بسم الله الرحمن الرحيم

همه ی امتیازات این پایان نامه به دانشگاه لرستان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب در مجلات، کنفرانس ها یا سخنرانی ها، باید نام دانشگاه لرستان (یا استاد یا اساتید راهنمای پایان نامه) و نام دانشجو با ذکر ماخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

تقدیم به:

پدر و مادرم که در تک تک لحظات تحصیلم مشوق و یاری رسانم بودند

و

همسر عزیزم که با صبر و محبت بی دریغش همیشه باعث دلگرمی ام بوده است

تشکر و قدردانی:

ای بس نباشیم و جهان خواهد بود　　فی نام زما و فی نشان خواهد بود

زین پیش نبودیم، نبود هیچ خلل　　زین پس چو نباشیم همان خواهد بود

به امید آنکه بیمودن مدارج تحصیلی و مراتب علمی مافرزندان این مرز پرگهر همراه و هم سنگ با افزایش سطح معرفت و اخلاق باشد و با عنایات حضرت دوست اوج سعادت ایران و ایرانی را شاهد باشیم.

بر خود لازم می دانم که از:

همسر مهربانم که همواره مشوق من در راه تحصیل علم بوده و در این راه از هیچ تلاشی فروگذار نبوده است؛

اساتید راهنمای بزرگوارم جناب دکتر احمد اسماعیلی و جناب دکتر حسن مداح عارفی که در طول انجام این پایان نامه نهایت راهنمایی و مساعدت را به اینجانب داشته اند؛

جناب دکتر فرهاد نظریان که در مدت اجرای این پروژه از هر گونه راهنمایی دریغ نفرمودند و خانم مهندس نرگس ابدالی و مهندس سید ایمان طباطبایی که از مشاوره های ایشان نهایت استفاده را برده ام؛

خانم مهندس نوروزی مقدم کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده ی کشاورزی دانشگاه لرستان و دوستان ارجمندم آقایان علی گراوند، محمد صالحی پور، مجید عبدالغفوریان، محمد فرهمند نژاد، کیوان صالحی، سلمان کیانی، محمدمهدی مردانی، عادل نوروزیان، کرم نادری، هاشم خواجه، سیامک بیرانوند، اصغر طاهری فر، مهدی هاتفی، یعقوب شبانی نژاد، سعید مالکی، محمد یعقوبی، رضا امینی و خانم ها مجیری، ترابیان و پنجو و سایر عزیزانی که همراهی و تعامل با ایشان برایم مغتنم بوده است نهایت تشکر و سپاس گذاری را داشته باشم.

محمود ضابطی

zabetimahmood@yahoo.com

تیرماه ۹۰

دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

عنوان پایان‌نامه

ارزیابی تنوع ژنتیکی بین توده‌های آویشن(*Thymus*) ایران با استفاده از نشانگر دی ان ِای چندشکل تکثیر شده تصادفی(RAPD)

نگارش

سید محمود ضابطی

اساتید راهنما

دکتر احمد اسماعیلی

دکتر حسن مداح عارفی

استاد مشاور

دکتر هادی احمدی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته اصلاح نباتات

تیرماه ۱۳۹۰

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲-۱-آویشن ۹
۲-۱-۱- گیاه‌شناسی ۱۰
۲-۱-۲- شیمی گیاه ۱۱
۲-۱-۳- ارتباط اکولوژی با ترکیبات ثانویه گیاه آویشن ۱۲
۲-۱-۴- زراعت ۱۴
۲-۱-۵- ژنتیک و پلی‌پلوئیدی ۱۴
۲-۱-۶- گونه‌های مهم جنس *Thymus* در ایران ۱۵
۲-۱-۷- موارد استفاده ۱۷
۲-۲- نشانگرهای ژنتیکی ۲۰
۲-۲-۱- انواع نشانگرهای ژنتیکی ۲۰
۲-۲-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی ۲۰
۲-۲-۱-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی و فیزیولوژیکی ۲۱
۲-۲-۱-۳- نشانگرهای مولکولی ۲۱
۲-۲-۲- ویژگی نشانگرهای مولکولی ۲۱
۲-۲-۳- نشانگرهای مولکولی پروتئینی ۲۲
۲-۲-۴- نشانگرهای مولکولی DNA ۲۳
۲-۲-۴-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۳
۲-۲-۴-۲- پروفایل حرارتی سیکل‌های PCR ۲۴

