

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) مناطق مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP

لیلا رضایی^۱، اردشیر قادری^۲، محمدرضا نقوی^۳، محمدعلی ابراهیمی^۴، اعظم‌السادات ریاضی^۵، علی
مهرآفرین^۶، حسنعلی نقدی‌بادی^{۷*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه پیام‌نور واحد تهران مرکزی، تهران
۲- عضو هیأت علمی، گروه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج
۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۴- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه پیام‌نور واحد تهران مرکزی، تهران
۵- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۶- عضو هیأت علمی، گروه پژوهشی کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاددانشگاهی، کرج
۷- دانشیار پژوهش، گروه پژوهشی کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاددانشگاهی، کرج
*آدرس مکاتبه: کرج، گروه پژوهشی کشت و توسعه مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی
جهاددانشگاهی، صندوق پستی: ۱۳۶۹ - ۳۱۳۷۵، تلفن: ۰۲۶-۳۴۷۶۴۰۱۰، نمابر: ۰۲۶-۳۴۷۶۴۰۲۱
پست الکترونیک: Naghdibadi@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۱/۶/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۸

چکیده

مقدمه: گل راعی یکی از گیاهان مهم دارویی ایران است که عمدتاً در درمان افسردگی و همچنین میگرن استفاده می‌شود. هدف: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی گل راعی، جمعیت‌های جمع‌آوری شده این گیاه از نقاط مختلف کشور در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی کشت و از نظر تنوع ژنتیکی و همبستگی آن با پراکنش جغرافیایی مورد بررسی قرار گرفتند. روش بررسی: DNA ژنومی از بافت برگ‌های جوان به روش CTAB استخراج شد و با آنزیم‌های *EcoRI* و *TruII* مورد هضم قرار گرفت. تکثیر قطعات حاصل هضم با ۱۲ ترکیب آغازگری طبق روش وس و رنگ‌آمیزی ژل آکرلامید با استفاده از نیترات نقره بر اساس روش باسام انجام گرفت. نتایج: در مجموع ۲۳۵ باند قابل امتیازدهی مشاهده شد که ۹۷ درصد از آنها چند شکل بودند. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی برای جفت آغازگرهای استفاده بین دو مقدار $0/45 \leq PIC \leq 0/31$ با میانگین $0/38$ بود. میزان تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها نیز از $0/29$ تا $0/89$ متغیر بود. کلاستر بندی جمعیت‌ها بر اساس جمعیت و منطقه نشان از تنوع ژنتیکی و گستره بالای رویشگاه‌های گل راعی و عدم همبستگی میان تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی بود. از سوی دیگر مختصات اصلی PC_1 و PC_2 به ترتیب $12/8$ و $8/3$ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. نتیجه‌گیری: وجود تنوع بالا میان جمعیت‌های گل راعی ایران امکان اجرای برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت ذخایر ژنتیکی را فراهم می‌سازد. البته تحقیقات گسترده‌تری روی توانایی تولید و مقدار متابولیت‌های هیپرپسین و هیپرفورین میان جمعیت‌های این گیاه لازم است. گل‌واژگان: *Hypericum perforatum* L. تنوع ژنتیکی، نشانگرهای AFLP



خارجی و تعیین تفاوت میان آنها، AFLP را روشی مناسب برای بررسی تنوع و تعیین قرابت ژنتیکی معرفی نمودند [۸]. بلجا و همکاران (۲۰۰۳) قدرت تفکیک و کارایی نشانگرهای مولکولی AFLP، RAPD و SSR را در ارقام زیتون مورد مقایسه قرار دادند و بیشترین تعداد باند چند شکلی و کمترین میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار، در مورد نشانگر AFLP حاصل شد، همچنین بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به AFLP بود که خود قابلیت تفکیک بالای این نشانگر را به تأیید می‌رساند [۶]. لیما و همکاران (۲۰۰۲) روابط ژنتیکی بین ارقام زراعی نیشکر را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که در بین ارقام نیشکر قرابت ژنتیکی زیادی وجود دارد و می‌توان با استفاده از داده‌های حاصل از AFLP با اطمینان بیشتری (نسبت به ضریب والدینی) درجه خویشاوندی را در بین ارقام نیشکر تعیین نمود [۷]. اینکرلی و همکاران (۲۰۰۱) با مطالعه بر روی ارقام بهاره و زمستانه گندم‌های دوروم ترکیه و همچنین نمونه‌های آرلیپوس گزارش دادند که نشانگر AFLP در مقایسه با سایر نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR در تعیین تنوع و تفکیک نمونه‌ها کارایی بیشتری دارد [۸].

