گیاه و زیست فناوری ایران
Iranian Journal of Plant & Biotechnology (IJPB)

مقاله پژوهشی

ارزیابی تمایزی دو گونه مرزه *Satureja avromanica* و *Satureja edmondi* با استفاده از مطالعات سیتوژنتیکی و فیتوشیمیایی

مهدیه صالحی وژده نظری (نویسنده مسئول)[1*] و سمانه سماوات[2]

۱*- دکتری، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران،
mahdiyehsalehi1@gmail.com

۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران،
samaneh.samavat@gmail.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۳

Differentiative assessment between *Satureja avromanica* and *Satureja edmondi* using cytogenetic and phytochemical traits

Mahdiyeh Salehi Vozhdehnazari (Corresponding author)[1*] and Samaneh Samavat[2]

1- Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, mahdiyehsalehi1@gmail.com

2- Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, samaneh.samavat@gmail.com

Received: May 2024 Accepted: July 2024

چکیده

با توجه به قرابت ظاهری و تشابه خواص جمعیت‌های مختلف مرزه (*Satureja* spp.)، تفکیک گونه‌های آن از یکدیگر مستلزم انجام مطالعات تکمیلی و دقیق‌تر است. بر این اساس، *S. avromanica* و *S. edmondi* به عنوان دو گونه اندمیک ایران، به لحاظ خصوصیات کاریوتیپی و فیتوشیمیایی، مورد مطالعه قرارگرفتند. در مطالعات سیتوژنتیکی، صفات متعددی چون طول کل کروموزوم (TL)، طول بازوی بلند (LA)، طول بازوی کوتاه (SA)، شاخص سانترومری (CI)، درصد شکل کلی کروموزوم (TF%)، اختلاف طول نسبی (DRL)، شاخص عدم تقارن درون کروموزومی (A_1)، شاخص عدم تقارن بین کروموزومی (A_2)، شاخص پراکندگی (DI)، و فرمول کاریوتیپی (KF) برای جمعیت‌های ۴۸ و ۵۵ از مرزه ادموندی و ۶۳ و ۶۷ از مرزه اورامانی اندازه‌گیری و محاسبه شد. بر اساس نتایج، عدد پایه کروموزومی در جمعیت‌های اورامانی و ادموندی به ترتیب x=۱۲، (۲n=2x=۲۴) و x=۱۵، (۲n=2x=۳۰) بود. در تجزیه خوشه‌ای به روش پیوستگی کامل، جمعیت‌های ۶۳ و ۶۷ در یک خوشه و جمعیت‌های ۴۸ و ۵۵ در خوشه دیگر واقع شدند. همچنین جمعیت‌های دو گونه از نظر تمامی صفات کاریوتیپی مورد مطالعه، با یکدیگر اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (P<0.01). بر اساس آنالیز GC-MS، به ترتیب ۲۱ و ۲۵ ترکیب مختلف در اسانس مرزه ادموندی و مرزه اورامانی ردیابی شد. ترکیبات اصلی موجود در اسانس مرزه اورامانی، piperitone (۱۹٪) و piperitenone (۲۶٪/۳)، بود، در حالی که عمده‌ترین اجزای موجود در اسانس مرزه ادموندی p-cymene (۶۳٪/۲)، thymol (۵٪/۷) و γ-terpinene (۸٪/۸) بود. بیشترین (۱٪/۳۶) و کمترین (۰٪/۴۲) میزان بازده اسانس به ترتیب مربوط به جمعیت‌های ۶۳ از مرزه اورامانی و ۴۸ از مرزه ادموندی بود. بنابراین، دو گونه مذکور، به عنوان گونه‌های مستقل و متمایز از یکدیگر تلقی می‌شوند. همچنین، انجام مطالعات تکمیلی برای بررسی تنوع ژنتیکی این دو گونه به کمک مارکرهای مولکولی مختلف می‌تواند در تأیید نتایج حاضر، نیز حائز اهمیت باشد.

کلمات کلیدی: اسانس، تفکیک گونه، کروموزوم، گیاه دارویی، GC-MS

Abstract

Considering the similarity of morphology and properties of different populations of savory (*Satureja* spp.), the separation of its species from each other requires additional and more detailed studies. Accordingly, *S. avromanica* and *S. edmondi*, two endemic species of Iran, were studied for their karyotypic and phytochemical characteristics. For cytogenetic studies, several traits such as total chromosome length (TL), long-arm length (LA), short-arm length (SA), centromeric index (CI), overall chromosome shape (%TF), relative length difference (DRL), intrachromosomal asymmetry index (A_1), interchromosomal asymmetry index (A_2), dispersion index (DI), and karyotypic formula (KF) were measured and calculated for populations 48 and 55 from Edmondi savory and 63 and 67 from Oramani savory. Based on the results, the basic chromosomal numbers in Oramani and Edmondi populations were x=12 (2n=2x=24) and x=15 (2n=2x=30), respectively. In cluster analysis based on complete linkage method, populations 63 and 67 were located in one cluster, however, 48 and 55 were placed in another cluster. Furthermore, the populations of the two species had statistically significant differences with each other for all the karyotypic traits (P<0.01). Based on GC-MS analysis, 21 and 25 different compounds were detected in Edmondi and Oramani savory essential oils (EOs), respectively. The main compounds in the EO of Oramani savory were piperitone (19%) and piperitenone (26.3%), while the main components in Edmondi savory EO were p-cymene (63.2%), thymol (5.7%), and γ-terpinene (8.8%). The highest (1.36%) and lowest (0.42%) EO yields were calculated for populations Oramani 63 and Edmondi 48, respectively. Therefore, these two mentioned species are considered as independent and distinct species from each other. Additionally, conducting additional studies to investigate the genetic diversity of these two species by different molecular markers can be important in confirming the present results.

