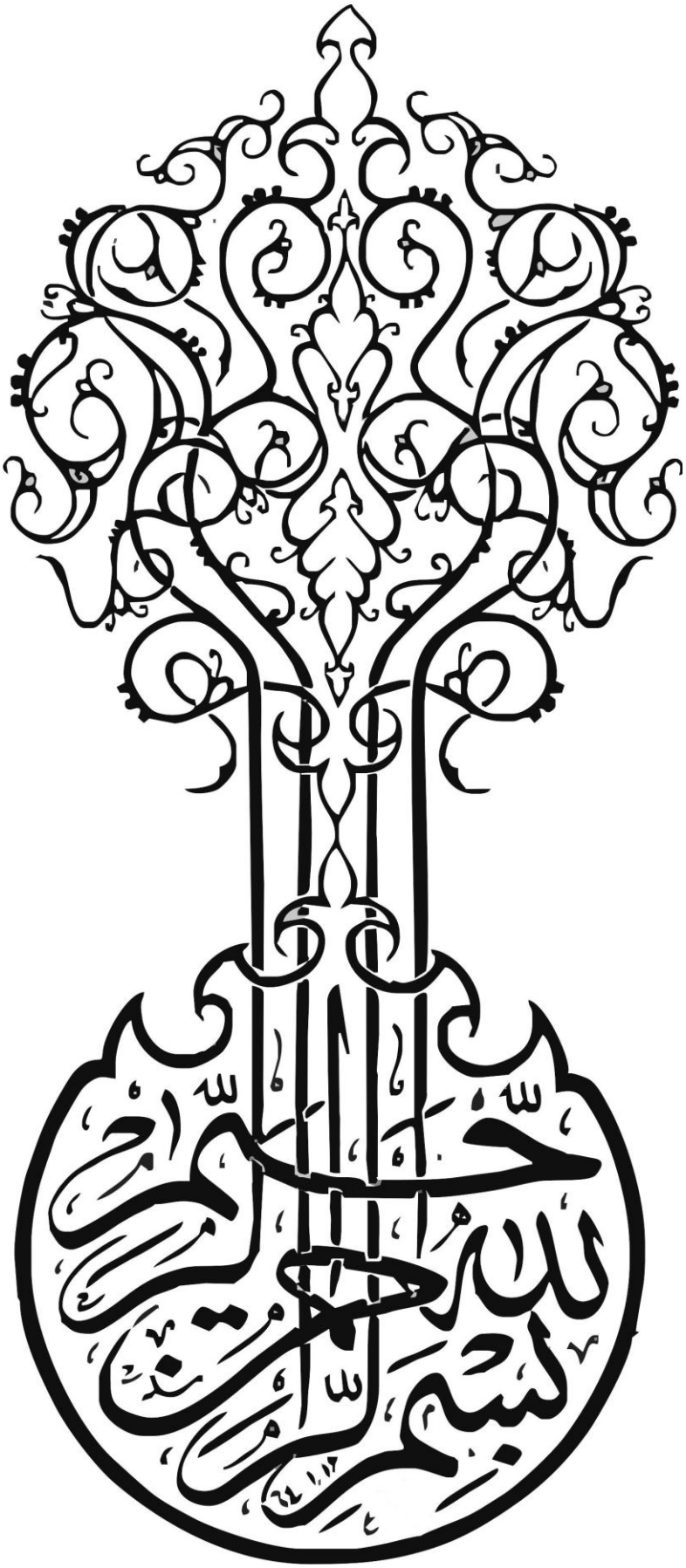
بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشگاه رازی
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی
گرایش اصلاح نباتات

بررسی تنوع کاریوتیپی و تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌هایی از آویشن با استفاده از نشانگرهای مولکولی

اساتید راهنما
دکتر عبداله نجفی
دکتر علیرضا زبرجدی

استاد مشاور
مهندس هوشمند صفری

نگارش
ولی‌اله یوسفی

اسفند ۱۳۹۰

دانشگاه رازی
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

ولی‌اله یوسفی

بررسی تنوع کاریوتیپی و تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌هایی از آویشن با استفاده از نشانگرهای مولکولی

در تاریخ **۱۳۹۰/۱۲ /۰۷** توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول دکتر عبداله نجفی با مرتبه علمی استادیار امضاء

۲- استاد راهنمای دوم دکتر علیرضا زبرجدی با مرتبه علمی دانشیار امضاء

۳- استاد مشاور مهندس هوشمند صفری با مرتبه علمی مربی پژوهشی امضاء

٤- داور داخل گروه دکتر کیانوش چقامیرزا با مرتبه علمی استادیار امضاء

٥- داور خارج گروه دکتر محسن فرشادفر با مرتبه علمی استادیار امضاء

اسفند ۱۳۹۰

تقدیر و تشکر:

سپاس و آفرین برخدای کامران و کامکار و آفریننده زمین و آسمان را که در پرتو لایزالش توفیق آموختن میسر گردید تا منت‌پذیر آستان کبریایش گردم. از **خانواده گرانقدرم** به‌خاطر تمام حمایت‌های مادی و معنوی ایشان در طول تحصیلم سپاسگزاری می‌کنم. همچنین از اساتید راهنمای محترم خود، آقایان **دکتر عبداله نجفی** و **دکتر علیرضا زبرجدی** و استاد مشاورم آقای **مهندس هوشمند صفری** که به مثابه معلمانی دلسوز در این مقطع تحصیلی و انجام این پایان نامه از راهنمایی‌ها و مشاوره‌های ارزنده ایشان همیشه برخوردار بوده‌ام، قدردانی می‌کنم.