۲-۲-۴-۳- دمای ذوب (Tm) آغازگرها ۲۵
۲-۲-۴-۴-تشخیص و تجزیه فرآورده‌های PCR ۲۷
۲-۲-۵-PCR با آغازگرهای اختیاری ۲۷
۲-۳-کاربردهای نشانگرهای مولکولی ۳۳
۲-۳-۱- کاربرد نشانگرهای مولکولی در بررسی ژنتیکی جمعیت‌ها ۳۳
۲-۳-۲-کاربرد انگشت‌نگاری DNA در علوم گیاهی ۳۴
۲-۴-هم‌ولوژی باندها ۳۵
۲-۵- کدام نشانگر برای کدامین هدف ۳۷
۲-۶- مروری بر پژوهش‌های انجام شده [illegible] آویشن ۳۷
۲-۶-۱- نشانگرهای ژنتیکی و کاربرد آن در مطالعات آویشن ۳۷
۲-۶-۲- کاربرد نشانگرهای RAPD در تحقیقات آویشن ۴۱
۲-۷- روش‌های آماری ۴۴
۲-۷-۱- پارامترهای تنوع ۴۴
۲-۷-۲- فواصل ژنتیکی ۴۶
۲-۷-۳- تجزیه خوشه‌ای (Cluster analysis) ۴۶
۲-۷-۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) ۴۸

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد آزمایشگاهی ۵۱
۳-۱-۱- توده‌های آویشن مورد استفاده ۵۱
۳-۱-۲- مواد شیمیایی ۵۳
۳-۲- دستگاه‌های آزمایشگاهی ۵۴

۳-۳- روش‌های آزمایشگاهی ۵۴
۳-۳-۱- استخراج DNA ۵۴
۳-۳-۲- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA ۵۶
۳-۳-۳- واکنش RAPD-PCR ۵۷
۳-۳-۴- بهینه‌سازی واکنش PCR ۶۰
۳-۳-۵- الکتروفورز محصولات PCR ۶۱
۳-۴- روش‌های آماری مورد استفاده ۶۱

فصل چهارم: نتایج، بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- نتایج استخراج DNA ۶۵
۴-۱-۱- نتایج آنالیز طیف UV، IR و GCMass ۶۶
۴-۲- نتایج مربوط به گرادیان دمایی واکنش‌های PCR ۷۱
۴-۳- نتایج چندشکلی آغازگرها ۷۲
۴-۳-۱- آغازگرها با باند اختصاصی ۷۷
۴-۴- آنالیز داده‌ها ۷۹
۴-۴-۱- تجزیه به مولفه‌های اصلی ۸۲
۴-۴-۲- آنالیز توده‌ها با منشا جغرافیایی مشخص ۸۵
۴-۴-۳- آنالیز گونه‌ها ۸۷
۴-۵- نتیجه‌گیری ۹۹
۴-۶- پیشنهادات ۱۰۰
۴-۷- منابع ۱۰۱

چکیده:

