بسم الله الرحمن الرحيم

ا یازات ان پایان دا ه تان عق دارد. ورت ا غاده از مام یا ی از طا

جلات، اس یا مران باید م دا ه تان (یا ا تادیا اسا یدرا مای پایان) م دا وبا

ذ ما زو ن ب وزازد مر یلات تیی دا ه ود. مران ورت ورد یه د

وی ار وار .

قدم :

رر روارم، او یم با زل مرا ش مر ت

ما م آ . غاوا تادی و ودم . اش رج ودوو ودش ام .

و رردای:

مدو پاس ی پایان راور ی ن ت و ت آ و ن طا ود. راوری سا ر ت ی پایاش وا م گا ی دیا یات دارم وو ود وش را ز عم یارام. س از واع ا آ تان خاق یتا، د تان ررو ما م و ی زم رو ی ش و ودم ودهو ندو عا قا وند ما ش و ودم ورو رام با ند. از ز مات خاوادهم وص وا بام و مرش ناب آ ی ندس رضا و ی واره دوران ل وق و ن ا جا ودهارو ان م ما ایاری دهار ل و رردای رادارم. ا پاس ودرا از اساید اقدرو . ناب آ ی د مرا مدا ما یی ود مر د یان مروزآبادی مام ا ل پایان با مرو وص. ما ی اهامات ا ف ودروبارا ما ی ر ا ودراهشای ا جا ودهار ا از ی دارم. از اساید شاورم ناب آ ی د مر ن راح عاری و د مر دی ا مدی واره از ات ارز ره شان ه دم و رردای دارم. از ندس یدا مان با بای، س ارای و ون وروزی قدم با ات ارز ره ود ک . ا ل رون ان پایان ایاری ودهار ی م. از آ ی ید ودضا ی اه و کار ا جا ما ی ا ل پایان ودهار ل دا . و پایان از کا . ای . یادوخا هام وا ندمار ی م و ای . آ ها از راور نان آرزوی و ت دارم.

زا مری

مرماه ۱۳۹۰

دانشگاه لرستان
دانشکده کشاورزی

عنوان:

ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن (*Thymus* spp.) ایران با استفاده از نشانگر نیمه‌تصادفی ISJ

نگارش:

فرزانه مجیری

اساتید راهنما:

دکتر احمد اسماعیلی
دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

اساتید مشاور:

دکتر حسن مداح عارفی
دکتر عبدالهادی احمدی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد
رشته اصلاح نباتات

تیرماه ۱۳۹۰

چکیده

آویشن یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای جهان بعلت دورگه‌گیری‌های بین گونه‌ای تنوع زیادی دارد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن موجود در ایران، برای اولین بار از ۳۰ آغازگر نیمه‌تصادفی ISJ از دو گروه آغازگرهای ردیاب اینترون (IT) و ردیاب اگزون (ET) بر روی ۷۰ توده آویشن استفاده شد. تمام آغازگرها در مجموع ٦٩٤ باند تکثیر کردند که ٦٨٣ عدد باند (۹۸٪) آنها چندشکل بودند. بیشترین تعداد باند چندشکل از ۱۷ تا ۲۷ باند متغیر بود. متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۲۳/۱۳ عدد و برای هر ژنوتیپ ۹/۹۱ عدد برآورد شد. بیشترین و کمترین محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر IT_{15-36} و IT_{2-18} به ترتیب با ۰/۳۷ و ۰/۲۱ بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر را آغازگر ET_{15-33} (۹/۳٦) و کمترین مقدار را آغازگر ET_{6-18} (۳/۷٤) به خود اختصاص داد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار DARwin 5 و روش UPGMA و تشکیل ماتریس تشابه دایس، توده‌ها را به شش گروه تقسیم کرد. میانگین شاخص شانون ۰/۲۹٤ برآورد گردید. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع درون گونه‌ها بیشتر از تنوع بین گونه‌هاست بطوریکه از کل تنوع ژنتیکی ۸۸ درصد آن مربوط به درون گونه‌ها و ۱۲ درصد تنوع مربوط به بین گونه‌ها بود. گروه‌بندی گونه‌ها به روش UPGMA و فاصله ژنی نی، گونه‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد. فواصل ژنتیکی نی بر اساس فراوانی آللی بین گونه‌ها از ۰/۰۲۵ تا ۰/۱۱۷ متغیر بود. بیشترین فاصله ژنتیکی نی بین گونه *T. daenensis* و *T. vulgaris* و کمترین فاصله بین گونه *T. fedtschenkoi* و *T.migricus* دیده شد. نتایج نشان داد که گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای تا حدودی با منشأ جغرافیایی مطابقت دارد. از تنوع موجود در درون و بین گونه‌ها می‌توان در برنامه‌های اصلاحی برای تولید هتروزیس و ایجاد روابط تکاملی و اهلی‌سازی گیاهان استفاده نمود.

