

Study of Genetic Diversity and Population Structure of Six Species of *Hypericum* L. In Habitat Areas of Iran

Somaieh Esfandani-Bozchaloyi * 

Corresponding author, PhD. graduated, Research Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, I.R., Iran. Email: somayehesfandani@znu.ac.ir

Received: 03/08/2024

Revised: 05/10/2024

Accepted: 25/01/2025

Abstract

Background and objectives

Hypericum (Guttiferae, Hypericoideae) is a large genus comprising almost 500 species, primarily herbs, shrubs, and a few trees, and is classified into 36 taxonomic sections. Iranian species of this genus primarily grow in the north, northwest, and center of Iran, forming floristic elements of the Hyrcanian mountainous areas, as well as Irano-Turanian, Mediterranean, and Zagros elements. These species are of medicinal, commercial and horticultural value. SCoT morphological and molecular data were used to study the genetic diversity and population structure of six species of the genus *Hypericum*. One of the objectives of the present study is to determine whether SCoT markers can effectively distinguish *Hypericum* species from each other.

Materials and Methods

A total of 58 individuals from geographical areas belonging to six different species of the genus *Hypericum*, including: *H. lysimachioides*; *H. asperulum*; *H. scabrum*; *H. hirtellum*; *H. perforatum* and *H. triquetrifolium* were sampled in the provinces of East Azerbaijan, Lorestan, Kermanshah, Isfahan and Hamedan in July and August 1400-1403. For morphological studies, 5 to 12 samples of each species were used. A total of 24 morphological traits (16 qualitative traits, 8 quantitative traits) were examined. PCoA was used to group the species. For SCoT analysis, 58 plant accessions (five to twelve samples from each population) belonging to six populations with different ecological characteristics were used. CTAB method was used to extract genomic DNA. 10 SCoT primers were used for this study, which produced 135 polymorphic bands. UPGMA cluster analysis was performed to analyze molecular data and determine genetic relationships.

Results

The biplot diagram of the distribution of *Hypericum* species based on the first and second principal components of PCA using morphological characteristics placed plant samples of each species together and formed separate groups. Accordingly, the greatest differentiation was observed between the species *H. triquetrifolium*, *H. hirtellum* and *H. scabrum*. 135 amplified polymorphic bands were generated across 6 *Hypericum* species. The size of the amplified



fragments ranged from 100 to 3000 bp. The highest and lowest number of polymorphic bands was 22 for SCoT-3 and 7 for SCoT-15, on an average of 13.5 polymorphic bands per primer. The PIC of the 10 SCoT primers ranged from 0.37 (SCoT-17) to 0.64 (SCoT-16) with an average of 0.50 per primer. MI of the primers ranged from 3.44 (SCoT-16) to 5.85 (SCoT-15) with an average of 4.7 per primer. EMR of the SCoT primers ranged from 6.22 (SCoT-15) to 11.55 (SCoT-1) with an average of 9.5 per primer. Molecular variance analysis showed that 67% of genetic variation was between species and 33% within species. Cluster analysis was performed using the genetic distance matrix based on the Jacard distance, using the UPGMA method, and the species were placed in separate clusters.

Conclusion

In this study, the efficiency of the SCoT marker in the plant genome and its role in the genomic diversity of *H. perforatum* species was used. The results of this study showed a high level of genetic diversity and gene flow in the populations of 6 *Hypericum* species and were able to divide the studied species into separate groups using both morphological and molecular characteristics, and we did not encounter intermediate forms in this differentiation. The results of the SCoT marker data were in good agreement with the morphological data. These results showed that the SCoT marker can be used in the classification of *Hypericum* species and this information can be useful in strategies for species identification, plant breeding and germplasm conservation programs.

Keywords: Cluster Analysis, Morphology, Molecular Analysis, Species identification, *Hypericum*, SCoT markers (Start Codon Targeted)

مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های شش گونه گل راعی *Hypericum L.* در مناطق رویشگاهی ایران

سمیه اسفندانی بزچلوبی* 

*نویسنده مسئول مکاتبات، دانش‌آموخته دکتری، زیست‌شناسی سیستماتیک گیاهی، پژوهشکده فناوری نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

پست الکترونیک: somayehesfandani@znu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶

تاریخ اصلاحات نهایی: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۳

چکیده

سابقه و هدف

جنس *Hypericum* (Guttiferae, Hypericoideae) با حدود ۵۰۰ گونه و ۳۶ بخش متعلق به خانواده Hypericaceae شامل گونه‌های علفی و درختی در بیشتر نقاط جهان است. گونه‌های ایرانی این تیره عمدتاً در شمال، شمال غرب و مرکز ایران رشد می‌کنند و عناصر فلوربستی مناطق کوهستانی هیرکانی، عناصر ایرانو تورانی، مدیترانه‌ای و زاگرس را تشکیل می‌دهند. این گونه‌ها دارای ارزش دارویی، تجاری و باغبانی هستند. به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های شش گونه از جنس *Hypericum* از داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی SCoT استفاده شد. یکی از اهداف این پژوهش، این است که آیا نشانگرهای SCoT گونه‌های *Hypericum* را می‌توانند به خوبی از هم متمایز کنند؟