آویشن یک گیاه معطر و دارویی با اهمیت فزاینده در کشاورزی و اقتصاد می‌باشد. در این جنس هیبریداسیون بین گونه‌ای و تنوع مورفولوژیکی به وفور یافت می‌شود؛ که این امر مشکلاتی را در شناسایی گونه‌های جنس آویشن به وجود می‌آورد. بنابراین به علت وجود مشکلات در شناسایی این جنس، کاربرد نشانگرهای مولکولی به علت مستقل بودن از شرایط محیطی و دارا بودن چند شکلی بیشتر نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در تشخیص گونه‌های این جنس مورد توجه قرار گرفته‌است. استخراج DNA بر اساس روش تغییریافته خانوجا انجام گرفت. در این پژوهش ۷۰ توده آویشن که از مناطق مختلف جمع‌آوری شده بود بوسیله ۳۰ آغازگر RAPD بررسی گردید. همچنین در این مطالعه ۳٤ توده که شامل ۵ گونه آویشن بودند، بوسیله ۳۰ آغازگر RAPD آنالیز شدند. آنالیز آموا و تنوع ژنتیکی شانون، تنوع ژنتیکی بیشتری را در داخل گونه‌ها نسبت به بین گونه‌ها نشان داد. با استفاده از این نشانگر ٤۰۷ باند قابل امتیازدهی ایجاد شد که ۳۲۰ باند چندشکلی مناسبی نشان دادند. درصد چندشکلی با میانگین ۷۸٪ از ۱۰۰٪ برای آغازگرهای B06، D05، OPA2، OPB5 و OPZ10 با بیشترین درصد چندشکلی تا ۵۰٪ برای آغازگرهای D13، OPB10 و OPY7 با کمترین درصد چندشکلی متغیر بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) در توده‌های مورد بررسی ۰/۲۵ محاسبه شد. ماتریس تشابه حاصل از ضریب جاکارد و دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA به دست آمد. دندوگرام مربوطه توسط نرم افزار داروین ترسیم گردید. براساس ضرایب تشابه به دست آمده، ارزش تشابه ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از ۰/٤۵ تا ۰/۹۳ نشان داد و ۱۰ گروه اصلی به دست آمد. پروفایل باندی RAPD نشان داد که این نشانگر به خوبی توانسته بود که توده‌های آویشن را تفکیک کند و همچنین برخی از تفاوت‌هایی را که در اثر جدایی جغرافیایی بوجود آمده را نشان دهد. نتایج نشان داد که روش RAPD حاوی اطلاعات مفید و مناسبی جهت برآورد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های آویشن است. از آنجایی که جمعیت‌های طبیعی آویشن یک منبع مهم ژنتیکی است، بنابراین اطلاعات تنوع ژنتیکی می‌تواند منبع بالقوه‌ای جهت مواد اصلاحی برای پیشرفت صفات تجاری در گیاه آویشن باشد.

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

کشور ایران رویشگاه گونه‌های بی‌شماری از گیاهان خودرو است که با مناطق مختلف این کشور پهناور سازگار شده‌اند و جزء منابع با ارزش ژنتیکی در تحقیقات بنیادی و کاربردی اصلاح نباتات به شمار می‌آیند و در برطرف کردن نیازهای انسان می‌توانند کمک شایانی نمایند (امیدبیگی، ۱۳۷۹). اطلاعات و دانش بشر در مورد مسایل تنوع گیاهان دارویی بسیار اندک است. پس از یک دوره طولانی تخریب و تضییع پوشش گیاهی اکنون ناچار به احیا، توسعه و به‌کارگیری اصولی گیاهان دارویی در طبیعت ایران هستیم.

موسسات داروسازی خواهان گیاهان یک‌دست و استاندارد با مواد موثره یکنواخت و معینی می‌باشند که این ویژگی‌ها در گیاهان وحشی به جهت وجود تنوع ژنتیکی و متفاوت بودن شرایط محیطی، زمان برداشت و روش‌های خشکانیدن وجود ندارد؛ در صورتی‌که خصوصیات ذکر شده در گیاهان دارویی-زراعی به دلیل یکنواخت بودن شرایط فوق قابل حصول است و برای رسیدن به این هدف بایستی در زمینه‌های به‌نهژادی و به‌زراعی، تحقیقاتی انجام شود.

