بررسی تنوع کاریوتیپی گونه‌های جنس *Thymus* از نقاط مختلف ایران

ولی اله یوسفی[۱]، عبدالله نجفی[۲]، علیرضا زبرجدی[۳،*] و هوشمند صفری[٤]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه رازی و دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و اصلاح‌نباتات، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

٤- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۸)

چکیده

آویشن (*Thymus*)، یک گیاه دارویی معطر، گیاهی شناخته شده، چندساله و خشبی از تیره لامیاسه است. جنس *Thymus* به‌دلیل فراوانی بالای هیبریداسیون و اینتروگرسیون بین گونه‌های هم‌ناحیه، از لحاظ رده‌بندی بسیار پیچیده است و برخی از گونه‌های این گیاه دارویی بومی ایران هستند. در مطالعه حاضر، هفت اکوتیپ *Thymus* جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران به همراه گونه زراعی لندن با استفاده از مشخصات کاریوتیپی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی در این گیاه دارویی مورد مطالعه قرار گرفتند. تعداد پایه ثانویه در پنج اکوتیپ x = ۱۵ و در سه اکوتیپ دیگر x = ۳۰ بود که احتمالاً از یک تعداد پایه اولیه x = ۷ نشأت گرفته‌اند. سطوح پلوئیدی این اکوتیپ‌ها شامل دیپلوئید و تتراپلوئید بود. اکوتیپ‌های مورد مطالعه *Thymus* در طبقه‌بندی Stebbins رده ۱A و ۱B را اشغال کردند که این مطلب دلالت بر وجود تقارن کاریوتیپی ابتدایی در این اکوتیپ‌ها می‌باشد. میانگین طول کروموزوم از ۱/۰۳ تا ۱/۵۲ میکرون متغیر بود. تمام کروموزوم‌ها از نوع متاسانتریک (m) بودند. همچنین تجزیه خوشه‌ای با استفاده از پارامترهای کروموزومی و بر اساس UPGMA، اکوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد.

واژگان کلیدی: آویشن، سیتوژنتیک، تنوع ژنتیکی، گیاه دارویی، کروموزوم

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: **zebarjadi@razi.ac.ir**

مقدمه

جنس آویشن *Thymus sp.* در سال ۱۷۳۵ میلادی توسط لینه مورد شناسایی و طبقه‌بندی قرار گرفت که شامل گروه بزرگی از گیاهان دارویی است (Elena-roselo, 1981). در سطح دنیا، حدود ۳۵۰ گونه *Thymus* وجود دارد که در آسیا و اروپای میانه گسترش دارند. از این تعداد، بیش از ٦۰ گونه، بومی اروپا بوده که اسپانیا و ترکیه با حداکثر تنوع، مهم‌ترین صادرکنندگان آویشن به‌شکل وحشی می‌باشند. تعداد گونه‌های گزارش‌شده جنس *Thymus* در ایران ۱۷ گونه است که ١٤ گونه آن محدود به ایران است و بیش‌ترین پراکنش را در شمال و غرب کشور دارند و تعداد آن‌ها به‌طرف جنوب و شرق کشور کاهش می‌یابد (Jamzad, 1994). آویشن گیاهی خشبی و چندساله از تیره Lamiaceae با نام علمی *Thymus vulgaris* می‌باشد. همچنین گیاهی آفتاب دوست، مقاوم به خشکی و معطر است که تقریباً در همه جای جهان کاربرد دارویی دارد (Stahl-Biskup, 2002).

آویشن از گیاهان مهم تجاری است که در برخی از کشورها نظیر مجارستان ارزش اقتصادی بالایی دارد و به‌دلیل وجود مواد مؤثره زیاد در صنایع آرایشی و بهداشتی، به لحاظ دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی در صنایع غذایی و خصوصاً در صنعت داروسازی مدرن، به لحاظ دارا بودن اثرات آرام‌بخش، رفع التهابات حنجره، برونشیت، آسم، عفونت‌های مزمن روده‌ای، عفونت‌های قارچی، روماتیسم، تقویت معده و قوای جسمانی و چندین اثر مفید دیگر بسیار مؤثر و کارا واقع شده است (Omidbaigi, 2000; Brown, 2002). در طب گیاهی قدیم آلمان، از چای حاوی مقدار ۱ تا ۲ گرم از آویشن خشک‌شده (که حداقل ۰/۵ درصد از فنل، ماده تیمول باشد) برای برطرف کردن علائم برونشیت، سیاه‌سرفه و التهابات غشای مخاطی ترشحی از بخش فوقانی دستگاه تنفسی استفاده می‌شد (Leung and Foster, 1996). هم اکنون در ایران، فرآورده‌های دارویی مختلفی از آویشن ساخته شده و به‌طور گسترده مورد مصرف بیماران قرار می‌گیرد. از آن جمله می‌توان قطره تیم‌آرتا، قرص و شربت تیمکس و شربت تیمیان را نام برد که این سه فرآورده به‌عنوان ضد سرفه و خلط‌آور به‌کار می‌روند (Jahanara and Haerizadeh, 2001). آویشن محتوی ۰/۸ تا ۲/٦ درصد (معمولاً ۱ درصد) اسانس است که قسمت اعظم آن را فنل‌ها (۲۰ تا ۸۰ درصد)، هیدروکربن‌های مونوترپنی (مثل پی–سیمنووای – ترپینن) و الکل‌ها (مثل لینالول، آ–ترپینن و ٤–توجانول) تشکیل می‌دهد که گاهی هر کدام از این ترکیبات تا ۸۰ درصد (یا بیشتر) از ترکیبات اسانس را شامل می‌شوند. به‌طور طبیعی تیمول جزء اصلی فنلی در آویشن بوده و کارواکرول نیز یک جزء فرعی است (Leung and Foster, 1996).