مواد و روش‌ها

در مجموع ۵۸ فرد از مناطق جغرافیایی متعلق به شش گونه مختلف جنس *Hypericum* شامل *H. lysimachioides*; *H. asperulum*; *H. scabrum*; *H. hirtellum*; *H. perforatum* and *H. triquetrifolium* در استان‌های آذربایجان شرقی، لرستان، کرمانشاه، اصفهان و همدان در تیر و مرداد ۱۴۰۰-۱۴۰۳ نمونه‌برداری شدند. برای مطالعات ریخت‌شناسی، از هر گونه ۵ تا ۱۲ نمونه تهیه شد. در مجموع ۲۴ صفت مورفولوژیکی (۱۶ خصوصیت کیفی، ۸ صفت کمی) مورد بررسی قرار گرفت. برای گروه‌بندی گونه‌ها از روش تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی PCoA استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل SCoT از ۵۸ توده گیاهی (پنج تا دوازده نمونه از هر جمعیت) متعلق به شش جمعیت با ویژگی‌های اکولوژیکی مختلف استفاده شد. برای استخراج DNA ژنومی از روش CTAB استفاده گردید. تعداد ۱۰ پرایمر (آغازگر) SCoT برای این بررسی استفاده شد که تعداد ۱۳۵ نوار چندشکل تولید کردند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی و تعیین روابط ژنتیکی از تجزیه خوشه‌ای UPGMA استفاده شد.

نتایج

نمودار بای پلات پراکنش گونه‌های *Hypericum* بر اساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم PCA با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، نمونه‌های گیاهی هر گونه در کنار هم گروه‌های جداگانه‌ای تشکیل دادند. بر این اساس، بیشترین تمایز بین گونه‌های *H. triquetrifolium*، *H. hirtellum* و *H. scabrum* مشاهده شد. در تجزیه مولکولی نشانگرهای SCoT، در مجموع ۱۳۵ باند چندشکلی در شش گونه *Hypericum* تولید شد. اندازه قطعات تکثیر بین ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. بیشترین و کمترین تعداد نوارهای چندشکل ۲۲ باند برای S3 و ۷ باند برای S15 بود که به‌طور متوسط ۱۳/۵ باند چندشکل در هر آغازگر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، از ۰/۳۷ در S17 تا ۰/۶۴ در S16 با میانگین ۰/۵ در هر آغازگر متغیر بود. مقدار شاخص نشانگر (MI) پرایمرها از ۳/۴۴ در S16 تا ۵/۸۵ در S15 با میانگین ۴/۷ در هر آغازگر متغیر بود و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) پرایمرها از ۶/۲۲ در S15 تا ۱۱/۵۵ در S1 با میانگین ۹/۵ در هر پرایمر متغیر بود. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۶۷ درصد تنوع ژنتیکی در بین گونه‌ها و ۳۳ درصد در داخل گونه‌ها



Copyright: © 2025 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (<http://ijrfpbgr.areeo.ac.ir/>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

بود. تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس فاصله ژنتیکی براساس معیار جاکارد، به روش UPGMA انجام شد و گونه‌ها در خوشه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از کارایی نشانگر SCoT در ژنوم گیاهان و نقش آن در تنوع ژنومی گونه‌های *H. perforatum* استفاده شده است. نتایج این تحقیق سطح بالایی از تنوع ژنتیکی و جریان ژنی را در توده‌های ۶ گونه *Hypericum* نشان داد و توانست با استفاده از هر دو ویژگی ریخت‌شناسی و مولکولی، گونه‌های مورد مطالعه را به گروه‌های مجزا تقسیم نماید و در این تمایز با فرم‌های میانی مواجه نشدیم. نتایج داده‌های نشانگر SCoT به‌خوبی با داده‌های مورفولوژیک مطابقت داشت. این نتایج نشان داد که نشانگر SCoT را می‌توان در طبقه‌بندی گونه‌های *Hypericum* استفاده کرد و این اطلاعات می‌تواند در راهبردهای برنامه‌های شناسایی گونه‌ها، اصلاح نبات و حفاظت ژرم‌پلاسم مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز مولکولی، تجزیه خوشه‌ای، مورفولوژی، شناسایی گونه، *Hypericum*، نشانگر SCoT

مقدمه

جنس *Hypericum* (Guttiferae, Hypericoideae) با حدود ۵۰۰ گونه متعلق به خانواده Hypericaceae شامل درختان، درختچه‌ها و گیاهان چند ساله است که در ۳۶ بخش توزیع شده است (Crockett & Robson, 2011). گونه‌های این خانواده در سرتاسر جهان در مناطق معتدل پراکنده هستند اما در شرایط محیطی شدید مانند بیابان‌ها و قطب‌ها وجود ندارند. گونه‌های ایرانی این تیره عمدتاً در شمال، شمال‌غرب و مرکز ایران رشد می‌کنند و عناصر فلوریستی مناطق کوهستانی هیرکانی، عناصر ایرانو تورانی، مدیترانه‌ای و زاگرس را تشکیل می‌دهند. گونه‌های این جنس بیشتر صخره‌های سنگی و آهکی با شیب تند و لبه‌های جنگل‌های مرتفع را ترجیح می‌دهند (Robson, 1968; Azadi, 1999).

