

صلى الله عليه وسلم





دانشگاه صنعتی اصفهان  
دانشکده کشاورزی

ارزیابی تنوع ژنتیکی در توده های ایرانی آویشن دنايي  
(*Thymus daenensis*)  
با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات کشاورزی

مریم ذوقی

اساتیدراهنما

دکتر آقافخر میرلوحی

دکتر مهدی رحیم ملک

۱۳۹۰





دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات کشاورزی خانم مریم ذوقی

تحت عنوان

ارزیابی تنوع ژنتیکی در توده های ایرانی آویشن دنايي

(*Thymus daenensis*)،

با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

در تاریخ ۱۳۹۰/۶/۲۹ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهائی قرار گرفت.

دکتر آقافخر میرلوحی

استاد راهنمای پایان نامه

دکتر مهدی رحیم ملک

استاد راهنمای پایان نامه

دکتر مجید طالبی

استاد مشاور پایان نامه

مهندس بابک بحرینی نژاد

استاد مشاور پایان نامه

دکتر محمدرضا سبزهعلیان

استاد داور

دکتر مهدی کدیور

استاد داور

دکتر احمد ریاسی

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده



نمی توانید به ساختن دنیای بهتر امید داشته باشید؛ مگر آنکه تک تک افراد جامعه پیشرفت کنند. به این منظور هر یک از ما باید جز اینکه به پیشرفت خود می اندیشد، در برابر همه افراد بشر نیز احساس مسئولیت کند. وظیفه ما این است که برای کسانی که می توانیم، مفید باشیم. ((ماری کوری))

## تشر و قدردانی:

از خانواده عزیزم که ارزش های زندگی را به من آموختند، همواره پشتیبانم بوده اند و اکنون نیز وجودشان استوارکننده قدم هایم است.

از اساتید راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر آقا فخر میرلوحی و جناب آقای دکتر مهدی رحیم ملک، که شاگردی در محضر ایشان بزرگترین افتخار زندگیم بود و جبران قطره ای از زحمات و محبت هایشان برایم قابل تصور نیست، نهایت تشکر و امتنان را دارم.

از اساتید ارجمند، دکتر مجید طالبی و مهندس بابک بحرینی نژاد که مشاورت این پایان نامه را بر عهده داشتند. از اساتید ارجمند، آقایان دکتر سبزعلیان و دکتر کدیور که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را تقبل نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم.

مراتب سپاس خود را از آقای مهندس ناطقیان و خانم مهندس اسداللهیان که همواره مشوق و راهنمای من در طی این پروژه بوده اند و انگیزه پیشرفت و مبارزه با موانع را در من جاری ساختند ابراز می دارم.

از دوستانم خانم ها کمائی ، اولادزاد، رودگر، افاضل ، بهارلوئی و آقایان ضرابیان ، براتی ، خدایی سپاسگزارم.

مریم ذوقی

تابستان ۹۰





کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های  
فاشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی  
اصفهان است.



تقدیم بہ پدر و مادر فداکارم

و برادر مہربانم



## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
هشت	فهرست مطالب
یازده	فهرست جداول
سیزده	فهرست شکل ها
۱	چکیده
۲	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱ کلیات و اهداف
	<b>فصل دوم: بررسی منابع</b>
۶	۱-۲ گیاهشناسی آویشن
۷	۲-۲ گونه های مهم جنس <i>Thymus</i>
۸	۳-۲ خصوصیات مهم جنس <i>Thymus</i>
۸	۴-۲ آویشن دنايي
۸	۱-۴-۲ ریخت شناسی
۸	۲-۴-۲ فنولوژی
۸	۵-۲ مصارف دارویی گیاه آویشن
۹	۱-۵-۲ استفاده در طب سنتی
۹	۲-۵-۲ استفاده در طب نوین
۹	۳-۵-۲ استفاده در صنایع بهداشتی
۱۰	۶-۲ تنوع ژنتیکی
۱۱	۷-۲ اهمیت تنوع ژنتیکی
۱۱	۸-۲ روش های بررسی تنوع ژنتیکی
۱۱	۱-۸-۱ انتخاب به کمک نشانگر
۱۱	۲-۸-۲ نشانگر مورفولوژیک
۱۲	۳-۸-۲ نشانگر مولکولی
۱۲	۴-۸-۲ نشانگر بیوشیمیایی
۱۲	۵-۸-۲ نشانگرهای مبتنی بر DNA
۱۳	۶-۸-۲ نشانگرهای DNA مبتنی بر دورگ گیری اسیدهای نوکلئیک
۱۷	۹-۲ روش های تجزیه و تحلیل
۱۷	۱-۹-۲ تجزیه خوشه ای
۱۷	۲-۹-۲ تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCOA)
۱۸	۱۰-۲ مطالعات انجام شده روی آویشن

