

**دانشگاه آزاد اسلامی**

**واحد علوم و تحقیقات تهران**

**کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی**

**موضوع :**

**بررسی اکوتیپ های مختلف گیاه Allium hirtifolium**

**از دیدگاه مولکولی (با نشانگر RAPD) و مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی(آلیسین)**

**استاد راهنما :**

**استاد مشاور :**

**نگارنده:**

 **فهرست مندرجات**

**عنوان صفحه**

فهرست مندرجات.. ﻫ

فهرست اختصارات ی

فهرست نمودارها و اشکال

فهرست جداول

**چکیده**

 1

**فصل اول: مقدمه**  4

**فصل دوم: گیاهشناسی**

2-1- گیاهشناسی Allium hirtifolium 8

2-2- انتشار جغرافیایی 8

2-3- کاریولوژی 8

2-4- موارد مصرف 10

2-4-1- مصارف غذایی 10

2-4-2- استفاده در طب سنتی 10

2-5- تحقیقات انجام شده در Allium hirtifolium10

2- 6- جنس Allium spp. 2-6-1- مشخصات عمومی و طبقه بندی 11

2-6-2- خصوصیات شیمیایی 13

2-6-3- کاریولوژی 13

2-7- ارزشهای اقتصادی گونه های جنس آلیوم 14

2-8- زیرجنسهای جنس آلیوم 14

2-8-1- زیر جنس Allium 15

2-8-2- زیر جنس Rhizirideum15

2-8-3- زیر جنس Melanocrommyum15

2-8-4- زیر جنس Amerallium

2-9- مراحل نمو در آلیومها 16

2-9-1- جوانه زنی بذر 16

2-9-2- سبز شدن بذور و نمو گیاهان نورسته 17

2-9-3- دوره جوانی و انتقال به مرحله تولید مثلی 17

2-9-4- رشد و نمو سالیانه پس از بلوغ 19

2-9-4-1- گونه های پیاز دار 19

2-9-4-1-1- گونه های پیازدار با مبدا مدیترانه 20

2-9-4-1-2- گونه های گلدار با مبدا ایرانو تورانی 20

2-9-4-3- آلیومهای خوراکی 23

2-9-5- تکثیر 24

2-9-5-1- تکثیر از راه بذر 24

2-9-5-2- تکثیر رویشی 25

2-9-5-3- کشت بافت در آلیومها 26

2-10- اصلاح ژنتیکی در آلیومها و استفاده از گونه های وحشی Allium26

2-10-1- بانک های بذر آلیوم در دنیا 27

2-10-2- بانک های ژن آلیوم در دنیا 27

2-10-3- عملیات نگهداری و اصلاحی در مراکز جمع آوری و نگهداری آلیوم ها 27

2-11- بررسی تنوع ژنتیکی و عوامل ایجاد تنوع 28

2-11-1- تجزیه کلاستر 31

2-11-2- تجزیه به مولفه اصلی 31

2-11-3- معیارهای فاصله یا شباهت ژنتیکی 32

2-12- مراکز تنوع جنس Allium32

2-13- مصارف مختلف آلیومها در دنیا 33

**فصل سوم: بررسی مولکولی به کمک نشانگرRAPD**

3-1- نشانگر چیست؟ 38

3-2- کاربرد های نشانگرهای مولکولی 38

3-3- انواع نشانگرها 39

3-4- نشانگر RAPD40

3-4-1- مراحل روش RAPD41

3-4-1-1- استخراج DNA41

3-4-1-2- تخمین غلظت DNA41