از آقایان **دکتر کیانوش چقامیرزا** و **دکتر محسن فرشادفر** به خاطر قبول زحمت داوری و بازخوانی دقیق این پایان نامه و رهنمودها و پیشنهادهای ارزنده‌شان و همچنین از آقای **دکتر محمد اقبال قبادی** مدیریت محترم گروه اصلاح نباتات صمیمانه قدردانی می‌کنم.

لازم می‌دانم از اساتید دوره کارشناسی ارشدم آقایان **دکتر عزت اله فرشادفر، دکتر هومن سالاری، دکتر دانیال کهریزی، دکتر صحبت بهرامی نژاد، دکتر محسن سعیدی** و **دکتر مختار قبادی** به خاطر تمام زحماتی که در طول دوره تحصیلی‌ام بر ایشان تحمیل کرده‌ام کمال تشکر را داشته باشم. از آقای **دکتر داود صادق‌زاده اهری** و خانم **دکتر لیلا زارعی** به خاطر کمک زیادی که در جهت انجام این تحقیق به بنده کردند بر خود لازم می‌دانم کمال تشکر را داشته باشم.

نسبت به همکلاسی‌ها و دوستان گرامیم مهندس فرزاد احمدی‌آذر، مهندس عسگر رنجبر کله‌نو، دکتر مهرزاد اله قلی پور، دکتر ولی‌اله رسولی، دکتر حجت هاشمی‌نسب علی‌آبادی، دکتر مهدی گراوندی، حسین رستمی احمدوندی، رشید احمدیار، رضا اشرفی پارچین، محمد کاظم رحیمی، ابوالفضل عبداله‌زاده وانلوجق، اباسلط رستمی اجیرلو، شهاب فکری مِهین، مجید عبدلی، هاشم خدامرادی، عبدالرضا احمدپور، یونس اسمی‌زاده، همایون امیری کَندوله، هادی هاشم زاده، علیرضا کریمی، محمود حبیبیان شلمزاری، رضا عربی لارهنگ، وحید براتیان، مسلم ابدالی، علی مجیدزاده، حمید انصاری‌پور، جهاد سورنی، مهدی کرمی دهکردی، ناصر مرادی، سعید شیخه‌پور، غلامعلی سبعه، محمد پناه، کامران جهاندیده، کامران مرادپور، مهدی محمدی خانکِهدانی، میثم افسری اکبرآبادی، مریم سهرابی، مهین احمدی شاهدانی، نسیم فاضلی پیرکاشانی، سمیه ساردوئی، عاطفه ظاهری، سیدصلاح الدین حسینی، علی اکبرآبادی، سعید طاهری، مهدی آقایی‌نژاد، جواد معتمدی، مراد شعبان، محمد اسدی، نصراله مرادی‌کُر، اسداله مرادی حسن آباد، وحید پیری حسن آبادی، مسعود میرزایی، رسول کچویی سفیددشتی، سید یاسرالدین موسوی، محمدحسین رومنا، ایاز نادری چوپلو، داود امیرخانی، امیر قدس مطهری و مهدی شفیعی ابنوی ابراز تشکر داشته و از خداوند منان برای ایشان کسب‌موفقیت و کامیابی را در تمام مراحل زندگی خواستارم.

تقدیم به:

حضرت امام حسین (ع)

"اسوه انسانیت و آزادگی"

و

مادرم،

آیینه افتادگی، مهربانی، صبر و پارسایی که زندگی‌ام همه برایش رنج بود و وجودش همه برایم مهر؛

پدرم،

که استقامت و تلاشش شهامت زیستن را در من پرورش داد؛

و برادرانم

پشتیبان و دلخوشی‌ام در زندگی؛

وهمه کسانی که در راه **آبادانی سرزمین** و برقراری **عدالت** می‌کوشند.

چکیده

این تحقیق طی سال‌های۱۳۹۰-۱۳۸۹ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی و آزمایشگاه سیتوژنتیک مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه روی ۱۴ اکوتیپ مختلف آویشن انجام شد. طرح آزمایشی مورد استفاده برای مطالعه صفات کاریوتیپی طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار بود. تنوع ژنتیکی آویشن با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD و صفات کاریوتیپی مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۲۸ آغازگر ISSR مورد استفاده بیست آغازگر نوارهای مختلفی را تکثیر کردند. میزان چندشکلی حاصل از نشانگر ISSR برابر با ۹۶/۷۶ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA بر اساس نشانگر مولکولی ISSR اکوتیپ‌ها را بر اساس مکان جغرافیایی گروه‌بندی کرد. بیست آغازگر RAPD نیز نوارهای مختلفی تکثیر کردند. میانگین چندشکلی آغازگرهای RAPD، ۳۱/۹۴ درصد بود. با انجام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از داده‌های ژنوتیپی نشانگر RAPD اکوتیپ‌ها مطابق با مکان جغرافیایی دسته‌بندی شدند. میزان چندشکلی حاصل از ترکیب این دو نشانگر برابر با ۹۵/۲۸ درصد بود. با ترکیب داده‌های دو نشانگر مولکولی نیز اکوتیپ‌ها مطابق با مکان جغرافیایی گروه‌بندی شدند. میانگین شاخص نشانگر، نسبت چندشکلی مؤثر و قدرت تفکیک آغازگرهای RAPD بیشتر از آغازگرهای ISSR بود. میانگین شاخص محتوای چندشکلی دو نشانگر یکسان بود (۰/۴۳). بیشترین شباهت ژنتیکی بر مبنای هر دو نشانگر بین اکوتیپ‌های ۲۷۸۰۰ (نمونه شماره ۴ جمعیت سرعین، اردبیل) و ۲۷۸۱۴ (نمونه شماره ۶ جمعیت پارس‌آباد مغان، اردبیل) مشاهده شد. آزمون مانتل بین داده‌های نشانگرهای ISSR و RAPD حاکی از همبستگی معنی‌دار بین این دو نشانگر بود. در نتیجه می‌توان گفت که هر دو نشانگر ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های آویشن را نشان دادند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها برای صفات کاریوتیپی اختلافات بین اکوتیپ‌ها را آشکار کرد. تمام صفات کاریوتیپی مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بودند. گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA بر اساس صفات کاریوتیپی اکوتیپ‌ها با سطح پلوئیدی نمونه های آویشن مطابقت داشت. با انجام تجزیه به مولفه‌های اصلی برای صفات کروموزومی، دو مولفه مهم شناسایی شد که ۸۸/۹۲ درصد تنوع کل داده‌ها را تبیین کردند. آزمون مانتل بین داده‌های مولکولی و کاریوتیپی حاکی از وجود همبستگی پایین و غیرمعنی‌دار بود.

