



تخمین اندازه‌ی ژنوم گونه‌های آویشن به روش فلوسایتومتري

پرنیان کریمزاده^۱، ابوذر سورنی^{۲*}

^۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

^{۲*} گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

* نویسنده مسئول: soorni@cc.iut.ac.ir

چکیده

آویشن یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی از خانواده‌ی Lamiaceae می‌باشد که از مزایای دارویی آن می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدنفخ، ضد التهاب، ضدباکتریایی، ضدقارچی، رفع سوزش و اسهال اشاره کرد. علیرغم تنوع زیاد گونه‌های آویشن، تنها اطلاعاتی از اندازه ژنوم تعداد محدودی از گونه‌ها وجود دارد. از آن جایی که مطالعه و بررسی اندازه‌ی ژنوم اطلاعات مفیدی در بسیاری از مباحث زیستی از جمله تکامل، اکولوژی و ژنتیک جمعیت فراهم می‌کند، لذا این مطالعه در جهت ارائه‌ی یافته‌های جدید، در زمینه‌ی تخمین اندازه‌ی ژنوم در گونه‌های آویشن به منظور مقایسه‌ی تفاوت‌ها و شباهت‌های درون و بین گونه‌ای انجام می‌شود. در همین جهت، اندازه‌ی ژنوم (مقدار DNA ژنومی) ۱۱ گونه آویشن، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتري (به روش رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید) بررسی شد. نتایج نشان داد که، مقدار 2C DNA نمونه‌ها از ۱/۱۱۶۷ pg تا ۲/۳۴۶۸ pg تفاوت داشت، که در واقع نشان‌دهنده‌ی یک تنوع دو برابری در اندازه‌های به‌دست آمده است، به طوریکه اندازه‌ی ژنوم آن‌ها بین ۵۴۶/۲ Mbp در گونه‌ی *T. lancifolius* (اصفهان) تا ۱۱۴۷/۹ Mbp در گونه‌ی *T. fedtschenkoi* (یزد) تخمین زده شد.

کلمات کلیدی: گیاه دارویی، مقدار DNA هسته‌ای، تنوع، تغییرات درون گونه‌ای.

مقدمه

آویشن (*Thymus*) گیاهی متعلق به خانواده‌ی Lamiaceae می‌باشد و یکی از ارزشمندترین ادویه‌ها و طعم‌دهنده‌ها در صنایع غذایی است، که به طور گسترده از خواص دارویی آن استفاده می‌شود، از جمله‌ی این خواص می‌توان به ضدنفخ، ضد اسپاسم، هاضم، ضدالتهاب و دفع آفات اشاره کرد (Nabavi et al., 2015). مطالعات انجام شده در ارتباط با سطح پلوئیدی و تعداد کروموزوم‌های جنس *Thymus*، دو سطح پلوئیدی (دیپلوئید و تتراپلوئید) با پنج شمارش کروموزومی مختلف $2n=2x=28,30$ و $2n=4x=54,56,58$ را برای این جنس گزارش کرده است (Morales, 1986). تغییرات کروموزومی مثل پلی-پلوئیدی، وجود کروموزوم اضافی (B- Chromosome) و همچنین وجود فرایندهای جهش‌زا مثل فعالیت ترانس‌پوزون‌ها، دو برابر شدن ژنومی^۱ و نوترکیبی می‌توانند باعث تغییرات درون گونه‌ای اندازه‌ی ژنوم شوند. این تغییرات همچنین می‌توانند موضوع بحث انتخاب طبیعی قرار گیرند، و در نهایت باعث جدایی گونه‌ها شوند (Smarđa and Bures, 2010). بر همین اساس، تغییرات تعداد کروموزوم در جنس *Thymus*، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی تغییرات درون و بین گونه‌ای در اندازه‌ی ژنوم این جنس باشد. علاوه بر تغییرات کروموزومی، به نظر می‌رسد تغییرات جغرافیایی و محیطی نیز بتواند در تغییر اندازه‌ی ژنوم دخیل باشد (Smarđa and Bures, 2010).

