DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2012.6378

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۲٤-۱٤ (۱۳۹۱)

مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های گل‌راعی (*Hypericum perforatum* L.) ایران با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای

سیده رقیه موسوی[۱]، جعفر احمدی[۲*] و فاطمه سفیدکن[۳]

۱- کارشناس‌ارشد، اصلاح نباتات، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمینی (ره)، قزوین
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، عضو هیئت علمی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین
پست الکترونیک: njahmadi910@yahoo.com
۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰٤/۱۱

چکیده

گل‌راعی یک گیاه دارویی با متابولیت‌های ثانویه فراوان می‌باشد که دارای خواص درمانی ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و همچنین فعالیت ضد افسردگی است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۲۹ توده گل‌راعی متعلق به هشت جمعیت جمع‌آوری شده از استان‌های آذربایجان‌غربی، گیلان، تهران، سمنان، کردستان، لرستان، اردبیل و گلستان با استفاده از ۱۲ آغازگر نشانگر ISSR بررسی گردید. تعداد باندهای هر آغازگر از ۱۱ تا ۲٦ متغیر بود و در مجموع ۲۲۱ قطعه تکثیری امتیازدهی شدند که از این تعداد ۱۹٦ مکان چند شکلی نشان دادند. میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگرها (PIC) ۰/۳۷ برآورد گردید و آغازگرهای UBC–841Y و UBC-807 بالاترین مقدار PIC (۰/٤۱) را نشان دادند. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش الگوریتم UPGMA تنوع بالایی را در بین توده‌های مورد بررسی نشان داد. بیشترین فاصله بین توده ۲۳۳۳۵ از اردبیل با توده‌های ۱۷۹۸۲ و ۱٤۲۰٦ از آذربایجان‌غربی و بین توده‌های ۳۳۳۳۷ از گیلان و ۱۷۹۸۲ از آذربایجان‌غربی و کمترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های ۱۳۱۸۰ و ۱۳۳٤۷ از گیلان مشاهده شد. واریانس مولکولی درون جمعیت‌ها (توده‌های درون استان‌ها) و بین جمعیت‌ها (بین استان‌ها) به‌ترتیب ۷۸ درصد و ۲۲ درصد از واریانس کل داده‌ها برآورد شد که این توزیع واریانس نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا بین توده‌های مورد بررسی در هر ناحیه جغرافیایی بود. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ISSR بطور مؤثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی توده‌های گل‌راعی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گل‌راعی، نشانگر، ISSR.

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع بسیار ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، اشتغال‌زایی و صادرات غیر نفتی داشته باشند. تنوع آب و هوایی و شرایط اکولوژیکی مختلف، باعث تنوع گیاهان دارویی در سراسر ایران شده است. خوشبختانه در سالهای اخیر، تلاش‌های فراوانی

برای شناخت همه جانبه گیاهان دارویی از نظر پراکنش آنها در ایران، شرایط اکولوژیک، استفاده‌های دارویی، نحوه استخراج و شناسایی مواد مؤثره، کشت و اهلی کردن، اصلاح گونه‌های مهم، بررسی روش‌های نوین در افزایش مواد موثره و مطالعه اثرات دارویی آنها صورت گرفته و نتایج جالب توجهی نیز حاصل شده است (Technical report writing committees, 2008). گل‌راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. از گیاهان بسیار ارزشمند دارویی است که متعلق به تیره کلازیاسه (Clusiaceae) و زیر خانواده هایپریکوئید (Hypericoideae) می‌باشد (Hazler *et al*., 2008). این گیاه بومی اروپا، آسیا و شمال آفریقاست. در ایران در نواحی شمال، شمال شرق، شمال غرب و غرب، استان‌های فارس، کهکلیویه و دامنه کوه‌های البرز می‌روید (Naghdibadi *et al*., 2005) و دارای خواص درمانی ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی و همچنین فعالیت ضدافسردگی است (Hazler *et al*., 2008). از آنجا که گیاهان دارویی منابع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه هستند، حفاظت ژرم‌پلاسم در زیستگاه‌های طبیعی‌شان اهمیت ویژه‌ای دارد (Ghanadha *et al*., 2003). بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم گیاه، تعیین ساختار ژنتیکی و پتانسیل هر گونه گیاهی قبل از انجام هر کار اصلاحی و معرفی ارقام کیفی با عملکرد بالا، امری لازم و ضروری در توسعه استراتژی‌های جمع‌آوری و حفاظت مواد گیاهی به عنوان منابع ژنتیکی می‌باشد. یکی از روشهای مهم بررسی تنوع ژنتیکی، روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA است که به طور قابل توجهی در تجزیه و تحلیل فیلوژنی (Phylogeny)، شناسایی مولکولی ژنوتیپ‌ها و بررسی تنوع و خویشاوندی ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت نشانگرهای مولکولی به این دلیل است که این نوع نشانگرها از نظر فنوتیپی خنثی بوده و تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند. البتّه تعداد زیادی از این نشانگرها برای تجزیه و تحلیل ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (Moemeni, 2004). در بررسی‌های انجام شده در زمینه تنوع ژنتیکی گل‌راعی، با استفاده از نشانگر AFLP بر روی ٥٦ توده گل‌راعی در آمریکا مشخص شده است که این نشانگر نه فقط برای تعیین تنوع درون گونه‌ای مناسب است، بلکه به‌عنوان ابزاری برای تصدیق وجود مواد مؤثره در گیاهان دارویی از طریق انگشت نگاری ژنتیکی می‌باشد (Percifield *et al*., 2007). در آزمایشی جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ جمعیت و توده بومی ایتالیایی *Hypericum perforatum* L. از ١٤ آغازگر RAPD، هفت آغازگر ISSR و چهار آغازگر AFLP استفاده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های هر سه نشانگر جمعیت‌ها را به ۳ گروه مجزا تقسیم کرد (Barcaccia *et al*., 2006). در تحقیقی ساختار ژنتیکی هشت جمعیت گل‌راعی در کرواسی با استفاده از ٦ آغازگر RAPD بررسی شده است. با توجه به نتایج بدست آمده میزان تنوع ژنی بین ۰/۱۲ و ۰/۳ برآورد گردید. بر این اساس پیشنهاد شد که تنوع کم می‌تواند به دلیل غلبه آپومیکسی و مسافت کم انتشار بذر در این گیاه باشد (Hazler *et al*., 2008). در آزمایشی تنوع ژنتیکی و روابط گونه‌ای ١٦ ژنوتیپ گیاه دارویی گرویلیا توسط نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی شده است. ۱۲ آغازگر ISSR مورد استفاده در مجموع ۲۰۸ قطعه و باند قابل امتیازدهی تولید کردند که چند شکلی بین گونه‌ای ١٦ ژنوتیپ مورد بررسی را ۹۹/۵۱ درصد تخمین زدند. دندروگرام ترسیم شده از ترکیب داده‌های دو نشانگر،