Keywords: Chromosome, Essential oil, GC-MS, Medicinal plant, Species separation

مقدمه و کلیات

جنس مرزه (*Satureja*) متعلق به تیره نعنا (Lamiaceae) و دارای گونه‌های متعدد و ارزشمندی از گیاهان دارویی است. این جنس شامل ١٦ گونه متفاوت است که ۹ گونه آن انحصاری ایران است. مرزه بومی مدیترانه شرقی و جنوب غرب آسیا است و در نواحی مختلف ایران به ویژه در دامنه‌های کوهستانی آذربایجان، کرمانشاه، خراسان، ارسباران و گیلان به طور طبیعی رویش دارد (Shahnazi *et al.*, 2008). مرزه گیاهی علفی و معطر یکساله یا چند ساله با ساقه‌های متعدد، افراشته، خیزان یا کمانی است که معمولاً پوشیده از کرک است (جم‌زاد، ۱۳۹۱). از آنجایی که اسانس این گیاهان شامل مقادیر قابل توجهی از مواد مؤثره ارزشمندی همچون تیمول و کارواکرول است، در میان انواعی از گیاهان دارویی، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (نورمند مؤید و همکاران، ١٤٠٢). اسانس مرزه، دارای خواص ضدمیکروبی است و در طب سنتی در درمان مشکلات پوستی، گوارشی، فشار خون، دیابت، سردرد، درد مفاصل و تقویت سیستم ایمنی بدن کاربرد دارد (امیدبیگی، ۱۳۹۲). از بین گونه‌های مختلف مرزه بومی فلور ایران، در تفکیک دو گونه‌ی مرزه اورامانی با نام علمی *S. avromanica* Maroofi. و مرزه ادموندی (*S. edmondi* Briq.) از یکدیگر اختلاف نظرهایی وجود دارد. به صورتی که جم‌زاد (۱۳۹۱) در فلور ایران گزارش کرد که این دو گونه از نظر صفات کلی گیاه شناختی شبیه به یکدیگرند و تفکیک این دو را به عنوان گونه‌های مستقل، منوط به انجام بررسی‌های تکمیلی دانست. همچنین این دو گونه را به عنوان گونه‌های سینونیم با یکدیگر نیز به شمار نیاورده است. این در حالی است که پیشتر این دو گونه صرفاً بر اساس مطالعات گیاه‌شناسی توسط دیگر گیاه‌شناسان به عنوان گونه‌های مستقل از یکدیگر ثبت شده بودند (Maroofi, 2010، جم‌زاد، ۱۳۹۱). بر این اساس در ادامه به برخی از مهمترین خصوصیات گیاه‌شناختی این دو گونه در فلور ایران پرداخته شده است. مرزه اورامانی گیاهی بوته‌ای، به ارتفاع ۳۵ تا ۸۰ سانتی‌متر، با ساقه‌های متعدد ساده و یا با انشعابات کم است. برگ‌هایش متقابل و یا دسته‌ای و کاسه گل آن پوشیده از کرک است. این گونه نخستین بار از روستای بلبر منطقه اورامان کردستان جمع‌آوری شده است و به عنوان گونه جدید و انحصاری جنس مرزه در ایران توسط Maroofi (۲۰۱۰) معرفی گردیده است. اسانس این گیاه دارای مواد مؤثره ارزشمندی چون تیمول، کارواکرول، پاراسیمن، و گاماترپینن است (هوشیدری و همکاران، ١٣٩٦). مرزه ادموندی گیاهی بوته‌ای به ارتفاع ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر، با ساقه‌های متعدد نازک و باریک است. برگ‌های آن متراکم یا تنک و بدون دمبرگ است. کاسه گل آن دارای دولبه نامشخص و تقریباً بدون کرک و یا با کرک‌های خیلی ریز زگیل مانند است. رویشگاه اصلی این گیاه را شکاف سنگ‌ها و صخره‌ها در مناطق کوهستانی منطقه ایرانی-تورانی می‌دانند (جم‌زاد، ۱۳۹۱). ترکیبات عمده موجود در اسانس این گونه مرزه نیز شامل پاراسیمن، گاماترپینن، تیمول و آلفا-ترپینئول است (نورمند مؤید و همکاران، ١٤٠٢). از آنجایی که فنوتیپ

گیاهان تا حدود زیادی تحت تأثیر مواد ژنتیکی هسته می‌باشد، یکی از روشهای بررسی تنوع در ارقام و گونه‌های مختلف گیاهی می‌تواند، انجام مطالعات سیتوژنتیکی باشد. بدیهی است گونه‌هایی که از نظر پارامترهای سیتوژنتیکی به یکدیگر شبیه هستند، قرابت بیشتری با یکدیگر دارند. ضمن اینکه به کمک اطلاعات کروموزومی جمعیت‌های گیاهی، مقایسه آن‌ها با یکدیگر نیز امکانپذیر می‌گردد. از آنجایی که گونه‌های مختلف مرزه از نظر کاریولوژی و ترکیبات فیتوشیمیایی متفاوت از یکدیگرند، مطالعه این ویژگی‌ها در کنار بررسی سایر صفات مورفولوژیکی آن‌ها، می‌تواند گامی مؤثر برای حـل مشکلات طبقه‌بندی و تفکیک گونه‌های آن از یکدیگر باشد. لازم به ذکر است که در خصوص تعداد کروموزوم‌ها در گونه‌های مختلف مرزه بومی ایران گزارش‌های محدودی وجود دارد. بر این اساس، تحقیق حاضر با هدف بررسی و مقایسه صفات سیتوژنتیکی و فیتوشیمیایی دو گونه مرزه ادموندی و اورامانی انجام گرفته است تا تأییدی بر تفکیک مؤثر این دو گونه از یکدیگر باشد.