به طور کلی مطالعه‌ی اندازه‌ی ژنوم، اطلاعات ارزشمندی را در زمینه‌ی بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک در دسترس قرار می‌دهد، به طوری که اندازه‌ی ژنوم یک فاکتور مهم در انتخاب ارگانیسم مناسب برای مطالعه پروژه‌های ژنومی محسوب می‌شود (موجوداتی با اندازه‌ی ژنوم بزرگتر، کمتر مورد توجه قرار می‌گیرند)، همچنین اطلاعات مفیدی را از نظر تعداد کلون لازم برای ساخت کتابخانه‌ی BAC فراهم می‌کند و در مطالعات تکامل و ژنتیک جمعیت از اهمیت خاصی برخوردار است (Leitch and Bennett, 2007). در طول سال‌های گذشته روش‌های متفاوتی برای تخمین اندازه‌ی ژنوم استفاده شده، اما سریع‌ترین

1- Duplication



روش، استفاده از روش فلوسایتومتری برای اندازه‌گیری مقدار C-value DNA می‌باشد. فلوسایتومتر دستگاهی است که قابلیت آنالیز جمعیت‌های بزرگی از سلول‌ها و توانایی اندازه‌گیری دقیق DNA را در مدت کوتاهی دارد (Dolezel and Bartos, 2005). در مطالعه‌ای که توسط Marie و Brown (۱۹۹۳) انجام گرفت، با استفاده از روش فلوسایتومتری، اندازه‌ی ژنوم گونه‌ی *T. vulgaris* (2C-Value=۱/۵۵) به دست آمد. همچنین در گزارش دیگری Mahdavi و Karimzadeh (۲۰۱۰) با استفاده از روش مذکور، به بررسی محتوای اندازه‌ی ژنوم سه گونه‌ی *T. eriocalyx*، *T. migricus* و *T. daenensis* پرداختند که اندازه‌ها به ترتیب ۶۲۸ Mbp، ۶۹۰ Mbp و در گونه‌ی آخر از ۴۹۹ Mbp تا ۱۱۸۲ Mbp در جمعیت‌های مختلف، گزارش شدند. هدف از این مطالعه، تخمین اندازه‌ی ژنوم گونه‌های آویشن و همچنین ارزیابی ارتباط اندازه‌ی ژنوم با ویژگی‌های جغرافیایی و اکولوژیکی گونه‌ها می‌باشد، بدین صورت که با استفاده از روش فلوسایتومتری، گونه‌های این جنس که از مناطق جغرافیایی مختلف جمع‌آوری شده‌اند، مورد بررسی قرار خواهند گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی مواد گیاهی:

بذر ۱۱ گونه‌ی جنس *Thymus* از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری شدند. بذور در گلدان‌های پلاستیکی کشت شده و به مدت ۴۵ روز در شرایط گلخانه رشد داده شدند.

اندازه‌گیری سایز ژنومی:

۵۰ میلی‌گرم از بافت تازه‌ی برگ آویشن، به همراه بافت گیاه *Capsicum annuum* به عنوان استاندارد داخلی، در یک پتری‌دیش قرار داده‌شد و به آن ۱ میلی‌لیتر بافر De Laat اضافه گردید و به مدت ۲۰ تا ۶۰ ثانیه عمل خرد کردن مواد گیاهی در این بافر انجام گرفت (De laat and Blass, 1984).

سوسپانسیون‌های هسته، به کمک فیلترهای celltrics (۲۰ تا ۵۰ میکرومتری) فیلتر شده و به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰ Rpm سانتریفوژ شدند، پس از آن محلول‌های رویی با دقت فراوان خارج گردید که حجم‌شان به ۲۰۰ میکرولیتر کاهش یافته بود. ۴۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی، پروپیدیوم یدید (PI) به هر تیوب اضافه شد و تیوب‌ها به آرامی با دست شیک شده و سپس به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شدند.