گونه‌های مورد بررسی را به ۳ گروه تقسیم کرده است (Pharmawati & McFarlane, 2004). با توجه به اهمیت نگهداری و اهلی سازی گل‌راعی و از آنجا که تاکنون هیچ تحقیق و گزارشی مبنی بر بررسی تنوع ژنتیکی گل‌راعی با استفاده از نشانگر ISSR در ایران گزارش نشده است، این پژوهش، با هدف بررسی تنوع ژنتیکی درون (داخل استانی) و بین جمعیتی (بین استانی) ۲۹ توده گل‌راعی موجود در بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور (جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران) با استفاده از نشانگر بین ریزماهواره‌ای ISSR انجام گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این پژوهش ۲۹ جمعیت از توده‌های گل‌راعی جمع‌آوری شده از استان‌های آذربایجان‌غربی، گیلان، کردستان، لرستان، تهران، سمنان، اردبیل و گلستان (جدول ۱) بررسی شدند.

جدول ۱- منشأ جغرافیایی و کد بانک ژن (مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور) توده‌های گل‌راعی مورد استفاده در این تحقیق

کد نمونه	کد توده	محل جمع‌آوری	کد نمونه	کد توده	محل جمع‌آوری
۱۸۸۲۳	The	تهران	۲۲۸۵۲	Aza1	آذربایجان غربی – چالدران
۱۷۱۹۷	Sem	سمنان	۲۲۸۵۳	Aza2	آذربایجان غربی – چالدران
۷۵۸۱	Gol	گلستان	۱٤۱۷۱	Aza3	آذربایجان غربی – ارومیه
۱۳۱۷٦	Gil1	گیلان– تالش ـ هشتپر	۱٤۱٦٤	Aza4	آذربایجان غربی – سلماس
۲۷۰۷۷	Gil2	گیلان – فومن	۱٤۲۰٦	Aza5	آذربایجان غربی – سلماس
۱۳۳۳۷	Gil3	گیلان– تالش ـ سوپان	۱۷۹۸۰	Aza6	آذربایجان غربی
۲۷۱۳۲	Gil4	گیلان – ماسال	۱۷۹۸۲	Aza7	آذربایجان غربی
۱۳۱۸۰	Gil5	گیلان– تالش– دیزگاه	۲۳۳۳۵	Ard1	خلخال– کندرخ
۲۷۱۰۱	Gil6	گیلان– فومن ـ ماسوله	۱۸۵۹٦	Ard2	اردبیل ـ فرش‌رستم
۱۳۳٤۷	Gil7	گیلان	۱۰٦٦۷	Lor1	لرستان
۱۳۳۳۲	Gil8	گیلان – تالش	۱۵۷۸۱	Lor2	لرستان
۲۷۱۱۸	Gil9	گیلان – ماسال	۳۱۰٤۳	Lor3	لرستان
۱۳۳٤٦	Gil10	گیلان	۲۲٦۰۰	Kor1	کردستان
۱۳۳٤۳	Gil11	گیلان	۲۵۹۷۸	Kor2	کردستان
			۹۰۳	Kor3	کردستان

