگ (*A. millefolium L.*)، یکی از گونه های دارویی و

جنس *Achillea L.* (بومادران) از تیره Asteraceae (مرکبان) با نام انگلیسی Plumajillo دارای حدود ۱۳۵ گونه علفی چند ساله است که در اروپا، بخش هایی از شمال آفریقا یافت می شود [۱۵]. همچنین گونه های اندکی از این جنس در آمریکای شمالی و نیمکره جنوبی نیز گزارش شده است [۱۸ و ۱۲]. زیستگاه این

به عنوان اجزای اصلی در خود دارد [۳۱] Gervais. (۱۹۷۷) با انجام مطالعات سیتولوژیکی بر روی کمپلکس گونه‌ای *A. millefolium* گزارش کرد که این گونه جمعیت‌های تتراپلوئید، هگزاپلوئید و نیز تیپ‌های هیبرید دارد [۱۰]. ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۲) گزارشات کروموزومی جدیدی از گونه بومادران هزار برگ را گزارش نمودند. در این تحقیق، دو سطح پلوئیدی مختلف  $2n=6x=54$  و  $2n=8x=72$  گزارش شد [۱۱]. شمارش کروموزومی، کاربوتیپ و محتوی DNA دو گونه از جنس بومادران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که میزان DNA هسته نه تنها در گونه‌های مختلف بلکه در جمعیت‌های متعلق به یک گونه نیز متفاوت است [۲۱].

بررسی سیتوژنتیکی چندگونه از جنس بومادران در ایران در سال ۲۰۰۹ توسط شیدایی و همکاران با استفاده از سلول‌های مریستمی نوک ریشه انجام شد. نتایج این تحقیق حاکی از دیپلوئید و تتراپلوئید بودن گونه‌های مورد بررسی بود. هم چنین گونه *A. biebersteinii* گونه‌ای اتوتتراپلوئید معرفی شد [۲۰].

بررسی سیتوژنتیکی ۸ گونه از جنس *Achillea* متعلق به بخش *Ptermica* در ترکیه، صورت پذیرفت. تعداد کروموزوم‌ها و مورفولوژی آن‌ها با استفاده از روش کاربوتیپ به دست آمد. تعداد کروموزوم‌ها در ۷ گونه‌ی مورد مطالعه  $2n=18$  در حالی که تنها در گونه‌ی *A. kotschyi*،  $2n=36$  بود [۱۴].

مطالعه سیتولوژیکی ۱۴ جمعیت مربوط به ۸ گونه‌ی جنس *Achillea* در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت. نتایج حاکی از سطوح پلوئیدی متفاوت در جمعیت‌های مورد بررسی بود. هم چنین مقایسه‌ی نتایج کروموزومی با صفات دانه‌ی گرده حاکی از وجود حالات غیر عادی در شکل دانه‌ی گرده گونه‌های

ارزشمند بومادران محسوب می‌شود که به طور خودرو در دشت‌ها، کنار جاده‌ها و در مناطقی از شمال کشور و ارتفاعات البرز می‌روید. از نظر ریخت‌شناسی دارای تنوع بالایی بوده که این تنوع بیشتر در صفات مربوط به برگ مشاهده می‌شود. این گونه در طب سنتی ایران به نام (حزنبل) ذکر شده است و به عنوان یکی از گونه‌های دارویی مهم در فارماکوپه ایران فهرست شده است. سرشاخه‌های گلدار و برگ‌های گیاه بومادران سرشار از ترکیبات موثره بوده که در طب سنتی در بهبود بیماری‌ها کاربرد دارد. از طرفی گیاه بومادران هزار برگ، گونه‌ای پلی‌پلوئیدی بوده که در آن جمعیت‌ها یا سیتوتیپ‌های تتراپلوئید ( $2n=36$ )، هگزاپلوئید ( $2n=54$ ) و حتی اکتاپلوئید ( $2n=72$ ) گزارش شده است. در عین حال، جمعیت‌های پنتاپلوئیدی این گونه، به عنوان گیاهی عقیم معرفی شده است [۱۹].