کلید واژه: آویشن، تنوع ژنتیکی، صفات کاریوتیپی، نشانگرهای ISSR و RAPD

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- اهداف تحقیق ۵

فصل دوم ۶

۲-۱- آویشن ۷

۲-۲- گیاه‌شناسی آویشن ۷

۲-۳- اکولوژی ۸

۲-۴- زراعت ۱۰

۲-۴-۱- کاشت ۱۰

۲-۴-۲- داشت ۱۱

۲-۴-۳- برداشت ۱۱

۲-۴-۴- عملیات پس از برداشت ۱۲

۲-۵-موارد استفاده آویشن ۱۲

۲-۵-۱ در طب قدیم ۱۲

۲-۵-۱ در طب جدید ۱۳

۲-۵-۳- مصارف غذایی ۱۴

۲-۶- سازگاری و مناطق پراکنش ۱۵

۲-۷- شیمی گیاه ۱۵

۲-۷-۱- مواد شیمیائی موثره و خواص درمانی آویشن ۱۶

۲-۸- اساس ژنتیکی مونوترپن‌های آویشن ۱۸

۲-۹- گلدهی و گرده‌افشانی ۲۰

۲-۱۰- تاکسونومی و گونه‌های آویشن ۲۱

۲-۱۰-۱- گونه‌های مهم جنس *Thymus* در ایران ۲۱

۲-۱۱- سیتوژنتیک آویشن ۲۳

۲-۱۱-۱- کروموزوم ۲۴

۲-۱۱-۲- کاریوتیپ ۲۴

۲-۱۱-۳- ویژگی‌های کاریوتیپی مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵

۲-۱۲- اهمیت تنوع ژنتیکی در اصلاح نباتات ۲۶

۲-۱۲-۱- اهمیت تعیین تنوع ژنتیکی بین گیاهان ۲۸

۲-۱۲-۲- هدف از تعیین تنوع ژنتیکی در به‌نژادی ۲۹

۲-۱۲-۳- الگوهای تنوع ۲۹

۲-۱۲-۴- عوامل موثر در تنوع ۲۹

۲-۱۳- روش‌های اصلاحی گیاه داروئی آویشن ۳۱

۲-۱۳-۱- تنوع ژنتیکی در آویشن و اهمیت آن ۳۲
۲-۱۴- انواع نشانگرها ۳۴
۲-۱۴-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی ۳۴
۲-۱۴-۲- نشانگرهای پروتئینی ۳۵
۲-۱۴-۳- نشانگرهای سیتوژنتیکی ۳۵
۲-۱۴-۴- نشانگرهای DNA ۳۷
۲-۱۵- عوامل موثر در انتخاب نشانگر ۳۷
۲-۱۶- انواع نشانگرهای DNA ۳۸
۲-۱۶-۱- نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون ۳۸
۲-۱۶-۱-۱- تکنیک RFLP ۳۸
۲-۱۶-۲- نشانگرهای مبتنی بر PCR ۳۸
۲-۱۶-۲-۱- چندشکلی طول قطعات حاصل از تکثیر(AFLP) ۳۹
۲-۱۶-۲-۲- ریز ماهواره ها (SSR) ۳۹
۲-۱۶-۲-۳- تکثیر نواحی بین ریز ماهواره‌ای یا بین توالی‌های تکراری ساده (ISSR) ۴۰
۲-۱۶-۲-۳-۱- مزایای تکنیک ISSR ۴۱
۲-۱۶-۲-۳-۲- معایب تکنیک ISSR ۴۲
۲-۱۶-۲-۴- DNA چند شکلی تکثیر شده تصادفی (RAPD) ۴۲
۲-۱۶-۲-۴-۱- مزایای تکنیک RAPD ۴۳
۲-۱۶-۲-۴-۲- معایب تکنیک RAPD ۴۳
۲-۱۷- بکارگیری نشانگرهای سیتوژنتیکی در تعیین تنوع ۴۴
فصل سوم ۴۶
۳-۱- تهیه نمونه گیاهی با استفاده از کشت بافت ۴۷
۳-۱-۱- ضدعفونی مواد گیاهی ۴۷
۳-۱-۲- تهیه محیط کشت ۴۷
۳-۱-۲-۱- محلول مادری ویتامین‌ها ۴۸
۳-۱-۲-۲- محلول مادری آهن با غلظت 10X ۴۸
۳-۱-۲-۳- محلول مادری مواد غذایی کم‌مصرف با غلظت 100X ۴۸
۳-۱-۲-۴- محلول مادری مواد غذایی پرمصرف با غلظت 10X ۴۸
۳-۱-۲-۵- محلول مادری یدید پتاسیم (ماده غذایی کم‌مصرف) با غلظت 1000X ۴۹
۳-۲- مواد گیاهی ۴۹
۳-۳- استخراج DNA ژنومی ۵۰
۳- ۴- تعیین کیفیت DNA ۵۱
۳- ۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۳
۳-۶- الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده ۵۷
۳-۷- رتبه‌بندی داده‌های حاصل از الکتروفورز ۵۸
۳-۸- شاخص‌های مولکولی ۵۹