اگرچه کاشت گیاهان دارویی و استفاده از آن‌ها قدمت طولانی دارد، ولی در زمینه اصلاح و به‌نژادی آن‌ها تاکنون پیشرفت قابل ملاحظه‌ای صورت نگرفته است. برخی محققین معتقدند که هنوز در ژرم‌پلاسم و ذخایر توارثی، پتانسیل و تنوع ژنتیکی بسیاری نهفته است که می‌توان از طریق انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و تلفیق این توانایی‌های ژنتیکی، گام‌های موثر و کاربردی در جهت بهبود عملکرد آن‌ها برداشت (امیدبیگی، ۱۳۷۹).

هدف عمده از اصلاح گیاهان دارویی بهبود کمیت و کیفیت آن دسته از مواد و ترکیباتی است که در صنایع دارویی از اهمیت خاصی برخوردار است. در زمینه اصلاح گیاهان دارویی اولین حرکت بایستی از طریق انتخاب بهترین و مناسب‌ترین پایه‌ها از توده‌های محلی شروع شود، بنابراین ضروری است ابتدا به جمع‌آوری و ارزیابی مواد ژنتیکی پرداخته، سپس انواع روش‌های اصلاحی را بر آن اعمال کرد (Pourohit and Vyas, 2004).

یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی نوین مبتنی بر استفاده از ارقام اصلاح شده با بیشترین عملکرد و کیفیت، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی است. اگرچه تخمین کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و در برخی موارد غیر ممکن است، اما تردیدی نیست که بسیاری از ژن‌های مفید از دست رفته‌اند، ذخایر ژنتیک با سرعت فزاینده‌ای کاهش یافته و محصولات زراعی عمده در معرض تهدید روز افزون

شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار گرفته‌اند. بنابراین، امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیک، از اهمیت بسیاری برخوردار است (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦).

وجود تنوع ژنتیکی مبنای همه گزینش‌ها است. با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جمعیت، حدود انتخاب چه طبیعی و چه مصنوعی وسیع‌تر می‌شود. از دیگر دلایل مهم بودن بررسی تنوع ژنتیکی، استفاده در مدیریت مجموعه‌های ژنتیکی با هدف کاهش هزینه‌ها، افزایش دقت و قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاحی است. یکی از پایه‌های اساسی اصلاح نباتات دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦). برای دستیابی به واریته‌های جدید و متحمل به آسیب‌های زنده و غیر زنده وجود تنوع ژنتیکی کافی و قابل دسترس در جمعیت‌های مورد مطالعه، امری حیاتی است. در برنامه‌های به‌نژادی کوشش‌های زیادی برای پیش‌بینی دورنمای ژنوتیپ‌های قوی در حال توسعه از یک تلاقی، با اندازه‌گیری مشابهت‌های ژنتیکی و یا فاصله ژنتیکی بین والدین به عمل آمده است، که از آنها در تخمین تنوع ژنتیکی مورد انتظار گروه‌های مختلف توده‌های در حال تفرق می‌توان استفاده نمود (سنجری پیرایواتلو، ۱۳۸۷). بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین و درون جمعیت‌ها، گونه‌ها و افراد مختلف یکی از اهداف اصلی و اولیه بسیاری از تحقیقات زیست‌شناسی و گیاه‌شناسی است. آگاهی از میزان تنوع ژنتیک ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی در اصلاح نباتات برای تولید ارقام هیبرید مهم می‌باشد؛ زیرا که تولید ارقام هیبرید مبتنی بر انتخاب والدین متنوع و دارای عملکرد مطلوب بوده تا در نتیجه آن، حداکثر هتروزیس در نتاج حاصل شود. از طرف دیگر اطلاع از میزان چندشکلی یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف، به منظور کاهش حجم نمونه‌های ذخایر توارثی نگهداری شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر بخصوص در گیاهان دگرگشن بسیار مفید خواهد بود. همچنین یکی از مهمترین موارد در گسترش سطح زیر کشت گیاهان، شناسایی و انتخاب نمونه مناسب برای هر منطقه می‌باشد؛ این عمل را می‌توان با استفاده از انتخاب به کمک نشانگر که یکی از کاربردهای مهم نشانگرهای ژنتیکی است انجام داد (بی‌همتا و همکاران، ۱۳۸۸). اولین راه حفاظت گونه‌ها، شناسایی و حفظ تنوع ژنتیکی در داخل گونه‌ها است که امکان دستیابی به یک مخزن ژنتیکی را فراهم می‌کند (Shasany *et al.*, 2005). بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصین اصلاح نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم آن، یاری می‌نماید و مطالعه الگوپذیری و تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ‌ها، نشان‌دهنده سازگاری‌های احتمالی آن‌ها با محیط‌های متفاوت می‌باشد (Loarcio *et al.*, 1996).