بومادران یک نام عمومی برای گونه‌های متعددی از *Achillea* در زبان فارسی است. نام لاتین این گیاه برگرفته از نام آشیل، قهرمان افسانه‌ای یونان است و گفته می‌شود در دوران نبردهای تروا، این گیاه برای درمان زخم و جلوگیری از خونریزی و عفونت استفاده می‌شده است. به دلیل شکل شانه‌ای برگ‌ها در نیومکزیکو و کلرادو به نام *Plumajnillo* مشهور است. در آمریکا و کشورهای اروپایی، به دلیل داشتن خواص انعقادی و بهبودی زخم، *Yarrow* نامیده شده است [۵] و [۴]. چای گیاهی برخی از گونه‌های آن به طور سنتی در ترکیه استفاده می‌شود. در طب سنتی چین نیز، چهار خاصیت عمده شامل ضد دیابت، نیرو بخش، ضدالتهاب و مقوی قلب برای این گیاه ذکر شده است. بومادران هزار برگ (*A. millefolium*)، گونه‌ای معطر بوده و ترکیبات مهمی از جمله منوترین‌های مختلف را

بر اساس تفاوت در شرایط اکولوژیکی نظیر ارتفاع، شیب مناطق، بافت خاک گزارش شده در منابع و میزان بارش جمع آوری گردید (جدول ۱).

جدول ۱-۲- پراکنش جمعیت های *A. millefolium* مورد بررسی

Accession number	رویشگاه
Am4	تهران: جاده دماوند به فیروزکوه، روستای سربندان □ ۱۹۴۰ متر، مازوجی
Am1	مازندران: بین پل سفید به فیروزکوه، تونل چپ دره □ ۲۱۳۴ متر، مازوجی ۶۱۰۱
Am6	گیلان: اسالم به خلخال، ۲۵ کیلومتری خلخال، ۲۰۰۵ متر، مازوجی ۶۱۰۵۰

لازم به ذکر است که کدگذاری نمونه‌های معرفی شده در تحقیق حاضر براساس کد گیاهان موجود در هرباریوم وزارت جهاد کشاورزی (IRAN) می‌باشد. با انتخاب سه جمعیت در سه تکرار این بخش از مطالعات انجام شد.

پس از جوانه‌دار کردن بذرها و ضدعفونی نمودن آنها، از کلشی سین و ۸- هیدروکسی کینولین به عنوان پیش تیمار استفاده گردید. پس از خارج کردن ریشه‌ها از داخل مواد پیش تیمار، آن‌ها را کاملاً با آب مقطر شستشو داده و سپس ریشه‌ها درون محلول کارنوی (۱) قسمت اسیداستیک: ۳ قسمت اتانول خالص) به مدت ۲۴ ساعت درمحل تاریک و در درجه حرارت محیط قرار داده شدند. پس از خروج ریشه‌ها از مواد تثبیت کننده، آنها را با آب مقطر شستشو داده و به الکل اتیلیک ۷۰ درصد منتقل کرده و در دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شدند. برای انجام فرایند هیدرولیز، اسیدکلریدریک یک نرمال اضافه گردید و در آن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از عمل هیدرولیز و شستشو با آب به نمونه‌های موجود رنگ استوارسین افزوده و بعد از ۲۴ ساعت

هیبرید بوده است [۷].

درسال ۲۰۰۶ بررسی‌های سیتولوژیکی بر روی جنس‌های مختلف گیاهان گل دار دربلغارستان صورت پذیرفت و کاریوتیپ برای چندین گونه که اساساً مربوط به جنس‌های *Achillea* و *Ranunculus* بود به دست آمد و جنبه‌های تاکسونومیک و تکاملی آن‌ها مورد بحث و تفسیر قرار گرفت. نتایج به دست آمده اعداد کروموزومی (۱۸، ۳۶، ۴۵، ۵۴)  $2n=$  را برای گونه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد [۱۸و۱۶]. از سوی دیگر، با توجه به موقعیت جغرافیایی کشور و وجود چهار فصل رویش در این سرزمین پهناور، ترکیبات اسانس در بسیاری از جمعیت‌های این گونه تعیین شده است. اما تا کنون به بررسی کموتیپ‌هایی که بیشترین ترکیبات موثره را داشته باشند پرداخته نشده است. از طرفی بر اساس گزارشات موجود سطوح پلویدی این گونه متنوع است. لذا اهداف پژوهش به شرح زیر بوده که در نتایج و بحث به آن پرداخته شده است.

هدف از پژوهش حاضر، شمارش کروموزومی درسه جمعیت متفاوت از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی و تعیین کاریوتیپ‌های مربوطه هر جمعیت و معرفی سیتوتیپ‌های جدید از گونه بومادران هزاربرگ است.