۳- ۸- ۱- درصد چندشکلی ۵۹
۳- ۸- ۲- شاخص محتوای چند شکلی (PIC) ۵۹
۳- ۸- ۳- شاخص نشانگر(MI) ۵۹
۳- ۸- ۴- شاخص (EMR) ۵۹
۳- ۸- ۵- قدرت تفکیکRP ۵۹
۳-۹- خصوصیات طرح آزمایشی و مطالعات کاریوتیپی ۵۹
۳-۱۰-تهیه محلول‌های مورد نیاز ۶۰
۳-۱۰-۱- محلول α- برومونفتالین ۶۰
۳-۱۰-۲- لویتسکی ۶۰
۳-۱۰-۳- محلول NaOH ۱ نرمال..... ۶۰
۳-۱۰-۴- هماتوکسیلین ۶۰
۳-۱۱- مراحل تحقیق..... ۶۱
۳-۱۱-۱- جوانه‌دار کردن بذرها و تهیه نمونه‌های ریشه ۶۱
۳-۱۱-۱-۱- جوانه‌دار کردن بذرها..... ۶۱
۳-۱۱-۱-۲- القاء پیش‌تیمار شیمیایی ۶۱
۳-۱۱-۱-۳- شستشوی بعد از پیش‌تیمار ۶۲
۳-۱۱-۱-۴-عمل تثبیت..... ۶۲
۳-۱۱-۱-۵- شستشوی بعد از تثبیت ۶۲
۳-۱۱-۱-۶- نگهداری..... ۶۲
۳-۱۱-۱-۷- هیدرولیز ۶۳
۳-۱۱-۱-۸- رنگ‌آمیزی..... ۶۳
۳-۱۱-۱-۹- تهیه لام میکروسکوپی ۶۳
۳-۱۱-۲- عکس‌برداری و اندازه‌گیری کروموزوم‌ها..... ۶۳
۳-۱۱-۳- مقایسه تقارن کاریوتیپی ۶۵
۳-۱۱-۳-۱- روش استبینز..... ۶۵
۳-۱۱-۳-۲- روش رومرو-زارکو ۶۶
۳-۱۱-۳-۳- ضریب پراکندگی پیرسون ۶۶
۳-۱۱-۳-۴- روش هوزیوارا ۶۷
۳-۱۱-۳-۵- پارامتر اختلاف طول نسبی کروموزوم (DRL)..... ۶۷
۳-۱۲- تجزیه و تحلیل‌های آماری ۶۸
۳-۱۲-۱- تجزیه و تحلیل‌های آماری مطالعات کاریوتیپی ۶۸
۳- ۱۲- ۱-۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها..... ۶۸
۳-۱۲-۲- تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی ۶۸
فصل چهارم.....۶۹
۴-۱- نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی ۷۰
۴-۱-۱- نتایج حاصل از نشانگر ISSR ۷۰