با توجه به پیشینه تحقیقات کم صورت گرفته در رابطه با این گیاه و پراکنش وسیع در سطح کشور، هدف اصلی این تحقیق بررسی تنوع مولکولی جمعیت‌های گل راعی با استفاده از نشانگرهای AFLP و تعیین ارتباط بین تنوع ژنتیکی (در صورت وجود) با پراکنش جغرافیایی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۲۳ جمعیت جمع‌آوری شده گل راعی از نقاط مختلف کشور بود (جدول شماره ۱) که بذره‌های این جمعیت‌ها در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی کرج کشت و اقدام به تهیه نمونه‌های برگ‌ی به منظور انجام مراحل بعدی تحقیق شد.

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* گیاهی علفی پایا از خانواده Hypericaceae و بومی غرب اروپا، آسیا و شمال آفریقا است. اهمیت این گیاه در چند سال اخیر به عنوان گیاهی دارویی به ویژه برای درمان افسردگی ملایم تا متوسط به طور قابل توجهی افزایش یافته است. ترکیبات مؤثر اصلی آنها هیپرفورین (Hyperforin) و هیپرسیسین (Hypericin) می‌باشد. البته ترکیبات مؤثر بیولوژیکی دیگری نظیر فلاونوئیدها و تانن نیز در این گیاه یافت می‌شود. هیپرسیسین به عنوان متابولیت اصلی گل راعی در اندازه‌گیری کیفیت آن مورد توجه است. به هر حال مطالعات اخیر نشان داده است که هیپرفورین می‌تواند یکی از عوامل ایجاد افسردگی باشد و این گیاه همچنان یکی از گیاهان دارویی مورد تقاضا می‌باشد [۱].

تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل تنازع بقاء موجودات از جمله گیاهان در برابر تغییرات زیست محیطی است. اطلاع از وضعیت تنوع ذخایر زیستی و روابط فیلوژنی جمعیت‌ها گام اولیه و اساسی در به‌نژادی و مدیریت آنها است [۲]. با توجه به تأثیر تنوع ژنتیکی در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی، بررسی این تنوع از طریق روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی حائز اهمیت خواهد بود. امروزه بررسی تنوع و قرابت ژنتیکی میان جمعیت‌های مختلف جانوری و گیاهی با استفاده از مارکرهای مولکولی DNA روشی معمول است [۳]. نشانگرهای مولکولی AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد توالی بازی DNA مورد تکثیر، دقت و تکرارپذیری بالا به عنوان یکی از کارآمدترین نشانگرهای مولکولی در مطالعه ژرم‌پلاسم‌های گیاهی مطرح است. نشانگر AFLP در سال (۱۹۹۵) توسط ووس و همکاران معرفی شد و اساس آن تکثیر انتخابی برخی از قطعات برش‌یافته ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز می‌باشد [۴، ۵، ۶، ۷]. احکامی (۲۰۰۵) با بررسی ارتباط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دوروم ایرانی و