در نهایت به کمک دستگاه فلوسایتومتری Partec Pas (<http://www.partec.de/>), اندازه‌گیری‌ها انجام و محتوای DNA هسته به وسیله فرمول زیر محاسبه شد: (Dolezel et al., 2003)

$$\text{مقدار DNA - 2C استاندارد (pg)} \times \frac{\text{میانگین پیک G1 نمونه}}{\text{میانگین پیک G1 استاندارد}} = \text{محتوای 2C-DNA نمونه (pg)}$$

(معادله ۱)

از آنجا که ۱ پیکوگرم (pg) معادل ۹۷۸ مگا جفت باز (Mbp) است، مقدار ژنوم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{مقدار ژنوم (Mbp)} = \text{اندازه ژنوم مونوپلوئید} \times ۹۷۸ \text{ (pg)}$$

(معادله ۲)

نتایج و بحث

نتایج اندازه‌گیری‌های فلوسایتومتری در بین ۱۸ نمونه متعلق به ۱۱ گونه از جنس *Thymus*، در جدول شماره ۱ گزارش شدند. این اندازه‌گیری‌ها تنوع ۲/۱۰۲ برابری را در بین گونه‌های مورد مطالعه نشان داد (جدول ۱)، به طوری که کمترین C-Value اندازه‌گیری شده ۰/۵۵۸ pg مربوط به گونه‌ی *T. lancifolius* و بیشترین مقدار آن، ۱/۱۷۳ pg مربوط به گونه‌ی *T. fedtschenkoii* بود.

جدول ۱- مشخصات گونه‌ها و محل جمع‌آوری آن‌ها، به همراه مقدار C-Value اندازه‌گیری شده و اندازه‌ی هاپلوئیدی براساس

Mbp



استان (موقعیت)	گونه‌ها	2C-Value (pg)	خطای استاندارد	IC-Value	خطای استاندارد	اندازه‌ی هاپلوئید (Mbp)
آذربایجان شرقی	<i>T. pubescens</i>	۱/۲۲۵۱	۰/۰۳۹۴	۰/۶۳۲۴	۰/۰۱۹۷	۵۹۹/۲
آذربایجان غربی	<i>T. pubescens</i>	۲/۲۱۰۲	۰/۰۳۴۹۶	۱/۱۰۵۱	۰/۰۱۴۲	۱۰۸۱
آذربایجان غربی	<i>T. migricus</i>	۱/۲۲۴۸	۰/۰۳۶۹۲	۰/۶۱۲۴	۰/۰۰۶۱	۵۹۹/۱
لرستان	<i>T. daenensis</i>	۱/۱۲۰۹	۰/۰۰۹۲	۰/۵۶۰۴	۰/۰۰۳۷	۵۴۸/۲
فریدون شهر	<i>T. daenensis</i>	۱/۱۲۲۰۲	۰/۶۶۲۱	۰/۵۴۸۸	۰/۲۷۰۳	۷۳۵/۷
اراک	<i>T. daenensis</i>	۱/۱۰۵۶۸۳	۰/۶۷۶۲	۰/۵۴۰۸۰۹	۰/۲۷۶۰	۷۳۱/۵
آذربایجان غربی	<i>T. persicus</i>	۲/۱۶۴۹	۰/۰۰۶۷	۱/۰۸۲۴	۰/۰۰۲۷	۱۰۵۸/۹۲
قزوین	<i>T. kotschyanus</i>	۲/۱۵۷۸۵۷	۰/۴۶۴۱	۱/۰۷۸۹۲۹	۰/۱۸۹۴	۹۲۴/۶
قزوین	<i>T. kotschyanus</i>	۲/۱۷۹۰	۰/۰۸۹۶	۱/۰۸۹۵	۰/۰۳۶۶	۱۰۶۵/۸
اصفهان	<i>T. lancifolius</i>	۱/۱۱۶۷	۰/۰۲۷۰۱	۰/۵۵۸۳	۰/۰۱۱	۵۴۶/۲
کردستان	<i>T. lancifolius</i>	۲/۲۱۲۵	۰/۰۴۶۹	۱/۱۰۶۲	۰/۰۴۲۹	۱۰۸۲/۲
تجاری -	<i>T. vulgaris</i>	۱/۶۳۹۴	۰/۰۴۳۰	۰/۸۱۹۷	۰/۰۱۷۵	۸۰۱/۸
سمنان	<i>T. fedtschenkoi</i>	۱/۲۲۷۵	۰/۰۳۳۸	۰/۶۱۳۷	۰/۰۱۳۸	۶۰۰/۳
یزد	<i>T. fedtschenkoi</i>	۲/۳۴۶۸	۰/۰۵۸۰	۱/۱۷۳۴	۰/۰۲۳۶	۱۱۴۷/۹
کردستان	<i>T. transcaspicus</i>	۲/۱۸۰۵	۰/۰۴۱۱	۱/۰۹۰۲	۰/۰۱۶۷	۱۰۶۶/۵
یزد	<i>T. transcaspicus</i>	۲/۱۳۵۷۳۳	۰/۰۵۹۵۷	۱/۰۶۷۸۸۶	۰/۰۲۴۳	۱۰۴۴/۶۴
یزد	<i>T. fallax</i>	۲/۲۷۱۹	۰/۰۳۹۲۰۹	۱/۱۳۵۹۵۳	۰/۰۱۶	۱۱۱۱/۲
کرمان	<i>T. carmanicus</i>	۲/۱۵۶۴۲	۰/۰۵۱۲۶۲	۱/۰۷۸۲۱۱	۰/۰۲۰۹	۱۰۵۴/۷