روش‌های کلاسیک تخمین تنوع ژنتیکی بین گیاهان، برپایه خصوصیات ریختی استوار بوده ولی این خصوصیات تحت تاثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرند (Ford-Lloyd and Painting, 1996). برنامه‌های اصلاحی قدیمی از طریق آمیزش افراد و انتخاب نوترکیب‌های مطلوب از بین نسل‌های حاصل از آمیزش صورت می‌گرفت. چنین برنامه‌هایی بسیار پرزحمت و وقت‌گیر هستند. تکنولوژی DNA نوترکیب و مهندسی ژنتیک هم با اینکه می‌توانند بر بعضی محدودیت‌ها فایق آیند ولی بدلیل کافی نبودن تعداد ژن‌های کلون شده و فقدان دستورالعمل‌های انتقال ژن به بسیاری از گونه‌های زراعی، محدودیت دارند. از طرفی دست‌کاری صفات چند ژنی بوسیله روش‌های مهندسی ژنتیک مشکل است.

نشانگرهای مورفولوژیکی به شدت تحت تاثیر شرایط محیط و مرحله رشد موجود است، فراوانی و تنوع کمی دارند و گاهی برای مشاهده و ثبت آن‌ها باید منتظر ظهور آن‌ها ماند و در کل، اساس ژنتیک بسیاری از نشانگرهای مورفولوژیک هنوز مشخص نشده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦).

امروزه از چندشکلی DNA و پروتئین به عنوان یک نشانگر مولکولی در تحقیقات فیلوژنی، تاکسونومی، اکولوژی، ژنتیک و اصلاح گیاهان استفاده می‌شود (بی‌همتا و همکاران، ۱۳۸۸).

کاربرد نشانگرهای آیزوزایمی در اواخر دهه ۵۰ تا ۷۰ در بررسی تنوع ژنتیکی و تاکسونومی گیاهان سبب شد تا نقشه‌های ژنتیکی حاوی نشانگرهای مورفولوژیکی و آیزوزایمی برای برخی گونه‌های مهم زراعی در اواخر دهه ۷۰ بدست آید. ولی از آنجایی که نشانگرهای آیزوزایمی و مورفولوژیکی محدود هستند، بنابراین نقشه‌های تهیه شده تا آن زمان، نقشه‌های بسیار خلوتی بودند.

کشف آنزیم‌های برشی در دهه ۷۰ و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] در دهه ۸۰ از جمله موفقیت‌های قابل توجهی بود که امکان بررسی تنوع و چندشکلی صفات موجودات را در سطح DNA فراهم نمود (باقری و همکاران، ۱۳۸٦).

از طریق نشانگرهای مولکولی می‌توان از فاصله ژنتیکی بین والدین، جهت پیشگویی عملکرد هیبریدها استفاده کرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦).

گسترش علوم و فن آوری مولکولی در تجزیه و تحلیل مواد ژنتیکی، سبب افزایش دانش بشریت در علم ژنتیک و شناخت ساختمان و رفتار ژنوم‌های گیاهان زراعی گردیده است

1- Polymerase Chain Reaction (PCR)

