

ارزیابی تنوع ژنتیکی ده اکوتیپ خارمریم (*Silybum marianum* (L.) با استفاده از

صفات مورفولوژیک، فنولوژیک و فیتوشیمیایی

رسمیه حمید^۱، محمدرضا سیاهپوش^۲، رضا مامقانی^۳ و امیر سیاهپوش^۴

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

۲- نویسنده مسوول: استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران اهواز (siahpoosh@scu.ac.ir)

۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات خوزستان

۴- استادیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی در گیاه خارمریم مقدمه انجام برنامه‌های اصلاحی در این گیاه است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نه منطقه کشور ایران به همراه رقم خارجی بوداکالازی، آزمایشی در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در مزرعه آزمایش دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز اجرا شد. در این پژوهش صفات مورفولوژیک، فنولوژیک و فیتوشیمیایی بر روی اکوتیپ‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها تفاوت معنی‌داری ($\alpha \leq 0.01$) را برای کلیه صفات نشان داد. اکوتیپ‌های ساری و مبارکه بالاترین عملکرد دانه را در مقایسه با سایر اکوتیپ‌ها به خود اختصاص دادند. مقایسات میانگین صفات فیتوشیمیایی نشان داد که مقدار ترکیبات فنلی در محدوده ۸/۱۸-۱۴/۱۹ میلی‌گرم تانیک اسید بر گرم ماده گیاهی و مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در اکوتیپ‌های مختلف بین ۵/۳۵۷-۱۱/۰۷۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم عصاره خشک بود. میزان سیلی‌مارین در محدوده ۳۲/۰۷-۵۵/۴۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ گرم عصاره خشک در بین ارقام تغییر یافت. بر اساس تجزیه خوشه‌ای داده‌ها، اکوتیپ‌ها در دو گروه قرار گرفتند. به طوری که، اکوتیپ‌های ملاثانی، آمل، ساری، اهواز، شوشتر، اصفهان، بابل و نجف‌آباد در خوشه اول و اکوتیپ‌های مبارکه و مجاری در خوشه دوم قرار گرفتند. اعضای گروه اول از نظر میزان ترکیبات پلی‌فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند، ارتفاع متوسط تا کوتاه داشتند. اکوتیپ‌های گروه دوم بسیار زودرس و با بلند بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که بین توده‌های خارمریم از نظر صفات مورفولوژیکی تنوع بالایی وجود دارد. به طوری که می‌توان از این اکوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی بهره برد.

کلید واژه‌ها: خار مریم، آنتی‌اکسیدان، پلی‌فنل، تجزیه خوشه‌ای، سیلیمارین و فلاونوئید

مقدمه

خارمریم یا ماریتیغال با نام علمی *Silybum marianum* (L.) Gaertn گیاهی دو لپه، پیوسته گلبرگ علفی، یک یا دو ساله از خانواده کاسنی (کمپوزیته) است. دانه‌های ماریتیغال حاوی فلاونولیکان‌های ارزشمندی مانند سیلیبین^۱، سیلیکریستین^۲ و سیلیدیانین^۳

است. که مجموع آنها تحت عنوان سیلیمارین^۴ شناخته می‌شوند (ابدالی، ۱۳۸۷). تحقیقات اخیر نشان داده است که مصرف مواد موثره این گیاه توسط افراد شاغل در صنایع رنگ‌سازی و شیمیایی، نقش عمده‌ای در عدم ابتلای آنها به مسمومیت‌های کبدی دارد (دیپ و همکاران^۵، ۲۰۰۶). به لحاظ استفاده روز افزون صنایع

4- Silymarin
5- Deep et al

1- Silybin
2- Silychristin
3- Silydianin

داروسازی از مواد موثره این گیاه، ماریتیغال از ۲۰ سال پیش در تعدادی از کشورها در مقیاس وسیعی کشت می‌شود. در اکثر کشورهای غربی (بخصوص آلمان، اتریش و رومانی) و در تعدادی از کشورهای جنوب آمریکا و جنوب آفریقا، همه ساله زمین‌های زراعی وسیعی به کشت ماریتیغال اختصاص می‌یابد (شکرپور، ۱۳۸۷). به طوری که فروش خارمریم در سال ۲۰۰۵ به بیش از ۸ میلیون دلار در ایالات متحده آمریکا رسید همین طور دهمین رتبه فروش در میان گیاهان دارویی در سال ۲۰۰۷ را به خود اختصاص داد (بلومنتال و همکاران^۱، ۲۰۰۶).

وجود تنوع ژنتیکی شرط اصلی اجرای برنامه‌های اصلاحی است تا شانس انتخاب صفات مطلوب افزایش یابد. لذا، بررسی تنوع ژنتیکی موجود در بین گونه‌ها و جمعیت‌های داخل گونه‌ها از نظر اصلاحی با ارزش بوده و کمک شایانی به پیشبرد برنامه‌های تحقیقاتی می‌نماید (برت و همکاران^۲، ۲۰۰۳ و عبدی و عارفی^۳، ۲۰۰۲). رام و همکاران^۴ (۲۰۰۵) ۱۵ نمونه ماریتیغال متشکل از ۱۰ جمعیت خارجی و ۵ جمعیت داخلی جمع‌آوری شده از منطقه جاموی هند را از لحاظ صفات مورفولوژیک و میزان سیلیمارین مورد مطالعه قرار دادند. بیشترین ضریب تغییرات ژنوتیپی، وراثت‌پذیری و پیشرفت ژنتیکی برای صفات عملکرد دانه در بوته، تعداد کاپیتول در بوته، تعداد شاخه در بوته، طول برگ، قطر ساقه، قطر کاپیتول و میزان سیلیمارین بدست آمد. آزدت و همکاران^۵ (۱۹۹۶) ۴۴ جمعیت اسپانیایی و ۱۴ جمعیت خارجی را از لحاظ ویژگی‌های فیتوشیمیایی و مورفولوژیک مورد بررسی قرار دادند. تجزیه میزان سیلیمارین از طریق HPLC فاز معکوس در این جوامع نشان داد که مقادیر سیلیبین و ایزوسیلیبین با میزان