جدول شماره ۱- منشأ جغرافیایی جمعیت‌های گل راعی مورد مطالعه

شماره جمعیت	نام منطقه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	اقلیم
۱	ایستگاه ماکرویو، غرب رستم‌آباد	۴۹°۰۱'	۳۶°۴۵'	۵۱۴	خشک، معتدل
۲	کمربندی لاهیجان به آستانه	۵۰°۱۰'	۳۷°۱۲'	۲۰	نیمه مرطوب، سرد
۳	اسالم به خلخال	۴۸°۴۶'	۳۷°۳۷'	۱۸۲۹	نیمه مرطوب، معتدل
۴	۲۰ کیلومتری به طرف نمین	۴۸°۳۶'	۳۸°۲۳'	۹۶۶	نیمه مرطوب، معتدل
۵	کلاردشت	۵۱°۰۵'	۳۶°۳۱'	۲۲۳۸	نیمه مرطوب، معتدل
۶	نور	۵۱°۵۲'	۳۶°۳۴'	-۳	نیمه مرطوب، معتدل
۷	الموت، ۴۵ کیلومتری قزوین	۵۰°۱۵'	۳۶°۲۵'	۱۵۷۳	نیمه مرطوب، معتدل
۸	زنجان - طارم	۴۸°۳۹'	۳۶°۵۲'	۲۱۱۹	نیمه مرطوب، معتدل
۹	نهایند، سراب جنگل گیان	۴۸°۱۳'	۳۴°۰۹'	۱۶۶۹	نیمه مرطوب، معتدل
۱۰	سیسخت به طرف چشمه میشی	۵۱°۲۹'	۳۰°۵۱'	۲۳۲۹	نیمه مرطوب، معتدل
۱۱	۳۰ کیلومتری به طرف بانه از سقز	۴۶°۰۱'	۳۶°۱۰'	۱۵۸۱	نیمه مرطوب، معتدل
۱۲	عاشقلو به وانیاق نرسیده به وانیاق	۴۶°۴۶'	۳۸°۵۶'	۱۲۹۴	خشک و سرد
۱۳	بین هشترود و میانه روستای قباقی تپه	۴۷°۲۰'	۳۷°۲۵'	۱۸۶۱	خشک و سرد
۱۴	چناران مراوه تپه	۵۵°۵۴'	۳۷°۴۵'	۷۵۴	نیمه خشک، گرم
۱۵	دیزباد علیا نیشاپور	۵۹°۱۷'	۳۶°۰۵'	۱۷۳۸	خشک و سرد
۱۶	جاده فیروز کوه به گدوک	۵۲°۵۷'	۳۵°۵۲'	۱۹۰۲	نیمه مرطوب، معتدل
۱۷	پل سفید به سنگده	۵۳°۱۰'	۳۶°۰۴'	۱۴۷۶	نیمه مرطوب، معتدل
۱۸	بین زیر آب و شیرگاه	۵۲°۵۳'	۳۶°۱۵'	۳۲۲	نیمه مرطوب، معتدل
۱۹	زیارت - گرگان	۵۴°۲۷'	۳۶°۴۰'	۱۱۸۸	نیمه خشک، گرم
۲۰	آزاده شهر به طرف شاهرود	۵۵°۱۶'	۳۷°۰۱'	۴۵۵	نیمه مرطوب، معتدل
۲۱	بین کلاله و روستای دهنه	۵۵°۲۹'	۳۷°۲۴'	۲۰۲	نیمه مرطوب، معتدل
۲۲	سیاه بیشه	۵۲°۲۱'	۳۶°۰۹'	۵۵۸	نیمه مرطوب، معتدل
۲۳	آسارا به کرج	۵۱°۱۱'	۰۶°۰۲'	۱۸۶۴	نیمه خشک، سرد

و غلظت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی گرفت.

هضم آنزیمی و اتصال آداپتورها

غلظت تمامی DNA های ژنومی با عمل رقیق‌سازی به ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رسانده شد. برای انجام هضم دوگانه از آنزیم‌های *EcoRI* و *Tru1I* به شرح زیر استفاده شد: *EcoRI*: 5u, *Tru1I*: 5u, Tungo buffer 1x: 4μL, Template DNA: 250ng, DDW: 10 μL. در ادامه اجزای

استخراج DNA ژنومی

برگ‌های جوان به صورت بالک از بوته‌های هر جمعیت برداشت و بعد از شستشو با آب جاری و محلول توین ۲۰ و آب دو بار تقطیر در هاون چینی با ازت مایع پودر شدند. استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام پذیرفت [۹]. بافر استخراج شامل: NaCl 1.4 M, Tris-HCl 100mM pH:8, EDTA 20mM pH:8, CTAB 2% w/v, β-Mercaptoethanol 0.2% w/v, PVP 4% بود که به هر نمونه برگگی (۱/۰ گرم) ۸۵۰ میکرولیتر از آن اضافه شد. کیفیت



نواربندی محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ژل اکریلامید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره از روش باسام و همکاران ۱۹۹۱ استفاده شد [۱۱].