واژگان کلیدی: آویشن، نشانگر نیمه‌تصادفی، ISJ، تنوع ژنتیکی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست مطالب	
فهرست شکل‌ها	
فهرست جداول	
فصل اول: مقدمه	
۱-۱- اهداف آزمایش	٦
۱-۲- فرضیات آزمایش	٦
فصل دوم: کلیات و بررسی منابع	
۲-۱- کلیات	۸
۲-۱-۱- طبقه‌بندی جنس آویشن	۸
۲-۱-۱-۱- جنس *Zataria* و منشأ جغرافیایی	۸
۲-۱-۱-۲- جنس *Ziziphora* و منشأ جغرافیایی	۹
۲-۱-۱-۳- جنس *Thymus* و منشأ جغرافیایی	۹
۲-۱-۱-۳-۱- گونه‌های مهم جنس *Thymus* در ایران	۱۰
۲-۱-۲- مشخصات گیاه‌شناسی	۱۱
۲-۱-۳- کاربردهای دارویی و غذایی	۱٤
۲-۱-٤- منشأ جغرافیایی	۱٦
۲-۱-۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها	۱٦
۲-۱-۵-۱- تجزیه خوشه‌ای	۱٦
۲-۱-۵-۲- تجزیه مولفه‌های اصلی (PCA)	۲۱
۲-۱-۵-۳- تجزیه مختصات اصلی (PCOA)	۲۲
۲-۱-۵-٤- محاسبه ضریب کوفنتیک و آزمون مانتل	۲۲
۲-۱-۵-۵- پارامترهای تنوع	۲۳
۲-۱-۵-٦- فواصل ژنتیکی	۲٤
۲-۱-٦- اصول انتخاب نشانگر	۲۵

۲-۱-٦-۱- انتخاب به کمک نشانگر ۲٦
۲-۱-۷- نشانگرهای ژنتیکی ۲٦
۲-۱-۷-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی یا فنوتیپی ۲۷
۲-۱-۷-۲- نشانگرهای سیتوژنتیکی ۲۸
۲-۱-۷-۳- نشانگرهای فیزیولوژیکی ۲۹
۲-۱-۷-٤- نشانگرهای مولکولی ۲۹
۲-۱-۷-٤-۱- نشانگرهای پروتئینی (بیوشیمیایی) ۲۹
۲-۱-۷-٤-۲- نشانگرهای مولکولی DNA ۳۰
۲-۱-۷-٤-۲-۱- نشانگرهای DNA غیرمبتنی بر PCR یا مبتنی بر هیبریداسیون ۳۱
۲-۱-۷-٤-۲-۲- نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR ۳٤
۲-۲- بررسی منابع ۳۹
۲-۲-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ ۳۹
۲-۲-۲- کاربرد نشانگرهای تصادفی و نیمه‌تصادفی در برآورد تنوع ژنتیکی ٤۱

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد ژنتیکی گیاهی ۵۰
۳-۲- استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های گیاهی ۵۱
۳-۲-۱- روش نمونه‌گیری ۵۱
۳-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۵۷
۳-٤- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگرهای ISJ ۵۹
۳-۵- آغازگرها ٦۰
۳-۵-۱- بهینه‌سازی واکنش PCR ٦۳
۳-۵-۲- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ٦٤
۳-٦- روش‌های آماری مورد استفاده ٦۵

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱- استخراج DNA ۷۱
٤-۱- ۱- استخراج DNA به روش خانوجا با اندکی تغییر کیفیت بالاتری دارد ۷۱