استخراج DNA: استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته توصیف شده توسط Doyle و Doyle (1990) از گیاهچه‌های جوان گل‌راعی انجام شد. سپس DNAهای استخراج شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) سترون‌سازی‌شده حل گردیدند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کمیت و کیفیت DNA بدست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ و ژل آگاروز ۰/۸ درصد تعیین گردید و رقیق سازی لازم با

توجه به غلظت هر نمونه جهت استفاده در واکنش‌های PCR انجام گردید. در این پژوهش از ۱۵ آغازگر قلاب شده بین ریزماهواره‌ای ISSR متعلق به دانشگاه بریتش کلمبیا (UBC) ساخت شرکت سیناکلون (ایران، تهران) استفاده گردید. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲ـ توالی نوکلئوتیدی و کد آغازگرهای ISSR قلاب شده مورد استفاده در این تحقیق

توالی آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر
$(TC)_8C$	UBC-823	$(AG)_8T$	UBC-807
$DBD(AC)_7$	UBC-889	$(GA)_8TYC$	UBC-850
$(GT)_8YA$	UBC-849	$(AC)_8T$	UBC-825
$(GA)_8CCY$	UBC-841Y	$(GA)_8C$	UBC-811
$(AC)_8YA$	UBC-856	$(CA)_8A$	UBC-817
$(AC)_8YT$	UBC-855	$(AC)_8C$	UBC-826

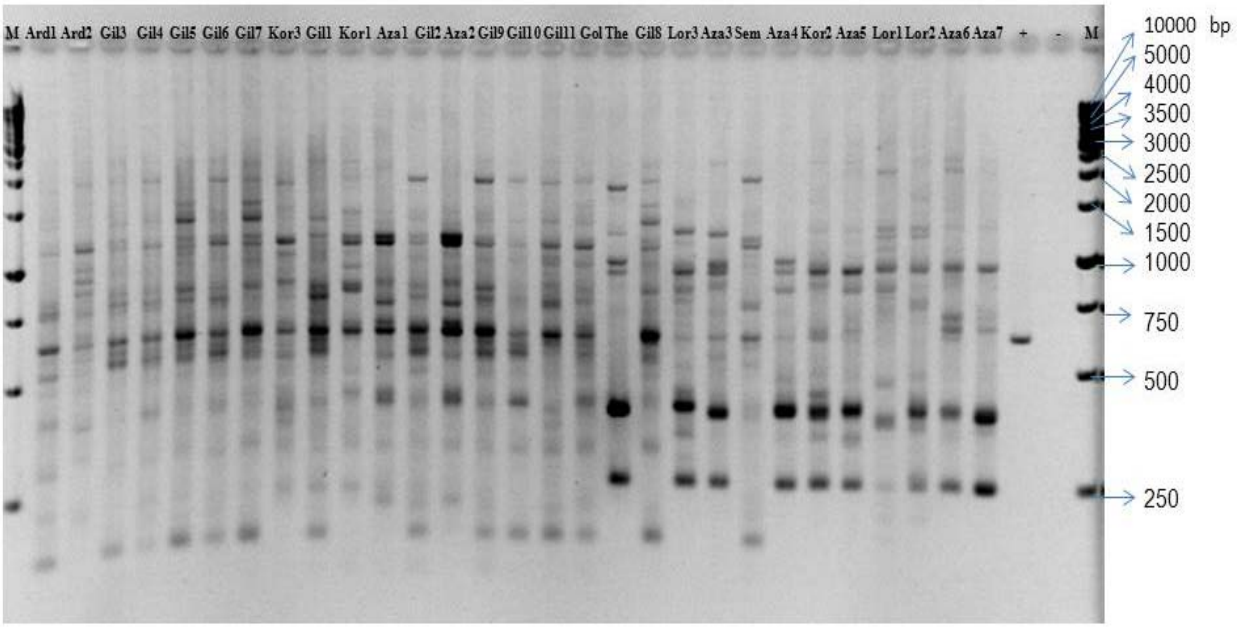
پس از بررسی اولیه محصولات آغازگرها از نظر تکرارپذیری و چندشکلی، از بین آنها تعداد ۱۲ آغازگر با بهترین وضوح باندی بالا جهت اعمال در تمام ژنوتیپ‌ها انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Techne مدل TC-5000) در حجم۱۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ میکرولیتر PCR Master Kit (1x) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل دمای ۹٤ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، اتصال آغازگرها به مدت ٤۵ ثانیه در دمای ۵۲ـ٤٦ درجه (متناسب با توالی آغازگر)، بسط در دمای ۷۰ درجه به مدت ۲ دقیقه و در پایان بسط نهایی در ۷۰ درجه به مدت ٤ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل به مدت ۲۰ دقیقه با اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری توسط دستگاه ژن فلش (ساخت شرکت UVP آمریکا) انجام شد.