## مواد و روش‌ها

ابتدا مناطق عمده پراکنش گونه مورد نظر بر اساس آدرس‌ها موجود در فلورهای معتبر تعیین گردید و موقعیت جغرافیایی کلیه نمونه‌های هرباریومی مورد مطالعه، بر روی نقشه علامت‌گذاری شد. جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی از خرداد ۱۳۹۱ آغاز و به تناوب تا آخر تابستان نمونه‌ها و بذرهای پنج جمعیت متفاوت

$x=9$  می‌باشد. همه جمعیت‌ها در داشتن کروموزوم‌هایی به نسبت درشت مشترک بودند اما سطوح پلویدی آنها متفاوت بود. به طوری که در جمعیت‌های Am1 و Am6 ( $2n=6x=54$ ) و جمعیت‌ها هگزاپلوید بودند. در حالی که در جمعیت Am4 ( $2n=8x=72$ ) و جمعیت اکتاپلوید می‌باشند (شکل‌های ۱ و ۲). در اغلب جمعیت‌های مورد مطالعه آنالیز کاریو تیپی حاکی از متقارن بودن الگوی کروموزومی بوده است. با استفاده از نسبت اندازه طول بازوی بلند به کوتاه و بر اساس نظر لوان و همکاران فرمول کاریو تیپی گونه‌های مورد بررسی تعیین شد. این مطالعه نشان داد که اغلب کروموزوم‌ها متاسانتریک تا ساب متاسانتریک هستند. نتایج تجزیه کاریو تیپی شامل طول کل کروموزوم (TL)، طول نسبی کوتاه ترین کروموزوم (S %)، فرمول کاریو تیپی و رده کروموزومی در جدول ۲ نشان داده شده است.

مورد بررسی قرارگرفت. پس از اسکواش نمونه‌ها، حداقل ده پهنه متافازی بررسی و پس از تشخیص نمونه های مناسب و دستیابی به یاخته‌های متافازی یا پرومتافازی، با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد بازینی قرار گرفته و تصاویر لازم تهیه شد. کاربوتیپ وایدیو گرام گونه‌ها انجام شد.

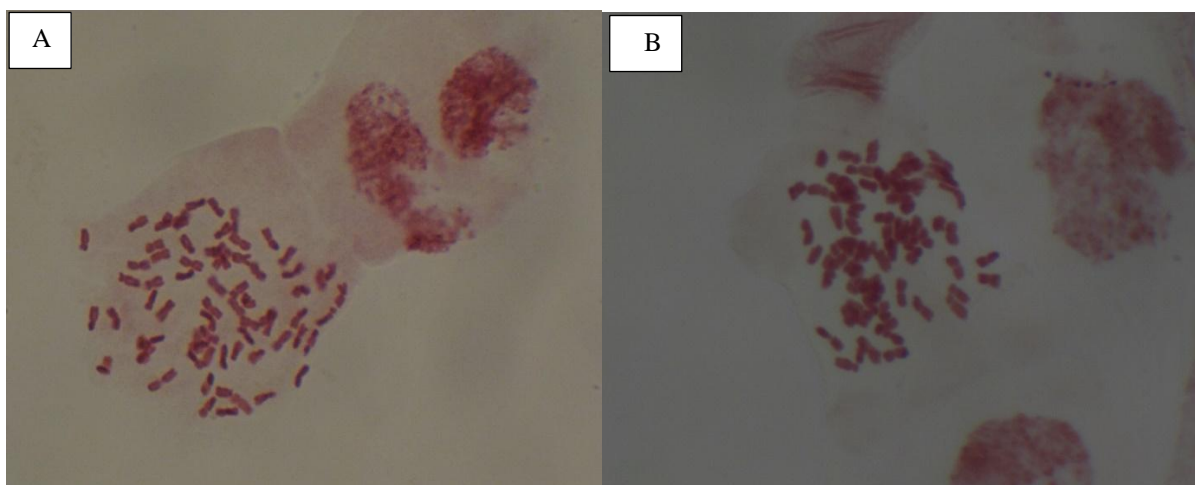
عکس‌های گرفته شده با وضوح مناسب و پراکنش بالا را انتخاب نموده و پارامترهایی نظیر طول کل کروموزوم (TL)، اندازه بازوی بلند (L)، اندازه بازوی کوتاه (S) و نسبت بازوی بلند به کوتاه و نیز شاخص ضریب سانترومتری (CI) توسط نرم‌افزار Micromasure برحسب میکرون در برنامه Excel 2003 اندازه گیری شد.