۴-۱-۱-۱- چندشکلی در ISSR ۷۰
۴-۱-۱-۲- شاخص محتوای چندشکلی ۷۳
۴-۱-۱-۳- شاخص نشانگر و نسبت چندشکلی مؤثر ۷۴
۴-۱-۱-۴- قدرت تفکیک ۷۴
۴-۱-۱-۵- بررسی ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر ISSR ۷۴
۴-۱-۱-۶- نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR ۷۵
۴-۱-۱-۷- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر ISSR ۷۶
۴-۱-۲- نتایج حاصل از نشانگر RAPD ۷۸
۴-۱-۲-۱- چندشکلی در RAPD ۷۸
۴-۱-۲-۲- شاخص محتوای چندشکلی ۸۱
۴-۱-۲-۳- شاخص نشانگر و نسبت چندشکلی مؤثر ۸۲
۴-۱-۲-۴- قدرت تفکیک ۸۲
۴-۱-۲-۵- بررسی ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر RAPD ۸۳
۴-۱-۲-۶- نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD ۸۴
۴-۱-۲-۷- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر RAPD ۸۵
۴-۱-۳- نتایج حاصل از ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۸۷
۴-۱-۳-۱- بررسی ماتریس تشابه جاکارد بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۸۷
۴-۱-۳-۲- نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۸۸
۴-۱-۳-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۸۹
۴-۱-۴- مقایسه نشانگرهای ISSR و RAPD ۹۱
۴-۲- نتایج حاصل از مطالعات کاریوتیپی ۹۳
۴-۲-۱- ویژگی‌های سیتوژنتیکی نمونه‌ها ۹۳
۴-۲-۱-۱- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۸۲۰۹ (بوئین-داران-اصفهان) *Thymus daenensis* ۹۴
۴-۲-۱-۲- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ۲۱۱۱۸ (مزرعه گلویک-ندوشن-یزد) *Thymus kotschyanus* ۹۵
۴-۲-۱-۳- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۴۷۱ (سردشت-آذربایجان غربی) *Thymus kotschyanus* ۹۵
۴-۲-۱-۴- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۸۰۰ (سرعین-اردبیل) *Thymus kotschyanus* ۹۶
۴-۲-۱-۵- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۳۲۰۶ (دیلمان-سیاهکل-گیلان) *Thymus kotschyanus* ۹۷
۴-۲-۱-۶- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۸۱۴ (پارس‌آباد مغان-اردبیل) *Thymus kotschyanus* ۹۸
۴-۲-۱-۷- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۵۶۵۶ (شمال شهرک مهاجران-مرکزی) *Thymus sp.* ۱۰۰
۴-۲-۱-۸- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۲۲۱ (چادگان-اصفهان) *Thymus daenensis* ۱۰۰
۴-۲-۱-۹- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۵۹۵۱ (قروه-کردستان) *Thymus kotschyanus* ۱۰۱
۴-۲-۱-۱۰- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۷۵۰۷ (زاغه-خرم آباد-لرستان) *Thymus sp.* ۱۰۲
۴-۲-۱-۱۱- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۴۲۴۵ (خرم آباد-لرستان) *Thymus sp.* ۱۰۳
۴-۲-۱-۱۲- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۰۱۲۶ (فریدون‌شهر-اصفهان) *Thymus daenensis* ۱۰۴
۴-۲-۱-۱۳- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ روستای پارچین-اردبیل *Thymus sp.* ۱۰۵
۴-۲-۱-۱۴- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۴۲۸۷ (لندن-انگلیس) *Thymus vulgaris* ۱۰۶
۴-۲-۲- تجزیه آماری داده‌های سیتوژنتیکی ۱۱۲
۴-۲-۲-۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها ۱۱۲

۴-۲-۲-۲- بررسی همبستگی بین صفات ۱۱۴
۴-۲-۴-۳- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۱۱۵
۴-۲-۲-۴- تجزیه خوشه‌ای ۱۱۶
۴-۳- مقایسه نتایج مولکولی با نتایج کاریوتیپی ۱۱۹
۴-۴- نتیجه‌گیری کلی ۱۲۴
۴-۵- پیشنهادات ۱۲۵
منابع ۱۲۶

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- ترکیبات موجود در ۱۰۰ گرم پیکر رویشی خشک آویشن ۱۶
جدول ۲-۲- خصوصیات تیمول (فوریا و بلانس، ۱۹۹۵) ۱۷
جدول ۲-۳- خصوصیات کارواکرول (فوریا و بلانس، ۱۹۹۵) ۱۸
جدول ۳-۱- مشخصات اکوتیپ‌های مورد استفاده در این آزمایش ۴۹
جدول ۳-۲- غلظت و ترکیب مواد استفاده شده در واکنش PCR ۵۳
جدول ۳-۳- اسامی و مشخصات ۲۸ آغازگرISSR ۵۵
جدول ۳- ۴- مراحل واکنش دما و دوره های زمانی PCR با انتخاب دمای اتصال ۵۶
جدول ۳-۵- اسامی و مشخصات ۲۰ آغازگرRAPD ۵۶
جدول ۳- ۶- مراحل واکنش، دما و دوره های زمانی PCR با انتخاب دمای اتصال ۵۷
جدول ۳- ۷- صفات اندازه گیری شده برای کاریوتیپ‌های مورد مطالعه ۶۴
جدول ۳- ۸ - دسته‌بندی کروموزوم‌های هر کاریوتیپ بر اساس روش Levan ۶۵
جدول-۳- ۹ - جدول دو طرفه استبینز برای مقایسه تقارن کاریوتیپی ۶۶
جدول۴-۱- خصوصیات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ۱۴ اکوتیپ آویشن ۷۳
جدول۴-۲- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر ISSR ۷۵
جدول ۴-۳- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر ISSR ۷۸
جدول ۴-۴- خصوصیات آغازگرهای RAPD مورد استفاده ۸۱
جدول۴-۵- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر RAPD ۸۳
جدول ۴-۶- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر RAPD ۸۵
جدول ۴-۷- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۸۸
جدول ۴-۸- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۹۱
جدول۴-۹- مقایسه نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR، RAPD و ISSR+RAPD ۹۱
جدول ۴-۱۰- صفات مورد مطالعه و علائم اختصاری آن‌ها ۹۴
جدول ۴-۱۱- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۸۲۰۹ ..... ۹۴
جدول ۴-۱۲- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۱۱۱۸ ..... ۹۵
جدول ۴-۱۳- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۴۷۱ ..... ۹۶
جدول ۴-۱۴- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۸۰۰ ..... ۹۷
جدول ۴-۱۵- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۳۲۰۶ ..... ۹۸
جدول ۴-۱۶- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۸۱۴ ..... ۹۸
جدول ۴-۱۷- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۵۶۵۶ ..... ۱۰۰
جدول ۴-۱۸- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۷۲۲۱ ..... ۱۰۱
جدول ۴-۱۹- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۲۵۹۵۱ ..... ۱۰۲
جدول ۴-۲۰- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۷۵۰۷ ..... ۱۰۳
جدول ۴-۲۱- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۴۲۴۵ ..... ۱۰۴
جدول ۴-۲۲- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۰۱۲۶ ..... ۱۰۴