پس از ثبت اطلاعات، باندهای حاصل از هر آغازگر بر روی ژل براساس همردیفی باندها و به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی شدند. از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین توده‌ها استفاده گردید. گروه‌بندی توده‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین حسابی فاصله‌ها (UPGMA) با نرم‌افزار NTSYSpc.2.02 محاسبه و دندروگرام آن ترسیم گردید. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) جهت رسم نمودار دو بعدی بای پلات انجام گردید. میزان اطلاعات چندشکل (PIC) (Polymorphism information content) از طریق فرمول نشانگرهای از نوع غالب $PIC = 1-p^2-q^2$ (p برابر است با فراوانی حضور باند و q برابر است با فراوانی عدم حضور باند) و شاخص نشانگری (Marker index) برای هر آغازگر با استفاده از رابطه $MI = PIC \times EMR$ محاسبه گردید که EMR (Effective Multiplex Ratio) از نسبت نشانگرهای چند شکل به کل نشانگرها، بدست آمد. برای بررسی تنوع

ژنتیکی درون و بین جمعیتی نیز از نرم‌افزار Genalex 6.4 استفاده شد.

نتایج

آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه در مجموع ۲۲۱ قطعه (باند) قابل امتیازدهی تولید کردند که از آنها ۱۹۶ باند (۸۸/۷ درصد) چندشکلی نشان دادند. تعداد باندهای چندشکل هر آغازگر از ۱۱ تا ۲۶ متغیر بود. آغازگر UBC-841Y (GA)$_8$CCY) بیشترین تعداد مکان ژنی یا قطعه تکثیر یافته با ۲۸ باند و آغازگر UBC-849 (GT)$_8$YA) کمترین تعداد مکان ژنی با ۱۳ باند را تولید کردند. الگوی باندی DNAهای تکثیرشده از ۲۹ ژنوتیپ گل‌راعی توسط آغازگر UBC-841Y در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱ـ الگوی باندی DNAهای تکثیرشده از ۲۹ توده گل‌راعی توسط آغازگر UBC-841Y (GA)8CCY))

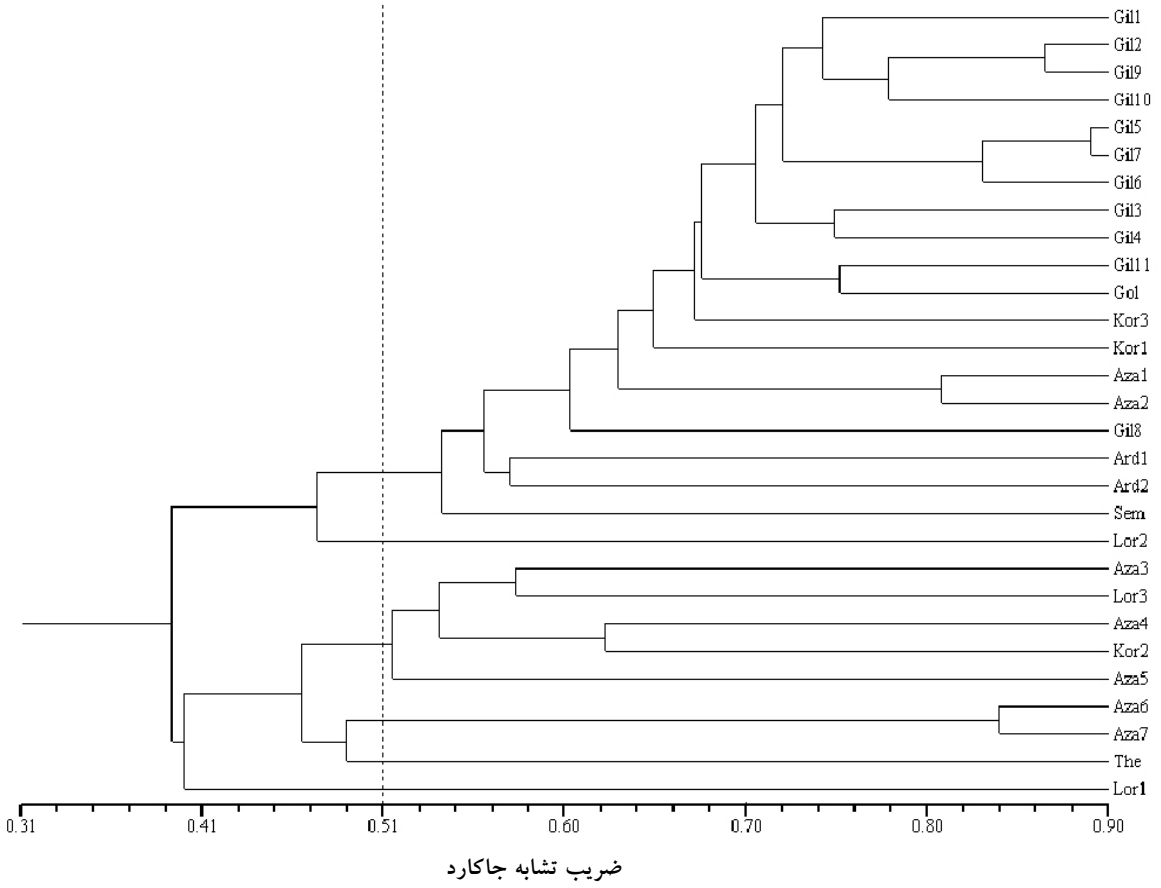
بیشترین درصد چند شکلی (۰/۹۵) با استفاده از آغازگر UBC-855 (AC)$_8$YT) و کمترین درصد چند شکلی (۰/۷) توسط آغازگر UBC-823 (TC)$_8$C) تولید شد. فاصله ژنتیکی توده‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد از ۰/۲۸ تا ۰/۸۹ متغیر بود. بالا بودن دامنه فاصله ژنتیکی میان توده‌ها نشان‌دهنده تنوع بالای توده‌های گل‌راعی ایران می‌باشد. به‌طوری‌که محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فراوانی آللی برای هر آغازگر بطور جداگانه محاسبه گردید (جدول ۳). میانگین محتوای اطلاعات چند شکل ۰/۳۷ بدست آمد که بین ۰/۳۱ تا ۰/۴۱ متغیر بود. بالاترین مقدار PIC به آغازگرهای UBC-807، UBC-841Y، UBC-855 و UBC-889 و کمترین مقدار PIC مربوط به آغازگر UBC-823 بود.