سیلیدیانین نسبت عکس دارد. در مطالعه اوتایی و همکاران^۶ (۲۰۰۶) در بین اکوتیپ‌های گل سفید و گل بنفش خارمریم در یک آزمایش چند ساله مشاهده شد که بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر شاخص بذری، ارتفاع بوته، شاخص رشد، تعداد کاپیتول در بوته، قطر کاپیتول و عملکرد دانه هر بوته تنوع معنی‌داری وجود دارد. شکرپور و همکاران^۷ (۲۰۰۷ و ۲۰۰۸) ۳۴ جمعیت ماریتیغال را از لحاظ صفات مورفولوژیک و ترکیب‌های فلاونولیگنانی مورد تحقیق قرار داده و تنوع ژنتیکی معنی‌داری را در درون و بین اکوتیپ‌ها گزارش کردند. رابطه بین نشانگرهای مورفولوژیک، فیتوشیمیایی و مولکولی در ۳۲ اکوتیپ جمع‌آوری شده از نواحی مختلف کشور به همراه دو رقم خارجی بوداکالازی و seedsCN مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اکوتیپ‌های دارای وزن هزاردانه بیشتر و تاریخ گلدهی، ارتفاع بوته، قطر کاپیتول و عملکرد دانه کمتر دارای سیلیکریستین و سیلیبین بیشتر و سیلیدیانین کمتری بودند. به عبارت دیگر، دانه‌های درشت‌تر، سیلیبین بیشتر و سیلیدیانین کمتری داشتند (شکرپور و همکاران ۱۳۷۸).

حسنلو و همکاران (۱۳۸۳) ۱۴ جمعیت از نقاط مختلف کشور (شمال، غرب و جنوب غرب) همراه با رقمی با منشا مجارستان را از نظر ویژگی‌های رویشی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرار دادند. بر پایه نتایج بدست آمده، عوامل محیطی محل رویش گیاه خارمریم ضمن تاثیر بر ویژگی‌های رویشی بر مقدار کمی و کیفی ترکیبات فلاونولیگنانی نیز تاثیر گذاشت. ارزیابی تنوع ژنتیکی بر مبنای صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و زراعی می‌تواند برای سازماندهی ژرم پلاسما، گزینش والدین مناسب برای دورگ‌گیری و تولید جمعیت‌های در حال تفرق سودمند باشد (فرشادفر، ۱۳۷۴). در این تحقیق سعی بر آن شد تا تنوع اکوتیپ‌های مختلف خارمریم نقاط مختلف ایران با توجه به صفات مورفولوژیک،

وجود تنوع ژنتیکی شرط اصلی اجرای برنامه‌های اصلاحی است تا شانس انتخاب صفات مطلوب افزایش یابد. لذا، بررسی تنوع ژنتیکی موجود در بین گونه‌ها و جمعیت‌های داخل گونه‌ها از نظر اصلاحی با ارزش بوده و کمک شایانی به پیشبرد برنامه‌های تحقیقاتی می‌نماید (برت و همکاران^۲، ۲۰۰۳ و عبدی و عارفی^۳، ۲۰۰۲). رام و همکاران^۴ (۲۰۰۵) ۱۵ نمونه ماریتیغال متشکل از ۱۰ جمعیت خارجی و ۵ جمعیت داخلی جمع‌آوری شده از منطقه جاموی هند را از لحاظ صفات مورفولوژیک و میزان سیلیمارین مورد مطالعه قرار دادند. بیشترین ضریب تغییرات ژنوتیپی، وراثت‌پذیری و پیشرفت ژنتیکی برای صفات عملکرد دانه در بوته، تعداد کاپیتول در بوته، تعداد شاخه در بوته، طول برگ، قطر ساقه، قطر کاپیتول و میزان سیلیمارین بدست آمد. آزدت و همکاران^۵ (۱۹۹۶) ۴۴ جمعیت اسپانیایی و ۱۴ جمعیت خارجی را از لحاظ ویژگی‌های فیتوشیمیایی و مورفولوژیک مورد بررسی قرار دادند. تجزیه میزان سیلیمارین از طریق HPLC فاز معکوس در این جوامع نشان داد که مقادیر سیلیبین و ایزوسیلیبین با میزان

1- Blumenthal *et al.*2- Bert *et al.*

3- Abdi & Arefi

4- Ram *et al.*5- Azdet *et al.*6- Ottay *et al*7- Shokrpour *et al.*

خط صورت گرفت. ارزیابی صفات روی ۳۰ بوته از هر کرت که به طور تصادفی انتخاب شده بودند، انجام شد. صفات مورد ارزیابی عبارت بودند از صفات مورفولوژیک و فنولوژیک که عبارتند از: ارتفاع بوته، تعداد کاپیتول در بوته، قطر کاپیتول اصلی در بوته، تعداد دانه در کاپیتول اصلی، وزن دانه در کاپیتول اصلی، وزن هزار دانه، عملکرد دانه، تعداد روز تا ساقه دهی، تعداد روز تا گلدهی (مطابق روش اشنایتر و میلر^۲، ۱۹۸۱) و تعداد روز تا رسیدگی، و صفات فیتوشیمیایی شامل: میزان فنل (به روش فولین سیکالتو؛ سینگلتن و روسی^۳، ۱۹۶۵)، میزان فلاونوئید (به روش نور سنجی کلرید آلومینیوم؛ مدا و همکاران^۴، ۲۰۰۵)، میزان سیلیمارین (به روش اسپکتروفتومتری؛ حقی و پیرعلی^۵، ۱۳۸۲) و ظرفیت آنتی اکسیدانی (به روش DPPH؛ هانگ و همکاران^۵، ۲۰۰۵). (۲۰۰۵). آنالیز آماری در این تحقیق با استفاده از نرم افزارهای SAS و SPSS انجام شد. گروه بندی اکوتیپ‌ها به روش وارد^۶ با استفاده از داده‌های استاندارد شده براساس فاصله اقلیدوسی انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات

صفات مورفولوژیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اکوتیپ‌های مختلف از نظر صفات مورد بررسی در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان دادند، که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در بین اکوتیپ‌های نقاط مختلف کشور می باشد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ‌های مجاری و مبارکه دارای بالاترین میانگین ارتفاع بوده و کمترین میانگین ارتفاع مربوط به اکوتیپ-های نجف‌آباد و آمل بود (جدول ۱). ارتفاع اکوتیپ-

فنولوژیک و فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گیرد و اکوتیپ‌هایی که از نظر تجاری اهمیت بیشتری دارند، شناسایی و جهت بکارگیری در برنامه‌های به نژادی معرفی شوند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ده اکوتیپ خارمریم متشکل از اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از استان‌های خوزستان (اهواز، ملاثانی، شوشتر) اصفهان (اصفهان، مبارکه، نجف‌آباد)، ساری، آمل، بابل و رقم تجاری وارداتی به نام بوداکالازی^۱ از مجارستان مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور ارزیابی‌های فنوتیپی، اکوتیپ‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز کشت گردیدند. فاصله ردیف‌های کاشت ۹۰ سانتی متر و فاصله بوته‌ها بر روی ردیف ۲۵ سانتی متر بود. طول هر کرت ۶ متر، عرض آن ۴ متر و فاصله کرت‌ها از یکدیگر ۱ متر در نظر گرفته شد و در هر کرت، کشت در ۴ ردیف انجام گرفت. فاصله تکرارها از یکدیگر ۱/۵ متر بود. در هر حفره کاشت ۳ عدد بذر کشت گردید که پس از سبز شدن، بوته‌های اضافی به ۱ بوته تنک شدند. مطابق با نیاز کودی محاسبه شده کود اووه به عنوان منبع نیتروژن به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار استفاده شد، کود سوپر فسفات تریپل نیز به عنوان منبع فسفر و به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار به کار رفت. یک دوم مقدار کود ازته و تمام کود فسفات در هنگام کاشت، به زمین داده شد. یک دوم کود ازته باقیمانده در مرحله ساقه‌دهی برای هر خط کشت محاسبه و داده شد و بلافاصله آبیاری صورت گرفت. در این آزمایش از علف کش و حشره کش استفاده نشد و برای مبارزه با علف هرز وجین دستی انجام شد. آبیاری با استفاده از سیفون و براساس درصد رطوبت وزنی صورت پذیرفت. در هر کرت ردیف‌های ۱ و ۴ به عنوان حاشیه در نظر گرفته شد و نمونه‌گیری از دو خط وسط کرت با حذف نیم متر از ابتدا و انتهای هر

2- Schneiter & Miller

3- Singleton & Rossi

4- Meda *et al.*

5- Hung *et al.*

6- Ward's method

1- Budakalasz

نسبت به اکوتیپ‌های مجاری و ساری تفاوت معنی‌دار داشت و سایر اکوتیپ‌های دیگر از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند. نتایج مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد که بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر عملکرد دانه تفاوت معنی‌دار وجود داشت، به طوری که اکوتیپ ساری بالاترین عملکرد دانه را نشان داد. کمترین میانگین عملکرد دانه نیز در اکوتیپ‌های اهواز، اصفهان و بابل وجود داشت. اکوتیپ مبارکه نسبت به اکوتیپ‌های ملاثانی، شوشتر و آمل تفاوت معنی‌دار نشان داد. اکوتیپ‌های نجف‌آباد و مجاری نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان دادند (جدول ۲).

صفات فنولوژیک

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد که بین اکوتیپ‌های مورد بررسی از نظر تعداد روز تا سبز شدن، اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ بابل دارای بیشترین تعداد روز تا سبز شدن و اکوتیپ مجاری کمترین میانگین را از نظر صفت مورد مطالعه نشان دادند. اکوتیپ‌های اهواز و شوشتر دوره روز تا سبز شدن بالاتری نسبت به اکوتیپ‌های مبارکه و آمل داشتند. سایر اکوتیپ‌ها به لحاظ این دوره تفاوت معنی‌داری با هم نشان ندادند (جدول ۳). از بین اکوتیپ‌های مختلف، اکوتیپ مجاری دارای کمترین میانگین صفت تعداد روز تا روزت بود و بالاترین میانگین‌ها برای این صفت مربوط به اکوتیپ‌های اهواز، ساری، بابل، نجف-آباد و آمل گزارش گردید (جدول ۴). اکوتیپ شوشتر اختلاف معنی‌داری با اکوتیپ‌های اصفهان و مبارکه نشان داد. از نظر طول دوره روز تا ساقه دهی، اکوتیپ بابل بالاترین دوره روز تا ساقه‌دهی را نشان داد. اکوتیپ‌های مبارکه و مجاری نیز کوتاه‌ترین دوره را نشان دادند. اکوتیپ‌های اهواز، ملاثانی، شوشتر، اصفهان و ساری نسبت به اکوتیپ‌های آمل و بابل اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۴). در این تحقیق مطابق روش اشنایتر