٤-٢- نتایج بهینه‌سازی واکنش PCR ٧٣
٤-٣- تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ ٧٥
٤-٣-١- مقایسه بین قطعات تولید شده توسط آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ ٧٥
٤-٣-٢- مقایسه بین قطعات تولید شده توسط آغازگرهای نیمه‌تصادفی IT و ET ٨٠
٤-٣-٣- نشانگرهای اختصاصی آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ ٨٣
٤-٣-٤- تشکیل ماتریس تشابه و گروه‌بندی بر اساس آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ ٨٥
٤-٣-٥- تجزیه مولفه‌های اصلی نشانگرهای . ISJ ٩٩
٤-٤- تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آغازگرهای نیمه‌تصادفی گروه IT و ET ١٠٢
٤-٤-١- تشکیل ماتریس تشابه و گروه‌بندی بر اساس آغازگرهای نیمه‌تصادفی گروه IT و ET ١٠٢
٤-٤-٢- تجزیه مولفه‌های اصلی نشانگرهای نیمه‌تصادفی گروه IT و ET ١١٠
٤-٥- آنالیز گونه‌ها ١١٣
٤-٥-١- آنالیز گونه‌ها با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ ١١٤
٤-٥-١-١- نتایج آنالیز واریانس مولکولی ١١٤
٤-٥-١-٢- تجزیه مختصات اصلی (PCOA) ١١٥
٤-٥-١-٣- برآوردی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها ١١٦
٤-٥-٢- آنالیز گونه‌ها با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی دو گروه IT و ET ١١٧
٤-٥-٢-١- نتایج آنالیز واریانس مولکولی ١١٧
٤-٥-٢- ٢- تجزیه مختصات اصلی (PCOA) ١١٨
٤-٥-٢-٣- برآوردی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها ١٢٠
٤-٦- نتیجه‌گیری ١٢٣
٤-٧- پیشنهادها ١٢٥
فهرست منابع ١٢٦

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۲-۱- شمایی از مکان هدف آغازگرهای نیمه‌تصادفی بر روی ژنوم	٤٠
شکل ۳-۲- الگوی باندی نشانگر اندازه ۱۰۰bp (شکل الف) و ۱kb (شکل ب)	٦٥
شکل ٤-۱- DNA ژنومی استخراج شده از گیاه دارویی آویشن به کمک روش‌های	٧٢
شکل ٤-۲- DNA ژنومی استخراج شده از چند توده آویشن ایران مورد استفاده	٧٣
شکل ٤-۳- الکتروفورز محصول PCR مربوط به نشانگر ISJ	٧٤
شکل ٤-٤- گرادیانت دمایی آغازگر IT_{15-36}	٧٤
شکل ٤-٥- نمودار مقایسه میزان ایجاد باندهای چندشکل و یک شکل با تعداد	٧٨
شکل ٤-٦- نمودار مربوط به درصد چندشکلی آغازگرهای ISJ	٧٨
شکل ٤-۷- نمودار مربوط به درصد چندشکلی دو نوع آغازگر IT و ET	٧٨
شکل ٤-۸- الکتروفورز محصول PCR تعدادی از توده‌های آویشن با آغازگر	٧٩
شکل ٤-۹- الکتروفورز محصول PCR تعدادی از توده‌های آویشن با آغازگر.	٧٩
شکل ٤-۱۰- الکتروفورز محصول PCR توده‌های آویشن با آغازگر نیمه‌تصادفی ET_{12-28}	٨٠
شکل ٤-۱۱- باند اختصاصی آغازگر IT_{15-32} در توده شماره ٤٦ با اندازه ۲۰۰ جفت‌باز	٨٥
شکل ٤-۱۲- باند اختصاصی آغازگر ET_{12-29} در توده شماره ۳۹	٨٥
شکل ٤-۱۳- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin 5 با استفاده از	٨٧
شکل ٤-۱٤- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin 5 با استفاده از.	٩١
شکل ٤-۱٥- دندروگرام گونه *T. kotschyanus* از چند منشأ جغرافیایی	٩٣
شکل ٤-۱٦- دندروگرام گونه *T. fedtschenkoi* از چند ناحیه از یک منشأ جغرافیایی ...	٩٤
شکل ٤-۱۷- دندروگرام گونه *T. vulgaris* از چند ناحیه از یک منشأ جغرافیایی	٩٥
شکل ٤-۱۸- دندروگرام گونه *T. daenensis* از چند ناحیه از یک منشأ جغرافیایی	٩٦
شکل ٤-۱۹- تفاوت نحوه باننددهی توده شماره ٤١ در محصول آغازگر ET_{18-6}	٩٧
شکل ٤-۲۰- تفاوت نحوه باننددهی توده شماره ٤١ در محصول آغازگر IT_{15-35}	٩٧
شکل ٤-۲۱- نمودار دوبعدی داده‌های حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی	١٠٠
شکل ٤-۲۲- نمودار سه‌بعدی داده‌های حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی	١٠١
شکل ٤-۲۳- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin 5 با استفاده از روش	١٠٣
شکل ٤-۲٤- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin 5 با استفاده از روش	١٠٥