Robson (۱۹۶۸) تعداد ۲۱ گونه از جنس *Hypericum* را در منطقه تحت پوشش فلورا ایرانیکا معرفی کرد. در ادامه Robson (۱۹۷۷) و Assadi (۱۹۸۴) دو گونه *H. fursei* N. و Robson و *H. dogonbadanicum* Assadi را دو گونه بومی شمال و جنوب‌غرب ایران گزارش کردند. Azadi (۱۹۹۹) در فلور ایران، ۱۹ گونه، ۴ زیرگونه در ۵ بخش شامل *Campyloporus* (Spach) R. Keller, *Hypericum*, *Hirtella* Stef., *Taeniocarpum* Jaub. & Spach. and *Drosanthe* (Spach) Endl.)، را شناسایی و دو گونه

مشکوک از جمله *H. heterophyllum* Vent. و *H. olivieri* Boiss. (Spach) را تشخیص داد. گونه‌های *Hypericum* در ایران عموماً با نام محلی «هوفاریقون» که ابن سینا (یا بوعلی سینا) آن را نامیده است، شناخته می‌شود (Robson, 1968).

گل راعی، هوفاریقون، گل شهناز و علف جای با نام علمی *Hypericum perforatum* L. گیاهی علفی، گلدار و پایا از تیره گل‌راعیان است که معمولاً به صورت خودرو در میان کشتزارهای گندم و ذرت یافت می‌شود. گل راعی تقریباً تا یک متر بلندی دارد و به همراه شاخه‌های جفتی و متقابل رشد می‌کند. برگ‌های آن متقابل و بی‌پایه (چسبیده) است، تا دو سانتی‌متر بلندی دارد و دارای نقاط غده‌ای و نیمه شفاف متعددی است که در برابر نور پدیدار می‌شوند. گل‌های زرد تا سفید رنگ، دارای پنج گلبرگ با پرچم‌های بیرون زده است و به‌صورت مجتمع در بالای ساقه‌ها دیده می‌شوند. (Campbell et al., 1997; Schulz et al., 1998) از این گیاه بیش از پنج فراورده دارویی در بازار ایران موجود است. قرص نروکسین دینه، قطره هایپیران و قرص پرفوران که هر سه در درمان افسردگی کاربرد دارند؛ افشانه نوروزیک که در درمان دردهای عصبی کاربرد داشته و خاصیت ضدالتهابی دارد. عصاره گیاه گل راعی که عصاره گلایکولی به دست آمده از سرشاخه‌های گل‌دار این گیاه است، در درمان ترک‌های

بودن و کم هزینه بودن بکارگیری آن، چندشکلی بالا، آشکارسازی اطلاعات ژنتیکی وسیع و فراگیر بودن آغازگرهای آن در ژنوم گیاهان اشاره کرد. افزون بر این، در طراحی آغازگرهای این نشانگر به اطلاع از توالی نوکلئوتیدی ژنوم نیاز نیست.

با توجه به اهمیت گل راعی به عنوان گونه باارزش و دارویی و لزوم شناسایی تنوع ژنتیکی این گونه در ایران، این تحقیق به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌های مختلف *Hypericum* با استفاده از نشانگرهای مولکولی با هدف ژن، یعنی SCoT انجام شده است. یکی از اهداف این پژوهش، این است که آیا نشانگرهای SCoT گونه‌های *Hypericum* را می‌توانند به خوبی از هم متمایز کنند؟ و آیا این اطلاعات می‌تواند در راهبردهای برنامه‌های شناسایی گونه‌ها، اصلاح نبات و حفاظت ژرمپلاسم مفید باشد؟

مواد و روش‌ها مواد گیاهی

در مجموع ۵۸ فرد از شش جمعیت جغرافیایی متعلق به شش گونه مختلف جنس *Hypericum* شامل *H. lysimachioides*; *H. asperulum*; *H. scabrum*; *H. hirtellum*; *H. perforatum* and *H. triquetrifolium* در استان‌های آذربایجان شرقی، لرستان، کرمانشاه، اصفهان و همدان در تیر و مرداد ۱۴۰۳-۱۴۰۰ نمونه‌برداری شدند. اطلاعات بیشتر در مورد توزیع جغرافیایی الحاقات در جدول ۱ آمده است.

پوستی پا مؤثر است. این عصاره سبب تحریک رشد و تمایز بافت می‌شود و اثرهای ضد التهاب و آنتی باکتریال دارد. همچنین عصاره هوفاریقون، عصاره روغنی این گیاه است که در درمان زخم معده کاربرد دارد و اثرهای ضد زخم و ضد التهاب دارد (Percifield et al., 2007; Glisic et al., 2002; Agostinis et al., 2006). این گیاه دارای مجموعه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه است که از میان آنها می‌توان به نفتودیانترون‌ها (هایپرین و سودوهایپرین)، آسپیل فلوروگلوکوسینول‌ها (هایپرفورین و آدهایپرفورین) و اسانس اشاره کرد (Morshedloo et al., 2014; Radusiene et al., 2005).