جدول ۳- درصد چندشکلی، تعداد مکان‌های تکثیر شده چند شکل، محتوای اطلاعات چند شکل و شاخص نشانگری در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۹ توده گل‌راعی

کد آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	درصد چند شکلی	PIC	MI
UBC_807	۱٦	۱٤	۰/۸۷	۰/٤۱	۲/۹٦
UBC_850	۲۲	۱۹	۰/۸٦	۰/۳۹	۳/۷
UBC_811	۲۰	۱۸	۰/۹	۰/۳۸	۳/۵۱
UBC_825	۱٤	۱۱	۰/۷۸	۰/۳۳	۲/۱۱
UBC_826	۱۷	۱٦	۰/۹٤	۰/۳۷	٤/۰۵
UBC_823	۱۷	۱۲	۰/۷	۰/۳۱	۲/٦۱
UBC_ 841Y	۲۸	۲٦	۰/۹۳	۰/٤۱	٦/۲۵
UBC_849	۱۳	۱۲	۰/۹۲	۰/۳۹	٤/٤۱
UBC_855	۱۹	۱۸	۰/۹۵	۰/٤	٤/۰۲
UBC_856	۱۷	۱۵	۰/۸۸	۰/۳٦	۳/۸۵
UBC_889	۱۷	۱٦	۰/۹٤	۰/٤	۳/۸۳
UBC_817	۲۱	۱۹	۰/۹	۰/۳٤	٤/۳۸
مجموع	۲۲۱	۱۹٦	۱۰/٦	٤/٤۹	٤۳/۷
میانگین	۱۸/٦۳	۱٦/۵۵	۰/۸۸	۰/۳۷	۳/۷

همچنین از شاخص نشانگری (MI) به‌عنوان معیاری برای تخمین چندشکلی نشانگرها استفاده شد که بین ۲/۱۱ تا ٦/۲۵ متغیر بود. بالاترین شاخص نشانگری مربوط به آغازگر UBC-841Y و کمترین مقدار آن به آغازگر UBC-825 تعلق داشت. میانگین شاخص نشانگری آغازگرها ۳/۷ محاسبه شد. به منظور تشخیص بهترین روش محاسبه ضریب شباهت و خوشه‌بندی (خوشه‌ای کردن) نمونه‌ها، همبستگی (ضریب) کوفنتیک که یک همبستگی بین شباهت‌های نشان داده شده روی دندروگرام و درجه واقعی شباهت آنهاست و بیانگر اعتبار و همخوانی خوشه‌ای حاصل با ماتریس داده ورودی می‌باشد، برای هر روش ترکیبی محاسبه شد. بیشترین مقدار (r = ۰/۹۵) برای روش خوشه‌ای کردن با استفاده از الگوریتم UPGMA براساس ضریب شباهت جاکارد مشاهده شد. بنابراین با استفاده از تشابه بدست آمده بین نمونه‌ها، گروه‌بندی آنها با استفاده از این الگوریتم و براساس شاخص جاکارد و آنالیز اتصال همسایه انجام شد (شکل ۲).