فرآیند پژوهش

در جدول (۱) برخی اطلاعات مربوط به مناطق جمع‌آوری چهار جمعیت مورد مطالعه از دو گونه مرزه ادموندی و اورامانی آورده شده است. شناسایی جمعیت‌های مورد مطالعه توسط متخصصان گیاه‌شناس مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور انجام شد. به منظور انجام بررسی‌های فیتوشیمیایی سرشاخه‌های گلدار جمعیت‌های هر دو گونه با مراجعه به رویشگاه‌های اصلی آن‌ها در شهریور سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری گردید. همچنین، جمع‌آوری بذور آن‌ها برای انجام مطالعات سیتوژنتیکی در آبان همان سال انجام شد.

جدول۱- مشخصات مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های مرزه (*Satureja* spp.)

Table 1- Characteristics of the collected *Satureja* population localities (*Satureja* spp.)

نام علمی	کد جمعیت	محل جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا(m)
S. edmondi	48	کرمانشاه–سنقر–میان راهان	34°.35'.06"N	47°.26'.34"E	1439
S. edmondi	55	کرمانشاه–کامیاران–حجت آباد	34°.37'.19"N	47°.13'.52"E	1428
S. avromanica	63	کردستان–اورامان تخت–روستای بلبر	35°.14'.16"N	46°.17'.34"E	990
S. avromanica	67	کردستان–اورامان تخت– روستای بلبر	35°.14'.18"N	46°.17'.22"N	912

مطالعات سیتوژنتیکی

جوانه‌زنی بذور و نمونه‌گیری از ریشه: بذور هر جمعیت، پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه داخل پتری‌دیش و روی کاغذ صافی استریل کشت شدند. شدت نور ۱۲۰۰ لوکس با دوره نوری ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و رطوبت ۶۰٪ در نظر گرفته شد. پس از جوانه‌زنی و رشد ریشه تا ۱/۵ سانتیمتر، قسمت انتهایی ریشه جدا شد و به ترتیب مراحل پیش تیمار در آلفا برومو نفتالین ۰/۰۵٪، تثبیت

در محلول لویتسکی (Levitsky) که شامل محلول کرومیوم تری‌اکسید (Chromium trioxide) و فرمالدهید (Formaldehyde) ٤٠٪ به نسبت برابر بود، انجام شد. نمونه‌ها در محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال در دمای ٦٠°C به مدت هشت دقیقه قرار داده شدند تا هیدرولیز شوند. همچنین، مخلوط هماتوکسیلین ٤٪ و یک گرم سولفات آمونیوم فریک برای رنگ‌آمیزی نمونه‌ها استفاده شد. سپس اسلایدهایی برای مشاهده تصاویر کروموزومی توسط میکروسکوپ Olympus BH-2 تهیه شدند. بزرگنمایی تصاویر با استفاده از لنز ۱۰۰x در سیستم آنالیز تصویری تقریباً ۲۰۰۰ برابر بود. پس از تهیه صفحات متافازی و حداقل سه کاریوتیپ برای هر جمعیت، با استفاده از نرم‌افزار MicroMeasure 3.3، طول کروموزوم‌ها اندازه‌گیری شد. برای تعیین نوع کروموزوم‌ها نیز از روش Levan *et al*., (1964) استفاده شد. جدول دو طرفه Stebbins (Stebbins, 1971) یکی از کارآمدترین روش‌های دسته‌بندی کاریوتیپ است. این روش ابزار مناسبی برای تعیین جایگاه کاریوتیپ گونه‌ها از لحاظ تکاملی است. تخمین نامتقارن بود کاریوتیپ از شاخص عددی رومرو–زرکو (Romero-Zarco, 1986) استفاده شد. سایر پارامترهای کاریوتیپی نیز مطابق فرمول‌های ذیل، محاسبه شد.

فرمول (۱): طول کل کروموزوم (TL) از مجموع طول بازوی بلند (L) و کوتاه (S) بر حسب میکرومتر (µm) محاسبه شد. $TL = L + S$

فرمول (۲): شاخص سانترومری (CI) از نسبت S به TL محاسبه شد. $CI = \frac{S}{TL}$

فرمول (۳) درصد شکل کلی (%TF):

$$\%TF = \frac{\text{مجموع طول کل بازوهای کوتاه}}{\text{مجموع طول کل کروموزومها}}$$

فرمول (٤): اختلاف درصد طول نسبی کروموزوم (DRL) بیانگر اختلاف حداقل ($\%RI_{min}$) و حداکثر طول نسبی($\%RI_{Max}$) کروموزومها در یک کاریوتیپ است. $DRL = \%RI_{Max}-\%RI_{min}$

مطالعات فیتوشیمیایی: برای این منظور، از سر شاخه گلدار گیاهان در مرحله گل‌دهی کامل، نمونه‌برداری انجام شد. پس از خشک شدن نمونه‌ها در شرایط سایه و دمای ۳۰±۲°C، ۱۰۰ گرم از قسمت‌های غیرچوبی گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی پودر شدند. اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب انجام شد. رطوبت احتمالی اسانس‌ها با پودر سولفات سدیم بی آب (Na_2SO_4) به عنوان ماده جاذب رطوبت، حذف شد. اسانس‌های به دست آمده تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی در یخچال (دمای ٤°C) نگهداری شدند. بازده اسانس براساس وزن خشک سرشاخه محاسبه شد.