شکل ٤-٢٥- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin 5 با استفاده از روش ١٠٧
شکل ٤-٢٦- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار DARwin 5 با استفاده از ١٠٩
شکل ٤-٢٧- نمودار دوبعدی داده‌های حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی ١١٢
شکل ٤-٢٨- نمودار سه‌بعدی داده‌های حاصل از تجزیه مولفه‌های اصلی..... ١١٣
شکل ٤-٢٩- نمودار درصد واریانس مولکولی جهت تعیین تنوع بین و درون گونه‌ای ١١٤
شکل ٤-٣٠- نمودار مربوط به پراکندگی ٥ گونه آویشن با ١١٥
شکل ٤-٣١- دندروگرام نااریب ٥ گونه آویشن با استفاده از فاصله ژنتیکی ١١٦
شکل ٤-٣٢- نمودار درصد واریانس مولکولی جهت تعیین تنوع بین و درون گونه‌ای ١١٨
شکل ٤-٣٣- نمودار مربوط به پراکندگی ٥ گونه آویشن با استفاده ١١٩
شکل ٤-٣٤- دندروگرام نااریب ٥ گونه آویشن با استفاده از فاصله ژنتیکی ١٢١

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱- وضعیت دو فرد i و j با همدیگر از نظر یک صفت نشانگری	۱۷
جدول ۳-۱- کد، نام گونه و محل جمع‌آوری ۷۰ توده آویشن	۵۰
جدول ۳-۲- ترکیبات بافر استخراج DNA روش خانوجا و همکاران	۵۲
جدول۳-۳- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR	٦۰
جدول ۳-٤- لیست آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز	٦۲
جدول۳-۵- زمان و دمای مورد نیاز برای مراحل مختلف هر یک از	٦٤
جدول ۳-٦- منابع تغییر تجزیه واریانس مولکولی برای افراد درون یک جمعیت	٦۷
جدول ۳-۷- منابع تغییر تجزیه واریانس مولکولی افراد درون یک جمعیت از نواحی	٦۸
جدول ٤-۱- مقایسه کمی و کیفی چهار روش استخراج DNA مورد مطالعه	۷۲
جدول ٤-۲- تعداد باندها و میزان اطلاعات چندشکلی هر کدام از آغازگرهای	۷۷
جدول ٤-۳- لیست توده‌های دارای باند اختصاصی (نشانگر) در آویشن با استفاده	۸٤
جدول ٤-٤- مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه شده توسط هر مولفه	۱۰۰
جدول ٤-۵- مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه شده توسط هر مولفه	۱۱۱
جدول٤-٦- آنالیز AMOVA جهت اندازه‌گیری تنوع درون و بین گونه‌ای	۱۱٤
جدول ٤-۷- اندازه‌گیری شاخص اطلاعاتی شانون با استفاده از نرم‌افزار Popgen32	۱۱٦
جدول ٤-۸- فواصل ژنتیکی نی (قطر پایین) و شباهت‌های ژنتیکی (قطر بالا)	۱۱۷
جدول ٤-۹- آنالیز AMOVA جهت اندازه‌گیری تنوع درون و بین گونه‌ای	۱۱۸
جدول ٤-۱۰- اندازه‌گیری شاخص اطلاعاتی شانون آغازگرهای گروه IT و ET	۱۲۰
جدول ٤-۱۱- فواصل ژنتیکی نی (قطر پایین) و شباهت‌های ژنتیکی (قطر بالا)	۱۲۲