جدول ۴-۲۳- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ روستای پارچین-اردبیل ۱۰۶
جدول ۴-۲۴- تجزیه کاریوتیپ اکوتیپ ۱۴۲۸۷ ..... ۱۰۷
جدول ۴-۲۵- خصوصیات کاریوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۰۸
جدول ۴-۲۶- پارامترهای تقارن (تکامل) کاریوتیپی جمعیت‌های مورد مطالعه ۱۱۰
جدول ۴-۲۷- نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی ۱۱۲
جدول ۴-۲۸- مقایسه میانگین برای صفات کاریوتیپی به روش دانکن در سطح ۱٪ ۱۱۳
جدول۴-۲۹- ضرایب همبستگی صفات کاریوتیپی اندازه‌گیری شده ۱۱۴
جدول۴-۳۰- ضرایب همبستگی صفات مرتبط با تقارن کاریوتیپی ۱۱۴
جدول ۴-۳۱- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس صفات کاریوتیپی ۱۱۵
جدول ۴-۳۲- نتایج تجزیه خوشه‌ای در حالات مختلف ۱۱۸
جدول ۴-۳۳- ماتریس تشابه بین اکوتیپ‌ها بر اساس صفات سیتوژنتیکی ۱۱۹

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- توزیع شماتیک شیمیوتایپ‌های آویشن (*Thymus vulgaris*) در جنوب فرانسه و شمال شرقی اسپانیا ۹

شکل ۲-۲- بیوسنتز و کنترل ژنتیکی مونوترپن‌های غالب در *T. vulgaris* در جنوب فرانسه ۱۹

شکل۲-۳- تصاویر تهیه شده از سلول‌های مرحله متافازی آویشن (عکس از مولف) ۲۵

شکل ۴-۱- الگوی نواری ISSR در ۱۴ نمونه آویشن، آغازگر UBC-864; M: مارکر، C: کنترل ۷۰

شکل ۴-۲- الگوی نواری ISSR در ۱۴ نمونه آویشن با استفاده از آغازگر S3; M: مارکر، C: کنترل ۷۱

شکل ۴-۳- دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA ۷۶

شکل ۴-۴- نمودار پراکنش توده‌ها بر اساس نشانگر ISSR بر مبنای دو مؤلفه اصلی ۷۷

شکل۴-۵- نمودار ۳ بعدی بر اساس نشانگر ISSR بر مبنای دو مؤلفه اصلی ۷۷

شکل ۴-۶- الگوی نواری RAPD در ۱۴ نمونه آویشن با استفاده از آغازگر E7; M: مارکر، C: کنترل ۷۹

شکل ۴-۷- دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA ۸۵

شکل ۴-۸- نمودار پراکنش تودهها بر اساس نشانگر RAPD ۸۶

شکل ۴-۹- نمودار ۳ بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر RAPD ۸۶

شکل ۴-۱۰- دندروگرام حاصل از ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD بر اساس روش UPGMA ۸۸

شکل ۴-۱۱- نمودار پراکنش اکوتیپ‌ها بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۹۰

شکل۴-۱۲- نمودار سه بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس ترکیب دو نشانگر ISSR و RAPD ۹۰

شکل ۴-۱۳- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد نشانگرهای ISSR و RAPD ۹۳