کروماتوگراف گازی فوق سریع (GC-FID): به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس هر یک از دو گونه مرزه مورد مطالعه، نمونه‌های اسانس به دستگاه کروماتوگراف گازی فوق سریع (Thermo-UFM) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) و داده پرداز با نرم افزار Chrom-Card 2006 مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه دارای ستون DB-5 نیمه قطبی (به طول

۱۰m، قطر داخلی ۰/۱ mm و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/٤ µ) بود. گاز حامل، هلیوم و فشار آن در ابتدای ستون برابر ۳ $Kg\ cm^{-2}$، دمای قسمت تزریق ۲۸۰°C و دمای آشکارساز ۲۸۰°C تنظیم شده بود.

دستگاه GC-MS: گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی مدل واریان ۳٤۰۰ از نوع تله یونی مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ m و قطر ۰/۲۵ mm ضخامت لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵ mµ بوده است. برنام iریزی حرارتی ستون همسان با برنامه ریزی ستون در دستگاه GC بوده است. دمای محفظه تزریق ۱۰ درجه بیش از دمای نهایی ستون تنظیم شده است. گاز حامل هلیوم بوده که با سرعت ۳۱/۵ سانتی‌متر بر ثانیه در در طول ستون حرکت کرده است. زمان اسکن برابر یک ثانیه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ناحیه جرمی از٤۰ تا ۳٤۰ بوده است.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از مطالعات سیتوژنتیکی در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار تجزیه واریانس شدند. هر تکرار یک سلول از مریستم گیاه است و از هر جمعیت سه اسلاید از مریستم انتهایی سه گیاه مختلف تهیه شده‌است. قبل از تجزیه واریانس آزمون نرمال بودن روی داده‌ها انجام شد و نیازی به تبدیل داده نبود. از نرم افزار آماری SPSS (IBM SPSS Statistics V 22) برای تجزیه واریانس استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD (حداقل اختلاف معنی‌دار) انجام گرفت.

نتایج و بحث

مطالعات سیتوژنتیکی: صفات کاریوتیپی چهار جمعیت مورد بررسی از دو گونه مرزه ادموندی و اورامانی در جدول (۲) آورده شده‌است. همچنین تصاویر صفحات متافاز میتوزی به همراه کاریوتیپ و ایدیوگرام مربوط به هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه در شکل‌های ۱ تا ٤ نشان داده شده‌است. بر اساس جدول (۲)، تمام جمعیت‌ها بر اساس سطح پلوئیدی، دیپلوئید (2n) هستند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در گونه *S. avromanica* عدد پایه کروموزومی *x*=۱۲، (۲n =۲x= ۲٤) است و در گونه *S. edmondi* *x*=۱۵ و (۲n =۲x= ۳۰) است. نتایج حاصل از بررسی تنوع سیتوژنتیکی سایر گونه‌های مرزه توسط دیگر محققان حکایت از آن دارد که تعداد کروموزوم در جمعیت‌های گونه *S. hortensis* ۲n =۲x= ٤۸ و در دو جمعیت مربوط به *S. mutica* و *S. boissieri* برابر با ٦۰ =٤x= ۲n بود (زارع تیموری و همکاران، ۱۳۹۸). همچنین Salehi Vozhdehnazari و همکاران (a ۲۰۲۲) در بررسی ۱۵ جمعیت از پنج گونه مرزه گزارش کردند که وضعیت کروموزومی گونه‌های *S. kermanshahensis* و *S. macrantha* به صورت 2n=2x=24 است و در مورد *S. sahendica*، *S. edmondi* و *S. khuzistanica* به صورت 2n=2x=30 بود. از لحاظ تکامل کاریوتیپی و براساس کلاس تقارن Stebbins تمام جمعیت‌های مورد مطالعه در کلاس 1B قرارگرفتند. Salehi Vozhdehnazari و همکاران (a ۲۰۲۲) نیز گزارش کردند که جمعیت‌هایی از گونه‌های *S. macrantha*، *S. sahendica*، *S. edmondi* و *S. kermanshahensis* در گروه 1B هستند ولی جمعیت‌های *S. macrantha* (3)، *S. khuzistanica* و (7) *S.sahendica* در گروه