فصل اول

مقدمه

رویشگاه‌های طبیعی ایران به عنوان ذخایر ارزشمند توارثی می‌توانند منشأ تهیه و تولید گیاهان، به خصوص گیاهان دارویی با سازگاری مناسب با شرایط کشت مزرعه‌ای مورد توجه قرار بگیرند (امیدبیگی، ۱۳۷٤). در گیاهان دارویی ویژگی‌های ظاهری و شرایط مورفولوژیکی برای تولید کننده اهمیت چندانی ندارد و آنچه که در اولویت اهداف اصلاحی قرار می‌گیرد ارتقای کمیت و کیفیت ترکیب‌های متابولیکی و مواد موثره موجود در اندام این گیاهان است. مواد موثره همان متابولیت‌های ثانویه گیاه هستند که با توجه به ساختمان شیمیایی خود به چهار دسته روغن‌های اسانسی، آلکالوئیدها، فلانوئیدها، ترکیب‌های فنلی و تانن‌ها تقسیم می‌شوند. از آنجائیکه عوامل محیطی سبب تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و کیفیت ماده مؤثره آنها می‌گردد، باید در نظر داشت که محصول زراعی یک گیاه دارویی زمانی می‌تواند مقرون به‌صرفه باشد که مقدار متابولیت‌های اولیه و ثانویه آنها به حد مطلوب رسیده باشد (امیدبیگی، ۱۳۷۹). انتخاب ارقام برتر، دورگ‌گیری، تغییر ساختار ژنتیکی به منظور دستیابی به صفات برتر، کشت درون شیشه‌ای[1]، ایجاد پلی‌پلوئیدی و جهش از جمله روش‌های اصلاحی در گیاهان دارویی است (امیدبیگی، ۱۳۷٤).

مطالعات اندکی بر روی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی صورت گرفته است و مصرف روزافزون این گروه از گیاهان به‌صورت وحشی از رویشگاه‌های طبیعی، سبب کاهش ذخیره ژنتیکی آنها شده است، بطوریکه در حال حاضر بیشتر گونه‌های گیاهان دارویی در معرض خطر انقراض قرار دارند. یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی آویشن (*Thymus* spp.) می‌باشد که از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای از خانواده نعناعیان[2] و زیر خانواده Nepetoideae است که به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی فراوان با کاربردهای دارویی، ضدعفونی‌کننده، غذایی و صنعتی، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. مطالعات اولیه در رابطه با تنوع و خصوصیات ژنتیکی جنس آویشن در سال ۱۸۷۷ میلادی توسط داروین[3] صورت گرفت (Tarayre and Thompson, 1997). این گیاه تفاوت‌های ژنتیکی فراوانی از نظر سطح پلوئیدی و خصوصیات تاکسونومیکی نشان می‌دهد، بگونه‌ای که سطوح پلوئیدی دیپلوئید تا هگزاپلوئید با پایه ژنتیکی مختلف در آن یافت می‌شود. تعداد کروموزوم‌های دیپلوئید آن به‌صورت ۲n=۳۰ و ۲n=۲۸ می‌باشد (Stahl, 2002). اکثر گونه‌های جنس *Thymus* از نظر ژنتیکی سازگار بوده و بدلیل سهولت هیبریداسیون بین گونه‌ای، هیبریدهای بارور فراوانی در این جنس وجود دارد که تنوع ژنتیکی بالایی در آن ایجاد نموده است. وجود گونه‌های فراوان و همچنین اینترگرسیون موفق بین گونه‌ای سبب سازگاری و پراکندگی وسیع در این

[1] In vitro culture
[2] Lamiaceae
[3] Darvin

جنس شده است. ترکیبات ترپنوئیدی شاخص در جنس آویشن مونوترپنوئیدها هستند که معمولاً حدود ۹۰٪ اسانس را تشکیل می‌دهند (جمزاد، ۱۳۸۸). اسانس ماده موثره آویشن است (زرگری، ۱۳٦۹; آئینه‌چی، ۱۳٦٥) و نقش آن در دفع حشرات برگخوار و میکروبهاست. عطر گیاهان اسانس‌دار عاملی برای جذب حشرات گرده‌افشان است (جمزاد، ۱۳۸۸). ترکیبات شیمیایی آویشن غنی از تیمول، کارواکرول، لینالول و پاراسیمن است. تیمول و کارواکرول از مهمترین ترکیبات فنولیک روغن آویشن است (Piccaglia and Marotti, 1991). از بین گونه‌های آویشن ۱۸ گونه از ایران شناسایی شده است. پروفسور رشینگر در فلورا ایرانیکا ١٤ گونه و زیرگونه آویشن را گزارش کرده که ٤ گونه انحصاری آن شامل آویشن منطقه تالشی (*T. trautvetteri*)، آویشن کرمانی (*T. carmanicus*)، آویشن ایرانی (*T. persicus*) و آویشن دنایی (*T. daenensis*) است که در نواحی وسیعی پراکنده هستند (Rechinger, 1982).