تجزیه‌های آماری

پس از ثبت اطلاعات، ژل به دست آمده برای هر جفت آغازگر امتیازدهی شد. برای حضور باند عدد ۱ و عدم حضور باند عدد صفر در نظر گرفته شد. با استفاده از نرم‌افزار Excel متغیرهای مربوط به هر آغازگر در ردیف‌ها و نام ژنوتیپ‌ها در ستون قرار گرفت. سپس ماتریس تشابه و تجزیه‌ی خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc ver.2 انجام و دندروگرام بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه DICE ترسیم شد. مقادیر محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای هر ترکیب آغازگر از رابطه
$$PIC - 1 = \sum_{i=1}^n P_i^2$$
 محاسبه شد که در آن P_i برابر با فراوانی الی I ام و n برابر با تعداد باندهای مشاهده شده است [۱۲]. تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis) (PCo) نیز با استفاده از همین نرم‌افزار انجام گرفت.

واکنش به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به مدت یک شبانه‌روز در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. بعد از انجام عمل هضم، اتصال آدپتورها به شرح زیر انجام شد: افزودن اجزای اتصال (Buffer Ligase 10x: 1µL E.Adaptor 5pm: 1µL, M. Adaptor 50pm: 1µL, T4 DNA Ligase: 7.5uint) به مواد حاصل از هضم و سپس اجزای واکنش چهار ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۰].

تکثیر پیش انتخابی و انتخابی

مرحله تکثیر پیش انتخابی با آنزیم Taq polymerase شرکت Fermentas توسط آغازگرهای توالی‌های 5'- EcoRI: 5'- *Tru1I*: 5'- GACTGCGTACCAATTC-3' و 3'- GATGAGTCCTGAGTAA-3' انجام شد. سیکل دمایی در این مرحله شامل: دو دقیقه ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۲۴ سیکل شامل ۳۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه ۶۳ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. مرحله تکثیر انتخابی با استفاده از ۱۲ ترکیب مختلف از آغازگرها با سه یا دو نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳' انجام گرفت (جدول شماره ۲). برای مشاهده الگوی

جدول شماره ۲- ترکیب‌های آغازگری و فراوانی باندهای مشاهده شده

ترکیب آغازگری	تعداد کل باند	تعداد باندهای چندشکلی	درصد چندشکلی	PIC	MI
<i>Tru1I</i> +TG/ <i>EcoRI</i> +CAT	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰/۴۰	۶/۴
<i>Tru1I</i> +GTC/ <i>EcoRI</i> +GAG	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۳۸	۵/۷
<i>Tru1I</i> +ACT/ <i>EcoRI</i> +CCC	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۴۵	۶/۳
<i>Tru1I</i> +TG/ <i>EcoRI</i> +CCC	۲۷	۲۶	۹۶	۰/۳۱	۸/۱
<i>Tru1I</i> +AAC/ <i>EcoRI</i> +GAG	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰/۴۱	۶/۶
<i>Tru1I</i> +AGG/ <i>EcoRI</i> +CAA	۲۰	۱۹	۹۵	۰/۳۵	۶/۷
<i>Tru1I</i> +ACT/ <i>EcoRI</i> +GAG	۱۸	۱۶	۸۸	۰/۳۳	۵/۳
<i>Tru1I</i> +TG/ <i>EcoRI</i> +CAA	۴۸	۴۳	۸۹	۰/۳۶	۱۵/۵
<i>Tru1I</i> +ACT/ <i>EcoRI</i> +CAA	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰/۴۲	۵/۵
<i>Tru1I</i> +TG/ <i>EcoRI</i> +GAG	۲۳	۲۳	۱۰۰	۰/۳۶	۸/۳
<i>Tru1I</i> +AAC/ <i>EcoRI</i> +CAA	۸	۸	۱۰۰	۰/۴۲	۳/۴
<i>Tru1I</i> +AGG/ <i>EcoRI</i> +GAG	۱۷	۱۷	۱۰۰	۰/۳۴	۵/۸
میانگین	۲۳۵	۲۲۶	۹۷	۰/۳۸	۶/۹۷