از نظر رده‌بندی، جنس آویشن بسیار پیچیده بوده و طبقه‌بندی آن مشکل است. این موضوع به‌دلیل فراوانی گونه‌ها و عدم ناسازگاری ژنتیکی بین این گونه‌هاست (Huxley, 1992; Horwath *et al.*, 2008). تلاقی‌های بین گونه‌ای و اینتروگرسیون موفق در جنس آویشن، مهم‌ترین عامل تنوع گونه‌ای در این جنس است. نتایج دورگ‌گیری، اغلب از نظر خصوصیات ظاهری و ژنتیکی حالت بینابینی داشته و یا حالت چندگانه‌ای را بروز می‌دهند. این گونه‌ها از نظر خصوصیات ژنتیکی بسیار شبیه به هم بوده و خصوصیات ظاهری مشابهی را نشان می‌دهند (Horwath *et al.*, 2008). مطالعات سیتوژنتیکی در گیاهان، به‌عنوان ابزار ارزشمندی برای شناسایی مواد ژنتیکی در جهت ایجاد تلاقی‌های بارور و طبیعی به‌کار می‌رود. در حدود ۳۰ تا ۸۰ درصد گیاهان عالی پلی‌پلوئید بوده و این خصوصیت مهم‌ترین عامل ایجادکننده گونه‌ها و تکامل گیاهان است (Lopez-Pujol *et al.*, 2004). در بیان اهمیت مطالعات کاریوتیپی یادآوری این نکته لازم است که مورفولوژی کروموزوم می‌تواند به‌عنوان یکی از مفیدترین معیارها جهت بررسی روابط تاکسونومیکی مورد استفاده قرار گیرد (Stebbins, 1971). آنالیزهای سیتوژنتیکی در جنس تیموس به‌دلیل اندازه بسیار کوچک

کروموزوم‌ها و مطالعات توارثی به‌دلیل میزان پایین جوانه‌زنی با مشکلاتی همراه است (Lopez-Pujol *et al.*, 2004). کروموزوم‌های جنس *Thymus* خیلی کوچک بوده و در زیر میکروسکوپ نوری با ۲-۱ میکرون طول مثل یکسری نقاط به‌نظر می‌رسند. تعداد کروموزوم‌ها در این جنس از ۲n = ۲٤ تا ۲n = ۹۰ متغیر بوده و سطح پلوئیدی نیز شامل دیپلوئیدی، تتراپلوئیدی و هگزاپلوئیدی می‌باشد. تعداد پایه کروموزوم‌ها x = ۱٤ و x = ۱۵ احتمالاً از تعداد پایه x = ۷ نشأت گرفته‌اند (Stahl-Biskup, 2002). گونه‌های تتراپلوئید با ۲n = ٥٦ و ۲n = ٥۸ کروموزوم احتمالاً از دو برابر شدن ژنوم گونه‌های دیپلوئید (n = ۲۸ ۲) و هیبریداسیون دو گونه با گامت‌هائی با n = ۱٤ و n ۱۵ = کروموزوم و سپس دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های هیبرید مورد نظر به‌وجود آمده‌اند (Lopez-Pujol *et al.*, 2004). در همین راستا در مطالعه النا-روسلو (Elena-roselo, 1981) تعداد کروموزوم‌های گونه *T. vulgaris* (۲n = ۳۰) گونه *T. zygis* (۲n = ۲۸) و گونه *T.aestivus* (بیشتر از ٦۰ عدد) گزارش شده است.

اصلاح موفق بر پایه انتخاب دقیق از درون جوامع متنوع گیاهی بوده و تنوع ژنتیکی به‌عنوان مهم‌ترین عامل در انتخاب یک فرد، از اهمیت فراوانی برخوردار است. مطالعات اندکی بر روی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی صورت گرفته است. مصرف روزافزون این گروه از گیاهان به‌صورت وحشی از رویشگاه‌های طبیعی، سبب کاهش ذخیره ژنتیکی (ژرم‌پلاسم) آن‌ها شده به‌طوری که در حال حاضر بین ٤۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ گونه از گیاهان دارویی در خطر انقراض قرار دارند (Khanuja*et al.*, 2000; Canter *et al.*, 2005; Sarvat *et al.*, 2008). یکی از روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از فنون سیتولوژیکی می‌باشد که منجربه شناسایی افراد مناسب در یک جامعه گیاهی متنوع می‌گردد. برای گسترش تنوع ژنتیکی در خزانه ژنی گیاهان دارویی و معطر می‌توان جمعیت‌هایی را که در گروه‌های دورتر قرار دارند با هم تلاقی داد (Ahmadabadi *et al.*, 2005). با توجه به مطالب ارائه شده تحقیق حاضر به‌منظور مطالعه تنوع سیتوژنتیکی گونه‌های مختلف آویشن گردآوری شده از نقاط مختلف کشور اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۸ اکوتیپ آویشن از نظر ویژگی‌های کاریوتیپی انجام گردید. از بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه ۷ نمونه از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع دریافت و ۱ نمونه دیگر از مرتع جمع‌آوری شد (جدول ۱). آزمایش در قالب تجزیه واریانس یک‌طرفه با پنج تکرار انجام شد، یعنی برای هر اکوتیپ پنج سلول متافازی مناسب انتخاب شده و آنالیزهای آماری بر روی کروموزوم‌های این پنج سلول انجام شد. بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی شده و تحت شرایط سترون، داخل پتری‌دیش و روی کاغذ صافی کشت شدند. پس از جوانه‌زنی، زمانی که طول ریشه‌چه به اندازه مناسب (۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر) جهت نمونه‌گیری رسید، عمل نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف و در فواصل زمانی معین انجام شد تا بهترین زمان نمونه‌گیری، (زمانی که قسمت بیشتر سلول‌ها در مرحله متافاز هستند) به‌دست آمد. پس از قطع ریشه‌چه، به‌ترتیب عمل پیش‌تیمار (با استفاده از محلول ٤ درصد آلفا برومونفتالین اشباع در آب، در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه)، عمل تثبیت (با استفاده از محلول لویتسکی[1] در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱٦ ساعت)، عمل هیدرولیز (در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه با استفاده از محلول ۱ نرمال NaOH) و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها (با استفاده از رنگ هماتوکسیلین به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق) انجام شد و پس از تهیه اسلاید از منطقه مریستمی نوک ریشه،