خوشبختانه کشور ایران به دلیل برخورداری از وسعت تنوع آب و هوایی و جغرافیایی کشور دارای تنوع ژنتیکی غنی است. بعلاوه ایران جزء مناطق پیدایش و تنوع بسیاری از گونه‌های گیاهی است و این موضوع کمک شایانی به تنوع ژنتیکی کشور نموده است. متأسفانه علیرغم این موضوع، کشور ما به دلیل عوامل فرسایشی بسیار زیاد بیشترین میزان فرسایش ژنتیکی گیاهی را در سطح جهان داراست (وجدانی، ۱۳۷٥). یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی بوده است. اگر چه تخمین این کاهش تنوع ژنتیکی مشکل و یا غیرممکن است اما موجب از دست رفتن تعداد زیادی از ژن‌های مفید و ذخایر ژنتیکی شده و عمده محصولات زراعی در معرض تهدید روزافزون شرایط محیطی نامناسب و تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرند (قره یاضی، ۱۳۷٥). اصلاح نباتات به کمک علم بیوتکنولوژی گیاهی، با تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان به دنبال افزایش پایدار عملکرد می‌باشد. برای دستیابی به واریته‌های جدید و متحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده، وجود تنوع ژنتیکی کافی و قابل دسترس در جمعیت‌های مورد مطالعه، امری حیاتی است (وجدانی، ۱۳۷٥). اصلاح نباتات موفق بر پایه انتخاب دقیق از درون جوامع متنوع گیاهی استوار بوده و تنوع ژنتیکی به عنوان مهمترین عامل در انتخاب یک فرد، از اهمیت فراوانی برخوردار است. تنوع ژنتیکی یک صفت، ارزش متفاوت افراد یا ژنوتیپ‌ها برای آن صفت می‌باشد (باقری و همکاران، ۱۳۷٥; سمیعی، ۱۳۸۳). ریشه بسیاری از محدودیت‌های موجود برای روش‌های مختلف اصلاح نباتات، فقدان ابزارهای مناسب برای مطالعات و ارزیابی ژنتیکی است. کارآیی یک برنامه اصلاحی انتخابی به وسعت تنوع ژنتیکی و قابلیت توارث یک صفت بستگی دارد (Amini *et al*., 2008). یکی دیگر از

دلایل اهمیت تنوع ژنتیکی، استفاده در مدیریت مجموعه‌های ژنتیکی با هدف کاهش هزینه‌ها، افزایش دقت و قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاحی است. بنابراین یکی از پایه‌های اساسی اصلاح نباتات دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است (نقوی و همکاران، ۱۳۸٤). یک بهنژادگر در صورتی شانس موفقیت برای ایجاد ارقام اصلاح شده در برنامه‌های اصلاحی خود دارد که تنوع کافی برای انتخاب او وجود داشته باشد (وجدانی، ۱۳۷۲; وجدانی، ۱۳۷۵).

هدف بیشتر برنامه‌های بهنژادی تلاش برای پیش‌بینی نتاج حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های مختلف، از طریق اندازه‌گیری مشابهت‌های ژنتیکی و یا فاصله ژنتیکی بین والدین 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، 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 سازگاری احتمالی آن‌ها با محیط‌های متفاوت می‌باشد (Loarce *et al*., 1996). همچنین تنوع ژنتیکی مهمترین عامل بقاء موجودات از جمله گیاهان زراعی در برابر تغییرات شرایط محیطی و آفات است (چاولا، ۱۳۸۲). پوجار و همکاران بیان کردند که مطالعه تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی جهت انتخاب مناسب والدین متفاوت و بدست آوردن هیبریدهای هتروزیس برای نگهداری و متمایز نمودن ژرم‌پلاسم بسیار حائز اهمیت است (Pujar *et al*., 1999). بگونه‌ای که فن‌آوری نشانگرهای مبتنی بر DNA، اصلاح‌گران گیاهی را در غلبه بر بسیاری از مشکلات موجود در زمینه طبقه‌بندی و حفاظت ژرم‌پلاسم گیاهی حمایت کرده است (فولاد، ۱۳۷۲; قره یاضی، ۱۳۷۵).