در طی سالهای اخیر انواع مختلفی از روشهای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) ابداع شده‌اند که از جمله آنها می‌توان به مواردی مانند Nested PCR, Boster PCR, Hot start PCR, Touch down PCR, Ampliwax PCR و GEMS (SCoT= Start) اشاره کرد. نشانگر مولکولی (codon targeted) یا در ترجمه فارسی، کدون‌های آغاز هدف واقع شده، روشی است که در آن پرایمرها براساس توالی‌های آغاز (ATG) طراحی شده و نواحی بین کدون‌های آغاز طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر و تفاوت‌ها آشکار می‌شود. پرایمرهای SCoT معمولاً ۱۸-۲۴ نوکلئوتیدی هستند و محتوای C و G آنها ۵۰٪ تا ۷۲٪ است (Kalendar, 2007). نشانگرهای SCoT به‌طور کلی در مقایسه با RAPD و ISSR از تکرارپذیری بیشتری برخوردارند و عقیده بر این است که طول و دمای اتصال آغازگرها، تنها عواملی نیستند که در تکرارپذیری الگوی نواری آنها نقش دارند (Collard & Mackill, 2009). از مزایای این نشانگر می‌توان به آسان

جدول ۱- نام و منشأ گونه‌های جنس راعی *Hypericum* مورد مطالعه

Table 1. Name and origin of the studied species of the genus *Hypericum*

No	Species	Province	Locality
Sp1	<i>H. perforatum</i> L.	Esfahan	Ghameshlou, Sanjab
Sp2	<i>H. triquetrifolium</i> Turra	Lorestan	Oshtorankuh, above Tihun village
Sp3	<i>H. lysimachioides</i> Boiss. & Noe in Boiss.	Kermanshah	Islamabad
Sp4	<i>H. asperulum</i> Jaub. & Spach.	Hamedan	Nahavand
Sp5	<i>H. scabrum</i> L.	East Azerbaijan	78 km from Mianeh to Khalkhl.
Sp6	<i>H. hirtellum</i> (Spach) Boiss.	Lorestan	Durood

مطالعات ریخت‌شناسی

عرض دانه، شکل برگ ساقه‌ای، شکل برگ قاعده‌ای، شکل دانه، نوک برگه، نوک کاسبرگ، دمبرگ برگ ساقه‌ای، کرک دمبرگ برگ ساقه‌ای، نوک برگ قاعده‌ای، دمبرگ برگ قاعده‌ای، کرک دمبرگ برگ قاعده‌ای، نوک برگ ساقه‌ای، رنگ دانه، شکل کاسبرگ، طول برگ ساقه‌ای، طول برگ قاعده‌ای، کرک پهنک برگ ساقه‌ای و عرض برگ قاعده‌ای بودند.

۵ تا ۱۲ نمونه از هر گونه برای مورفومتری استفاده شد. در مجموع ۲۴ صفت مورفولوژیکی (۱۶ خصوصیت کیفی، ۸ صفت کمی) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). صفات مورفولوژیکی شامل صفات تعداد کاسبرگ، عرض کاسبرگ، طول کاسبرگ، تعداد گلبرگ، وجود گلبرگ، انشعاب ساقه،

جدول ۲- فهرست صفات انتخاب شده و کدهای آنها در مطالعات ریخت‌شناسی

Table 2. List of selected characters and their codes in morphological studies.

No.	Characters	Numerical code
1	Length of basal leaves	mm
2	Width of basal leaves	mm
3	Length of stem leaves	mm
4	Number of calyx	
5	Calyx length	mm
6	Calyx width	mm
7	Number of petal	No.
8	Seed width	mm
9	Bract apex	0-acute 1- narrow 2- absence
10	State of stem	0-unbranched 1- branched
11	Shape of basal leaves	0-linear 1- linear- lanceolate 2- lanceolate 3- lanceolate – acuminate 4- ovate 5- ovate – broad elliptical
12	Basal leaves apex	0-acute 1- narrow
13	Basal leaves petiole	0-absence 1- presence
14	Hair of basal leaves petiole	0-absence 1- presence
15	Shape cauline leaves	0- linear 1- linear- lanceolate 2- lanceolate 3- lanceolate – acuminate 4- ovate 5- ovate –broad elliptical
16	Cauline leaves apex	0- acute 1- narrow
17	Cauline leaves petiole	0-absence 1- presence
18	Hair of cauline leaves petiole	0-absence 1- presence
19	Hair of cauline leaves lamina	0-absence 1- presence
20	Seed shape	1-kidney-round 2- kidney 3- kidney-pear shape 4- globular cubic shaped
21	Seed color	1- dark brown 2- brown 3- yellow
22	State of petal	0-absence 1- presence
23	Calyx apex	1- narrow 2- acute
24	Shape calyx	1-ovate - lanceolate 2- lanceolate 3 - linear- lanceolate

شد. این برگ‌ها ابتدا موقع جمع‌آوری نمونه با پودر سیلیکاژل خشک شدند، سپس در هنگام استخراج DNA در آزمایشگاه با استفاده از ازت مایع پودر گردیدند. برای استخراج DNA ژنومی از شیوه‌نامه زغال فعال CTAB استفاده شد (Doyle, 1990) کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع از ۲۲ پرایمر SCoT که توسط (Collard & Mackill, 2009) مورد استفاده قرار گرفته بود، ۱۰ پرایمر برای کارهای بعدی انتخاب شدند و ایجاد باندهای پلی‌مورفیسم با وضوح بالا نمودند (جدول ۵). واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl در pH=۸ انجام شد. ۵۰ میلی‌مولار KCl؛ ۱/۶ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP (Bioron، آلمان)؛ ۰/۴ میکرومولار از یک پرایمر واحد؛ ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و 1U از آنزیم Taq DNA پلیمراز (Bioron، آلمان) استفاده شد (جدول‌های ۳ و ۴).