MI: شاخص نشانگر

PIC: میزان اطلاعات چندشکلی



نتایج

نتایج حاصل از واکنش AFLP

در این تحقیق فقط نوارهای چند شکل کاملاً مشخص و مطمئن امتیازدهی شدند (شکل شماره ۱). توالی آغازگرها، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چند شکل و درصد چند شکلی برای هر جفت آغازگر در جدول شماره ۲ ارائه شده است. در مجموع ۲۲۶ آلل چند شکل مشاهده شد و درصد پلی مورفیسم ۹۷ درصد بود، به طوری که تعداد آلل برای هر جفت آغازگر از ۸ تا ۴۸ متغیر بود و نیز میانگین تعداد آلل برای هر آغازگر ۲۸ عدد بود (جدول شماره ۲)، از سوی دیگر بیشترین مقدار ($PIC=0.45$) مربوط به جفت آغازگر $Tru1I+ACT/EcoRI+CCC$ و کمترین مقدار آن ($PIC=0.31$) مربوط به ترکیب آغازگری $Tru1I+TG/EcoRI+CCC$ بود. بیشترین تعداد آللها مشاهده شده مربوط به جفت آغازگر $Tru1I+TG/EcoRI+CAA$ با ۴۸ آلل و کمترین مقدار مربوط به جفت آغازگر $Tru1I+AAC/EcoRI+CAA$ با ۸ آلل بود. کمترین درصد چند شکلی را جفت آغازگر $Tru1I+ACT/EcoRI+GAG$ با ۱۶ آلل چند شکل نشان داد. میانگین تعداد باندهای چند شکل ۱۸ و میزان تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپها از ۰/۲۹ تا ۰/۸۹ متغیر بود.

تجزیه کلاستر

برای رسم نمودار خوشه‌ای (کلاستر) از ضریب دایس و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA استفاده شد (شکل شماره ۲). در این تحقیق، حداکثر تشابه میان جمعیت ۷ و ۶ مشاهده شد. با توجه به این موضوع که این دو جمعیت از نظر صفات مورفولوژیکی نظیر طول و عرض برگ، فاصله برگ پایینی و بالایی و تعداد غده‌های سیاه برگی مشابه ولی از لحاظ ناحیه رویش بسیار متفاوت می‌باشند می‌توان عوامل مختلفی از جمله جابجایی بذر میان این دو ناحیه و یا عدم پوشش کل ژنوم به دلیل ناکافی بودن تعداد ترکیبات آغازگری مورد استفاده را در حاصل شدن چنین نتیجه‌ای دخیل دانست. در

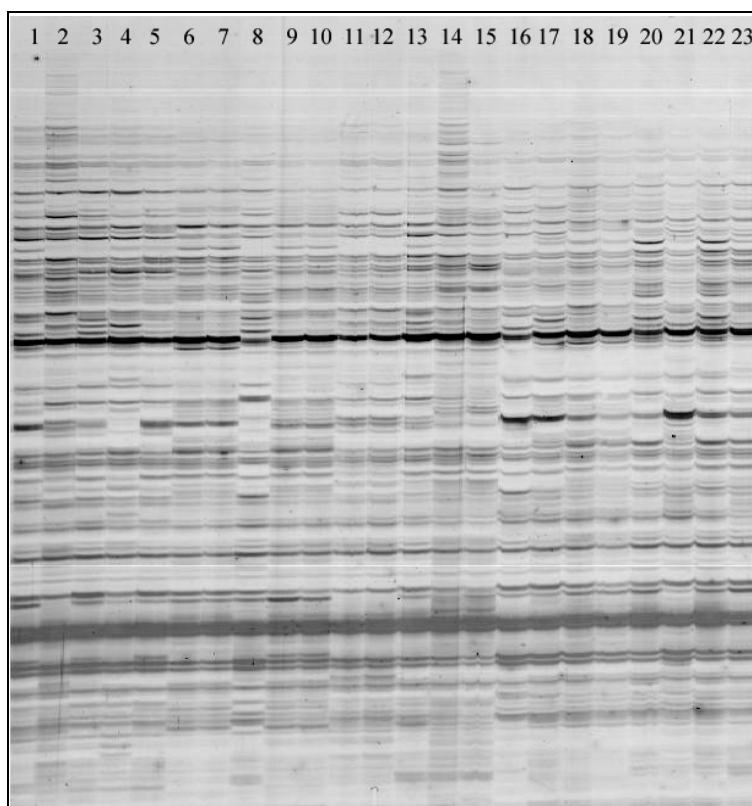
سایر جمعیت‌ها به ترتیب بیشترین تشابه میان جمعیت‌های ۱۱ و ۱۲، ۵ و ۳، ۱۴ و ۱۵ مشاهده شد. با توجه تشابه ژنتیکی جمعیت‌ها در اقلیم‌های متفاوت می‌توان گفت در این تحقیق تنوع مولکولی مشاهده شده با پراکنش جغرافیایی همبستگی نداشته و ارتباطی قوی میان آنها وجود ندارد.