1. Levitsky

جدول ۱- مشخصات اکوتیپ‌های مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Characteristics of ecotypes used in this experiment

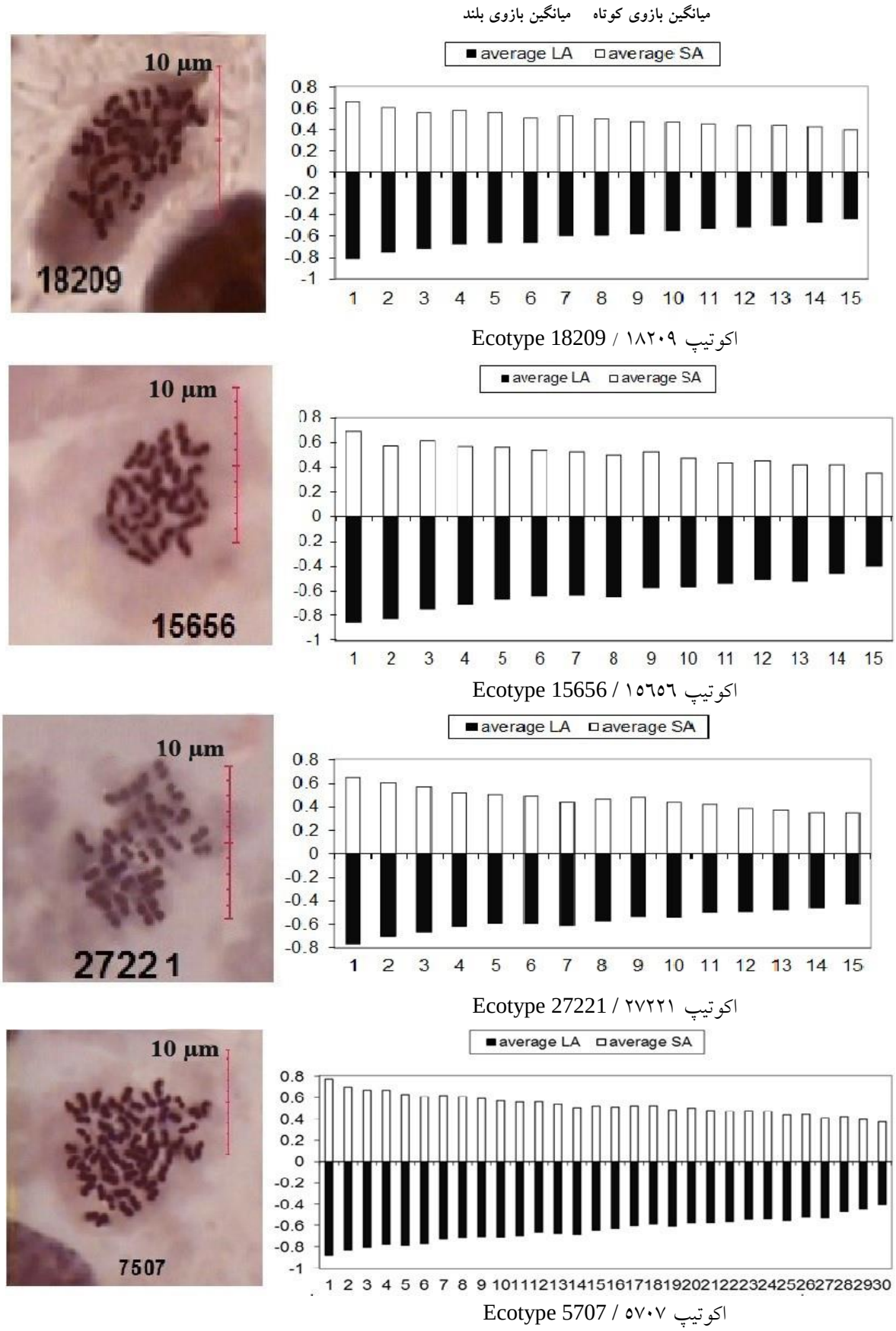
ردیف Row	کد اکوتیپ Ecotype code	نام علمی اکوتیپ Ecotype name	Collection site	محل جمع‌آوری
1	18209	*Thymus daenensis*	Isfahan- Daran-Bouein	بوئین-داران-اصفهان
2	15656	*Thymus sp.*	Markazi-Arak	شمال شهرک مهاجران-مرکزی
3	27221	*Thymus daenensis*	Isfahan-Chadegan	چادگان-اصفهان
4	7507	*Thymus sp.*	Lorestan-Khorramabad-Zaghehd	زاغه-خرم آباد-لرستان
5	14245	*Thymus sp.*	Lorestan-Khorramabad	خرم آباد-لرستان
6	10126	*Thymus daenensis*	Isfahan-Fereydoonshahr	فریدون شهر-اصفهان
7	-	*Thymus sp.*	Ardebil-Parchin	اردبیل-روستای پارچین
8	14287	*Thymus vulgaris*	UK-London	لندن-انگلیس

تصاویر کروموزوم‌ها با استفاده از سیستم آنالیز تصویری و با بزرگنمایی ۲۷۷۵ تهیه گردید. حداقل پنج سلول متافازی مناسب به‌عنوان تکرار جهت اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک کروموزوم‌ها انتخاب شد و پس از تهیه کاریوتیپ با استفاده از نرم‌افزار Micromeasure 3.3 صفت‌های طول کل کروموزوم (TL[1])، طول بازوی بلند (LA[2])، طول بازوی کوتاه (SA[3])، نسبت بازوها (Arm Ratio = L/S) و شاخص سانترومری که بیانگر نسبت بازوی کوتاه به طول کل کروموزوم است محاسبه گردید. در این بررسی برای تعیین وضعیت تکاملی و مطالعه تقارن کاریوتیپی اکوتیپ‌های مورد مطالعه از جدول دوطرفه Stebbins استفاده شد (Stebbins, 1971) و عامل‌های اختلاف درصد طول نسبی بزرگ‌ترین و کوچک‌ترین کروموزوم (DRL[4])، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A2) (Romero-Zarco, 1986) و درصد شکل کلی (TF %[5]) (Huziwara, 1962) محاسبه گردید. برای تعیین نوع کروموزوم‌ها نیز از روش Levan استفاده شد (Levan *et al.*, 1964). به‌منظور تجزیه آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات کروموزومی، تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS[6] انجام شد. مقایسه میانگین نیز به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن با همین نرم‌افزار صورت گرفت. همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA[7]) برای تشخیص سهم هر یک (UPGMA[8]) از صفات در میزان تنوع موجود بین جمعیت‌ها و برای گروه‌بندی آن‌ها تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای NTYSIS و MINITAB انجام شد.