3-4-1-3- انجام واکنش 42 RAPD

3-4-1-4- الکتروفورز محصولات 42 PCR

3-4-2- تجزیه داده های RAPD43

3-4-3- تکرار پذیری RAPD43

3-4-3-1- کیفیت و کمیت 43 DNA

3-4-3-2- آلودگی بیولوژیک 43

3-4-3-3- غلظت آغازگر 44

3-4-3-4- غلظت منیزیم 44

3-4-3-5- تکرارپذیری نیمرخ های دستگاه PCR44

3-4-3-6- زمان واسرشته سازی 44

3-4-3-7- درجه حرارت اتصال 45

3-4-3-8- مدت زمان بسط یا توسعه طویل شدن 45

3-4-3-9- دقت کردن در پیپت نمودن 45

3-5- مزایای RAPD 45

3-6- معایب RAPD46

 3-7- تحقیقات انجام شده با کمک نشانگر RAPD در جنس الیوم 47

**فصل چهارم: نشانگرهای مورفولوژیک**

4-1- مزایای نشانگرهای مورفولوژیک 50

4-2- معایب نشانگرهای مورفولوژیک 50

4-3- مقایسه مورفولوژیک آلیوم ها 51

4-3-1- گروه های پیازدار 52

4-3-2- گروه های ریزوم دار 52

4-3-3- گونه های آلیوم خوراکی 52

4-4- کاربرد نشانگرهای مورفولوژیک در جنس آلیوم 53

4-5- اساس ژنتیکی بعضی صفات مورفولوژیک در آلیوم ها 55

4-5-1- برگ و نشاء ها 55

4-5-2- ساقه گلدهنده 56

4-5-3- پیاز 56

4-5-4- گل 57

**فصل پنجم: بررسی فیتوشیمیایی**

5-1- تاریخچه استفاده از آلیومها در تغذیه و درمان بیماریها 59

5-2- ترکیبات شیمیایی موجود در گیاهان جنس آلیوم 60

5-2-1- ترکیبات فرار 60

5-2-2- ترکیبات غیر فرار 60

5-3- تاریخچه شناسایی آلیسین 61

5-4- چگونگی تشکیل آلیسین 61

5-5- روشهای تجزیه و شناسایی اجزاء تشکیل دهنده اسانس و

 عصاره های استخراج شده از گیاهان 62

5-5-1- کروماتوگرافی 62

5-5-2- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)63

5-5-3- کروماتوگرافی ستون 63

5-5-4- گاز کروماتوگرافی 64

5-5-5- طیف سنجی مادون قرمز (IR)64

5-5-6- طیف سنجی ماوراء بنفش (UV) و مرئی (Visible – Spectroscopy)64

5-5-7- رزنانس مغناطیسی هسته (nmr)65

5-5-8- گاز کروماتوگرافی قدام با طیف سنجی جرم (GC-Mass)65

**فصل ششم: مواد و روشها**

6-1- نمونه های گیاهی 69

6-2- دستگاههای مورد استفاده 70

6-3- مواد مورد استفاده 71

6-4- روشها 72

6-4-1- ارزیابی مورفولوژیکی 72

6-4-1-1- مواد و طرح آزمایشی 72

6-4-1-2- یادداشت برداری و ثبت خصوصیات 72

6-4-2- ارزیابی مولکولی 72

6-4-2-1- استخراج DNA73

6-4-2-2- ارزیابی کمی و کیفی نمونه های DNA74

6-4-2-3- الکتروفورز DNA75

6-4-2-4- شرایط واکنشهای PCR-RAPD76

6-4-3- ارزیابی فیتوشیمیایی 78

6-4-3-1- روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) در تشخیص وجود آلیسیس 79