داده‌های مورفولوژیک حاصل با استفاده از نرم‌افزار PAST نسخه ۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و تجزیه و تحلیل‌های آماری شامل تجزیه همبستگی بین صفات، تجزیه خوشه‌ای با روش Ward و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. تجزیه همبستگی داده‌های کیفی به روش آزمون Spearman و داده‌های کمی به روش آزمون Pearson انجام گردید. تجزیه خوشه‌ای و طبقه‌بندی تاکسون‌ها و جمعیت‌ها به روش Ward و براساس فاصله اقلیدوسی انجام شد. برای تجزیه خوشه‌ای، ابتدا داده‌ها استاندارد شدند (میانگین صفر و واریانس یک). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل آماری چندمتغیره PCoA بر روی داده‌های استاندارد شده انجام شد (Podani, 2000).

مطالعات مولکولی

برای تجزیه و تحلیل نشانگر SCoT تعداد ۵۸ توده گیاهی متعلق به شش جمعیت گل راعی با ویژگی‌های اکولوژیکی مختلف نمونه‌برداری شدند. برگ‌های تازه به‌طور تصادفی از یک تا ۱۲ بوته در هریک از جمعیت‌های مورد مطالعه استفاده

جدول ۳- برنامه دمایی SCoT-PCR مورد استفاده در مطالعات مولکولی تاکسون‌های جنس *Hypericum*

Table 3- SCoT-PCR temperature program used in molecular study of *Hypericum* genus taxa

Stage	Time (minutes)	Temperature °C	Cycle No
First Denaturation	5	94°	1
Denaturation	1	94°	
Annealing	1	52-56°	40
Extension	2	72°	
Final Extension	10	72°	1

جدول ۴- مواد و حجم محلول SCoT-PCR مورد استفاده در مطالعات مولکولی تاکسون‌های جنس *Hypericum*

Table 4- Ingredients and volume of SCoT-PCR solution used in molecular study of *Hypericum* genus taxa

Reaction components	Concentration of stock solution	Required Amount for 25μL	Final concentration
Steriled ddH ₂ O	-	18 μL	-
PCR buffer	10 X	2.5 μL	1 X
MgCL ₂	100 mM	0.7 μL	1.6 mM
dNTP	10m M(each)	0.5 μL	200 μ M(each)
Primer	10 μM	1 μL	0.4 μM
Enzyme	5 U / μL	0.5 μL	1 U / μL
DNA	-	2 μL	

نوارهای SCoT به‌دست‌آمده به‌عنوان کاراکترهای باینری

آنالیزهای مولکولی

شناسایی گونه‌ها بر اساس صفات مورفومتری

در این مطالعه ارزیابی صفات کیفی بر پایه فلور ایران انجام شد. برای ارزیابی صفات کمی تعداد ۱۰ نمونه و برای هر نمونه ۵ تکرار اندازه‌گیری گردید و بعد میانگین حاصل از هر صفات در بخش ریخت‌شناسی استفاده شد. به منظور بررسی و شناسایی متغیرترین صفات در میان جمعیت‌های مطالعه شده، تجزیه به عامل‌ها انجام شد. سه فاکتور اول ۷۶/۱۲ درصد از کل تنوع را بیان کردند (جدول ۵). نمودار رسته‌بندی براساس دو مؤلفه اصلی (PCA) رسم شد (شکل ۱) که بیانگر میزان نزدیکی یا واگرایی جمعیت‌های مطالعه شده براساس این دو مؤلفه می‌باشد. در فاکتور اول ۴۰/۱۸ درصد تنوع را نشان داد و صفات تعداد کاسبرگ، عرض کاسبرگ، طول کاسبرگ، تعداد گلبرگ، وجود گلبرگ، انشعاب ساقه، عرض دانه، شکل برگ ساقه‌ای و شکل برگ قاعده‌ای بیشترین ضریب همبستگی بیشتر از ۰/۷ را با این فاکتور نشان دادند (جدول ۵). فاکتور دوم که ۲۴/۲۹ درصد از کل تنوع را نشان داد صفات شکل دانه، نوک برگه، نوک کاسبرگ، دمبرگ برگ ساقه‌ای، کرک دمبرگ برگ ساقه‌ای، نوک برگ قاعده‌ای، دمبرگ برگ قاعده‌ای، کرک دمبرگ برگ قاعده‌ای، نوک برگ ساقه‌ای، قاعده‌ای، کرک دمبرگ برگ قاعده‌ای، نوک برگ ساقه‌ای، رنگ دانه و شکل کاسبرگ بیشترین ضریب همبستگی بیشتر از ۰/۷ را نشان داد. در فاکتور سوم که ۱۱/۶۴ درصد از کل تنوع را نشان داد صفات طول برگ ساقه‌ای، طول برگ قاعده‌ای، کرک پهنک برگ ساقه‌ای و عرض برگ قاعده‌ای دارای بیشترین ضریب همبستگی بودند (جدول ۵). نمودار بای‌پلات پراکنش گونه‌های *Hypericum* را براساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم PCA با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، نمونه‌های گیاهی هر گونه در کنار هم قرار داد و گروه‌های جداگانه‌ای تشکیل دادند (شکل ۱).