نتایج و بحث

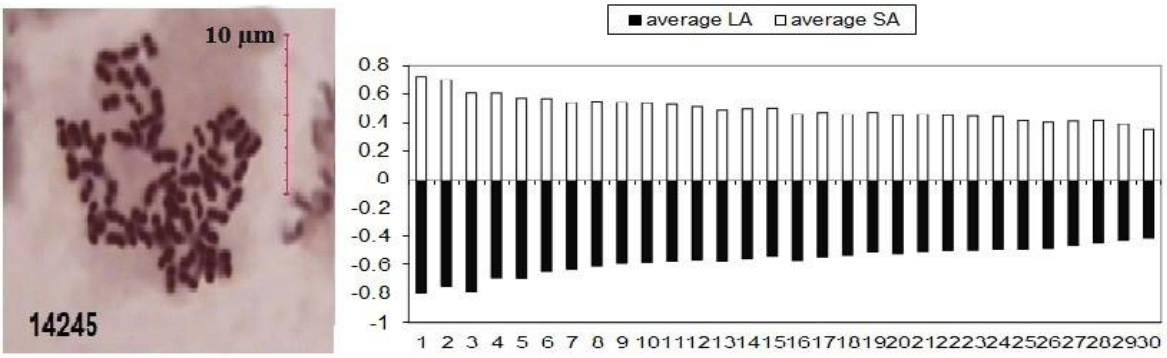
نتایج مطالعه حاضر به‌صورت سیتوتایپ و ایدیوگرام در شکل ۱ ارائه شده و در جدول ۲ سطح پلوئیدی، تعداد کروموزوم، فرمول کاریوتیپی، موقعیت در جدول Stebbins و عامل‌های تقارن کاریوتیپی نشان داده شده است. بنا بر یافته‌های این پژوهش، پنج اکوتیپ دیپلوئید با تعداد کروموزوم پایه x = ۱۵ و فرمول کاریوتیپی ۱۵m بودند (اکوتیپ‌های ۱، ۳ و ۸ در موقعیت ۱A و اکوتیپ‌های ۲ و ٦ در موقعیت ۱B در جدول Stebbins) و سه اکوتیپ تتراپلوئید با تعداد کروموزوم پایه x = ۳۰ و فرمول کاریوتیپی ۳۰ m بودند (اکوتیپ‌های ۵ و ۷ در موقعیت ۱A و اکوتیپ ٤ در موقعیت ۱B در جدول Stebbins).

1. Total Length of Chromosome
2. Long Arm
3. Short Arm
4. Difference of Range of Relative Length
5. Total Form Percentage
6. Statistical Package for the Social Sciences
7. Principal Components Analysis
8. Un-weighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

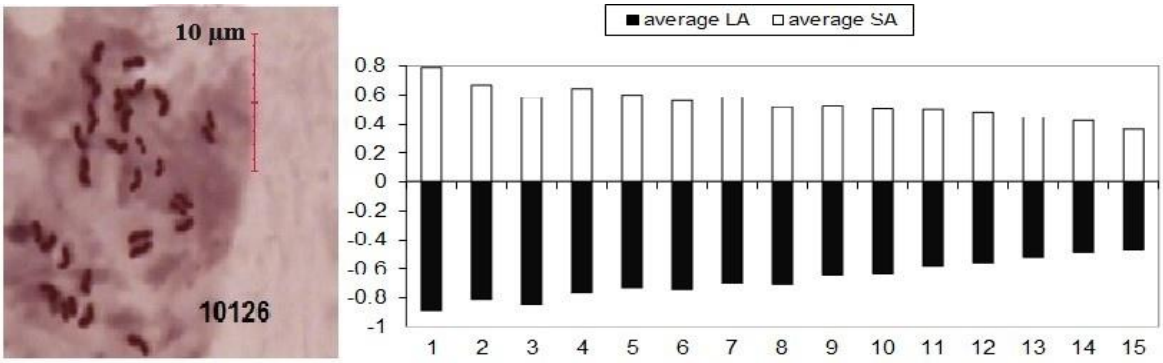


شکل ۱- سلول‌های متافازی، سیتوتایپ و ایدیوگرام در سه تا از اکوتیپ‌های مورد بررسی

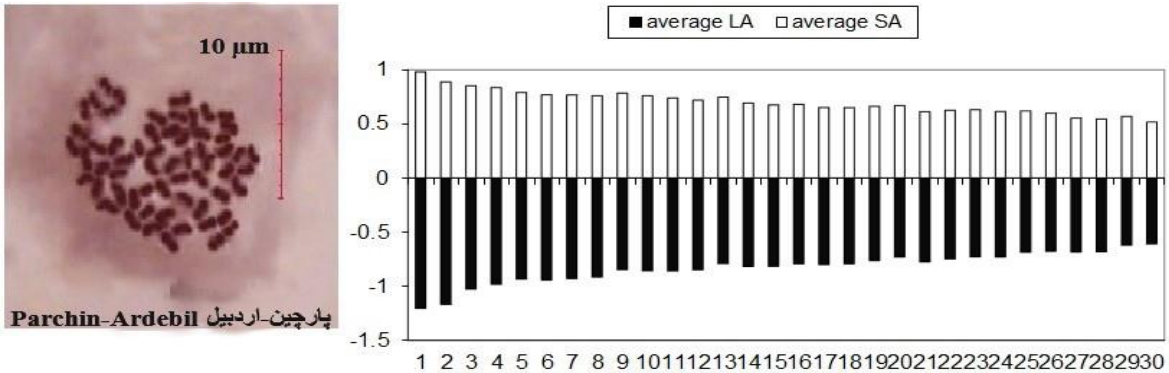
Figure 1. Metaphase cells, cytotype and ideogram in 3 of studied ecotypes