(سنجری پیرایواتلو، ۱۳۸۷). نشانگرهای مولکولی به علت مستقل بودن از شرایط محیطی و دارا بودن چند شکلی بیشتر نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در تشخیص ارقام زراعی و گونه‌های وحشی مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین فناوری مولکولی، به خصوص نشانگرهای مولکولی، برای نظارت توالی DNA درون گونه‌ای و بین گونه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد و با معرفی شاخص‌های مناسب جدید، از نژادهای محلی و گونه‌های علفی مربوطه، منابع جدیدی از تنوع ژنتیکی را به وجود می‌آورد (سنجری پیرایواتلو، ۱۳۸۷). در بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نشانگرهای مولکولی می‌توان برای مطالعات فیلوژنتیکی، اکولوژی گیاهان و همچنین تجزیه پاتوژن استفاده کرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦). توان شناسایی ارقام با نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، در مدیریت نمونه‌های جمع آوری شده ژرم پلاسم تسهیل می‌شود و ارقام یکسان با اسامی متفاوت مشخص می‌گردند (عبدمیشانی و نجات بوشهری، ۱۳۸۷).

از اواخر دهه ۸۰ تاکنون تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک تکنیک گسترده برای اکثر پژوهش‌ها شد و منجر به پیشرفت چندین آزمایش ژنتیکی جدید برپایه گزینش DNA تکثیر شده، گردید (Erlich, 1989). کارایی نشانگرهای مبتنی برDNA معمولاً بوسیله تکنولوژی که آن‌ها برای آشکارسازی چندشکلی برپایه DNA استفاده می‌کنند، تعیین می‌شود (Bardakci, 2000).

در مقایسه با نشانگرهای دیگر، تکنیک RAPD نیازمند هضم با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده، تهیه و نشاندار کردن کاوشگر و یا داشتن اطلاعات اولیه در مورد توالی ژنوم نمی‌باشد؛ در نتیجه روشی سریع بوده، تجزیه تحلیل آن آسان و نیاز به مقدار کمی DNA دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸٦).

آویشن از قدیمی‌ترین و مهمترین گیاهان دارویی است و در دهه‌های اخیر به سبب کاربردهای متعدد در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی جزء مهمترین گیاهان در عرصه تجارت جهانی بوده و مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. با توجه به عوارض جانبی و آثار سوء ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و وارداتی بودن فرآورده‌های دارویی در ایران انجام تحقیقات بر روی این گیاه باارزش، ضروری است.

از آنجا که آویشن‌های خودروی مناطق مختلف کشور از نظر ساختار ژنتیکی و روغن‌های پایه و اسانس بسیار متفاوتند و گاهی هم ماده موثره آن‌ها کمیت و کیفیت لازم برای استفاده صنعتی را ندارند، استفاده از ارقام محلی مستلزم جمع‌آوری نمونه‌های مناطق مختلف کشور، ارزیابی آن‌ها از نظر ژنتیکی و تنوع موجود در آن‌ها است. بنابراین، با توجه به مشکلات موجود در زمینهٔ شناسایی

این گیاه و دشواری تعیین موقعیت تاکسونومی گونه‌ها در جنس تیموس (به علت هیبریداسیون بین گونه‌ای و تنوع مورفولوژیکی)؛ کاربرد تکنیک‌های نوین نشانگرهای DNA، می‌تواند ابزار قدرتمندی در استفاده موثر از گونه‌های این گیاه دارویی محسوب شود. لذا در این تحقیق سعی گردید با استفاده از نشانگر رپید، تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های آویشن ایران بررسی گردد.

اهداف تحقیق:

۱) بررسی تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های آویشن جمع‌آوری شده از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران

۲) تعیین فواصل ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه

فرضیات تحقیق:

۱) بین مواد ژنتیکی مورد مطالعه، تنوع ژنتیکی وجود ندارد.

۲) مواد ژنتیکی با زیست گاه‌های مختلف در گروه‌های متفاوتی قرار نمی‌گیرند.