در مطالعه‌ی حاضر، اندازه‌ی ژنومی گونه‌های *T. kotschyanus*, *T. lancifolius*, *T. fedtschenkoi*, *T. fallax*، *T. transcaspicus*, *T. persicus*, *T. pubescens*, *T. carmanicus* برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفت.

با مقایسه‌ی مقادیر 2C-DNA به دست آمده از گونه‌های مختلف جنس آویشن، به راحتی می‌توان به تغییرات بین گونه‌ای در اندازه‌ی ژنوم گونه‌های این جنس پی برد. اندازه‌گیری‌ها، مقدار 2C-DNA دو جمعیت گونه‌ی *T. Kotschyanus* را که از نواحی جغرافیایی مشابه جمع‌آوری شده بودند (قزوین)، ۲/۱۶۸ pg برآورد کردند، این در حالی است که مقادیر 2C برای دو جمعیت گونه‌ی *T. lancifolius* که از مناطق جغرافیایی متفاوت به دست آمده بودند، ۱/۱۱۶۷ pg (در اصفهان) و ۲/۲۱۲۵ pg (در کردستان) برآورد شدند که نشان‌دهنده‌ی تفاوت ۲ برابری در اندازه‌ی ژنوم این دو جمعیت بود. همچنین در دو جمعیت *T. fedtschenkoi* مقدار 2C-DNA از ۱/۲۲۷۵ pg (سمنان) تا ۲/۳۴۶۸ pg (یزد) و برای دو جمعیت *T. pubescens* از ۱/۲۲ pg (آذربایجان شرقی) تا ۲/۲۱ pg (آذربایجان غربی) متفاوت بود. از طرف دیگر در سه نمونه‌ی جمع‌آوری شده از *T. daenensis*، تفاوت معنی‌داری در مقدار 2C-DNA مشاهده نشد (۱/۱۲۰ pg، ۱/۱۲۲ pg و ۱/۱۰۵۶ pg به ترتیب مربوط به استان‌های لرستان، فریدون شهر و اراک).

مقدار 2C-Value اندازه‌گیری شده برای دو گونه‌ی *T. migricus* و *T. vulgaris* به ترتیب ۱/۶۳۹ pg و ۱/۲۲۴ pg بود که با نتایج مطالعات قبلی هم‌خوانی داشت (در مطالعات قبلی، مقدار 2C در *T. vulgaris* ۱/۵۵ pg و برای *T. migricus* ۱/۴۱ pg گزارش شده بود) (Marie and Brown, 1993. Mahdavi and Karimzadeh, 2010). همچنین، مقادیر 2C-DNA گزارش شده برای گونه‌های *T. daenensis* نیز، با مقادیر اندازه‌گیری شده در بررسی‌های Mahdavi و Karimzadeh (۲۰۱۰)، در مورد این گونه مشابهت نشان دادند (Mahdavi and Karimzadeh, 2010).