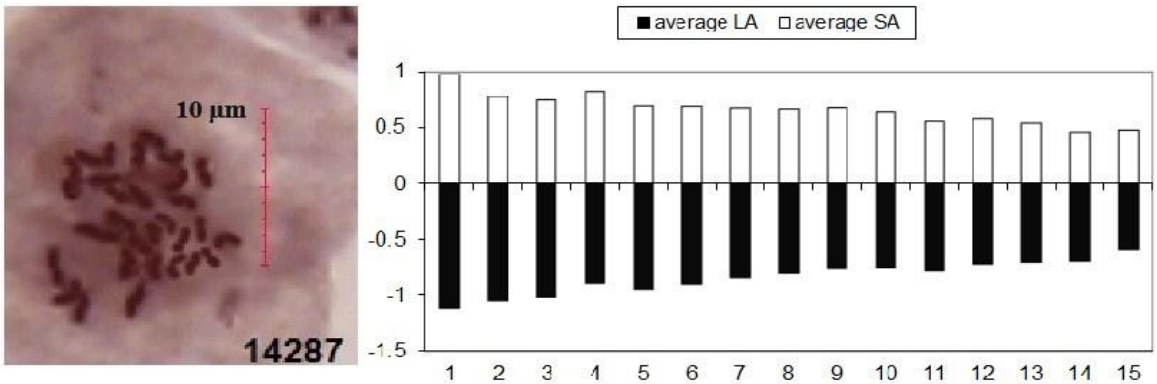
اکوتیپ ١٤٢٤٥ / Ecotype 14245



اکوتیپ ١٠١٢٦ / Ecotype 10126



اکوتیپ روستای پارچین-اردبیل / Ecotype Parchin-Ardebil



اکوتیپ ١٤٢٨٧ / Ecotype 14287

ادامه شکل ١

Figure 1 Continued

چون کاریوتیپ‌های نامتقارن‌تر متکامل‌تر هستند، لذا مقایسه تقارن اکوتیپ‌ها ضروری است. بررسی سنجش تقارن کاریوتیپ توده‌های مورد آزمون به لحاظ مؤلفه درصد شکل کلی (TF %) نشان داد که کمترین میران TF % مربوط به اکوتیپ شماره ۸ با ٤٤/١٨٢ درصد (نامتقارن‌ترین) و بیش‌ترین آن مربوط به اکوتیپ شماره ۵ با ٤٦/٨١٩ (متقارن‌ترین) می‌باشد و لذا تفکیک اکوتیپ‌ها از نظر این فاکتور چندان محسوس نمی‌باشد (جدول ۲). همچنین شاخص A1، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی، نیز این مطلب را تصدیق می‌کند زیرا بیش‌ترین مقدار A1 مربوط به اکوتیپ شماره ۸ با ۰/۲۰۹ (نامتقارن‌ترین) و کمترین مقدار مربوط به اکوتیپ شماره ۵ با ۰/۱۱۸ (متقارن‌ترین) می‌باشد؛ اما از نظر شاخص A2، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی، نامتقارن‌ترین اکوتیپ، شماره ٦ با ۰/۱۹۰ و متقارن‌ترین اکوتیپ‌ها، شماره ۷ با ۰/۱٦۲ و شماره ۱ با ۰/۱٦۳ می‌باشند. پارامتر DRL دارای رابطه مستقیم با شاخص A2 بوده و از لحاظ این پارامتر نیز اکوتیپ شماره ٦ نامتقارن‌ترین و اکوتیپ شماره ۷ متقارن‌ترین هستند. با توجه به اینکه شرط لازم برای انجام تجزیه و تحلیل‌های پیشرفته نظیر تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و غیره، رویدادهای حاصل از مطالعات سیتوژنتیکی، وجود اختلاف معنی‌دار بین اکوتیپ‌ها از لحاظ ویژگی‌های مورد اندازه‌گیری است، بنابراین جهت تعیین وجود یا عدم وجود تفاوت بین اکوتیپ‌ها از تجزیه واریانس استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس صفات کروموزومی اختلاف معنی‌دار بین اکوتیپ‌ها برای تمام صفات مورد مطالعه در سطح ۱ درصد را نشان داد (جدول ۳) لذا می‌توان بیان کرد تنوع زیادی بین ژرم‌پلاسم‌های مورد بررسی از نظر صفات مورد مطالعه وجود داشت. بر اساس نتایج مقایسه میانگین از نظر طول کل کروموزوم اکوتیپ‌های ۱ تا ٦ در یک گروه و اکوتیپ‌های ۷ و ۸ در گروه دیگر جای گرفتند. همچنین اکوتیپ‌های ۷ و ۸ بیشترین طول بازوی بلند و کوتاه را داشتند و در گروه یکسانی قرار گرفتند. اکوتیپ شماره ۵ بیشترین شاخص سانترومری و اکوتیپ شماره ۸ بیشترین نسبت بازوها را داشتند (جدول ٤). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌های مورد بررسی از نظر خصوصیات کروموزومی شامل طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت بازوها (بازوی بلند به کوتاه) و شاخص سانترومری در دو گروه دیپلوئیدها و تتراپلوئیدها قرار گرفتند (شکل ۲). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز تائید کننده نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای می‌باشد چون اکوتیپ‌های ٤، ۵ و ۷ که تتراپلوئید هستند در یک سمت و سایر اکوتیپ‌ها که دیپلوئید هستند در سمت دیگر قرار گرفته‌اند (شکل ۳). برای تعیین سهم نسبی هر یک از صفات کاریوتیپی مورد مطالعه، در تنوع بین اکوتیپ‌ها و گونه‌های مورد بررسی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه، درصد توجیه واریانس کل و درصد واریانس تجمعی برای هریک از دو مؤلفه اصلی اول در جدول ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این دو مؤلفه که به‌ترتیب ۵۵/۹ و ۳۵/٤ درصد از کل واریانس بین اکوتیپ‌ها و در مجموع ۹۱/۳ درصد از تنوع موجود بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه را توجیه کردند (شکل ۳).