تجزیه به مختصات اصلی (PCO)

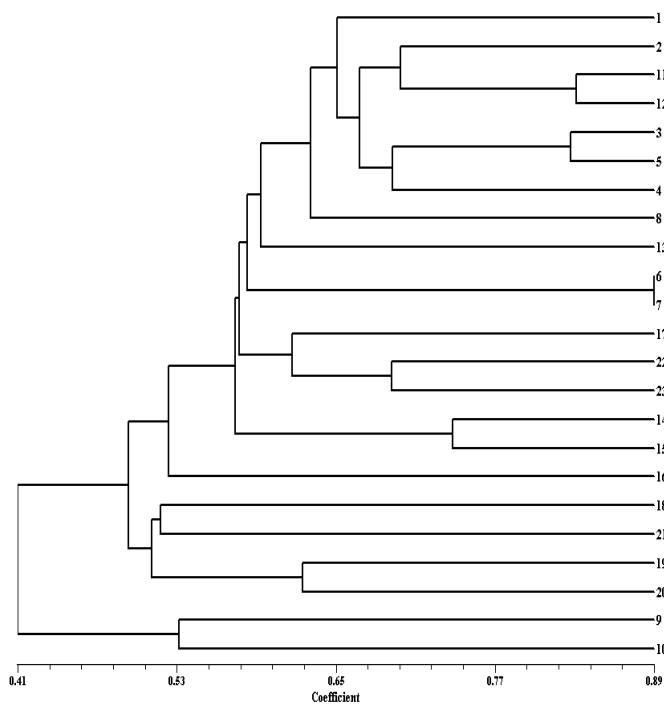
آرایش تجمعی ۲۳ جمعیت مورد مطالعه با استفاده از شباهت ژنتیکی مبتنی بر نشانگر AFLP در (شکل شماره ۳) نشان داده شده است. مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب ۱۲/۸ درصد و ۸/۳ درصد از واریانس کل را توجیه کردند.

بحث

به طور کلی عواملی مختلفی برآورد روابط ژنتیکی میان افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد که از آن جمله می‌توان به تعداد نشانگرهای مورد استفاده، توزیع نشانگر در ژنوم، طبیعت مکانیزم‌های تکاملی که در واقع زیربنای تنوع محاسبه شده می‌باشند، اشاره نمود [۱۳، ۲]. به طور کلی حجم اطلاعاتی که از روش AFLP به دست می‌آید وابستگی زیادی به تعداد آغازگر مورد استفاده دارد، اما الیس و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که با انتخاب ۶ ترکیب از بهترین آغازگرها، امکان توجیه ۸۰ درصد از روابط مورد انتظار وجود دارد [۱۴]. با توجه به مشاهده ۲۱۶ مکان چند شکل توسط ۱۲ ترکیب آغازگری مورد استفاده نتایج حاصل را می‌توان قابل اعتماد دانست. از طرفی ۹۷ درصد باندهای مشاهده شده، چندشکلی نشان دادند و میزان تشابه ژنتیکی میان جمعیت‌ها از ۲۹ درصد تا ۸۹ درصد متغیر بود. ملشینگر (۱۹۹۹) بیان داشت که دقت در تخمین تشابه ژنتیکی افراد به تعداد نشانگر مورد استفاده، میزان چند شکلی و میزان پوشش ژنومی نشانگرها بستگی دارد [۱۵].