2Bقرار دارند. بیشترین طول کل کروموزوم (TL) مربوط به جمعیت *S. edmondi*55 (۱/۴۲ µm) و کوچکترین طول کروموزوم در جمعیت *S. avromanica* 63 (۰/۹۸ µm) مشاهده شد. زارع تیموری و همکاران (۱۴۰۰) نیز نشان دادند که میانگین طول کروموزوم در ۱۰ جمعیت گیاه مرزه مربوط به سه گونه *S. hortensis*، *S. mutica* و *S. boissieri* مورد مطالعه µm ۱/۴۶ (دامنه µm ۱۹/۷۱–۱/۱) بود که از µm ۱/۱۹ در جمعیت تتراپلوئید S2P1 تا µm ۱/۷۱ در جمعیت دیپلوئید S1P1 متغیر بود. Salehi Vozhdehnazari و همکاران (a ۲۰۲۲) نیز گزارش کردند که میانگین طول کروموزوم ۱۵ جمعیت مورد مطالعه از پنج گونه مرزه (*S. macrantha*، *S. sahendica*، *S. edmondi*، *S. khuzistanica* و *S. kermanshahensis*) از µm ۰/۶۰ تا ۲/۲۷ می‌باشد. دو پارامتر A_1 و TF% به‌عنوان شاخص‌های تقارن درون کروموزومی وپارامترهای A_2 و DRL به‌عنوان شاخص‌های بین کروموزومی، تا حدودی جمعیت‌های مختلف هر گونه را از لحاظ تقارن و تکامل کاریوتیپ متمایز ساختند. بر این اساس از لحاظ تقارن درون کروموزومی جمعیت *S. edmondi*48، با داشتن کمترین میزان A_1 (۰/۱۵) و بیشترین میزان TF (۴۶٪/۰۷) از متقارن‌ترین و در عین حال ابتدایی‌ترین کاریوتیپ بوده‌است. در حالیکه جمعیت *S. avromanica* 67 با دارا بودن بالاترین مقدار A_1 (۰/۲۴) و پایین‌ترین مقدار TF (۴۰٪/۹۳)، از نامتقارن‌ترین و در عین حال متکامل‌ترین کاریوتیپ برخوردار است. از لحاظ تقارن بین کروموزومی نیز جمعیت *S. avromanica* 67 با بیشترین میزان A_2 (۰/۳۶)، کاریوتیپ نامتقارن و گونه‌ای تکامل یافته است. از نظر تیپ کروموزومی، تمام جمعیت‌های دو گونه دارای کروموزوم‌های متاسنتریک هستند. به منظور اندازه‌گیری تنوعات کاریوتیپی کوچک از پارامترشاخص پراکندگی (Dispersion Index; DI) که از نظر تقارن کاریوتیپی دارای این پتانسیل است که حتی تنوعات کاریوتیپی کوچک را می‌تواند کشف کند، استفاده شد. جمعیت *S. avromanica* 63(۱۳/۸۰) بیشترین و جمعیت *S. edmondi*55 (۹/۷۰) کمترین مقدار DI را بین جمعیت‌ها دارا بودند. نقش DI در مرتب کردن گونه‌های داخل یک کلاس مشابه است و هر چه DI بیشتر شود اختصاصی شدن کاریوتیپ بیشتر می‌شود (جدول ۲).

جدول ۲- صفات کاریوتیپی اندازه‌گیری شده در جمعیت‌های مورد مطالعه مرزه

Table 2 - Karyotypic traits measured for the studied populations of *Satureja* spp.

جمعیت	2n	TL	LA	SA	CI	%TF	DRL	A_1	A_2	DI	KF
S. avromanica 63	24	0.98	0.52	0.46	0.47	41.84	8.87	0.23	0.32	13.80	12m
S. avromanica 67	24	1.00	0.54	0.46	0.46	40.93	9.01	0.24	0.36	12.95	12m
S. edmondi 55	30	1.42	0.78	0.64	0.45	45.87	5.58	0.16	0.21	9.70	15m
S. edmondi 48	30	1.39	0.78	0.61	0.44	46.07	6.02	0.15	0.23	9.94	15m

طول کل کروموزوم **(TL)**، طول بازوی بلند **(LA)**، طول بازوی کوتاه **(SA)**، نسبت بازوها **(AR)**، شاخص سانترومری **(CI)**، درصد شکل کلی کروموزوم **(TF%)**، اختلاف طول نسبی **(DRL)**، شاخص عدم تقارن درون کروموزومی **(A_1)**، شاخص عدم تقارن بین کروموزومی **(A_2)**، شاخص پراکندگی **(DI)**، فرمول کاریوتیپی **(KF)**

Total chromosome length (TL), long-arm length (LA), short-arm length (SA), centromeric index (CI), overall chromosome shape (%TF), relative length difference (DRL), intrachromosomal asymmetry index (A_1), interchromosomal asymmetry index (A_2), dispersion index (DI), karyotypic formula (KF)

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات کاریوتیپی نشان داد که بین جمعیت‌ها از لحاظ تمامی صفات کروموزومی مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. که این امر بیانگر وجود تنوع اندازه کروموزوم‌ها در میان ژرم پلاسم‌های مورد بررسی می‌باشد (جدول ۳). بر این اساس، با توجه به اینکه عدد کروموزومی و سایر صفات کاریوتیپی اندازه‌گیری شده برای این دو گونه متفاوت از یکدیگر است و جمعیت‌های آن‌ها در خوشه‌های مجزا قرار گرفته‌اند، لذا این دو گونه از هم متفاوت و مستقل هستند.

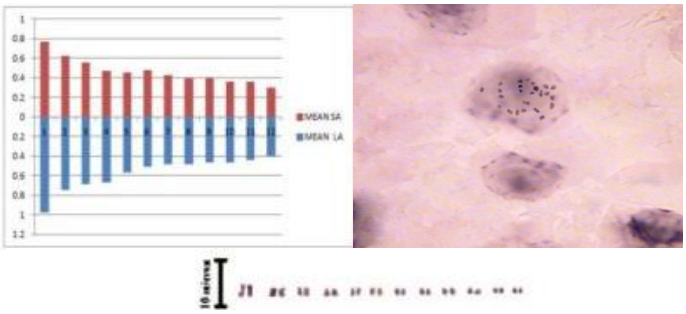
جدول ۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه

Table 3- The mean square obtained from the variance analysis of the karyotypic traits of the studied populations

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		TL	LA	SA	CI	%TF	DRL	A_1	A_2	DI
جمعیت	3	0.172**	0.060**	0.029**	0.004**	21.466**	9.976**	0.006**	0.014**	13.035**
خطا	11	0.002	0.000	0.001	0.01	0.143	0.271	0.000	0.000	0.153
CV (%)		18.32	19.86	16.80	3.38	5.58	23.19	22.73	23.04	16.47