شکل۴-۱۴- هیستوگرام آزمون منتل نشانگرهای ISSR و RAP ۹۳

شکل ۴-۱۵- آیدیوگرام اکوتیپ ۱۸۲۰۹ در مرحله متافاز میتوز ۹۴

شکل ۴-۱۶- آیدیوگرام اکوتیپ ۲۱۱۱۸ در مرحله متافاز میتوز ۹۵

شکل ۴-۱۷- آیدیوگرام اکوتیپ ۲۷۴۷۱ در مرحله متافاز میتوز ۹۶

شکل ۴-۱۸- آیدیوگرام اکوتیپ ۲۷۸۰۰ در مرحله متافاز میتوز ۹۷

شکل ۴-۱۹- آیدیوگرام اکوتیپ ۱۳۲۰۶ در مرحله متافاز میتوز ۹۷

شکل ۴-۲۰- آیدیوگرام اکوتیپ ۲۷۸۱۴ در مرحله متافاز میتوز ۹۸

شکل ۴-۲۱- سیتوتیپ اکوتیپ ۱۸۲۰۹ در متافاز میتوز ۹۹

شکل ۴-۲۲- سیتوتیپ اکوتیپ ۲۱۱۱۸ در متافاز میتوز ۹۹

شکل ۴-۲۳-سیتوتیپ اکوتیپ ۲۷۴۷۱ در متافاز میتوز ۹۹

شکل ۴-۲۴- سیتوتیپ اکوتیپ ۲۷۸۰۰ در متافاز میتوز ۹۹

شکل ۴-۲۵- سیتوتیپ اکوتیپ ۱۳۲۰۶ در متافاز میتوز ۹۹

شکل ۴-۲۶- سیتوتیپ اکوتیپ ۲۷۸۱۴ در متافاز میتوز ۹۹

شکل ۴-۲۷- آیدیوگرام اکوتیپ ۱۵۶۵۶ در مرحله متافاز میتوز ۱۰۰

شکل ۴-۲۸- آیدیوگرام اکوتیپ ۲۷۲۲۱ در مرحله متافاز میتوز ۱۰۱

شکل ۴-۲۹- آیدیوگرام اکوتیپ ۲۵۹۵۱ در مرحله متافاز میتوز ۱۰۱

شکل ۴-۳۰- آیدیوگرام اکوتیپ ۷۵۰۷ در مرحله متافاز میتوز ۱۰۲

شکل ۴-۳۱- آیدیوگرام اکوتیپ ۱۴۲۴۵ در مرحله متافاز میتوز ۱۰۳
شکل ۴-۳۲- آیدیوگرام اکوتیپ ۱۰۱۲۶ در مرحله متافاز میتوز..... ۱۰۴
شکل ۴-۳۳- سیتوتیپ اکوتیپ ۱۵۶۵۶ در متافاز میتوز ۱۰۵
شکل ۴-۳۴- سیتوتیپ اکوتیپ ۲۷۲۲۱ در متافاز میتوز ۱۰۵
شکل ۴-۳۵- سیتوتیپ اکوتیپ ۲۵۹۵۱ در متافاز میتوز ۱۰۵
شکل ۴-۳۶- سیتوتیپ اکوتیپ ۷۵۰۷ در متافاز میتوز ۱۰۵
شکل ۴-۳۷- سیتوتیپ اکوتیپ ۱۴۲۴۵ در متافاز میتوز ۱۰۵
شکل ۴-۳۸- سیتوتیپ اکوتیپ ۱۰۱۲۶ در متافاز میتوز ۱۰۵
شکل ۴-۳۹- آیدیوگرام اکوتیپ روستای پارچین-اردبیل در مرحله متافاز میتوز ۱۰۶
شکل ۴-۴۰- آیدیوگرام اکوتیپ ۱۴۲۸۷ در مرحله متافاز میتوز ۱۰۷
شکل ۴-۴۱- سیتوتیپ اکوتیپ روستای پارچین-اردبیل ۱۰۷
شکل ۴-۴۲- سیتوتیپ اکوتیپ ۱۴۲۸۷ در متافاز میتوز ۱۰۷
شکل۴-۴۳- پراکنش جمعیت‌ها بر اساس مقادیر A1 و A2..... ۱۱۰
شکل۴-۴۴- روند مشابه DRL و A2 بعنوان دو شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی ۱۱۱
شکل۴-۴۵- روند معکوس TF% و A1 به‌عنوان دو شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی ۱۱۱
شکل۴-۴۶- نمودار بای‌پلات جمعیت‌ها و صفات مورد بررسی با استفاده از مولفه اصلی اول و دوم ۱۱۶
شکل۴-۴۷- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس صفات کاریوتیپی مورد مطالعه ۱۱۷
شکل ۴-۴۸- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد نشانگر ISSR و داده‌های کاریوتیپی ۱۲۰
شکل۴-۴۹- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر ISSR و داده‌های کاریوتیپی..... ۱۲۰
شکل ۴-۵۰- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد نشانگر RAPD و داده‌های کاریوتیپی ۱۲۱
شکل۴-۵۱- هیستوگرام آزمون منتل نشانگر RAPD و داده‌های کاریوتیپی..... ۱۲۱
شکل ۴-۵۲- نمایش همبستگی ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد ترکیب داده‌های دو نشانگر ISSR و RAPD و داده‌های کاریوتیپی ۱۲۲
شکل۴-۵۳- هیستوگرام آزمون منتل ترکیب داده‌های دو نشانگر ISSR و RAPD و داده‌های کاریوتیپی..... ۱۲۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

براساس برآوردهای سازمان بهداشت جهانی، بیش از ۸۰ درصد از جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه سلامتی خود را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، مدیون گیاهان داروئی هستند و در کشورهای پیشرفته نیز استفاده از ترکیبات شیمیائی گیاهان داروئی رو به افزایش است (کانتر و همکاران، ۲۰۰۵). به دلیل عوارض فراوان ناشی از استفاده از داروهای شیمیائی مصنوعی، استقبال چشمگیری از داروهای طبیعی با منشاء گیاهی شده است، به‌طوری‌که تنها در کشور آمریکا میزان تجارت این داروها به ۶۲ میلیارد دلار در سال می‌رسد و انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۵۰ میلادی این میزان به ۵۰۰۰ میلیارد دلار برسد (کومار و گوپتا، ۲۰۰۸).

در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از ترکیبات شیمیائی که از قسمت‌های مختلف گیاهان داروئی به‌دست می‌آید افزایش یافته، به‌طوریکه بیش از ۴۰ درصد داروهای مورد استفاده در کشورهای اروپائی و آمریکائی منشاء گیاهی دارند (روت و همکاران، ۲۰۰۰؛ کومار و گوپتا، ۲۰۰۸). گیاهان داروئی هزاران سال است که در چین در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان به‌عنوان دارو، آنتی‌اکسیدان، چاشنی غذائی، رنگ، حشره‌کش، ضدعفونی کننده و خوشبو کننده در جهت بهبود زندگی بشر به‌کار می‌روند و به‌همین دلیل تولید این دسته از گیاهان هر ساله رو به افزایش است (کانتر و همکاران ، ۲۰۰۵؛ کومار و گوپتا، ۲۰۰۸). بیش از ۷۰ درصد از ۵۰۰۰۰ گونه گیاه داروئی که مورد استفاده قرار می‌گیرند، از طبیعت جمع‌آوری می‌شوند و تنها کمتر از ۱۰ درصد آن‌ها در کشورهای اروپائی مورد کشت قرار می‌گیرند که با توجه به فشار بر روی منابع طبیعی، نیازمند مطالعه بیشتر در این زمینه است (کانتر و همکاران ، ۲۰۰۵).