وجود اختلاف معنی‌دار در تمام صفات کروموزومی نشانگر تنوع ژنتیکی بالا در بین اکوتیپ‌ها از نظر صفات کاریوتیپی می‌باشد. جوادی و همکاران (Javadi *et al.*, 2009) نیز با مطالعه تنوع کاریوتیپی سه گونه از آویشن گزارش کردند که تعداد کروموزوم پایه برای اکوتیپ‌های دیپلوئید x = ۱۵ و برای اکوتیپ‌های تتراپلوئید x = ۳۰ بوده و در تجزیه واریانس، غیر از صفات CI و AR بقیه صفات در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بودند. مطالعه مهرپور و همکاران (Mehrpur *et al.*, 2001) بر روی *Thymus kotschyanus* نیز بیانگر تعداد کروموزوم پایه برای اکوتیپ‌های

جدول ۲- خصوصیات کاریوتیپی و پارامترهای تقارن (تکامل) کاریوتیپی اکوتیپ‌های مورد مطالعه

Table 2. Characteristics of karyotypes and karyotype asymmetry parameters *in* studied ecotypes

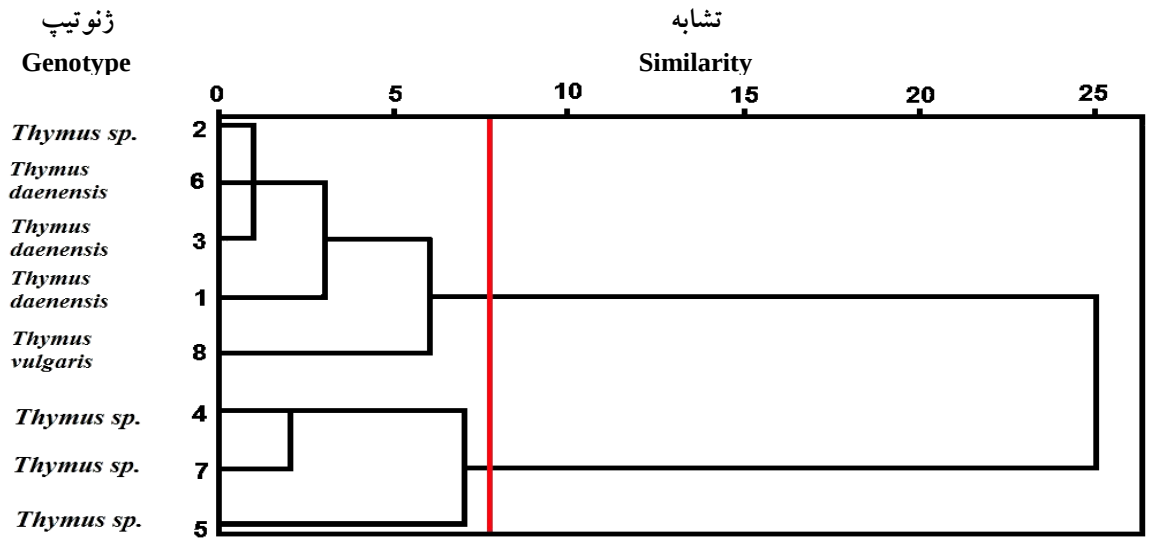
نمونه Sample	سطح پلوئیدی	Ploidy level	تعداد کروموزوم Chromosome No.	فرمول کاریوتیپی Karyotype formula	موقعیت در جدول Stebbins Position in Stebbins table	VRC[1]	DRL	TF %	A1	A2
1	دیپلوئید	Diploid	2n = 2x = 30	15 m	1A	1.104	3.831	45.470	0.161	0.164
2	دیپلوئید	Diploid	2n = 2x = 30	15 m	1B	1.123	4.671	45.316	0.164	0.189
3	دیپلوئید	Diploid	2n = 2x = 30	15 m	1A	1.034	4.124	44.905	0.188	0.177
4	تتراپلوئید	Tetraploid	2n = 4x = 60	30 m	1B	1.169	2.491	45.435	0.165	0.180
5	تتراپلوئید	Tetraploid	2n = 4x = 60	30 m	1A	1.060	2.361	46.819	0.118	0.172
6	دیپلوئید	Diploid	2n = 2x = 30	15 m	1B	1.218	4.634	44.869	0.184	0.190
7	تتراپلوئید	Tetraploid	2n = 4x = 60	30 m	1A	1.524	2.315	45.876	0.149	0.163
8	دیپلوئید	Diploid	2n = 2x = 30	15 m	1A	1.506	4.520	44.182	0.209	0.183

جدول ۳- نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی

Table 3. The results of analysis of variance in karyotypic traits

منبع تغییرات	SOV	درجه آزادی DF	میانگین مربعات (MS) TL	LA	SA	CI	AR
اکوتیپ	Ecotype	7	0.206 **	0.069 **	0.037 **	0.000131 **	0.010 **
خطا	Error	32	0.017	0.005	0.004	0.0000982	0.003
ضریب تغییرات (٪)	CV (%)	–	10.66	10.55	11.44	2.09	4.47