های اهواز، ملاثانی با اکوتیپ شوشتر اختلاف معنی‌داری نشان داد. از نظر تعداد کاپیتول در بوته بالاترین تعداد کاپیتول در بوته در اکوتیپ مبارکه، و حداقل تعداد کاپیتول در بوته در اکوتیپ‌های بابل و نجف‌آباد وجود داشت. تعداد کاپیتول در بوته اکوتیپ‌های ساری و شوشتر بسیار بالاتر از اکوتیپ‌های آمل، اصفهان، مجاری، آمل و اهواز بود (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ آمل دارای بیشترین میانگین قطر کاپیتول و اکوتیپ‌های مبارکه و مجاری دارای کمترین میزان قطر کاپیتول بودند. قطر کاپیتول اصلی اکوتیپ‌های ملاثانی و اصفهان بسیار پایین‌تر از اکوتیپ‌های اهواز، شوشتر، نجف‌آباد، ساری و بابل مشاهده گردید (جدول ۲). بین اکوتیپ‌های مورد بررسی از نظر تعداد دانه در کاپیتول اصلی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ خارمریم با منشا ساری دارای بیشترین تعداد دانه در کاپیتول اصلی بود. اکوتیپ‌های مجاری و مبارکه نیز کمترین میانگین‌ها را از نظر صفت مورد مطالعه نشان دادند. اکوتیپ‌های بابل، آمل و نجف‌آباد تعداد دانه در کاپیتول اصلی بالاتری نسبت به سایر اکوتیپ‌ها نشان دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که از نظر وزن کل دانه در کاپیتول اصلی تمامی اکوتیپ‌ها از نظر آماری در یک گروه قرار نمی‌گیرند. بالاترین وزن دانه در کاپیتول اصلی مربوط به اکوتیپ نجف‌آباد بود. پایین‌ترین وزن دانه در کاپیتول اصلی مربوط به اکوتیپ‌های مبارکه و مجاری بود. اکوتیپ‌های ملاثانی و اصفهان نیز تفاوت معنی‌داری با اکوتیپ‌های شوشتر، ساری، آمل و بابل نشان دادند (جدول ۲). براساس تجزیه و تحلیل آماری وزن هزار دانه، اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ نجف‌آباد دارای بالاترین میانگین بوده و حداقل میانگین وزن هزار دانه در اکوتیپ‌های اصفهان و بابل وجود داشت (جدول ۳). وزن هزار دانه اکوتیپ‌های اهواز

اکوتیپ مبارکه بود. اکوتیپ‌های ملاثانی و آمل نیز تفاوت معنی‌داری با اکوتیپ‌های شوشتر، ساری، اصفهان و بابل نشان دادند (جدول ۶). براساس تجزیه و تحلیل آماری برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ نجف آباد و مجاری دارای بالاترین میانگین بوده و حداقل میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در اکوتیپ مبارکه وجود داشت، اکوتیپ‌های اهواز و ساری نسبت به اکوتیپ اصفهان تفاوت معنی‌داری نشان دادند. سایر اکوتیپ‌ها در یک گروه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که مقدار ترکیبات فلاونوئیدی در اکوتیپ‌های مختلف بین ۵/۳۵۷-۱۱/۰۷۹ میلی‌گرم در ۱۰۰گرم عصاره خشک تغییر یافت به طوری که بیشترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی مربوط به اکوتیپ شوشتر بود و اکوتیپ مبارکه کمترین مقدار را نشان داد. اکوتیپ‌های اهواز، ملاثانی و مجاری نسبت به اکوتیپ‌های اصفهان، نجف‌آباد، ساری، آمل تفاوت بسیار معنی‌داری نشان دادند. اکوتیپ بابل نیز با سایر اکوتیپ‌ها اختلاف معنی-دار نشان داد (جدول ۶).

از نظر محتوای سیلی‌مارین نیز اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد در بین اکوتیپ‌ها مشاهده شد. میزان سیلی‌مارین در محدوده ۳۲/۰۷-۵۵/۴۰ میلی‌گرم برگرم عصاره خشک بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ‌ها از نظر این صفت در گروه‌های آماری مختلفی قرار می‌گیرند. بالاترین میزان سیلی‌مارین مربوط به اکوتیپ شوشتر و پایین‌ترین میزان سیلی‌مارین مربوط به اکوتیپ مبارکه بود. اکوتیپ‌های ملاثانی، مجاری، نجف‌آباد و اهواز نیز تفاوت معنی‌داری با اکوتیپ‌های آمل، ساری، اصفهان و بابل نشان دادند (جدول ۶).

و میلر^۱ (۱۹۸۱) مراحل مختلف گلدهی ثبت گردید. طبق این روش شروع گلدهی (R-5%) زمانی است که حدود ۵ درصد کاپیتول‌ها باز شده و پایان گلدهی (R-75% گلدهی) زمانی است که تقریباً ۷۵ درصد کاپیتول‌ها باز شده باشند. براساس نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها در سطح خطای ۱ درصد بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر دوره روز تا شروع گلدهی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تمامی اکوتیپ‌ها از نظر دوره روز تا شروع گلدهی در یک گروه قرار نمی‌گیرند. اکوتیپ نجف آباد با (۱۴۵ روز) بالاترین دوره روز تا شروع گلدهی و اکوتیپ‌های مجاری و مبارکه به ترتیب با (۱۳۰ روز) و (۱۳۲ روز) کمترین دوره روز تا شروع گلدهی را نشان دادند. هم‌نیطور اکوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر دوره روز تا پایان گلدهی اختلاف معنی‌دار نشان دادند. اکوتیپ نجف آباد با (۱۶۳ روز) بالاترین دوره روز تا پایان گلدهی را نشان داد در حالی که اکوتیپ‌های مبارکه و مجاری با (۱۴۱ روز) و (۱۴۳ روز) کوتاهترین دوره را نشان دادند. اکوتیپ‌های اهواز، ملاثانی، شوشتر، اصفهان و ساری با طول دوره روز تا پایان گلدهی ۱۵۲ تا ۱۵۴ روز نسبت به اکوتیپ‌های آمل و بابل اختلاف معنی‌دار نشان دادند (جدول ۴).