هر نوع صفتی که در بین افراد متفاوت باشد نشانه‌ای برای شناسایی حامل آن صفت است که به آن یک نشانگر گفته می‌شود. برای آنکه بتوان از یک صفت به‌عنوان نشانگر ژنتیکی استفاده نمود، آن صفت باید حداقل دارای دو ویژگی باشد: ۱- این صفت در بین دو فرد متفاوت باشد و والدین را از یکدیگر متمایز نماید بعبارتی پلی‌مرفیسم نشان دهد، بگونه‌ای که از طریق این نشانگر کروموزوم حامل ژن جهش یافته از کروموزوم حامل ژن معمولی قابل تشخیص باشد (چاولا، ۱۳۸۲). ۲- صفت مورد نظر قابلیت توارث داشته باشد یعنی بتواند به شیوه ژنتیکی به ارث برسد.

از آنجا که نشانگرهای مورفولوژیک دارای توارث غالب- مغلوب بوده و شدیداً تحت تاثیر عوامل محیطی می‌باشند لذا برای نظارت توالی DNA درون گونه‌ای و بین گونه‌ای نشانگرهای مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند و با معرفی شاخص‌های مناسب جدید، از نژادهای محلی و

گونه‌های علفی مربوطه، منابع جدیدی از تنوع ژنتیکی را بوجود می‌آورد (سنجری پیرایواتلو، ۱۳۸۷). امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA با کاربردهای متنوع و فراوان به سرعت در حال توسعه است، خصوصاً از زمانی که دانشمندان دریافتند که استفاده از این نشانگرها یک فرصت مناسب برای مقایسه مستقیم و تعیین مواد ژنتیکی، مستقل از اثرات محیطی است. مستقل بودن این نشانگرها از اثرات محیط و مرحله رشد باعث می‌شود که آن‌ها بطور ذاتی برای دسته‌بندی اختصاصی و منشأیابی ژنوتیپ‌ها مفید باشند. با توجه به مزایای فراوان نشانگرهای مولکولی، امروزه ژنوتیپ‌سنجی بر مبنای این نشانگرها امروزه کاملاً متداول بوده و برای تشخیص چندشکلی ابزارهای متنوعی را در اختیار بهنژادگران قرار می‌دهد (شاه نجات بوشهری، ۱۳۸۲). از مهمترین کاربرد نشانگرهای مولکولی DNA در اصلاح نباتات، تخمین تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف بوده است. اطلاع از این تنوع برای انتخاب دقیق والدین مناسب، جهت تولید هیبریدهای قوی دارای اهمیت فراوانی است. همچنین از تنوع ژنتیکی حاصل از نشانگرهای DNA در مطالعات شناسایی ارقام و تجزیه تحلیل‌های فیلوژنتیک و اکولوژیکی استفاده می‌شود (Kumar, 1999; Sharma *et al*., 2002).

بررسی تنوع ژنتیکی از طریق نشانگرهای مولکولی با مقایسه همزمان اطلاعات مورفولوژیکی در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی ارقام و هیبریدهای بین و درون گونه‌ای بسیار مفید است (قره یاضی، ۱۳۷۵). یکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، نشانگر نیمه‌تصادفی ISJ[1] است که بر اساس نواحی برش اتصال اینترون–اگزون (نقطه پیرایش اینترون) طراحی می‌شوند. این دسته از آغازگرها دارای توالی‌های ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی هستند و به دو نوع گروه IT[2] و ET[3] تقسیم‌بندی می‌شوند. آغازگرهای گروه IT نواحی اینترون و آغازگرهای گروه ET نواحی اگزونی را تکثیر می‌کنند. بر خلاف نشانگر RAPD این آغازگرها کاملاً تصادفی نبوده و نتایج حاصل از آن نسبت به نشانگر RAPD قابل اعتمادتر بوده و تکرارپذیری بالایی دارند. کاربرد این آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی و نیز اجتناب از هدف قرار دادن مناطق هتروکروماتینی در ژنوم گیاهان است. چندشکلی به‌دست آمده از این نوع آغازگرها ناشی از تفاوت در تکثیر قطعاتی از ژنوم است که مورد رونویسی قرار می‌گیرند (Rafalski *et al*., 1997). اولین بار از نشانگرهای ISJ جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های غلات استفاده شد (Weining and Langridge, 1991; Weining and Henry, 1995).