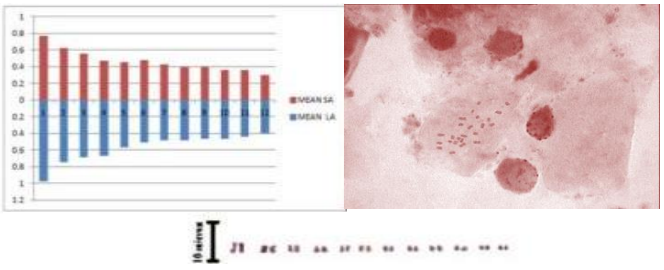
= معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

**** = significant at 1% probability level**



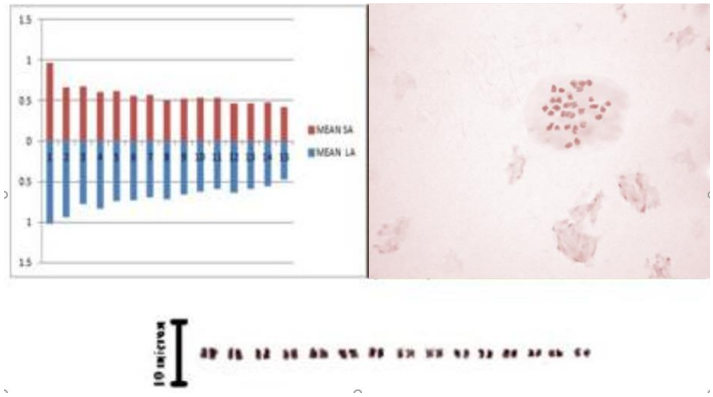
شکل ۱- صفحه متافازی، کاریوتیپ و ایدیوگرام *S. avramanica*67

Fig 1- Metaphase chromosome plate, karyotype, and ideogram of *S. avramanica*67



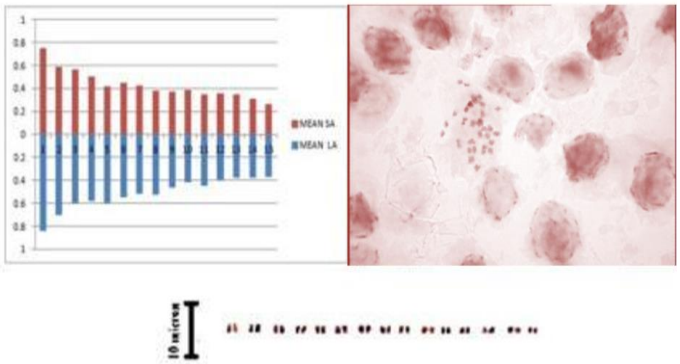
شکل ۲- صفحه متافازی، کاریوتیپ و ایدیوگرام *S. avramanica*63

Fig 2- Metaphase chromosome plate, karyotype, and ideogram of *S. avramanica*63



شکل ۳- صفحه متافازی، کاریوتیپ و ایدیوگرام *S. edmondi* 55

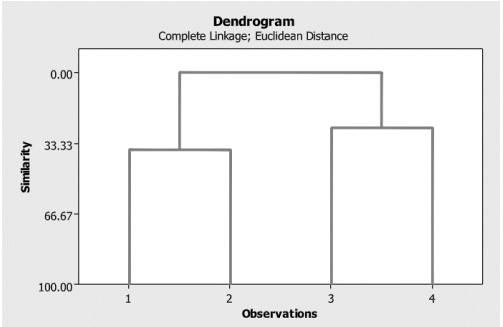
Fig 3- Metaphase chromosome plate, karyotype, and ideogram of *S. edmondi* 55



شکل ٤- صفحه متافازی، کاریوتیپ و ایدیوگرام *S. edmondi* 48

Fig 4- Metaphase chromosome plate, karyotype, and ideogram of *S. edmondi* 48

در این پژوهش، گروهبندی جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس کلیه صفات کاریوتیپی، با استفاده از تجزیه خوشه‌ای انجام شد (شکل ٥). در تجزیه خوشه‌ای به روش پیوستگی کامل (complete linkage) جمعیت‌های مورد بررسی در دو گروه متمایز قرارگرفتند، به طوری‌که جمعیت‌های ٦٣ و ٦٧ در یک خوشه و جمعیت‌های ٤٨ و ٥٥ در خوشه دیگر واقع شدند. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌هایی که در یک خوشه قرارگرفته‌اند، منشأ یکسانی دارند.



شکل ٥- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات کاریوتیپی جدول ٢ (١: ٦٣، ٢: ٦٧، ٣: ٤٨، ٤: ٥٥)

Fig 5- Dendrogram resulting from cluster analysis based on karyotypic traits in Table 2 (1: 63, 2: 67, 3: 48, 4: 55)