صفات فیتوشیمیایی

براساس نتایج تجزیه واریانس بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر محتوای فنل کل، میزان فلاونوئید، میزان سیلی‌مارین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۵). مقدار ترکیبات فنلی در محدوده ۸/۱۸-۱۴/۱۹ میلی‌گرم در ۱۰۰گرم عصاره خشک بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اکوتیپ‌ها از نظر آماری در یک گروه قرار نمی‌گیرند. بالاترین میزان فنل مربوط به اکوتیپ نجف‌آباد و مجاری بود. همچنین پایین‌ترین میزان فنل مربوط به

حمید و همکاران: ارزیابی تنوع ژنتیکی ده اکوتیپ خارمریم...

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مورفولوژیک در بین اکوتیپ‌های خارمریم

منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع	تعداد کاپیتول در بوته	قطر کاپیتول اصلی	وزن دانه در کاپیتول اصلی	وزن هزار دانه	عملکرد دانه	تعداد دانه در کاپیتول اصلی
تکرار	۲	۱۸/۸۷۲	۰/۰۹	۰/۰۲۹	۰/۰۰۷	۲/۲۹۲	۷۱/۷۹۵	۱/۶۳
اکوتیپ	۹	۳۴۲/۶۷۱**	۱۶/۵۳۹**	۵۰/۱۳۱**	۴/۰**	۱/۲۷۸**	۱۵۰۳۹۶/۲۲**	۷۷۶۰/۴۶**
خطا	۱۸	۸/۸۴	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۰۳۶	۰/۲۴	۴۵۳۰/۲۸۹	۷/۷۶
ضریب تغییرات (%)		۱/۹۸	۳/۰۱	۱/۰۱	۲/۸۱	۲/۱۳	۱۴/۲۵	۰/۹۵

^{ns} غیر معنی دار، * و ** به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیک در بین اکوتیپ‌های مختلف

نام اکوتیپ	ارتفاع (سانتیمتر)	تعداد کاپیتول در بوته	قطر کاپیتول اصلی (میلی متر)	تعداد دانه در کاپیتول اصلی	وزن دانه در کاپیتول اصلی (گرم)	وزن هزار دانه (گرم)
اهواز	۱۴۱ cde	۱۱ /۶۶ d	۴۲/۴۰ dc	۲۹۶/۶ d	۷/۲۷ b	۲۳/۵۶ ab
ملائانی	۱۴۳/۷۳ cde	۱۳/۲ c	۴۱/۱۲ e	۲۶۲/۳ e	۶/۳۸ c	۲۳/۳۲ abc
شوشتر	۱۵۱/۸۸ b	۱۴/۲ b	۴۲/۸۱ bc	۳۰۷/۳ c	۷/۴۳ b	۲۳/۳۵ abc
اصفهان	۱۴۵/۲۶bcd	۱۰/۸۳ de	۴۰/۹۷۷ e	۲۹۰/۰۶ d	۶/۶۴ c	۲۲/۱۷ c
نجف آباد	۱۳۶/۵۸ e	۱۰/۳۸ e	۴۳/۴۶ b	۳۲۴/۳۳ b	۸/۲۲ a	۲۴/۲۰ a
مبارکه	۱۶۳/۶۵a	۱۷/۹۳ a	۳۲/۸۵f	۲۰۶/۲۶ f	۴/۸۳ d	۲۳/۳۴ abc
ساری	۱۳۸/۴۶ed	۱۴/۳۳ b	۴۳/۲۵ bc	۳۵۳/۱۳ a	۷/۱۸ b	۲۲/۳۸ bc
آمل	۱۳۵/۵۵e	۱۱/۵۳ d	۴۴/۹۴ a	۳۲۱/۳ b	۷/۵۲ b	۲۳/۲۴ abc
بابل	۱۴۷/۸۱ bc	۱۰/۴۶ e	۴۱/۴۳ de	۳۲۶/۳ b	۷/۵۶ b	۲۲/۲۳ c
مجارستان	۱۶۵/۳۵ a	۱۳/۶۶ bc	۳۳/۷۳ f	۲۰۱/۹۳ f	۴/۷۸ d	۲۲/۸۱ bc

در هر ستون حروف غیر یکسان، اختلاف معنی دار میانگین‌ها را در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن نشان می‌دهد.

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فنولوژیک در بین اکوتیپ‌های خارمریم

منابع تغییرات	درجه آزادی	روز تا سبز شدگی	روز تا روزت	روز تا ساقه دهی	روز تا ۱۰٪ گلدهی	روز تا ۷۰٪ گلدهی
تکرار	۲	۱/۲۰	۱/۲۳۳	۰/۴۰۰	۰/۵۸	۰/۰۲
اکوتیپ	۹	۲۰/۲۱۸**	۱۳/۸۱۱**	۷۵/۹۲**	۱۱/۴۶**	۲۵/۱۳**
خطا	۱۸	۰/۴۵	۰/۷۸	۱/۱۴۰	۱/۸۴	۱/۳۶
ضریب تغییرات (%)	-	۶/۵۷۹	۱/۳۱۸	۰/۹۰۵	۲/۹۲	۲/۳۳

^{ns} غیر معنی دار، * و ** به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