هدف این پژوهش ارزیابی کارایی روش PCR با آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ در برآورد تنوع ژنتیکی ۷۰ توده آویشن ایران و مقایسه نشانگرهای اینترونی و اگزونی جهت معرفی آغازگرهایی که

[1] Intron-exon Splice Junction
[2] Intron targeting
[3] Exon tageting

توانایی تولید بیشترین چندشکلی را در بین توده‌ها دارند می‌باشد. همچنین از این تنوع ژنتیکی برای پیش‌بینی نتایج حاصل از تلاقی توده‌های مختلف، از طریق اندازه‌گیری مشابهت‌های ژنتیکی و یا فاصله ژنتیکی بین والدین استفاده می‌شود.

۱-۱- اهداف تحقیق

۱) بررسی روابط خویشاوندی و فواصل ژنتیکی تنوع ژنتیکی توده‌های آویشن

۲) مقایسه نشانگرهای ISJ ردیاب اینترون (IT) و ردیاب اگزون (ET) در بررسی تنوع ژنتیکی آویشن ایران

۳) تعیین فواصل ژنتیکی توده‌های مورد مطالعه

٤) تعیین تنوع درون و بین گونه‌ای آویشن با استفاده از مجموع نشانگرها و مقایسه آنها با نشانگرهای ردیاب اینترون (IT) و ردیاب اگزون (ET)

۱-۲- فرضیات تحقیق

۱) نشانگرهای اینترونی و اگزونی میزان تنوع مشابهی را آشکار می‌سازند.

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

۳) بین گونه‌ها و درون گونه‌های آویشن از نظر انواع نشانگرهای اینترونی و اگزونی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- کلیات

آویشن (*Thymus* spp.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای است. مصریان و یونانیان باستان از این گیاه برای درمان بیماری‌های خود استفاده می‌کردند. به‌علت خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدانگلی اسانس آویشن، این گیاه از قرن ۱۶ به‌طور رسمی به‌عنوان یک گیاه دارویی معرفی شد و خواص درمانی آن مورد تائید قرار گرفت. نیومن[1] در سال ۱۷۲۵ میلادی، ماده موثره این گیاه را کشف کرد و آن را کافور آویشن نامید سپس دانشمند دیگری به نام لالماند[2] در سال ۱۸۵۳، این ماده را تیمول[3] نام گذاشت. از این زمان به بعد، بررسی‌های زیادی بر روی اثر درمانی این گیاه به عمل آمد و از آن در معالجه بیماری‌های مختلف استفاده شد.

آویشن یکی از گیاهان مهم تجاری است که در برخی کشورها از جمله مجارستان از نظر صادراتی ارزش خاصی دارد. بطوری که سالیانه معادل ۲۰ تن آویشن به ارزش ۶۰ هزار دلار از مجارستان به سایر کشورهای اروپایی صادر می‌شود. اسپانیا و فرانسه نیز تهیه‌کنندگان آویشن برای آمریکا هستند. در حال حاضر آویشن در سطوح وسیعی در کشورهای اسپانیا، آلمان، فرانسه، پرتغال، آمریکا، چک اسلواکی، مجارستان و شمال آفریقا کشت می‌شود (امیدبیگی، ۱۳۷۹).

۲-۱-۱- طبقه‌بندی جنس آویشن

جنس آویشن یکی از جنس‌های خانواده نعناعیان[4] است که در زیر خانواده نپتوئیده[5] قرار دارد و از نظر فیلوژنی با جنس‌های *Origanum*، *Zataria* و *Micromeria* قرابت و خویشاوندی دارد (Morales, 2002). جنس‌های دیگر به نام های *Zataria* و *Ziziphora* تحت عنوان نام آویشن وجود دارند که هر یک دارای مصارف و کاربردهای متعدد دارویی، صنعتی و غذایی هستند (جمزاد، ۱۳۷۳).

۲-۱-۱-۱- جنس *Zataria* و منشأ جغرافیایی

این جنس دارای گونه‌ای به نام *Z.multiflora* Boiss. است که یکی از جنس‌های نزدیک به آویشن است که تحت عنوان آویشن شیرازی یا آویشن برگ پهن در جنوب ایران شناخته می‌شود و

---

[1] Nioman
[2] Lalmand
[3] Thymol
[4] Lamiaceae
[5] Nepetoideae