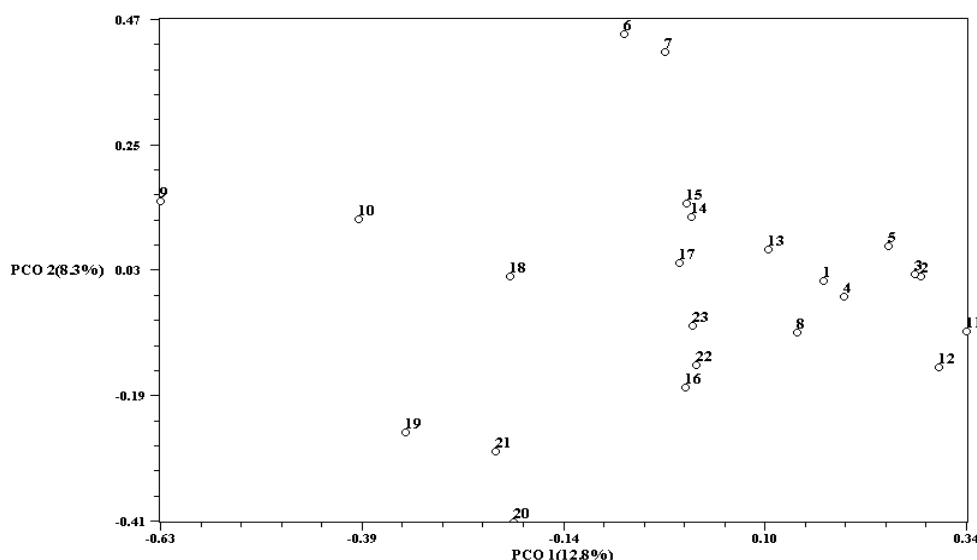


شکل شماره ۱- الگوی بانندی حاصل از الکتروفورز نمونه‌های DNA تکثیرشده با استفاده از ترکیب آغازگری *Tru1I+TG/EcoRI+CAA*



شکل شماره ۲ - دندروگرام به دست آمده از گروه‌بندی ۲۳ جمعیت با بهره‌گیری از الگوریتم UPGMA





شکل شماره ۳- پلات مختصات اصلی (PCO) جمعیت‌های مورد مطالعه

به عنوان روش مکمل با تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه‌تر از داده‌های مولکولی می‌شود [۱۶] مقایسه پلات مختصات اصلی (شکل شماره ۳) و نمودار خوشه‌ای (شکل شماره ۲) نشان‌دهنده مطابقت پراکنش ارقام در محور دو بعدی با دندروگرام تجزیه خوشه‌ای داشت.

به طور کلی نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا میان جمعیت‌های گل راعی کشور و پتانسیل مناسب جهت اجرای برنامه‌های به‌نژادی است. از سوی دیگر تنوع ژنتیکی موجود انجام آنالیزهای فیتوشیمی و توان‌سنجی تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش را در جمعیت‌های این گیاه الزامی می‌سازد.

از ضریب دایس و روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA برای رسم نمودار خوشه‌ای استفاده شد که نمودار حاصل دارای ضریب کوفتیک $r=0.88$ بود. در تجزیه کلاستر با استفاده از داده‌های مولکولی، به طور کلی ضریب کوفتیک بالا نشان از برآزش مناسب نمودار حاصل است. در تجزیه به مختصات اصلی، مؤلفه‌های اول و دوم به ترتیب $12/8$ و $8/3$ درصد از واریانس کل را توجیه کردند، این حالت نشان‌دهنده توزیع مناسب نشانگرهای AFLP در سطح ژنوم می‌باشد، مقدار پایین درصد مؤلفه‌های اصلی در توجیه واریانس ژنتیکی در سایر تحقیقات نیز گزارش شده است [۱۳، ۲]. مسمر و همکاران (۱۹۹۲) پیشنهاد کردند که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

منابع

1. Naghdibadi HA, Amin G, Makkizadeh M and Ziai SA. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review. *J. Medicinal Plants* 2005; 4 (16): 1 - 14.
2. Farsi M, Zolali J, Principle of Plant biotechnology. Ferdosi Mashhad University Press 2004, pp: 495.
3. Abdemishani S, Aliakbar Sh. Plant Breeding. Tehran University Press. 1998, p: 352.
4. Jones CJ, Edwards KJ, Castsglione S, Winfield MO, Matthes M, Daly A. Reproducibility testing of RAPD, AFLP, SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 1997; 3: 381 - 90.