جدول ۴) مقایسه میانگین صفات فنولوژیک در بین اکتوپهای مختلف

نام اکتوپ	روز تا سبز شدگی	روز تا روزت	روز تا ساقه دهی	روز تا ۱۰٪ گلدهی	روز تا ۷۰٪ گلدهی	عملکرد دانه (کیلوگرم)
اهواز	۸ e	۶۹abc	۱۱۹ bcd	۱۴۱ bcd	۱۵۳ b	۱۲۱۳/۵۵ f
ملاثانی	۱۰ d	۶۸ bc	۱۱۸ cd	۱۳۸ d	۱۵۴ b	۱۶۳۱/۸۹ c
شوشتر	۸ e	۶۴ e	۱۲۱ abc	۱۴۰ cd	۱۵۴ b	۱۶۳۰/۴۴ c
اصفهان	۱۰ cd	۶۷ cd	۱۱۸ d	۱۴۴ ab	۱۵۲ b	۱۲۴۵/۵ f
نجف آباد	۱۱ cd	۶۹abc	۱۲۰ bcd	۱۴۵ a	۱۶۳ a	۱۴۷۳/۴۴ d
مبارکه	۱۲ bc	۶۵ de	۱۰۹ e	۱۳۲ e	۱۴۳ e	۱۷۲۱ b
ساری	۱۱ cd	۷۰ab	۱۲۲ ab	۱۴۲ abc	۱۵۳ b	۱۸۰۶/۳۳ a
آمل	۱۳ b	۶۹ abc	۱۲۱ abc	۱۳۸ d	۱۴۸ d	۱۶۴۷/۴۳ c
بابل	۱۵ a	۷۱ a	۱۲۳a	۱۴۴ ab	۱۵۰ d	۱۲۰۹/۳۸ f
مجارستان	۶ f	۶۴ e	۱۰۹ e	۱۳۰ e	۱۴۱ e	۱۳۵۵/۷۸ e

در هر ستون حروف غیریکسان، اختلاف معنی دار میانگین ها را در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چنددامنه ای دانکن نشان می دهد.

جدول ۵- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فیتوشیمیایی در بین اکتوپهای خارمریم

منابع تغییر	درجه آزادی	ترکیبات فنلی	درصد آنتی اکسیدانت	میزان سیلی مارین	میزان فلاونوئید
تکرار	۲	۱/۳۹۲	۱۱/۲۶۷	۴/۹۹۵	۰/۰۴۶
اکتوپ	۹	۴۱/۴۳۰**	۴۲۵/۵۱۶**	۵۸۱/۶۴۹**	۵۸/۰۸۶**
خطا	۱۸	۰/۱۰	۷/۶۱	۱/۴۳	۰/۲۴
ضریب تغییرات(٪)	-	۳/۳۳۲	۳/۲۴۲	۲/۹۰۳	۲/۵۴۱

ns غیر معنی دار، * و ** به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات فیتوشیمیایی در بین اکتوپهای خارمریم

نام اکتوپ	میزان ترکیبات فنلی (میلی گرم تانیک اسید/گرم گیاه)	درصد ترکیبات آنتی اکسیدانتی (میلی گرم/ میلی لیتر)	ترکیبات فلاونوئیدی (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم عصاره خشک)	میزان سیلیمارین (میلی گرم بر ۱۰۰ گرم عصاره خشک)
اهواز	۹/۳۲۵ e	۸۸/۸۹۹ b	۱۰/۱۶۱ b	۵۰/۳۲۶ b
ملاثانی	۱۲/۲۴۸ b	۸۹/۸۵ ab	۹/۴۸۸ b	۵۱/۰۱۲ b
شوشتر	۱۲/۸۷۷ ed	۸۶/۹۶۱ ab	۱۱/۰۷۹ a	۵۵/۴۰۲ a
اصفهان	۹/۶۳۱ e	۶۸/۲۹۱ c	۸/۴۷۸ c	۳۸/۵۱۱ c
نجف آباد	۱۳/۶۰۵ a	۹۱/۴۹۸ a	۸/۵۱۷ c	۵۱/۵۸۶ b
مبارکه	۸/۱۸۲ f	۵۴/۵۴۶ d	۵/۳۵۷ e	۳۲/۰۷۲ d
ساری	۱۱/۰۴۰ c	۸۳/۶۳۵ b	۸/۵۸۶ c	۳۸/۸۵۱ c
آمل	۱۲/۳۷۳ b	۸۸/۸۶۱ ab	۸/۷۱۵ c	۳۸/۷۵۶ c
بابل	۱۰/۵۳۴ cd	۸۶/۲۲۴ ab	۷/۶۱۱ d	۴۱/۴۱۲ c
مجارستان	۱۴/۱۹۰ a	۹۱/۴۸۸ a	۹/۴۹۷ b	۵۲/۳۱۵ b

در هر ستون حروف غیریکسان، اختلاف معنی دار میانگین ها را در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چنددامنه ای دانکن نشان می دهد.

گروه بندی اکوتیپ‌ها بر اساس صفات مورفولوژیک، فنولوژیک و فیتوشیمیایی

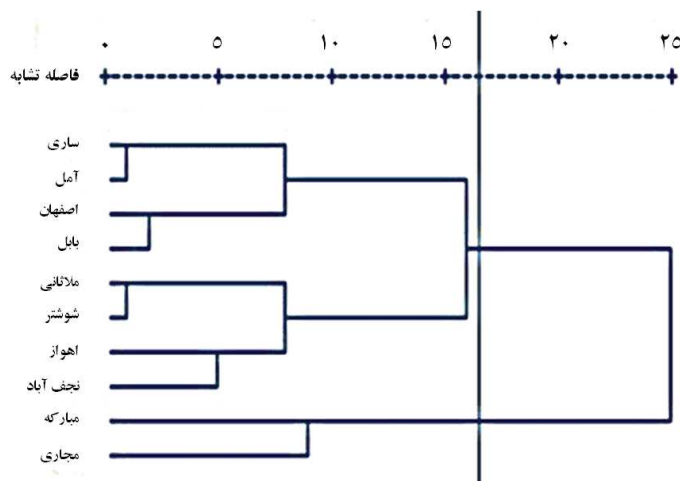
دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای صفات مختلف در شکل ۱ آمده است. با برش دندروگرام در فاصله تشابه ۱۶ دو گروه اکوتیپی حاصل گردید. بر اساس گروه بندی حاصل، اکوتیپ‌های ملاثانی، آمل، ساری، اهواز، شوشتر، اصفهان، بابل و نجف‌آباد در خوشه اول قرار گرفتند، در این گروه، اکوتیپ‌های اهواز، شوشتر و ملاثانی مربوط به یک اقلیم و متعلق به مناطق گرم و خشک جنوب غربی هستند.