با توجه به نتایج به دست آمده از سه گونه‌ی *T. fedtschenkoi*، *T. lancifolius* و *T. pubescens*، تفاوت‌های قابل توجهی در اندازه‌ی ژنوم جمعیت‌های مختلف یک گونه که از لحاظ جغرافیایی جدا شده بودند، مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی ایجاد



تنوع درون گونه‌ای در اندازه‌ی ژنوم می‌باشد و چنین به نظر می‌رسد که تغییرات جغرافیایی و محیطی نیز بتواند در تغییر اندازه‌ی ژنوم دخیل باشد، این نتایج با یافته‌های دیگر مطالعات نیز مطابقت داشت (Schmuths *et al.* 2004. Smarda and Bures, 2006).

نتایج این بررسی و مقایسه‌ی آن با دیگر تحقیقات چنین نشان می‌دهد که تغییرات در اندازه‌ی ژنوم نه تنها با واگرایی بین گونه‌ها مرتبط است، بلکه می‌تواند به شرایط مختلف محیطی و مراحل تکامل موثر بر جمعیت‌های متفاوت یا ویژگی‌های هر گیاه نیز مرتبط باشد (Ohri, 1998).

منابع

- De Laat, A. M. M. and Blass J. 1984. Flow cytometric characterization and sorting of plant chromosomes. *Theoretical and applied genetics*, 67(5): 463-467.
- Dolezel, J. and Bartos, J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1): 99-110.
- Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H. and Greilhuber, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: The Journal of The International Society for Analytical Cytology*, 51(2): 127-128.
- Leitch, L. J. and Bennett, M. D. 2007. *Genome size and its uses: The impact of flow cytometry. Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes*, Wiley-VCH: 153-176.
- Mhdavi, S. and Karimzadeh, G. 2010. Karyological and nuclear DNA content variation in some Iranian endemic *Thymus* species (Lamiaceae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12: 447-458.
- Marie, D. and Brown, S. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C value for 70 species. *Biology of the Cell*, 78(1-2): 41-51.
- Morales, R. 1986. Taxonomia de los generos *Thymus* (excluida de la seccion serpyllum) y *Thymbra* en la peninsula iberica. *Ruizia. Monografias del Jardin Botanico*, 3: 1-324.
- Nabavi, S. M., Marchese, a., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M. and Nabavi, S. F. 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as anti bacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173: 339-347.
- Ohri, D. 1998. Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany*, 82 (suppl-1): 75-83.
- Schmuths, H., Meister, A., Horres, R. and Bachmann, k. 2004. Genome size variation among accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 93(3): 317-321.
- Smarda, P. and Bures, P. 2006. Intra specific DNA content variability in *Festuca pallens* on different geographical scales and ploidy levels. *Annals of Botany*, 98(3): 665-678.
- Smarda, P. and Bures, P. 2010. Understanding intra specific variation in genome size in plants. *Preslia*, 82(1): 41-61.

Genome Size Estimation of *Thymus* Species by Flow Cytometry

Parnian Karimzadeh¹, Aboozar Soorni^{2*}

¹ Biotechnology Department, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan

^{2*} Biotechnology Department, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan

*Corresponding Author: soorni@cc.iut.ac.ir

Abstract

Thymus is the one of the most important medicinal plants that belongs to Lamiaceae family. The medicinal properties of genus *Thymus* include antibacterial, antioxidant, carminative, digestive, anti-inflammatory. Despite a long variety of *Thymus* species, there is information about the genome size of only a limited number of species. Since, genome size estimation provides useful information in many biological fields, including evolution, ecology and population genetics, this study is presenting new finding about genome size in *Thymus* species for comparison of inter-intra specific differences and similarities. Therefore, the genome size of 18 accessions belonging to 11 species of genus *Thymus* was evaluated using flowcytometry (samples was stained with propidium iodide). The results showed that the 2C DNA contents of the samples varied from 1.1167 pg to 2.3468 pg, which confirmed a more than 2-fold variations, so that genome sizes were ranged from 546.2 Mbp to 1147.9 Mbp.

Keywords: Medicinal plant, Nuclear amount, Diversity, Intra specific variation.