فصل دوم

کلیات

و

بررسی منابع

کلیات

۲-۱-آویشن

خانواده نعناعیان[۱] 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 دو تا پنج هزار گونه از بوته‌های معطر و درختچه‌های کوتاه است (بقالیان و نقدی‌بادی، ۱۳۷۹). این خانواده در ایران شامل ٤٦ جنس و ٤١٠ گونه و زیر گونه می‌باشد (Naghibi *et al.*, 2005). اغلب نعناعیان تولید کننده ترپن‌ها و انواع ترکیبات دیگر هستند که این ترکیبات را (به طور عمده) در غدد اپیدرمی برگ‌ها، ساقه‌ها و اندام‌های زایشی ذخیره می‌کنند (بقالیان و نقدی‌بادی، ۱۳۷۹).

جنس آویشن با نام علمی *Thymus* یکی از گیاهان دو لپه خانواده نعناعیان است که در زیر خانواده Nepetoideae قرار دارد. اسم این جنس از لغت یونانی Thyo به معنای عطر گرفته شده است. تفسیر دیگری که در رابطه با نام این جنس وجود دارد کلمه یونانی Thymos به معنای جرات و قدرت است و می‌تواند نمادی برای اثر دارویی و شفابخشی این گیاه باشد (جم‌زاد، ۱۳۸۸).

آویشن (*Thymus spp.*) به صورت بوته‌های پرپشت در دامنه‌های خشک و بین تخته سنگ‌های نواحی مختلف مدیترانه از جمله در کشورهای فرانسه، پرتغال، اسپانیا، ایتالیا و یونان و ایران می‌روید (زرگری، ١٣٦٩). آویشن همه ساله در سطح وسیعی از کشورهای اسپانیا، آلمان، فرانسه، پرتغال، آمریکا، چک، اسلواکی، مجارستان و شمال آفریقا کشت می‌شود (امید بیگی، ۱۳۷۹). در ایران نیز سطح زیر کشت این گونه رو به افزایش است.

از آویشن در صنایع غذایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده‌های متنوعی می‌کنند. روغن آویشن یک نگهدارنده گیاهی بی‌خطر برعلیه هجوم قارچ‌ها به محصولات غذایی، پس از برداشت می‌باشد (Kumar *et al.*, 2008). روغن آویشن خاصیت ضد میکروبی هم از خود نشان می‌دهد (Maksimovic *et al.*, 2008). همچنین روغن آویشن دارای خواصی نظیر ضد اسپاسم، باد شکن، ضد عفونی کننده، ضد کرم، ضد رماتیسم و خلط آور، همچنین نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیر دهنده پیری پستانداران می‌باشد (نقدی بادی و مکی زاده تفتی، ۱۳۸۲؛ Malik *et al.*, 1987؛ James *et al.*, 1992). همچنین آویشن در انواع غذاها استفاده می‌شود و به عنوان ترکیبات

۱- Lamiaceae

معطر در اکثر فراورده‌های غذایی مهم نظیر مشروبات و دسرهای لبنیاتی استفاده می‌شود (Leung and Foster, 1996).

اروپا به همراه آمریکا یکی از بازارهای عمده مصرف کننده آویشن است. آمارهای تجارتی نشان می‌دهد که آمریکا سالیانه حدود ۱۰۰۰ تن آویشن وارد می‌کند. ۹۰ درصد از روغن آویشن در تجارت جهانی در اسپانیا تولید می‌شود (McGimpsey, 1993). صادرات آویشن ایران در سال ۲۰۰٤ میلادی در رتبه ۲٤ تجارت جهانی این محصول و به میزان ۱۸۷ هزار دلار بود که به طور عمده به امارات متحده عربی صورت گرفته است (بی‌نام، ۱۳۹۰).

۲-۱-۱- گیاه‌شناسی

آویشن زراعی (*Thymus vulgaris* L.)، گیاهی است از تیره نعناعیان که ساختار بوته‌ای دارد و دارای ساقه مستقیم و علفی یا چوبی و پر شاخه به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و در بعضی موارد تا ٤٥ سانتی‌متر است. ساقه‌های منشعب این گیاه پوشیده از کرک‌های سفید رنگ می‌باشد (Burnie, 1995).