6-4-3-2- تعیین مقدار آلیسیس به روش اسپکتروفتومتری 80

6-4-3-2-1- آماده سازی پیازهای A.hirtifolium81

6-4-3-2- نحوه اندازه گیری جذب در دستگاه اسپکتروفتومتری 82

**فصل هفتم: بحث و نتایج** 84

7-1- گروه بندی اکوتیپها با نشانگر RAPD85

7-2- گروه بندی بر اساس صفات مورفولوژیک 90

7-3- بررسی اکوتیپها از دیدگاه فیتوشیمیایی 92

7-4- مقایسه داده های RAPD و مورفولوژیکی 96

7-5- مقایسه داده های مورفولوژیک و آلیسیس 96

7-6- نتیجه گیری نهایی 98

7-7- پیشنهادات 98

**منابع** 100

**خلاصه پایان نامه به زبان انگلیسی** 107

 **فهرست نمودارها و اشکال**

شکل2-1 . تصویر Allium hirtifolium

شکل7-1-(الف).الگوی باندی تکثیرشده نمونه های 1تا8 DNA با اغازگ ر265

شکل7-1-(ب). الگوی باندی تکثیر شده نمونه های9تا16 DNA با اغازگر 265

شکل7-1. روابط خویشاوندی اکوتیپهای Allium hirtifolium با استفاده از

 داده های RAPD

شکل7-.2 روابط خویشاوندی اکوتیپهای Allium hirtifolium با استفاده از

 داده های مورفولوژی

شکل7- 3-(الف ).الیسین موجود د ر اکوتیپهای Allium hirtifolium استخراج

شده بوسیله روش TLCو عکسبرداری زیر UV

شکل7- 3-(ب). مقدار الیسین موجود در اکوتیپهای Allium hirtifolium

**چکیده**

 بیش از 139 گونه آلیوم در ایران گزارش شده اند که حدود 30 گونه آن بومی خود ایران هستند . در این میان Allium hirtifolium به لحاظ اینکه تاکنون تحقیقاتی از لحاظ مولکولی و یا مورفولوژیکی بر روی آن انجام نشده و تعداد تحقیقاتی که در مورد این گونه خاص در دنیا انجام گردیده, به لحاظ کمی بسیار اندک می باشد, لذا بر آن شدیم تا با جمع آوری این گیاه از نقاط اصلی رویش ان که عمدتا مناطق مرکزی ایران و خصوصاً استان لرستان است, به بررسی ابعاد مولکولی و مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی آن بپردازیم. بررسی های ما بر روی این گونه شامل بخش های زیر می باشد:

**بخش اول: جمع آوری و نگهداری مواد گیاهی**

ابتدا، نمونه های گیاهی از شانزده منطقه مختلف استان لرستان جمع آوری و در مرحله بعد مرکز تحقیقات منابع طبیعی استان لرستان و همچنین پژوهشکده علوم گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی تعیین هویت گردید و سپس غده ها تا انجام آزمایشات بعدی در یخچال و دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

**بخش دوم: بررسی مزرعه ای**

غده های آلیوم در آذرماه 1384 در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در سه تکرار، در هر ردیف 4 غده از هر اکوتیپ خاص به طور تصادفی انتخاب و سپس با فاصله 20 سانتی متر روی ردیف و 35 سانتی متر بین ردیف کشت شدند.

پس از رویش از سطح خاک، اطلاعات مورفولوژیکی از قبیل طول برگ، عرض برگ، ارتفاع ساقه گلدهنده، تعداد برگ، وزن متوسط غده ها در بوته، تعداد غده در بوته، مدت زمان کاشت تا سبز شدن و مدت زمان کاشت تا گل دهی، در هر بوته اندازه گیری شدند.

**بخش سوم: بررسی مولکولی با تکنیک RAPD**

الف) کشت در گلخانه: در فروردین ماه 1385 تعداد دو غده از هر اکوتیپ به طور تصادفی انتخاب و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، در گلدان کشت شدند و پس از رویش از سطح خاک و پس از حدود 10 روز برگهای جوان چیده شده و سریعاً در داخل یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده بوعلی محل انجام آزمایشات مولکولی، منتقل گردید و در فریزر و در دمای 20- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد.

ب) استخراج DNA : با روش Doyle and Doyle یا Hot CTAB ، DNA ها استخراج و پس از استخراج با دستگاه UVTECH، مشاهده گردیده و عکس برداری شدند. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری کیفیت DNA بررسی شد و نسبت جذب 280/260 اکثر DNA ها بین 2-8/1 بودند که نشان از کیفیت خوب DNA استخراج شده از لحاظ عدم آلودگی به پروتئین و یا DNA و پلی ساکاریدها و ... بود.

ج) PCR : با کمک 20 آغازگر ساخت دانشگاه بریتیش کلمبیا که 16 تا از آنها چند شکلی خوبی نشان دادند و براساس روش آدامز (1998),PCR انجام گردید و پس از الکتروفورز ژل اگارز 5/1 درصد و عکسبرداری از ژل ها ، با نرم افزار(NTSYS 2/02) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و براساس الگوریتم UPGMA دندروگرام رسم گردید.

**بخش چهارم: بررسی فیتوشیمیایی**

از آنجا که اکثر ترکیبات شیمیایی آلیوم ها ترکیبات گوگردی بوده و چیزی حدود 70 % این ترکیبات را هم آلیسین تشکیل می دهد لذا بررسی فیتو شیمیایی بر روی درصد آلیسین در اکوتیپ های مختلف انجام گردید و عصاره موجود در غده های گیاهان به روش بریتیش فارماکوپه, با مقداری تغییرات استخراج و با روش کاهش جذب در طول موج 324 نانومتر و پس از اختلاط با ماده ای به نام4 – مرکاپتو پیریدین میزان آلیسین اندازه گیری شد.