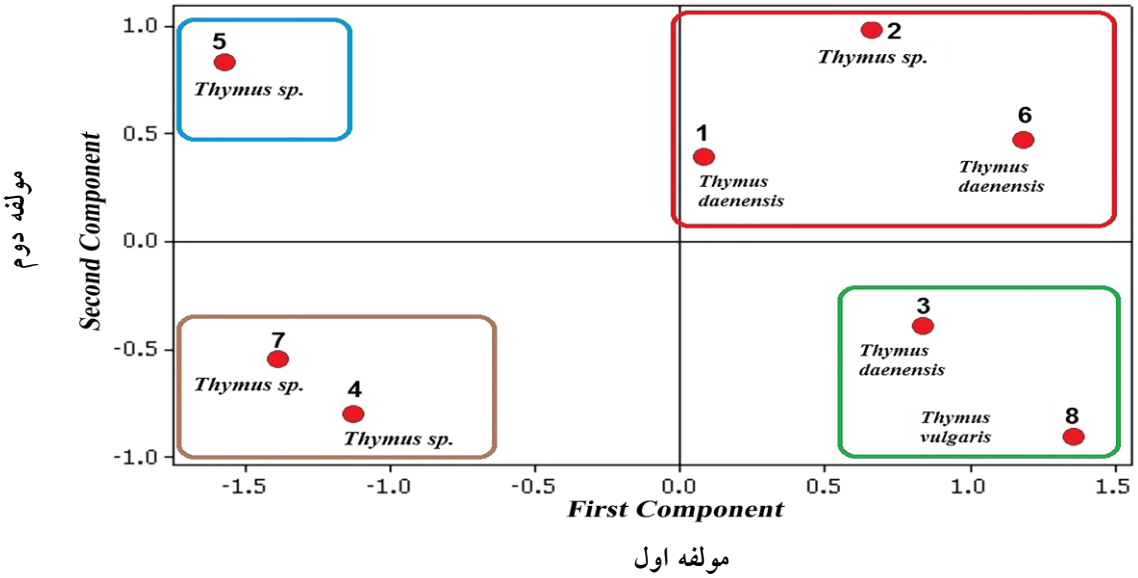
** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد. ** Significant at 1% of probability levels.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، بر اساس ۵ صفت کاریوتیپی

Figure 2. Dendrogram based on UPGMA method of cluster analysis for 5 karyotypic traits

1. Relative Value of Chromatin



شکل ۳- نمودار پراکنش اکوتیپ‌ها بر اساس دو مؤلفه اصلی اول

Figure 3. Scatter plot of ecotypes based on two components

جدول ٤- مقایسه میانگین برای صفات کاریوتیپی به روش دانکن در سطح ۱ درصد احتمال

Table 4. Mean comparison for karyotypic traits based on Duncan method at 1% of probability level

نمونه (Sample)	TL	LA	SA	CI	AR
1	.10 a	1.601 bc	0.501 b	0.456 ab	1.20 bc
2	.12 a	0.641 bc	0.508 b	0.454 b	1.21 bc
3	.03 a	0.569 c	0.464 b	0.448 bc	1.24 ab
4	.16 a	0.637 bc	0.531 b	0.454 b	1.21 b
5	.06 a	0.563 c	0.496 b	0.468 a	1.16 c
6	.21 a	0.671 b	0.546 b	0.447 bc	1.25 ab
7	.52 b	0.862 a	0.705 a	0.451 bc	1.22 ab
8	.50 b	0.840 a	0.665 a	0.439 c	1.29 a

جدول ٥- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس صفات کاریوتیپی

Table 5. The result of principal component based on 5 karyotypic traits

صفات (Traits)	مؤلفه اصلی اول (PC1)	مؤلفه اصلی دوم (PC2)
TL	0.293	-0.380
LA	0.320	-0.347
SA	0.256	-0.417
CI	-0.375	-0.203
AR	0.389	0.179
VRC	0.293	-0.380
DRL	0.239	0.356
TF	-0.381	-0.210
A1	0.377	0.192
A2	0.156	0.368
مقادیر ویژه (Eigenvalues)	5.580	3.540
درصد واریانس(% of variance)	55.900	35.400
درصد واریانس تجمعی (Cumulative %)	55.900	91.300

دیپلوئید ۱۵ = x و برای اکوتیپ‌های تتراپلوئید ۳۰ = x بود. نتایج صفری و همکاران (Safari *et al*., 2008) بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در صفات کاریوتیپی سه گونه از جنس تلخ‌بیان بود. مهدوی و همکاران (Mahdavi *et al*., 2009) نیز با مطالعه تنوع کاریوتیپی آویشن گزارش کردند نمونه‌های مورد بررسی برای صفات طول بازوی کوتاه، طول کل کروموزوم و حجم کروموزوم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد.

مقادیر بردارهای ویژه در مؤلفه اول نشان داد که صفات نسبت بازوها، شاخص سانترومری، شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی و درصد شکل کلی کروموزوم بیش‌ترین نقش را در تشکیل این مؤلفه داشته‌اند. همچنین در مؤلفه دوم صفاتی نظیر طول بازوی کوتاه، طول بازوی بلند، طول کل کروموزوم، مقدار نسبی کروماتین (VRC)، اختلاف طول نسبی (DRL) و شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی بیش‌ترین سهم را در تبیین تغییرات بین اکوتیپ‌ها داشته‌اند (جدول ۵). جوادی و همکاران (Javadi *et al*., 2009) با استفاده از نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی گزارش کردند دو مؤلفه اصلی اول ۹٤/٦٥ درصد واریانس کل را توجیه کردند. طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه و مقدار نسبی کروماتین (VRC) بیش‌ترین نقش را در تشکیل مؤلفه اصلی اول داشتند در حالی که صفات LA %، SA % و DRL بیش‌ترین نقش را در تشکیل مؤلفه اصلی دوم داشتند.

طبق دندروگرام، اکوتیپ‌های شماره ۲، ٦، ۳ و ۱ در یک گروه قرار گرفتند که این امر بیانگر اختلاف معنی‌دار این اکوتیپ‌ها با سایر اکوتیپ‌ها است. همچنین اکوتیپ شماره ۸ به‌تنهایی در یک گروه، اکوتیپ‌های شماره ٤ و ۷ در گروه بعدی و اکوتیپ شماره ۵ به‌تنهایی در گروه آخر قرار گرفتند. از طرف دیگر، نمونه‌های دیپلوئید در گروه‌های اول و دوم و نمونه‌های تتراپلوئید در گروه‌های سوم و چهارم جای گرفتند. اکوتیپ‌های شماره ۱، ٦ و ۳ (*T. daenensis*) از استان اصفهان و اکوتیپ شماره ۲ از استان مرکزی می‌باشد که در یک گروه جای گرفته‌اند. اکوتیپ شماره ۸ (*T. vulgaris*) از لندن در یک گروه جداگانه قرار گرفته است. نمودار پراکنش مبتنی بر مؤلفه‌های اصلی نیز گروه‌بندی مشابهی انجام داده و نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند. طبق نتایج جوادی و همکاران (Javadi *et al*., 2009) سه نمونه دیپلوئید گونه *Thymus daenensis* با هم در یک گروه قرار گرفتند و نمونه تتراپلوئید گونه *Thymus daenensis* از بقیه جمعیت‌ها فاصله گرفت. نمونه تتراپلوئید گونه *Thymus kotschyanus* و نمونه دیپلوئید گونه *Thymus daenensis* در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع به‌دلیل اهدای بذرهای آویشن تشکر و قـدردانی مـی‌گردد.