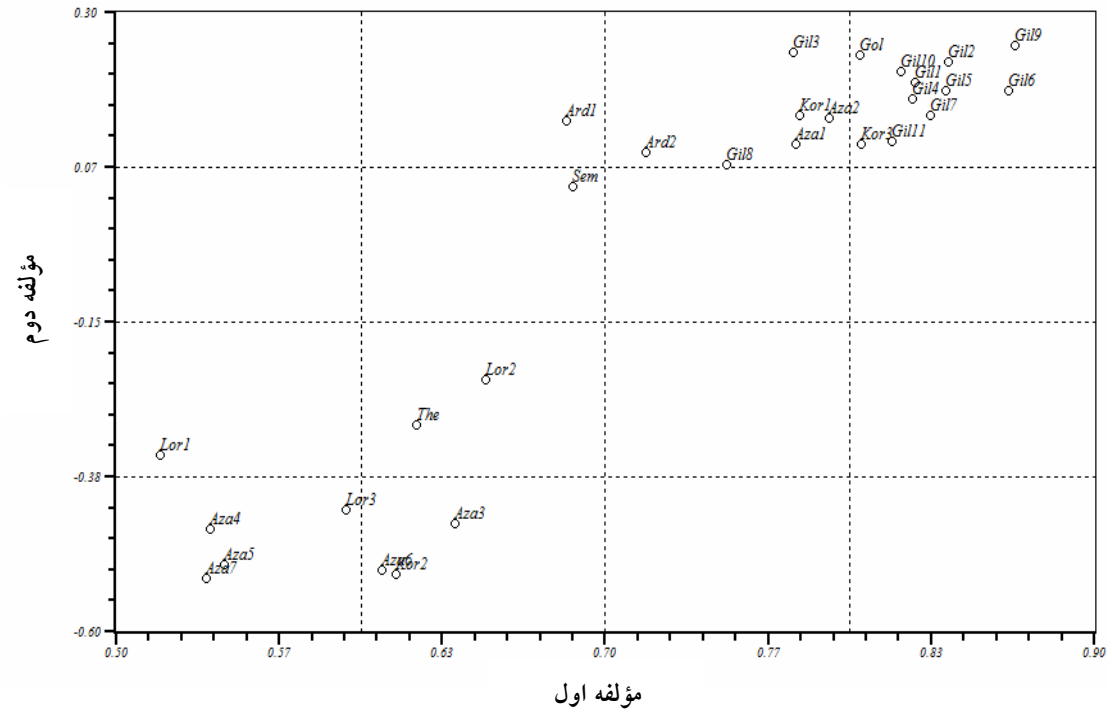
با در نظر گرفتن خط برش از ضریب تشابه ۵۱ درصد، توده‌های مورد مطالعه به ٦ گروه اصلی تقسیم شدند.۲۰ توده از مناطق مختلف جغرافیایی در گروه اول قرار گرفتند که شامل همه توده‌های گیلان، اردبیل و کردستان به‌استثنای توده ۲۵۹۷۸ از کردستان به همراه دو توده از آذربایجان غربی و یک توده از سمنان، لرستان و گلستان بودند. گروه اول به ۱۰ زیرگروه تقسیم شد که نشان‌دهنده تنوع بالا در بین توده‌های این گروه بود.



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ۲۹ توده گل‌راعی براساس باندهای حاصل از نشانگرهای ISSR با روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

در اولین زیر گروه توده سمنان در یک گروه مجزا قرار گرفت. در زیر گروه دوم توده‌های استان اردبیل در یک گروه مجزا قرار گرفتند. در زیرگروه سوم توده ۱۳۳۳۲ از گیلان در یک گروه و در زیر گروه چهارم توده‌های ۲۲۸۵۳ و ۲۲۸۵۲ از آذربایجان غربی در یک گروه قرار گرفتند. در زیرگروه پنجم توده ۲۲۶۰۰ و در زیرگروه ششم توده ۹۰۳ که هر دو متعلق به استان کردستان بودند قرار گرفتند. توده‌های استان گیلان در بقیه زیر گروه‌ها قرارگرفتند. تنوع موجود در بین توده‌های موجود در یک منطقه جغرافیایی را می‌توان به دگرگشنی گیاه نسبت داد. در گروه اصلی دوم فقط توده ۱۵۷۸۱ متعلق به لرستان قرار گرفت. گروه سوم شامل ۵ توده متشکل از سه توده آذربایجان غربی، یک توده از لرستان و یک توده از کردستان بودند که به ۳ زیر گروه تقسیم شدند. در زیر گروه اول توده ۱٤۲۰٦ (آذربایجان غربی) در گروه مجزایی قرار گرفت. در زیر گروه دوم توده‌های ۱٤۱۷۱ (آذربایجان غربی) و ۳۱۰٤۳ (لرستان) در یک گروه و توده‌های ۱٤۱٦٤ (آذربایجان غربی) و ۲۵۹۷۸ (کردستان) در یک گروه قرار گرفتند. در گروه اصلی چهارم دو توده آذربایجان غربی (۱۷۹۸۰ و ۱۷۹۸۲) قرار گرفتند. در گروه اصلی پنجم توده ۱۸۸۲۳ از تهران و در گروه آخر توده ۱۰٦٦۷ از لرستان قرار گرفتند. سه توده ۱۸۸۲۳ از تهران و