## فصل سوم: مواد و روش‌ها

- ۱-۳ جمع آوری زیر گونه مورد مطالعه ..... ۲۰
- ۲-۳ بررسی چندشکلی نشانگر RAPD ..... ۲۳
- ۱-۲-۳ استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های گیاهی ..... ۲۳
- ۲-۲-۳ تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ..... ۲۴
- ۳-۳ انجام آزمایشات RAPD ..... ۲۴
- ۱-۳-۳ آغازگرها ..... ۲۵
- ۲-۳-۳ dNTPs ..... ۲۷
- ۳-۳-۳ کلرید منیزیم  $MgCl_2$  ..... ۲۷
- ۴-۳-۳ بافر PCR ..... ۲۷
- ۵-۳-۳ آنزیم *Taq DNA polymerase* ..... ۲۷
- ۴-۳ الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده ..... ۲۸
- ۵-۳ محاسبات آماری ..... ۲۸

## فصل چهارم: نتایج و بحث

- ۱-۴ استخراج DNA ژنومی ..... ۳۰
- ۲-۴ انتخاب آغازگرهای مناسب RAPD ..... ۳۱
- ۱-۲-۴ بهینه سازی دمای اتصال آغازگرها ..... ۳۱
- ۲-۲-۴ بررسی آغازگرهای با چندشکلی مناسب روی کل نمونه ها ..... ۳۲
- ۳-۴ الگوی نواری آغازگرها ..... ۳۴
- ۴-۴ تجزیه خوشه ای ..... ۳۶
- ۱-۴-۴ ضریب همبستگی کوفنتیک ..... ۳۶
- ۲-۴-۴ ترسیم نمودار خوشه ای ..... ۳۶
- ۵-۴ تجزیه به مؤلفه های اصلی تعدیل شده (PCOA) ..... ۳۷
- ۶-۴ بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ها ..... ۴۰
- ۱-۶-۴ تنوع ژنتیکی درون جمعیت ها ..... ۴۰
- ۲-۶-۴ گروه بندی جمعیت ها ..... ۴۰
- ۳-۶-۴ ساختار ژنتیکی جمعیت ها ..... ۴۰

## فصل پنجم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادات

- ۱-۵-۱ پیشنهادات ..... ۴۲
- منابع ..... ۴۳

## فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۲: گونه ها جنس <i>Thymus</i> در ایران.....	۷
جدول ۱-۳: محل جمع آوری و مشخصات گونه های مورد مطالعه در تحقیق.....	۲۱
جدول ۲-۳: لیست آغازگرهای استفاده شده در مطالعه ژنوتیپ های آویشن.....	۲۵
جدول ۳-۳: مواد مورد نیاز برای واکنش PCR در مطالعه ژنوتیپ های آویشن دنايي.....	۲۷
جدول ۳-۴: زمان و دمای لازم برای سه مرحله مختلف (بازشدن، اتصال و بسط) در هر یک از دوره های حرارتی.....	۲۸
جدول ۱-۴: اطلاعات مربوط به نشانگرهای حاصل از آغازگرهای چندشکل در ژنوتیپ های آویشن.....	۳۵
جدول ۲-۴: اطلاعات مربوط به تنوع ژنتیکی جمعیت ها.....	۴۱
جدول ۳-۴: مقادیر ضرایب تشابه و فواصل ژنتیکی چهار جمعیت آویشن با روش نی.....	۴۱
جدول ۴-۴: تجزیه واریانس مولکولی جمعیت آویشن دنايي.....	۴۱





## فهرست اشکال

صفحه	عنوان
۳۱	شکل ۴-۱: DNA استخراج شده از برگ آویشن.....
۳۲	شکل ۴-۲: بهینه سازی چهار ترکیب آغازگری CGS-21 و CGS-31 در دماهای متفاوت.....
۳۳	شکل ۴-۳: الگوی بانندی حاصل از آغازگر C10.....
۳۴	شکل ۴-۴: الگوی بانندی حاصل از آغازگر ۲۰.....
۳۸	شکل ۴-۵: گروه بانندی ژنوتیپ های آویشن مورد مطالعه براساس ضریب تشابه Jaccard و به روش UPGMA.....
۳۹	شکل ۴-۶: نمودار تجزیه به مؤلفه های اصلی تعدیل شده سه بعدی برای ۹۰ ژنوتیپ مختلف آویشن.....
۴۱	شکل ۴-۷: نمودار گروه بندی چهار جمعیت مورد مطالعه ژنتیک جمعیت با آغازگرهای RAPD.....