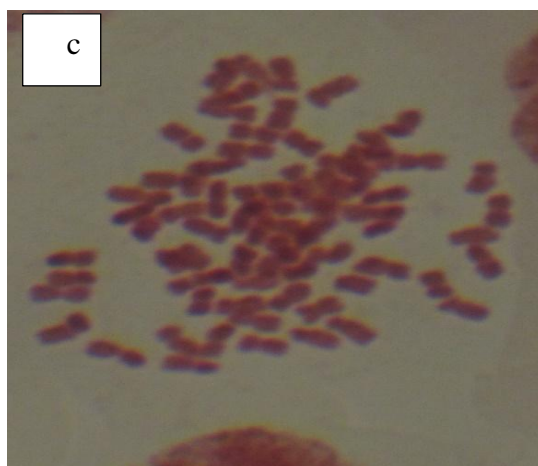
## نتایج

بر اساس مطالعات سیتولوژیکی انجام شده عدد پایه کروموزومی در کلیه جمعیت‌های مورد بررسی

جدول ۲- نتایج مشخصات کاریو تیپی پنج جمعیت مورد مطالعه

جمعیت	2n	Ploidy level	TF%	S%	Karyotype formula	SC
Am1	54	6x	40.69	58.70	22m+5sm	2A
Am4	72	8x	42.36	56.35	29m+7sm	2A
Am6	54	6x	40.18	64.67	19m+8sm	2A





شکل ۱- پهنه متافازی جمعیت‌های AM1 و AM6 با  $2n=6x=54$  و AM4 با  $2n=8x=72$  (bar=5 $\mu$ m)

## بحث

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق گونه دارویی بومادران هزار برگ دارای سیتوتیپ و کموتیپ‌های متعدد می‌باشد. Kaniki و همکاران در سال ۱۹۹۵ و فارسی و همکاران در سال ۲۰۰۰ سطح پلوئیدی  $2n=6x=54$  را برای این گیاه گزارش نمودند [۱۳]. جوزی در سال ۱۹۹۰ در مطالعه کاریوتیپ بر روی شش گونه جنس بومادران نشان داد که بومادران هزاربرگ گونه‌ای تتراپلوئید با  $2n=4x=36$  و عدد پایه  $x=9$  می‌باشد. این در حالی است که ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با مطالعه پنج جمعیت از گونه مزبور دو سطح پلوئیدی هگزاپلوئید و اکتاپلوئید را گزارش نمودند [۱۲]. رحیم ملکی و همکاران با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که در گونه فوق تنوع ژنتیکی مشاهده می‌شود [۱۴]. در نتایج این پژوهش نیز دو سطح پلوئیدی هگزاپلوئید و اکتاپلوئید مشاهده شد. طبق جدول لوان، کاریوتیپ‌ها عمدتاً به کلاس 2A تعلق دارند. در این کلاس کروموزوم‌ها عمدتاً متقارن و بیشتر از نوع متا یا ساب متا تانتریک هستند. (جدول ۲). ابراهیمی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ به این موضوع اشاره داشته‌اند. از سوی دیگر با توجه به مناطق جمع‌آوری و

شرایط اکولوژیکی مناطق مشاهده شد که تغییر شرایط محیطی موثر بر تغییر سطح پلوئیدی می‌باشد. Duchoslav و Safarova در سال ۲۰۱۰ به ارتباط بین توزیع سیتوتیپ‌ها و سازگاری آنها با فاکتورهای محیطی در جنس پیاز (*Allium*) اشاره داشته‌اند [۱۸]. همچنین یوسفزاده و همکاران در سال ۲۰۱۰ به ارتباط خشکی محیط و وقوع پلی پلوئیدی و ایجاد سیتوتیپ‌های مختلف جنس پرداخته‌اند [۲۲]. طبق نظر ایشان، اقلیم بیشترین تاثیر را در ایجاد تنوع و تغییر سطح پلوئیدی دارد. در پژوهش حاضر، جمعیت AM4 از استان تهران در ناحیه ایرانوتورانی و ارتفاع ۱۹۴۰ متری و جمعیت‌های AM1, AM6 به ترتیب از استان گیلان با ارتفاع ۲۰۰۵ متری و استان مازندران با ارتفاع ۲۱۳۴ در ناحیه هیرکانی جمع‌آوری شده بودند. در عین حال در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که دو برابر شدن ژنوم در بومادران سبب تغییر در ویژگی‌های ریختی گیاه و سازگاری آن به شرایط اکولوژیکی سخت می‌شود. براساس این نظریه نوع بافت خاک و میران مواد ارگانیک موجود در خاک در کنار عامل ارتفاع بر روی فنولوژی گیاهان پلوئیدی مهم است [۱۷]. به نظر می‌رسد تغییر شرایط اکولوژیکی ارتفاع و خاک ضمن تغییر آب و هوای کوهستانی به آب و