۱۰۶۶۷ و ۱۵۷۸۱ از لرستان متمایزترین توده‌ها بودند و در ضریب تشابه ۵۱ درصد با سایر گروه‌ها، اضافه شدند. تجزیه به مختصات اصلی براساس ماتریس تشابه جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS spc.2.02 انجام شد. بر این اساس دو مؤلفه اصلی اول تقریبا" ۶۲ درصد واریانس کل داده‌ها را توجیه نمودند و نمودار دوبعدی براساس این دو مؤلفه ترسیم گردید (شکل ۳). بیشتر توده‌های متعلق به یک منطقه جغرافیایی خاص در یک ناحیه از نمودار متمرکز شده‌اند و نتایج بدست آمده از گروه‌بندی توسط تجزیه به مختصات اصلی تا حدود زیادی با نتایج بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت.



شکل ۳ـ نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ماتریس تشابه جاکارد

با توجه به نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس مولکولی بر روی داده‌های آغازگرهای ISSR، میزان واریانس درون جمعیت‌ها ۳۵/۵ و واریانس بین جمعیت‌ها ۱۰/۱۶ برآورد شد (جدول٤) و واریانس مولکولی درون جمعیت‌ها (نواحی جغرافیایی) ۷۸ درصد و بین جمعیت‌ها ۲۲ درصد از واریانس کل داده‌ها را شامل شدند. این توزیع واریانس نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالا بین توده‌های مورد بررسی در هر جمعیت یا ناحیه جغرافیایی بوده و بیانگر امکان استفاده گسترده از این تنوع در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

جدول ٤- مقایسه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بین جمعیت‌های گل‌راعی با استفاده از آغازگرهای ISSR

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات(SS)	میانگین مربعات(MS)	مقدار واریانس	درصد واریانس
بین جمعیتی (بین استان‌ها)	٤	٣٣١/١٤	٨٢/٧٨	١٠/١٦	٪٢٢
درون جمعیتی (داخل‌استان‌ها)	٢١	٧٤٥/٤٨	٣٥/٥	٣٥/٥	٪٧٨
کل	٢٥	١٠٧٦/٦٢	-	٤٥/٦٦	٪١٠٠

بحث

در این آزمایش آغازگرهای دارای موتیف AC و GA سطح بالاتری از چند شکلی را در مقایسه با سایر آغازگرها نشان دادند که با نتایج Zar و همکاران (۲۰۱۲)، روی گیاه گندم، مطابقت داشت. همچنین، میانگین محتوای اطلاعات چند شکل ۰/۳۷ برآورد شد که مجدداً با نتایج Zar و همکاران (۲۰۱۲) در گیاه گندم همخوانی داشت، در حالی که Sarwat و Srivastava (2008) در بررسی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی *Tribulus terrestris* با استفاده از نشانگرهای ISSR، میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی را ۰/۳۱ گزارش کردند. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ISSR و cpSSR در گیاه *Jatropha curcas* محتوای چندشکلی اطلاعات بین ۰/۲۵ تا یک گزارش شد (Mittal & Dubey, 2010). به طور کلی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از PIC بالایی برخوردار بودند که نشان‌دهنده انتخاب صحیح آغازگرها و کارایی بالای آنها در این آزمایش می‌باشد. بنابراین، می‌توان از این آغازگرها برای بررسی سایر توده‌های گل‌راعی بهره گرفت. با توجه به منطقه جغرافیایی توده‌ها و مقایسه آن با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، تطابق مطلوبی بین فاصله ژنتیکی بعضی توده‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها مشاهده نگردید. به عنوان مثال توده‌های ١٠٦٦٧ و ١٥٧٨١ (هر دو از لرستان) اگرچه از نظر جغرافیایی نزدیک به هم بودند اما در دو گروه جداگانه قرار گرفتند و فاصله دندروگرامی زیادی (با ضریب تشابه ٤٢٪) داشتند. بعکس، توده‌های سمنان، کردستان، آذربایجان‌غربی، اردبیل و گیلان، با اینکه در مناطق جغرافیایی و اقلیمی کاملاً متفاوتی واقع شدند، اما براساس دندروگرام، فاصله ژنتیکی کمی بین آنها دیده شد (همه در گروه اول قرار گرفتند). با توجه به شواهد به نظر می‌رسد که اقلیم نقش مهمی در تنوع ژنتیکی توده‌ها ندارد. مقایسه‌ها نشان می‌دهد که دندروگرام در بعضی موارد با پراکنش جغرافیایی و اقلیمی تطابق زیادی ندارد. به عبارتی واقع شدن توده هایی با منشأ جغرافیایی متفاوت از همدیگر در یک گروه، نتایج مشخصی را بیان نمی‌کند و تطابق آشکاری بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی را نشان نمی‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جدایی جغرافیایی تنها عامل بوجود آورنده تنوع ژنتیکی نمی باشد و عواملی مانند مهاجرت‌ها و نقل و انتقال‌ها از یک نقطه به نقطه دیگر می‌توانند موجب پراکنش آنها شوند. این مطلب در مورد توده‌های مربوط به گروه اول صادق است. همچنین از آنجا که گل‌راعی گیاهی دگرگشن می‌باشد، وجود تنوع بالا در بین توده‌های گل‌راعی را می‌توان به دگرگشنی بالا در این گیاه نسبت داد. به‌طورکلی نتایج این