اکوتیپ‌های ساری، بابل و آمل نیز مربوط به مناطق معتدل شمالی هستند. اعضای این گروه از نظر میزان ترکیبات پلی فنلی و ظرفیت آنتی اکسیدانی بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند، این اکوتیپ‌ها ارتفاع متوسط تا کوتاه داشتند. اکوتیپ نجف‌آباد نیز در این خوشه قرار گرفت این اکوتیپ دیررس‌ترین و پاکوتاه‌ترین اکوتیپ بوده همچنین به لحاظ فعالیت آنتی-اکسیدانی و محتوای فنل کل بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده و از نظر وزن دانه در کاپیتول اصلی نسبت به سایر اکوتیپ‌ها برتری داشت. اکوتیپ‌های مبارکه و مجاری در خوشه دوم قرار گرفتند. این اکوتیپ‌ها زودرس‌ترین و پابلندترین اکوتیپ‌ها بودند. همچنین این اکوتیپ‌ها به لحاظ تعداد و وزن دانه در کاپیتول اصلی و همچنین قطر کاپیتول اصلی کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای می‌توان گفت که از نظر صفات اندازه‌گیری شده اکوتیپ‌های مناطق شمال و جنوب غرب کشور از تنوع کمتری نسبت به مناطق مرکزی کشور برخوردارند به طوری که اکوتیپ‌های اصفهان، نجف‌آباد و مبارکه که همگی در نواحی مرکزی کشور ایران قرار دارند در خوشه‌های متفاوتی قرار گرفتند. همچنین نتایج این مطالعه تا حدی مطابقت تنوع جغرافیایی با تنوع مورفولوژیکی را نشان داد (دسته بندی اکوتیپ‌های استان خوزستان در کنار هم

گواه این موضوع است) که ممکن است بیانگر قرابت-های ژنتیکی و خویشاوندی احتمالی موجود بین برخی از توده‌های مورد مطالعه باشد. در مواردی هم بخش‌هایی از دندروگرام عدم مطابقت تنوع جغرافیایی با تنوع ژنتیکی به دست آمده از داده‌های مورفولوژیک، فیتوشیمیایی و فنولوژیک را نشان می‌دهد، به طوری که نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان اصفهان در دسته‌هایی کاملاً متفاوت و دور از هم قرار داشتند و بعکس نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نسبتاً دور از هم بودند، مانند اصفهان و آمل در یک زیرگروه و در کنار هم دسته بندی شده‌اند. نتایج این تحقیق نیز تا حدی نظر گستا و همکاران^۱ (۲۰۰۶) مبنی بر اینکه ویژگی‌های زراعی گیاه خارمریم کمتر تحت تاثیر عوامل زیست محیطی قرار گرفته و سازگاری خوبی برای طیف وسیعی از شرایط محیطی نشان می‌دهد را تأیید می‌کند. همچنین قرار گرفتن برخی از اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های یک استان در گروه و زیرگروه‌های مجزا و همچنین گروه بندی اکوتیپ‌های برخی استان‌ها در مجاورت هم ممکن است ناشی از جابجایی ژرم پلاسم، و یا احتمالاً به خاطر پراکنش وسیع این گیاه در کشور باشد. همینطور عدم تطابق کامل تنوع مورفولوژیکی با تنوع جغرافیایی توده‌های خارمریم می‌تواند به دلیل جابجایی ژرم پلاسم باشد. به عبارت دیگر احتمال مهاجرت^۲ توسط عوامل محیطی مثل باد، پرنده‌گان، آب و... باعث جابجایی یک تیپ از یک محل به محل‌های دیگر شده باشد که پس از استقرار در محیط جدید، بعضی از خصوصیات ژنتیکی خود را حفظ کرده و یا قسمتی از ژرم پلاسم آن در اثر تلاقی در ژرم پلاسم تیپ‌های محل جدید نفوذ^۳ یابد و باعث ایجاد نوترکیبی ژنتیکی و در نهایت تنوع جدید گردد.

1. Gresta *et al.*
2- Migration
3- Introgression



شکل ۱- گروه بندی اکوتیپ‌های خارمریم براساس صفات مورفولوژیک، فنولوژیک و فیتوشیمیایی به روش دورترین همسایه‌ها

است. همچنین تنوع بالایی در بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه خارمریم حتی در مورد اکوتیپ‌های نزدیک به هم از نظر جغرافیایی نیز وجود دارد که با توجه به تکثیر از طریق بذر و دگرگشتی در خارمریم منطقی و مورد انتظار می‌باشد. این تنوع ژنتیکی بالا امکان سازگاری بیشتر گیاه خارمریم به محیط‌های مختلف را فراهم می‌نماید. چنین تنوع بالایی می‌تواند در مدیریت و حفاظت ژرم پلاسماهای اکوتیپ‌های خارمریم مفید باشد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از زحمات پرسنل مزرعه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران شهید چمران اهواز و همچنین اعضای انجمن علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت لازم را مبذول نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد. این تحقیق از حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز بر اساس قرارداد مالی به شماره ۹۰/۳/۰۲/۱۸۶۷۲ برخوردار بوده است.