5. Pejic I, Ajmone Mp and Morgante M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPS, RAPDs, SSRs, AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 1998; 97: 1248 - 55.
6. Belja A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L and Trujillo I. comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR Markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theor. Appl. Genet.* 2003; 107: 736 - 44.
7. Lima M, Garcia A, Oliveria K, Matsuoka S, Arizono H and De Souza CL. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane. *Theor. Appl. Genet.* 2002; 104: 30 - 8.
8. Incirli A and Akkaya MS. Assessment of genetic relationships in durum wheat cultivars using AFLP markers. *Genetic Resources and crop Evolution* 2004; 48: 233 - 8.
9. Porebski S, Grant BL and Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 1997; 15: 5 - 15.
10. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Theo V, Hornes M, Frijers A, Pote J, Peleman J, Hornes M, Frijers A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 4407 - 14.
11. Bassam BJ, Caetano AG and Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1991; 196: 80 - 3.
12. Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD and Sorrells ME. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 1993; 36: 181 - 6.
13. Antonio AFG, Benchimol LL, Barbosa AMM, Geraldi IO and Souza CL. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, SSR marker for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Gen. Mol. Bio.* 2004; 27: 579 - 88.
14. Ellis RP, Mcnicol JW, Baird E, Booth A and Lawrence P. The use of AFLP to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breeding* 1997; 3: 359 - 69.
15. Melchinger AE and Gumber RK. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops in: K.R.Lamkey and J.E. Stuber (Eds) Concepts and breeding of heterosis in crop plants. Madison WI. CSSA. 1999, pp: 29 - 43.
16. Messmer MM, Melchinger AA, Boppenmair J, Hermann RG, Brunklaus JE. RFLP analysis of early-maturing European maize germplasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. *Theor. Appl. Genet.* 1992; 83: 1003 - 12.



Assessment of Genetic Diversity in the Populations of *Hypericum perforatum* L. Using AFLP Markers

Rezaei L (M.Sc. Student)¹, Qaderi A (Ph.D. Student)², Naghavi MR (Ph.D.)³, Ebrahimi MA (Ph.D.)¹, Riazi AS (Ph.D. Student)⁴, Mehrafarin A (Ph.D.)⁵, Naghdi Badi H (Ph.D.)^{5*}

1- Department of Plant Biotechnology, Central Branch of Payame noor University of Tehran, Iran

2- Biotechnology Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

3- Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran

4- Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran

5- Cultivation & Development Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

*Corresponding author: Cultivation & Development Department of Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, P.O.Box: 31375-1369, Karaj, Iran
Tel: +98 – 26 – 34764010-18, Fax: +98 – 26 - 34764021

Email: Naghdibadi@yahoo.com

Abstract

Background: *Hypericum perforatum* is one of the valuable medicinal plants in Iran that is used in treating human diseases like mania, anxiety and depression.

Objective : Iranian *H. perforatum* populations were gathered from different regions of Iran and also their genetic diversity in company with the possible relationship between genetic diversity and geographical distribution were studied.

Methodes: DNA was isolated by CTAB method from young leaves and double digested by *EcoRI* and *TruII* enzymes. Polymorphic DNA markers generated by DNA fingerprinting technique AFLP (Vos method) using 12 primers combinations. DNA fragments detected with silver nitrate staining according to Basam protocol.

Results: Totally 235 bands were scored, that 97% of them were polymorphic. The PIC values ranged between 0.31 and 0.45 with mean of 0.38. The highest and the lowest levels of genetic similarity were 0.89 and 0.29, respectively. Cluster analysis using UPGMA method and DICE similarity coefficient indicated a high genetic diversity among *H. perforatum* populations. There was no relationship between genetic diversity and geographical distribution. Also for the all loci, the PC₁ and PC₂ explained 12.8% and 8.3% of the variation, respectively.

Conclusion: Wide genetic diversity between Iranian *H. perforatum* populations provide applied information to performance of breeding programs and genetic resource management. Of course, investigation of amount of hypericin and hyperforin metabolites in these populations are requiring to selection paramount genotypes.

Keywords: *Hypericum perforatum*, Genetic diversity, AFLP markers