پژوهش نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده در این آزمایش از طریق گروه‌بندی صحیح با هر دو روش تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی، توانستند توده‌های گل‌راعی را تا اندازه‌ای از لحاظ فاصله جغرافیایی از هم تفکیک کنند. با توجه به اینکه آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق چندشکلی قابل قبولی را نشان دادند، می‌توان در مطالعات آینده روی این گیاه و حتی سایر گیاهان دارویی از آنها استفاده کرد. همچنین با توجه به تنوع بدست آمده در بین توده‌های مورد بررسی می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

– Barcaccia, G., Arzenton, F., Sharbel, T.F., Varotto, S., Parrini, P. and Lucchin, M., 2006. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L. Heredity, 96: 322-334.

– Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

– Ghanadha, M.R., Zahravi, M. and Vahdati, K., 2003. Breeding Horticultural Crops. Dibagaran, Tehran, 344p.

– Hazler Pilepic, K., Males, Z. and Plazibat, M., 2008. Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. population. Periodicum Biologorum, 110: 367–371.

– Mittal, N. and Dubey, A.K., 2010. A novel set of highly polymorphic chloroplast microsatellite and ISSR markers for the biofuel crop *Jatropha curcas*. EurAsian Journal of BioSciences, 4: 119-131.

– Moemeni Dehaghi, S., 2004. Study the genetic diversity of different species of mint, using molecular marker RAPD. Dissertation, University of. Shahre kord.

– Naghdibadi, H.A., Amin, GH.R., Makkizadeh, M. and Ziaiei, A., 2005. Review of st. john's wort (*Hypericum perforatum* L.). Journal of Medicinal Plant, 16: 1-14.

– Percifield, R.J., Hawkins, J.S., Mccoy, J.A., Widrlechner, M.P. and Wendel, J.F., 2007. Genetic diversity in *Hypericum* and AFLP Markers for Species–specific Identification of *H.perforatum* L. Plant Medicinal,739: 1614-1621.

– Pharmawati, M., Yan, G. and McFarlane, I.J., 2004. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). Australian Systematic Botany, 17: 49–61.

– Sarwat, M., Das, S. and Srivastava, P.S., 2008. Analysis of genetic diversity through AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in ribulus terrestris, a medicinal herb. Plant Cell Rep, 27: 519–528.

– Technical report writing committees., 2008. Strategic Plan of Medicinal Plants. The promotion education and agricultural research, 1-40.

– Zar, M., Ahmadi, J., Garosi, G.H.A. and Beiki, A.H., 2012. Assessment of genetic diversity of wheat cultivars tolerant and susceptible to drought using Inter Simple Sequence Repeats markers (ISSR). Modern Genetics Journal, 4: 69-76.

Genetic diversity analysis in Iranian St. John's wort accessions (*Hypericum perforatum* L.) using inter simple sequence repeats markers

S.R. Mousavi [1], J. Ahmadi [2]* and F. Sefidcon[3]

1- M.Sc., Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran.
2*- Corresponding author, Associate Prof., Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. Iran.
Email: njahmadi910@yahoo.com
3- Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran.

Received: 28.04.2012 Accepted: 01.07.2012

Abstract

Hypericum perforatum L. is a medicinal plant abounding with secondary metabolites which have clinically proven anti-inflammatory, antiviral, antifungal, and antidepressant activities. In this study, the genetic diversity of 29 accessions from eight populations collected from eight provinces (Azerbaijan, Gilan, Tehran, Semnan, Kurdistan, Lorestan, Golestan and Ardabil) were assessed using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Twelve primers containing different simple sequence repeats (microsatellite) were used. The primers produced between 11 to 26 bands. Totally the markers produced 221 amplification products, out of which 196 bands were polymorphic. The results showed that polymorphism information content (PIC) of primers was 0.37. Primers 841Y-UBC and UBC-807 had the highest PIC (0.41). Cluster analysis based on Jacquard's similarity coefficient using Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) indicated wide range of diversity across the studied accessions. The highest genetic distance was observed between 23335 (Ardabil) with 17982 and 14206 (both of West Azerbaijan) accessions and between 133337 and 17982 accessions (Gilan and Azerbaijan) revealing closer genetic relationship. The least genetic distance was observed between 13180 and 13347 from Gilan. Molecular variation within and among the populations (within and among provinces) were estimated 78% and 22% of total variance, respectively. The distribution reflects high genetic diversity between the accessions in each geographical area. The results revealed that ISSR markers could be efficiently used for genetic differentiation of the St. John's Wort accessions.

Key words: *Hypericum perforatum*, Genetic Diversity, Marker, ISSR.