بر اساس مؤلفه اصلی ۱ گونه‌های شماره ۲ *H. triquetrifolium* و شماره ۶ *H. hirtellum* بخوبی از هم متمایز شدند، به‌طوری که به ترتیب دارای کمترین و بیشترین میانگین صفات تعداد کاسبرگ، عرض کاسبرگ،

(حضور = ۱، عدم حضور = ۰) کدگذاری شدند. با استفاده از نرم‌افزار اکسل متغیرهای مربوط به هر آغازگر (نوار) در ردیف‌ها و نام نمونه‌ها در ستون‌ها قرار گرفت. ماتریس دودویی صفر و یک حاصل به عنوان ورودی برای تجزیه آماری استفاده گردید. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص نشانگر (MI) به منظور کارایی سیستم نشانگرها محاسبه شدند (Powell et al., 1996). این تجزیه و تحلیل‌ها توسط نرم‌افزارهای (Hammer et al., 2012) PAST ver. 2.17 و DARwin ver. 5 انجام شد. برای نشان دادن تفاوت ژنتیکی جمعیت‌ها، تجزیه واریانس مولکولی AMOVA بوسیله نرم‌افزار (Peakall & Smouse, 2006) GenAlex 6.4 انجام شد.

مقادیر تمایز ژنتیکی بین گونه‌ها (Gst) و جریان ژنی (Nm) محاسبه شد. جریان ژن توسط (i) محاسبه و Nm تخمینی از جریان ژن از Gst بوسیله نرم‌افزار PopGene ver. 1.32 (Yeh et al., 1997) با فرمول $Nm = 0.5(1 - Gst) / Gst$ تعیین شد.

اندازه‌گیری فواصل و تشابه ژنتیکی

هر تفاوت ژنتیکی قابل اندازه‌گیری در سطح توالی ژنها یا فراوانی‌هایی آلی که بین افراد، جمعیت‌ها یا گونه‌ها قابل ثبت باشد تفاوت ژنتیکی بوده که تعیین آن و روابط ژنتیکی بین افراد یکی از اهداف ارزشمند اصلاح گونه‌های گیاهیست. فواصل یا تشابه‌های ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد را می‌توان با توجه به نوع داده‌ها از روشهای آماری گوناگونی محاسبه کرد. به منظور اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بر مبنای داده‌های نشانگرهای مولکولی، چندین روش مختلف معرفی شده است. معمول‌ترین روشهای اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی که برای داده‌های مولکولی به کار می‌روند شامل ضریب تشابه جاکارد (Jaccard et al., 1912) و دایس می‌باشند که در این مطالعه از ضریب جاکارد استفاده شد.

نتایج

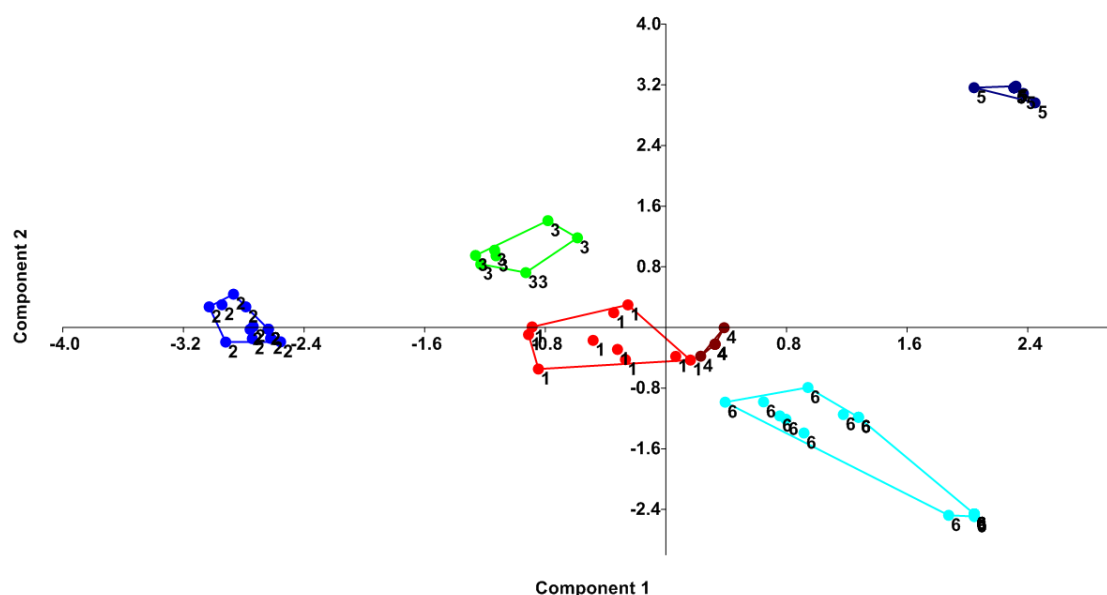
برگ قاعده ای، کرک دمبرگ برگ قاعده ای، نوک برگ ساقه ای، رنگ دانه و شکل کاسبرگ بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها بود (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد که هر دو ویژگی ریخت‌شناسی کمی و کیفی گونه‌های مورد مطالعه را به گروه‌های مجزا جدا کردند و در نمونه‌های مورد مطالعه با فرم‌های میانی مواجه نشدیم.