مطالعات فیتوشیمیایی: از جمله مهمترین فاکتورهای فیتوشیمیایی که برای مطالعه جمعیت‌های گیاهان دارویی مورد بررسی قرار می‌گیرد، درصد بازده، نوع و درصد اجزای تشکیل دهنده اسانس است. مقادیر و نوع ترکیبات اصلی موجود در اسانس جمعیت‌های مرزه اورامانی و ادموندی به ترتیب در جداول ٤ و ٥ آورده شده‌است. بر اساس آنالیز GC-MS اسانس جمعیت‌های مورد مطالعه، ۲۱ ترکیب در اسانس مرزه ادموندی و ۲۵ ترکیب در اسانس مرزه اورامانی شناسایی شد. عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس مرزه ادموندی p-cymene (٦۳٪/۲)، thymol (٥٪/۷) و γ-terpinene (۸٪/۸) بود. Sefidkon و Jamzad (۲۰۰٦) نیز گزارش کردند که در اسانس مرزه ادموندی ۳۰ ترکیب عمده وجود دارد که بیشترین درصد به ترتیب مربوط به p-cymene (٦۱٪/۱)، γ-terpinene (۹٪/٦) و thymol (٥٪) بود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. ترکیبات اصلی موجود در اسانس مرزه اورامانی piperitone (۱۹٪) و piperitenone (۲٦٪/۳) بود که میزان آن‌ها در دو جمعیت ٦۳ و ٦۷ متفاوت از یکدیگر بود. همچنین بیشترین درصد کارواکرول (٥/۷٪) در اسانس جمعیت ٦۷ از گونه اورامانی ردیابی شد. هوشیدری و همکاران (۱۳۹٦) نیز ٥/۲٪ کارواکرول در اسانس مرزه اورامانی ردیابی کردند. بر طبق نتایج، مشخص شد که ترکیباتی چون 1, 8-cineole، menthone، α-terpineol، shisofuran، pulegone، piperitenone، E-Jasmone، oxid β-bourbonene، β - globulol، eudesmol، α-cadinol و hexahydrofarnecyl acetone فقط اختصاص به جمعیت‌های مرزه اورامانی داشت و در جمعیت‌های مرزه ادموندی ردیابی نشدند. این در حالی است که ترکیباتی چون α-thujene، α-pinene، sabinene، camphene، myrcene، α-phellandrene، thymol methyl ether، methyl ether carvacrol، thymol acetate و germacrene D اختصاص به جمعیت‌های مرزه ادموندی داشت و در مرزه اورامانی ردیابی نشدند.

جدول ٤- ترکیبات اصلی موجود در اسانس دو جمعیت مرزه اورامانی (*S. avromanica*)

Table 4- The major compounds in the essential oils of two populations of *S. avromanica*

ردیف	نوع ترکیب	RI	مقدار (٪)	
			*S. avromanica*67	*S. avromanica*63
1	p-cymene	1021	4.0	3.80
2	1, 8-cineole	1031	1.4	1.6
3	γ-terpinene	1058	1.0	0.75
4	linalool	1100	7.1	8.2
5	menthone	1148	0.9	1.2
6	borneol	1167	2.8	1.0
7	terpinen-4-ol	1174	1.9	2.6
8	α-terpineol	1186	2.1	3.3
9	shisofuran	1198	0.9	1.4
10	pulegone	1233	2.6	3.2
11	piperitone	1249	17.3	19.0
12	bornyl acetate	1290	6.1	5.0
13	thymol	1292	1.1	1.2

14	carvacrol	1301	5.7	4.3
15	piperitenone	1340	22.6	26.3
16	piperitenone oxid	1366	5.5	7.6
17	β-bourbonene	1387	1.9	0.6
18	E-Jasmone	1390	-	2.1
19	e-caryophyllene	1424	-	0.8
20	spathulenol	1580	1.5	3.4
21	caryophyllene oxide	1585	8.0	1.5
22	globulol	1590	-	0.6
23	β-eudesmol	1651	1.9	-
24	α-cadinol	1652	4.2	3.7
25	hexahydrofarnecyl acetone	1856	5.3	4.3

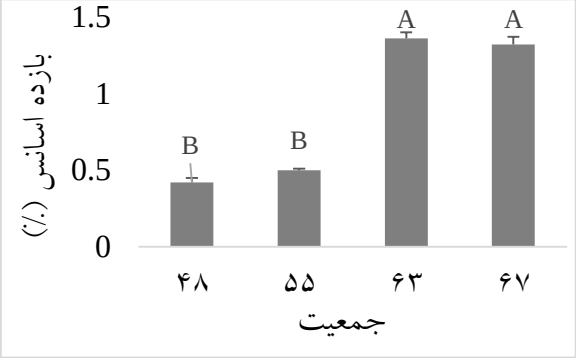
جدول ٥- ترکیبات اصلی موجود در اسانس دو جمعیت مرزه ادموندی (*S. edmondi*)

Table 5- The major compounds in the essential oils of two populations of *S. edmondi*

ردیف	نوع ترکیب	RI	مقدار (٪)	
			*S. edmondi*48	*S. edmondi*55
1	α-thujene	926	-	0.4
2	α-pinene	939	1.5	1.8
3	sabinene	951	0.8	0.4
4	camphene	954	0.4	0.9
5	myrcene	989	0.4	1.2
6	α-phellandrene	1003	0.2	-
7	p-cymene	1021	59.8	63.2
8	γ-terpinene	1058	8.8	8.2
9	linalool	1100	1.7	0.8
10	borneol	1167	2.7	3.0
11	terpinen-4-ol	1174	0.6	1.0
12	thymol methyl ether	1236	1	0.7
13	methyl ether carvacrol	1246	-	1.9
14	bornyl acetate	1290	1.1	0.7
15	thymol	1292	5.7	4.9
16	carvacrol	1301	2.8	3.7
17	thymol acetate	1349	0.8	0.5
18	e-caryophyllene	1424	0.4	0.6
19	germacrene D.	1483	0.4	0.4
20	spathulenol	1580	1.1	2.0
21	caryophyllene oxide	1585	2.4	2.5

درصد بازده اسانس جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس وزن خشک سرشاخه‌های گلدار، در شکل ٥ آورده شده است. در بررسی بازده اسانس جمعیت‌های مورد مطالعه مشخص شد که بیشترین (١/٣٦٪) و کمترین (٠/٤٢٪) میزان بازده اسانس به ترتیب مربوط به جمعیت‌های ٦٣ از گونه اورامانی و ٤٨ از گونه ادموندی بود (شکل ٦). در بررسی صورت گرفته توسط Salehi Vozhdehnazari و همکاران (b ٢٠٢٢) نیز میزان بازده اسانس جمعیت‌های مطالعه شده از مرزه ادموندی را از

۰/٤۲٪ تا ۲/۰۸٪ گزارش شد. همچنین هوشیدری و همکاران (۱۳۹٦)، گزارش کردند که میزان بازده اسانس جمعیت‌های وحشی از مرزه اورامانی، ۱/٤٪ است. به این ترتیب یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج سایر محققان مطابقت دارد.