### چکیده

آویشن گیاهی معطر، دارویی و بومی ایران است. ۱۴ گونه آویشن در ایران شناسایی شده است که در نواحی مختلف جغرافیایی و اکولوژیکی کشور پراکنده‌اند. در بین گونه‌ها، گونه آویشن دنیایی *Thymus daenensis* به طور وسیعی در غرب کشور گسترش دارد و دارای کاربردهای داروسازی است. اطلاع از تنوع بین و درون گونه ای راهکارهای حفاظت ژنتیکی برای جمعیت های کوچک در حال انقراض فراهم می نماید. امروزه نشانگرهای مولکولی مختلفی به وفور در انسان، گیاه، حیوان و به منظور مطالعات پایه‌ای و یا کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از کاربردهای مهم نشانگرهای مولکولی می‌توان به استفاده گسترده در انگشت نگاری، اینترگرسیون آلل‌ها و مطالعه تنوع ژنتیکی بسیاری از گیاهان دارویی اشاره کرد. یکی از نشانگرهای مولکولی که می‌توان اشاره کرد، نشانگر RAPD است. نشانگر RAPD از تکثیر بالایی برخوردار می‌باشد و نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA ژنوم برای طراحی و ساخت آغازگر ندارد. در این تحقیق ۹۰ نمونه آویشن دنیایی از ۱۸ جمعیت که توزیع مناسب جغرافیایی در کشور داشتند براساس فلور ایران جمع آوری شدند. ۱۶ آغازگر RAPD برای تکثیر ۱۴۵ نوار استفاده شد که از میان آنها ۱۲۷ (۸۷٪) نوار چند شکل بودند. در این بین آغازگر CGS-36 با ۱۵ نوار چند شکل و آغازگر OPA-01 با ۳ نوار چند شکل به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد نوار چند شکل را به خود اختصاص دادند. میانگین تعداد قطعات در هر آغازگر در ژنوتیپ های مورد بررسی ۹/۰۶ عدد بود و دامنه ی اندازه قطعات تکثیر شده بین ۱۵۰ تا ۱۲۵۰ جفت باز مشاهده گردید. آغازگرهای C3 و C9 به ترتیب بیشترین و کمترین محتوای چند شکلی (PIC) را نشان دادند. تنوع ژنی نی ۱/۵۳ و شاخص شانون برابر ۰/۴۴۹ محاسبه شد. نتایج این تحقیق نشان داد که استان های اصفهان و چهارمحال و بختیاری به ترتیب بیشترین و کمترین تنوع را دارا هستند. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بین جمعیت ها براساس نواحی جغرافیایی نشان دادند که تنوع بین جمعیت ها تنها ۱۸/۱۲٪ از تنوع کل دارا بود، در حالی که تنوع درون جمعیت برابر ۸۱/۸۷٪ است. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه ها با استفاده از ماتریس تشابه Jaccard محاسبه و دندوگرام حاصل با استفاده از روش UPMGA ترسیم گردید. نتایج نشان داد که سه مؤلفه ی اول در مجموع ۲۲/۸۶٪ از کل تغییرات را توجیه نمودند. نشان دهنده این مطلب است که نشانگرها در کل ژنوم پخش شده اند نتایج تجزیه و تحلیل نمودار خوشه ای و تجزیه به مؤلفه های اصلی تعدیل شده نشان دادند که اکثر ژنوتیپ ها براساس توزیع جغرافیایی گروه بندی شده است.

**کلمات کلیدی:** آویشن دنیایی، RAPD، روابط ژنتیکی، توزیع جغرافیایی



## فصل اول

### مقدمه

#### ۱-۱- کلیات و اهداف

گیاهان داروئی در ایران جزء ذخایر ژنتیکی ارزشمند محسوب می شوند. امروزه بسیاری از تحقیقات علوم گیاهی به جنبه های مختلف کاربردی این گیاهان معطوف می شود. از این رو محققان کشورهای مختلف تحقیقات ارزشمندی را روی گیاهان داروئی به انجام رسانده اند. متأسفانه با توسعه شهرها و عدم توجه به منابع طبیعی این منابع ژنتیکی با ارزش روز به روز در معرض خطر انقراض قرار می گیرند. در کشور ایران اکثر تحقیقات بر روی شناسایی و استخراج اسانس ها اختصاص داشته و مطالعه محدودی روی تنوع ژنتیکی این گیاهان صورت گرفته است. اصلاح گران از طریق مطالعه ژنوم این گیاهان پیشرفت های چشمگیری در بهبود و افزایش کمی و کیفی محصولات آنها داشته اند [۴۲].

آویشن دنايي با نام علمی *Thymus daenensis* از جمله گیاهان بومی ایران از خانواده نعناع (Lamiaceae) است [۱۴]. اسانس آویشن ماده ای است با نام تیمول با بوی مطبوع قوی، طعم تند، پایدار و خنک کننده است که از تقطیر برگ ها و سرشاخه های گلدار آن استخراج می شود. از برگ آویشن در فرآورده های غذایی و همچنین از اسانس گیاه در نوشیدنیها و صنایع دارویی، بهداشتی و آرایشی استفاده متنوعی می شود. مشهور است که روغن آویشن دارای خواص ضداسپاسم، بادشکن، ضد قارچ، ضد باکتریایی، ضد عفونی کننده، ضد ماتیسم، خلط آور، دارای آنتی اکسیدان، نگهدارنده طبیعی غذا و تاخیر دهنده پیری پستانداران می باشد. اسانس آویشن از جمله ۱۰ اسانس معروف می باشد که جایگاه خاصی در تجارت جهانی دارد [۱۲].