طول کاسبرگ، تعداد گلبرگ، وجود گلبرگ، انشعاب ساقه، عرض دانه، شکل برگ ساقه ای و شکل برگ قاعده ای بودند. بر اساس مؤلفه اصلی دوم، گونه شماره ۵ *H. scabrum* بخوبی از سایر گونه‌ها متمایز شد و دارای میانگین صفات شکل دانه، نوک برگه، نوک کاسبرگ، دمبرگ برگ ساقه ای، کرک دمبرگ برگ ساقه ای، نوک برگ قاعده ای، دمبرگ

جدول ۵- درصد واریانس و ضرایب همبستگی با سه فاکتور اول، دوم و سوم بر اساس تجزیه به عامل‌ها در صفات ریختی

Table 5. Variance percentage and the coefficients of the first three factors obtained from factor analysis of morphological traits.

Name of traits	Factor1	Factor2	Factor3
Number of sepals	0.93	-	-
Width of sepals	0.92	-	-
Length of sepals	0.85	-	-
Number of petals	0.85	-	-
Presence of petals	0.84	-	-
Branching of stem	0.84	-	-
Width of seeds	0.78	-	-
Shape of stem leaves	0.71	-	-
Shape of basal leaves	0.71	-	-
Shape of seed	-	0.84	-
Bract apex	-	0.80	-
Sepals apex	-	0.80	-
Caulin leaves petiole	-	0.77	-
Hair of caulin leaves petiole	-	0.77	-
Basal leaves apex	-	0.74	-
Basal leaves petiole	-	0.74	-
Petiole hairs of basal leaves	-	0.74	-
Caulin leaves apex	-	0.74	-
Seed color	-	0.73	-
Shape of sepals	-	0.70	-
Length of stem leaves	-	-	0.82
Length of basal leaves	-	-	0.81
Hairs of stem leaves	-	-	0.78
Width of basal leaves	-	-	0.71
Variance %	40.18	24.29	11.64
Com. Variance%	40.18	64.47	76.12



شکل ۱- نمودار بای پلات پراکنش گونه‌های *Hypericum* بر اساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم PCA با استفاده از صفات مورفولوژیکی
Figure 1. Biplot of the distribution of *Hypericum* species based on the first and second principal components of PCA using morphological characteristics.

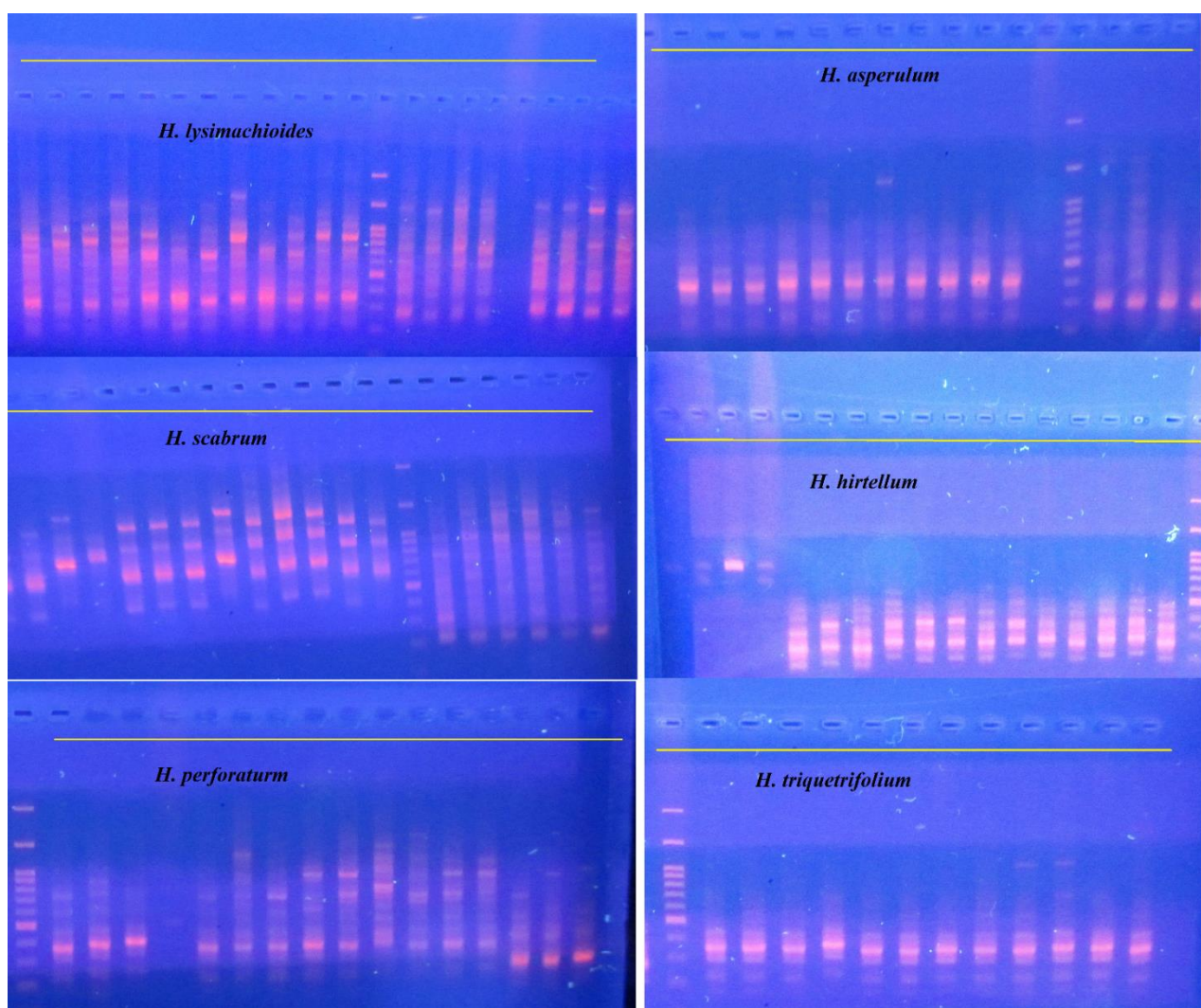
شماره گذاری نام گونه‌ها مطابق جدول ۱ می‌باشد The numbering of the species is shown in Table 1