در میان گیاهان داروئی، برخی جنس‌ها و گونه‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند که عمدتاً بدلیل دارا بودن ترکیبات فیتوشیمیائی و متابولیت‌های فراوان و مختلف در آن‌هاست. گیاه آویشن (*Thymus sp.*) از جمله این گیاهان می‌باشد که با دارا بودن بیش از ۲۰ نوع ترکیب شیمیائی شناخته شده و موثر، در زمره مهمترین گیاهان داروئی به شمار می‌رود (اوزگوون و تانسی، ۱۹۹۸؛ سوتو- مندیویل و همکاران، ۲۰۰۶؛ هورواث و همکاران، ۲۰۰۸). جهت اصلاح گیاهان در راستای افزایش کمی و کیفی آن‌ها، شناخت صحیح از اساس ژنتیکی و سیستم باروری آن ضروری می‌باشد. امروزه علاوه‌بر روش‌های سنتی (متداول) اصلاحی، روش‌های نوینی مانند انتقال ژن (ترانسفورماسیون یا مهندسی ژنتیک) و کشت بافت و سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند (کانتر و همکاران، ۲۰۰۵).

خانواده نعناعیان (Lamiaceae) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که دارای پراکنش جهانی می‌باشد (به غیر از مناطق قطب شمال و جنوب) و دارای حدود ۲۰۰ جنس و ۲ تا ۵ هزار گونه از بوته‌های معطر و درختچه‌های کوتاه است. اغلب نعناعیان تولیدکننده ترپن‌ها و انواع دیگر ترکیبات هستند که این ترکیبات را به‌طور عمده در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی ذخیره می‌کنند (بقالیان و نقدی‌بادی، ۱۳۷۹). بیش از ۵۰ گیاه مختلف آویشن نامیده می‌شوند که بیشتر آن‌ها به جنس *Thymus* تعلق دارند اما بعضی از آن‌ها جزء خانواده Lamiacaea هستند. مهم‌ترین کشورهای تولید کننده آویشن اسپانیا و ترکیه می‌باشند که تمامی تولید این گیاه به صورت وحشی صورت می‌گیرد. فرانسه، مجارستان و هلند نیز از نظر تولید در مقام‌های بعدی قرار دارند. آویشن (*Thymus sp.*) یکی از گیاهان تیره نعناعیان است که به‌صورت بوته‌های پرپشت در دامنه‌های خشک و بین تخته سنگ‌های مختلف مدیترانه از جمله در کشورهای فرانسه، پرتغال، اسپانیا، ایتالیا و یونان می‌روید (زرگری، ۱۳۶۹). این گیاه در نواحی نیمه خشک نیوزیلند به میزان چندین هزار هکتار به‌صورت خودرو وجود دارد (مک گیمپسی و همکاران، ۱۹۹۴). این گونه در کشور ما به‌طور وحشی دیده نشده است (زرگری، ۱۳۶۹). البته آویشن همه ساله در سطح وسیعی از کشورهای اسپانیا، آلمان، فرانسه، پرتغال، آمریکا، چک، اسلواکی، مجارستان و شمال آفریقا کشت می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۷۹). در ایران نیز سطح کشت این گونه رو به افزایش است.

از آویشن در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می‌شود. روغن آویشن دارای خواصی نظیر ضداسپاسم، ضدنفخ، ضدقارچ، ضدعفونی کننده، ضدکرم، ضدرماتیسم و خلط‌آور می‌باشد. اسانس آویشن از جمله ده اسانس معروف است که دارای خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی، آنتی‌اکسیدان، نگهدارنده طبیعی غذا و تأخیردهنده پیری پستانداران می‌باشد و جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد (مالک و همکاران، ۱۹۸۷؛ جیمز و همکاران، ۱۹۹۲). همچنین آویشن در انواع غذاها استفاده می‌شود و به‌عنوان ترکیبات معطر در اکثر فرآورده‌های غذایی مهم نظیر مشروبات و دسرهای لبنیاتی استفاده می‌شود (لئونگ و فاستر، ۱۹۹۶). اروپا به همراه آمریکا یکی از بازارهای عمده مصرف‌کننده آویشن است. آمارهای تجاری نشان می‌دهد که آمریکا سالیانه حدود ۱۰۰۰ تن آویشن وارد می‌کند. ۹۰ درصد از روغن آویشن در تجارت جهانی در اسپانیا تولید می‌شود (مک گیمپسی، ۱۹۹۳).

تنوع ژنتیکی از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است و سازگاری درازمدت و بقای جمعیت را تضمین می‌کند. افزایش جمعیت، عامل اصلی استفاده بی‌رویه از منابع طبیعی در جهت افزایش تولیدات کشاورزی می‌باشد. در بسیاری از موارد، این افزایش تولید با تخریب منابع زیستی و فرسایش شدید ذخایر توارثی همراه بوده است (رهایی، ۱۳۸۱). تنوع ژنتیکی اساس اصلاح‌نباتات است که از تکامل طبیعی ناشی شده و از اجزای مهم پایداری نظامهای بیولوژیکی می باشد (فراهانی و ارزانی، ۱۳۸۵). تنوع و انتخاب دو رکن اساسی در هر برنامه اصلاحی بوده که انجام انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب از لحاظ ویژگی‌های مورد بررسی است (اسلاجرن و ون، ۱۹۹۴). بیشتر به‌نژادگران معتقدند که