برگ‌های آن معطر، تا حدودی همیشه سبز، متقابل، تقریباً بدون دمبرگ، یا دارای دمبرگ بسیار کوتاه می‌باشد. برگ‌ها خاکستری روشن، بیضوی- نیزه‌ای تا حالت کشیده، که عموماً کنار برگ‌ها برگشته می‌باشد. سطح تحتانی برگ‌ها از گردی به رنگ متمایل به سفید، یا نمد مانند پوشیده شده؛ که دارای غده‌های فراوان اسانس می‌باشد و به علت وجود چنین غده‌هایی، معمولاً گل‌ها به رنگ ارغوانی کم رنگ تا سفید به شکل لوله‌ای، دولبه، صمغی و به طول پنج میلی‌متر دیده می‌شود. کاسبرگ‌ها کرکدار و غده مانند و دارای براکته‌هایی شبیه برگ می‌باشند. در شاخه‌های فرعی، گل‌ها به صورت دسته‌های جانبی و مارپیچی یا کروی شکل قرار می‌گیرند. همچنین کاسه گل به صورت زنگوله‌ای شکل با لبه دندانه‌ای کوتاه و صاف است (زرگری، ۱۳٦۹؛ Burnie, 1995; Morton, 1977; Letchamo *et al*., 1995).

بعضی از پایه‌های این گیاه دارای گل‌های فاقد پرچم (نرعقیم) و برخی دیگر، پرچم‌ها زودتر از مادگی (پروتاندری) رشد می‌کنند (زرگری، ۱۳٦۹). میوه از چهار فندقه کوچک تشکیل شده که در لوله کاسه گل محصور شده است. بذر آویشن گرد و ریز است که هر ۱۷۰/۰۰۰ بذر آن یک اونس (۲۸/۳ گرم) وزن داشته و بذور آن برای سه سال زنده باقی می‌مانند (Morton, 1977).

۲-۱-۲- شیمی گیاه

اسانس ماده موثره آویشن می‌باشد (زرگری، ۱۳٦۹؛ آئینه‌چی، ۱۳٦۵). اسانس آویشن مایعی است زرد یا قهوه‌ای مایل به قرمز تیره با بوی مطبوع قوی و طعم تند و پایدار و خنک کننده، که از تقطیر برگ‌ها و سرشاخه‌های گلدار *T.vulgaris* استخراج می‌شود (مومنی و شاهرخی، ۱۳۷۰) و ترکیباتی از مواد شیمیایی مختلف است.

به هر حال سرشاخه‌های آویشن حاوی اسانس، تانن‌ها، مواد اصلی تلخ، ساپونین‌ها و ضدعفونی کننده‌های گیاهی می‌باشند و جدول ۱-۱ سایر ترکیبات موجود در اندام‌های هوایی این گیاه را نشان می‌دهد (Prakash, 1990).

جدول۱-۱- ترکیبات موجود در ۱۰۰ گرم پیکر رویشی خشک آویشن (Prakash, 1990).

ترکیبات	مقدار
آب	۷/۸گرم
انرژی	۲۵۷ تا ۳۵۰ کیلوکالری
پروتئین	٦/۸ تا ۹/۱ گرم
چربی	٤/٦ تا ۷/٤ گرم
کربوهیدرات‌ها	٤۸ تا ٦۳/۹ گرم
پنتوزان	۱۲ تا ۱٦گرم
فیبر	۱۹ تا ۲٤ گرم
خاکستر	۱۱/۷ تا ۱۳/۲ گرم
کلسیم	۱۸۹ میلی‌گرم
آهن	۱۲٤میلی‌گرم
منیزیم	۲۲۰ میلی‌گرم
فسفر	۲۰۱ میلی‌گرم
پتاسیم	۸/٤ میلی‌گرم
سدیم	۵۵ میلی‌گرم
روی	٦ میلی‌گرم

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 P-cymene و γ-terpinene) و الکل‌ها (مثل linalool، α-terpineol و thujan-4-ol) تشکیل می‌دهد که گاهی هر کدام از این ترکیبات