References

Ahmadabadi, M., Ahmadian, P., Omidi, M. and Davoodi, D. (2005). Intraspecific karyotype diversity of *Aegilops triuncialis* in the northwest region of Iran. *Iranian Journal of Agriculture Science*, **36(4):** 969-977 (In Persian).

Brown, R.G. (2002). *Dictionary of medical plants*, Sarup and Sons Publishers, New Delhi, IN.

Canter, P.H., Thomas, H. and Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: Opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **23(4):** 180-185.

Elena-Roselo, J.A. (1981). Cytotaxonomic and evolutionary studies in *Thymus* (Labiatae): relationships of the members of section *Thymus Jalas*. *Anales Jardin Botanico De Madrid*, **38(1):** 51-59.

Horwath, A.B., Grayer, R.J., Keith-Lucas, D.M. and Simmonds, M.S.J. (2008). Chemical characterization of wild population of *Thymus* from different climatic regions in southeast Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36:**117-133.

Huxley, A. (1992).*The new RHS Dictionary of Gardening*, Macmillan Press, London, UK.

Huziwara, Y. (1962). Karyotype analysis in some genera of Composite. VIII. Further studies on the chromosome of aster. *American Journal of Botany*, **49:** 116-119.

Jahanara, F. and Haerizadeh, V. (2001). *Information and application of Iran formal herbal medicines*, Darougostar Razi Company, Tehran, IRI (In Persian).

Jamzad, Z. (1994). *Thyme*, Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran, IRI (In Persian).

Javadi, H., Hesamzadeh-Hejazi, S.M. and Babayev, M.S. (2009). Karyotypic Studies of three *Thymus* (Lamiaceae) species and populations in Iran. *Caryologia*, **62(4):** 316-325.

Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Srivastava, A. and Kumar, S. (2000). Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. *Euphytica*, **111:** 121-125.

Leung, A.Y. and Foster, S. (1996). *Encyclopedia of common natural ingredients: used in food, drugs, and cosmetics*, Wiley Interscience Publication–John Wiley & Sons Inc, New York, USA.

Levan, A., Fedga, K. and Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, **52:** 201-220.

Lopez-Pujol, J., Bosch, M., Simon, J. and Blanche, C. (2004). Allozyme diversity in the tetraploid endemic *Thymus loscosii* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, **93:** 323-332.

Mahdavi, S., Karimzadeh, G. and Maddah-Arefi, H. (2009). Chromosomal variation studies in some *Thymus* medicinal plants species. *Iranian Journal of Horticultural Science*, **40(1):** 29-36 (In Persian).

Mehrpur, Sh., Mirzaie-Nodoushan, H., Majd, A. and Sefidkon, F. (2001). Ploidy diversity in a species of *Thymus* (*Thymus kotschyanus*). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **6:** 57-77 (In Persian).

Omidbaigi, R. 2000. *Producion and processing of medicinal plants*, Behnashr: Astane Ghodse Razavi, Mashhad, IRI (In Persian).

Romero-Zarco, C. (1986). A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxonomy*, **35:** 526-530.

Safari, H., Hesamzadeh-Hejazi, S.M., Jalilian, N. and Ziaeinasab, M. (2008). Study of karyotypic variation on six different populations in three *Sophora* L. species. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **16(1):** 27-36 (In Persian).

Sarvat, M., Das, S. and Srivastava, P.S. (2008). Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. *Plant Cell Reports*, **27(3):** 519-528.

Stahl-Biskup, E. and Sáez, F. (2002). *Thyme The genus Thymus*, Taylor and Francis Group, London, UK.

Stebbins, G.L. (1971). *Chromosomal Evolution in Higher Plants*, Edward Arnold Publisher, London, UK.

Investigation of *Thymus spp*. Karyotypic Diversity in Different Regions of Iran

Valiollah Yousefi[1], Abdollah Najaphy[2], Alireza Zebarjadi[3,*] and Hooshmand Safari[4]

1- Former M.Sc. of Plant Breeding, Razi University and Ph.D. Student, Department of Plant Production and Breeding, Faculty of Technology and Engineering, Imam Khomeini International University, Qazvin
2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah
3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah
4- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah

(Received: September 3, 2013 – Accepted: January 18, 2014)

Abstract

Thymus, an aromatic medicinal plant, is a well-known, perennial and woody herb from Lamiaceae family. *Thymus* is taxonomically a very complex genus with a high frequency of hybridization and introgression among sympatric species, and some species of this herb are endemic to Iran. In the present study, in order to identification genetic variability in this medicinal plant seven *Thymus spp.* accessions collected from different regions of Iran along with London agricultural species were studied by karyotypic characteristics. The secondary basic numbers in all ecotypes was x = 15 that probably originate from a primary basic number x = 7. The ploidy levels of these ecotypes were diploid and tetraploid. The *Thymus* ecotypes under study occupied classes 1A and 1B of Stebbins' karyotype classification, indicating the presence of a primitive symmetrical karyotype in these ecotypes. The mean chromosome length ranged from 1.03 to 1.53 µm. chromosome types were detected as metacentric "m". Furthermore, the cluster analysis using chromosomal parameters and based on UPGMA assigned the ecotypes into four groups.

Keywords: Chromosome, Cytogenetic, Genetic diversity, Medicinal plant, *Thymus*

[*] **Corresponding Author, E-mail: zebarjadi@razi.ac.ir**