**نتایج حاصل از بررسی مورفولوژیک**

پس از ترسیم دندروگرام با کمک نرم افزار SAS شش گروه مختلف مورفولوژیک بدست آمد که تنوع موجود در آنها ارتباط زیادی با تنوع جغرافیایی نداشت. تجزیه واریانس و آزمون دانکن، اختلاف معنی داری را در بین بعضی صفات در اکوتیپ ها نشان داد.

**نتایج حاصل از بررسی مولکولی RAPD**

 در مجموع از 20 آغازگر استفاده شده، 16 تا چند شکلی بسیار بالایی را نشان دادند.درصد چند شکلی تمام آنها بالای 90% برآورد گردید و مشخص شد که تمام آنها از کارایی بالایی در تشخیص ژنوتیپ های مختلف برخوردار هستند. بررسی دندروگرام حاصل از ماتریس 0 و 1 ، اکوتیپ ها را در هر 8 گروه مختلف قرار داد. در این بررسی ارتباط زیادی بین گروه بندی مولکولی و جغرافیایی یافت نگردید.

**نتایج حاصل از بررسی فیتوشیمیایی**

میزان آلیسین در اکوتیپ ها با هم تفاوت داشت و از 61 /0 تا 63/3 میلی گرم آلیسین در هر گرم غده تازه متفاوت بود.میزان آلیسین با بعضی صفات مورفولوژیک از قبیل وزن غده همبستگی مثبت داشت. از مقایسه نتایج بدست آمده چنین استنباط می شود که تنوع ژنتیکی در میان اکوتیپ ها زیاد بوده بطوریکه حتی در اکوتیپ های یک منطقه نیز این مسئله وجود دارد و علت این تنوع زیاد ژنتیکی ممکن است عواملی از قبیل جهش های ژنی و نیز روش های تولید مثل جنسی باشد که البته این مسئله نیاز به بررسی بیشتری دارد.

در این بررسی مهمترین روش تشخیص چند شکلی و اختلافات ژنتیکی میان اکوتیپ ها استفاده از نشانگر RAPD بود. این روش هم روشی ساده و هم دقیق است و قادر به شناسایی اختلافات کوچک ژنتیکی می باشد.

**فصل اول**

**مقدمـه**

استفاده از نشا نگرهای ژنتیک قدمتی برابر با تاریخ بشر دارد. انسانهای نخستین، حتی آنهایی که هنوز کشاورزی را فرا نگرفته بودند و برای ادامه زندگی مجبور به جمع آوری بذر و میوه گیاهان بودند، بدون آنکه خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناختن و تمایز انواع بذر و میوه و جانوران وحشی استفاده می کردند و برخی را به برخی دیگر ترجیح می دادند، اما به صورت مدون و دانش مدار، شاید مندل، نخستین کسی بود که از نشا نگرهای مورفولوژیک يا نشا نگرهای مبتنی بر فنوتیپ برای مطالعه چگونگی توارث صفات در نخود فرنگی استفاده کرد (9).

 تا قبل از مندل، اصلاح گیاهان به عنوان هنر محسوب می شد و گزینش بر اصول علمی استوار نبود و اصلاحگران موفق افرادی بودند که استعداد زیادتری در تشخیص تنوع موجود داشتند. با پیشرفت علم ژنتیک و علوم وابسته، اصلاح گیاهان، با این علوم مرتبط شد و دیگر هنر و مهارت به تنهایی در امر گزینش دخالت نداشت و به نژادگر بنابر اصول علمی و با تعمّد می توانست تنوع و تغییراتی در گیاهان ایجاد نماید و از این راه واریته ها و ارقام جدید با صفات دلخواه به وجود آورد. (15) استفاده از نشا نگرهای ژنتیک، خصوصاً نشانگرهای مولکولی، ابزاری برای شناسایی تنوع و نوع تنوع هستند.(5) تنوع گونه ها در محیط به توانایی تولید و پایداری آن اکوسیستم وابسته است.(9)