نتیجه‌گیری

انتخاب نیازمند تنوع است و با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه توانایی انتخاب ژنوتیپ‌های برترافزایش می‌یابد. ارزیابی تنوع در ژرم پلاسماهای گیاهی گامی مهم در برنامه‌های اصلاحی و نیز مدیریت ژرم پلاسما به حساب می‌آید. بنابراین شناسایی و حفظ و نگهداری ذخائر ژنتیکی در گیاهان اهلی شده ضروریست. نتایج این بررسی حاکی از تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌های خارمریم در ایران بود. همین‌طور مشخص شد که برای گیاه خارمریم انتخاب ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا تحت شرایط یکسان آب و هوایی امکان پذیر می‌باشد. در این تحقیق اکوتیپ‌های ساری و مبارکه به عنوان اکوتیپ‌های با عملکرد بالا معرفی گردیدند که از نظر اصلاحی ارزشمند می‌باشند.

گروه‌بندی براساس صفات مورد مطالعه نشان داد که شباهت اکوتیپ‌ها در هر منطقه جغرافیایی از ایران بیش از مناطق دیگر است. که احتمالاً شرایط آب و هوایی ویژه مناطق مختلف کشور تشدید کننده این شباهت‌ها

منابع

۱. ابدالی مشهدی، ع. ۱۳۸۷. بررسی اثر تنظیم کننده رشد (CCC) و سرزنی بر عملکرد کمی و مواد مؤثره گیاه دارویی ماریتیغال. رساله دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۲۶ ص.

حمید و همکاران: ارزیابی تنوع ژنتیکی ده اکوتیپ خارمریم...

۲. حسنلو، ط.، خاوری نژاد، ر.، مجیدی هروان، ا.، ضیایی، س. و شمس اردکانی، م. ۱۳۸۳. مطالعه و تعیین فلاونولیکنانها در میوه‌های گیاه خارمریم جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران به روشهای اسپکتروفتومتری، TLC و HPLC. فصلنامه گیاهان دارویی، ویژه نامه گیاه خارمریم، ۲۵-۳۲.
۳. حقی، ق.، و پیرعلی، م. ۱۳۸۲. شناسایی و تعیین مقدار سیلی مارین در گیاه خارمریم. فصلنامه پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۹(۱): ۷۳-۸۹.
۴. شکرپور، م. محمدی، س. و مقدم، م. ۱۳۸۷. تجزیه ارتباط نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی AFLP گیاه دارویی ماریتغال (*Silybum marianum* L.). فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایرن. ۲۴(۳): ۲۷۸-۲۹۲.
۵. فرشادفر، ع. ۱۳۷۴. کاربرد ژنتیک کمی در اصلاح نباتات. جلد اول. انتشارات طاق بستان دانشگاه رازی. ۵۲۷ ص.
6. Abdi, N., and Maddah-Arefi, H. 2002. Study of variation and seed deterioration of *Bromus tomentollus* germplasm, in natural resources genbank. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 7: 1-25.
7. Azdet, T., Iglesias, J., and Martinez, F. 1993. Flavonolignans in the fruits of *Silybum* genus taxa: A chromatographic and mass spectrometric survey. Plants Medicinales. 26 :117- 129.
8. Bert, P.F., Jouan, I., Tourvieille de Labrouhe, D., Serre, F., Philippon, J., Nicolas, P., and Vear, F. 2003. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.). 2. Characterization of QTL involved in developmental and agronomic traits. Theoretical and Applied Genetics. 107:181-189.
9. Blumenthal, M., Ferrier, G.K.L., and Cavaliere, C. (2006). Total sales of herbal supplements in United States show steady growth. Herbal Gram, 71:64-66.
10. Deep, G., Singh, R.P., Agarwal, C., Kroll, D.J., and Agarwal, R. 2006. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. Oncogene Journal, 25: 1053-1069.
11. Gresta, F., Avola, G., and Guarnaccia, P. 2006. Agronomic characterization of some spontaneous genotypes of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) in Mediteranean environment. Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants, 12: 51-60.
12. Hung, D., Ou, B., and Prior., RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:1841-1856.
13. Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., and Nacoulma, O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry, 91: 571-577.
14. Ottay, M.N.S., and Abdel-Moniem, A.S.H. 2006. Genetic parameter variations among Milk thistle, *Silybum marianum* varieties and varietal sensitivity to infestation

- with seed-head Weevil, *Larinus latus* herbst. International Journal of Agriculture and Biology, 8: 862-866.
15. Ram, G., Bhan, M.K., Gupta, K.K., Thaker, B., Jamwal, U., and Pal, S., 2005. Variability pattern and correlation studies in *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Fitoterapia, 76: 143-147.
 16. Schneiter, A.A., and Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. Crop Science. 21: 901-903.
 17. Shokrpour, M., Torabi Gigloo, M., Asghari1, A., and Bahrapour. S. 2011. Study of some agronomic attributes in milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) ecotypes from Iran. Journal of Medicinal Plants Research, 5(11): 2169-2174.
 18. Shokrpour, M., Mohammadi, S.A., Moghaddam, M., Ziai, S.A., and Javanshir, A. 2007. Genetic properties of Milk thistle ecotype from Iran for morphological and flavonolignans characters. Pakistanian Journal of Biological Science, 19:3266-3271.
 19. Shokrpour, M., Mohammadi, S.A., Moghaddam, M., Ziai, S.A., and Javanshir, A. 2008. Variation in flavonolignan concentration of milk thistle (*Silybum marianum*) fruits grown in Iran. Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants, 13(4): 55-69.
 20. Singleton, V.L., Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture, 16(1): 144-153.