- [9] Ebrahim F., Pakniyat H., Arzani A., Rahimmalek M., (2012). Karyotype analysis and new chromosome number reports in *Achillea* species. *Biologia*. 67(2): 284-288.
- [10] Gervais G., (1971). Cytological investigation of *Achillea millefolium* complex (Compositae) in Quebec. *Canadian journal of botany*. 55(7):769-808.
- [11] Hofmann L., Fritz D., Nitz S., Kollmannsberger Drawert H., (1992). Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* complex. *Phytochemistry*, 31:537-542.s
- [12] Kiran, Y., Arabaci, T., Sahin, A. & Turkoglu, I., (2008), Karyological notes on another eight species of *Achillea* (Asteraceae) from Turkey. *Biologia*. 63: 343-348.
- [13] Khaniki, G. B. (1995). Chromosome numbers and morphometry in *Achillea* (Anthemideae, Compositae). *Nucleus*. 38: 104- 111.
- [14] Rahimmaleki, M.; Sayed Tabatabaei, B. E.; Arzani, A. and Etemadi, N. (2009). Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Bioch. Syst. Ecol.* 37: 354-361.
- [15] Rechinger K. H. (1964). *A Flora Iranica*. No. 158.
- [16] Reeves, A., (2001), *Micromesure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data*. *Genome*, 44: 439-443.
- [17] Ramsy J. (2011). Polyploidy and ecological adaptation in wild Yarrow. *PNAS*. 108 (17): 1069-7101.
- [18] Safaraova, L. and Duchoslav, M., (2010), Cytotype distribution in mixed populations of polyploidy *A. oleraceum* measured at a microgeographic scale. *Presila*, 82: 126-136.
- [19] Saukel J., Anchev M., Guo YP. Vitkova A., Nedelcheva A., Goranova A., Konakchiev A., Lambrou M., Nejati S., Rauchensteiner F. Ehrendorfer F., (2004). Comments on the biosystematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) in Bulgraria. *Phytol Balcanica*. 9: 361-400.
- [20] Sheidai M., Azani N., Attar F., (2009). New chromosome number and unreduced pollen formation in *Achillea* Species (Asteraceae). *Acta Biologica Szegediensis*. 53 (1): 39-43.
- [21] Turkoglu S., Askin Akpulat H., (2004). Chromosome numbers, Karyotypes and 4C DNA contents of *Achillea sipikorensis* Hausskn. and Bornm. and *Achillea sintenisii* Hub.-Mor. (Asteraceae). 57(3): 244-249.
- [22] Yousefzadeh, K., Houshmand, S., Madani, B. & Martinez-Gomez, P., (2010), Karyotypic Studies in Iranian wild almond species. *Caryolog. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*. 63 (2): 117-123.

هوای مرطوب و نیز تغییر در میزان بارش بر تغییر سطح پلوییدی موثر بوده است.

## تقدیر و تشکر

این تحقیق بخشی از طرح به شماره ۹۱۰۰۰۷۴۶ صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری می باشد.

## منابع

- [۱] امیدبگی ر، ۱۳۷۶. رهیافت های تولید و فراوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات طراحان نشر، ۴۲۴ صفحه.
- [۲] آذرینوند ح، قوام عربانی م، سفید کن ف، طویلی ع، (۱۳۸۸). بررسی تاثیر ویژگی های اکولوژیکی بر کمیت اسانس گل و برگ *Achilla millefolium* L. subsp. *millefolium*. ۲۵(۴): ۵۵۶-۵۷۱.
- [۳] آئینه چی ی، ۱۳۶۵. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۱۹۶ صفحه.
- [۴] جایمند ک. و رضایی م، (۱۳۷۸). بررسی ترکیبات موجود در اسانس گل بومادران هزار برگ. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع. ۴: ۷۱-۸۱.
- [۵] جایمند ک. و رضایی م، (۱۳۸۳). بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس اندام های هوایی گیاه *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* با روش های تقطیر. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع. ۲۰(۲): ۱۸۱-۱۹۰.
- [6] Afshari F.; Ebrahimi M.; Akbari M. and Farajpour M. (2013). Cytological investigations and new chromosome number reports in Yarrow (*Achillea millefolium*) accessions from Iran. *Comparative Cytogenetic*. 7(4): 271.
- [7] Baltisberger M. (2006). Cytological investigationson Bulgarian phanerogams. *Willdenowia* 36: 205-216.
- [8] Baltisberger M and Widmer A. (2016). Chromosome numbers and Karyotypes within the genus *Achillea* (Asteraceae: *Anthemidae*). *Willdenowia* 46 (1): 121-132.