روش های مولکولی ابزاری مناسب برای مطالعه اثر تنوع ژنتیکی گیاهی روی پایداری اکوسیستم هاست. این تنوع را ممکن است در چند سطح مورد بررسی قرارداد. تنوع حیاتی یک اکوسیستم معمولا از روی تعداد گونه های موجود در آن مشخص می شود. ضمن اینکه تنوع درون گونه ای نیز ممکن است سهم قابل توجهی در باروری سیستم داشته باشد. روش های مولکولی، امکانات ویژه را برای ارزیابی تنوع حیاتی ارائه می دهند و می توانند روش کلیدی برای ایجاد راهبردهای حفاظتی مناسب باشند.(13)

کاربردهای علمی بیولوژی مولکولی گیاهی و استفاده از نشانگرها به طور خلاصه شامل : (13)

1. تشخیص گیاهان 2- تشخیص عوامل بیماریزا 3- شناسایی گیاهان تجاری، صنعتی، دارویی 4- بررسی فیلوژنتیکی گیاهان 5- مدیریت گیاهان وحشی 6- مدیریت منابع ژنتیکی 7- اصلاح گیاهان از لحاظ کیفی و کمی و مقاومت به بیمارها و نیز عملکرد 8- انتقال ژن و...

ذخایر گیاهی هر کشور، مهمترین منابع و ثروتهای آن کشور به حساب آمده و ممالکی که به ارزش واقعی این ذخایر پی برده اند، آنها را حتی از طلا و نفت و سایر منابع زیر زمینی با ارزش تر می دانند.

گونه های مختلف Allium دارای ارزشهای فراوانی از لحاظ غذایی، دارویی و پزشکی هستند واثرات متعدد دارویی آنها بررسی شده است و از این خواص دارویی از هزاران سال قبل در درمان بیماریهایی مثل دیابت، بیماری های قلبی و التیام سیستم دفاعی و ایمنی بدن، درمان روماتیسم و... استفاده می شده است.(10)

جنس آلیوم متشکل از بیش از 700 گونه است(61) که بیش از 139 گونه آن در ایران گزارش شده است و در حدود 30 گونه آن بومی خود ایران هستند(78) Allim hirtifolium یک گونه قدیمی و بومی ایران است که به عنوان طعم دهنده و چاشنی غذایی استفاده می شده است.(133) در سالهای اخیر استفاده همه جانبه از نشا نگرهاي مولکولی در تحقیقات Allium مثل، توالي يابي DNA، بررسی سریع انواع سیتوپلاسمها و تشخیص گیاهان هیرید و استفاده وسیع در تهیه نقشه هاي ژنتیکی رو به افزایش است .

مشهورترین ترکیبات فيتوشیمیایی جنس Allium، ترکیبات گوگردی بوده که شاخصترین آنها که در غده ها و پیازهای خورد نشده آنها وجود دارد آلیین یا S- آلیل- (+)L- سیستئین سولفوکسید است و به دنبال خورد کردن یا پودر کردن غده ها، تحت اثر آنزیم آلیناز به آلیسین تبدیل می شود(60). هدف ما در این تحقیق بررسی تنوع موجود در اکوتیپهای A.hirtifolium موجود در مناطق زیست این گونه در استان لرستان از دیدگاه مولکولي با تكنيك (RAPD)، مورفولوژیکی وفیتوشیمیایی(آلیسین) می باشد و رابطه این نشا نگرها با هم و توانایی آنها در تعیین میزان تنوع را مورد بررسی قرار خواهیم داد.

 **فهرست جداول**

جدول6-1. مناطق جمع اوری نمونه های گیاهی

جدول6-2. وسایل و دستگاههای مورد نیاز برای بررسی های مولکولی و فیتوشیمیایی

جدول6-3. مواد مورد نیاز برای بررسی های مولکولی و فیتوشیمیایی

جدول6-4-2-4. اغازگرهای مورد استفاده در بررسی های مولکولی

جدول7-1. چند شکلی و تعداد ژنوتیپهای جدا شده توسط اغازگرها

جدول7-2-(الف). تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی

جدول7-2-(ب). مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی با ازمون دانکن

جدول7-3. الیسین در اکوتیپهای Allium hirtifolium

جدول7-4. همبستگی صفات مورفولوژیک والیسین