شکل ٦- مقایسه درصد بازده اسانس جمعیت‌های مورد مطالعه (*S. avramanica* (63, 67) و *S. edmondi* (48, 55)) برحسب وزن خشک (*P*<0.01)

Fig 6- Comparison of the percentage of essential oil yield of the studied populations (*S. avramanica* (48, 55) and *S. edmondi* (63, 67)) in terms of dry weight (*P*<0.01)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عدد پایه کروموزومی در جمعیت‌های دو گونه مرزه ادموندی و اورامانی با سطح پلوئیدی یکسان، متفاوت از یکدیگر است. همچنین جمعیت‌های این دو گونه در مطالعات کاریوتیپی و فیتوشیمیایی انجام شده، به طور معنی‌داری متمایز از یکدیگر بودند. لذا معرفی آن‌ها به عنوان گونه‌های مترادف با یکدیگر بر اساس نظر برخی از گیاه‌شناسان مورد تأیید نمی‌باشد. بر این اساس، دو گونه مذکور، به عنوان گونه‌های مستقل و متمایز از یکدیگر تلقی می‌شوند. لازم به ذکر است که انجام مطالعات تکمیلی برای بررسی تنوع ژنتیکی این دو گونه به کمک مارکرهای مولکولی مختلف می‌تواند در تأیید نتایج حاضر، نیز حائز اهمیت باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات جناب آقای مهندس گلی‌پور برای جمع‌آوری نمونه‌های مرزه از رویشگاه‌های طبیعی و سرکار خانم دکتر سفیدکن برای تفسیر نتایج مربوط به GC-MS، کمال تشکر را داریم.

منابع

۱) امیدبیگی، ر. ۱۳۹۲. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. به نشر وابسته به انتشارات آستان قدس رضوی. جلد دوم. چاپ هفتم. ٤٤۲ صفحه.

۲) جم‌زاد، ز. ۱۳۹۱. فلور ایران: تیره نعنا (Lamiaceae). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. ۱۰۷٤ صفحه.

۳) زارع تیموری، س.، کریم زاده، ق و. الف، شریعت. ۱۳۹۸. تنوع کاریولوژیک و اندازه ژنوم در گیاه دارویی مرزه (*Satureja* spp.). چهارمین کنگره سالانه بین المللی توسعه کشاورزی، منابع طبیعی، محیط زیست و گردشگری ایران، تبریز.

٤) زارع تیموری، س.، کریم زاده، ق و. الف، شریعت. ۱٤۰۰. تنوع کروموزومی و اندازه ژنوم

در گیاه دارویی مرزه (*Satureja* spp.). تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۹ (۲): ۲۳۶-۲۵۰.

۵) نورمندمؤید، ف.، عباس‌زاده، ب و. ن، ولی‌زاده. ۱۴۰۲. بررسی کارایی مصرف کودهای آلی و شیمیایی در افزایش عملکرد کمّی و کیفی اسانس مرزه سهندی *Satureja sahendica* Bornm.. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۹ (۳): ۳۳۶-۳۵۱.

۶) هوشیدری، ف.، سفیدکن، ف و. م، نادری. ۱۳۹۶. مقایسه‌ی کمی و کیفی اسانس مرزه‌ی اورامانی *Satureja avromanica* Maroofi. در رویشگاه و مزرعه. مجله علوم باغبانی ایران (علوم کشاورزی ایران)، ۴۸(۱): ۱۴۹-۱۵۹.

7) Levan, A. K, Fredga. and A, Sandberg. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

8) Maroofi, H. 2010. Two New Plant Species from Kurdistan Province, West of Iran. *Iranian Journal of Bototanical*, 16 (1): 76-80.

9) Romero Zarco, C. 1986. A New Method for Estimating Karyotype Asymmetry. *Taxonomy*. 36: 526-530.

10) Salehi Vozhdehnazari, M. S M, Hesamzadeh Hejazi, F, Sefidkon, M, Ghanbari Jahromi. and A, Mousavi. 2022a. Karyotype Analysis of Populations in Five *Satureja* Species from Iran, *Journal of Medicinal plants and By-product*, 11(2): 149-158. https://doi:10.22092/jmpb.2021.354602.1360

11) Salehi Vozhdehnazari, M. S M, Hesamzadeh Hejazi, F, Sefidkon, M, Ghanbari Jahromi. and A, Mousavi. 2022b. Variability in Morphology and Essential Oil Profile for 30 Populations of *Satureja* Species with Respect to Climatic Paramours Using Multivariate Analysis: An Opportunity for Industrial Products. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 25(5): 994-1011.

12) Sefidkon, F. and Z, Jamzad. 2006. Essential Oil Analysis of Iranian *Satureja edmondi* and *S. isophylla*. *Flavour & Fragrance Journal*, 21: 230-233.

13) Shahnazi, S. F, Khalighi-Sigaroodi, Y, Ajani, D, Yazdani, R, Taghizad–Farid, M, Ahvazi, et al. 2008. The Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Satureja intermedia* C. A. Mey. *Journal of Medicinal Plants*, 7 (25): 85-92.

14) Stebbins, G L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold Publisher LDT, London, 216 pp.