بود که به طور متوسط ۱۳/۵ باند چندشکل در هر آغازگر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) و نسبت چندگانه مؤثر (EMR) به منظور کارایی سیستم نشانگرها محاسبه شدند (جدول ۶). مقدار PIC برای ده پرایمر SCoT از ۰/۳۷ (SCoT-17) تا ۰/۶۴ (SCoT-) ۱۶ با میانگین ۰/۵ هر آغازگر متغیر بود. مقدار MI پرایمرها از ۳/۴۴ (SCoT-16) تا ۵/۸۵ (SCoT-15) با میانگین ۴/۷ در هر آغازگر متغیر بود. مقدار EMR پرایمرهای SCoT از ۶/۲۲ (SCoT-15) تا ۱۱/۵۵ (SCoT-1) با میانگین ۹/۵ در هر پرایمر متغیر بود (جدول ۶). آغازگرهایی با مقادیر EMR بالا در تشخیص ژنوتیپ‌ها حاوی اطلاعات مفیدی در نظر گرفته شدند.

شناسایی گونه‌ها براساس نشانگر SCoT

ده آغازگر SCoT برای مطالعه روابط ژنتیکی میان گونه‌های *Hypericum* غربالگری شدند. همه آغازگرها نوارهای چندشکلی قابل تکرار در تمام ۶ گونه *Hypericum* تولید کردند. تصاویر باندهای تکثیر شده SCoT توسط پرایمر SCoT-14 به تفکیک ۶ گونه در شکل ۲ نشان داده شده است.

در این تحقیق با استفاده از تعداد ۱۰ پرایمر (آغازگر) SCoT (جدول ۶)، در مجموع ۱۳۵ باند چندشکلی در ۶ گونه *Hypericum* تولید شده است. اندازه قطعات تکثیر شده بین ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود. بیشترین و کمترین تعداد نوارهای چندشکل ۲۲ باند برای SCoT-3 و ۷ باند برای SCoT-15



شکل ۲- ژل الکتروفورز گونه‌های مورد مطالعه از قطعات DNA تولید شده از آغازگر SCoT۱۴

Figure 2. Electrophoresis gel of the studied species from DNA fragments produced by SCoT-14

H. perforatum و کمترین مقدار ۰/۲۱ در گونه *H. triquetrifolium* با میانگین ۰/۳۰ مشاهده شد. تعداد آللهای مشاهده شده (Na) از ۰/۳۰ در *H. lysimachioides* تا ۰/۴۳ در *H. scabrum* متغیر بود. تعداد مؤثر آلل (Ne) از ۱/۰۲۲ در گونه *H. scabrum* تا ۱/۰۷۷ در گونه *H. lysimachioides* متغیر بود (جدول ۷).

سایر پارامترهای ژنتیکی برای ۶ گونه *Hypericum* تکثیر شده با پرایمرهای SCoT محاسبه شدند (جدول ۷). هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H) از ۰/۲۲ در گونه *H. asperulum* تا ۰/۴۱ در گونه *H. perforatum* با میانگین ۰/۳۱ متغیر بود. الگوی مشابهی برای شاخص اطلاعات شانون (I) مشاهده شد که بیشترین مقدار ۰/۳۹ در *H.*

جدول ۶- توالی نشانگرهای SCoT مورد استفاده و میزان چندشکلی آنها

Table 6. SCoT primers and the extent of polymorphism.

Primer name	Primer sequence (5'-3')	TNB	NPB	PPB	PIC	PI	EMR	MI
SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCA	13	13	100.00%	0.47	3.24	11.55	3.88
SCoT-3	CAACAATGGCTACCACCG	22	22	100.00%	0.59	5.83	7.50	4.88
SCoT-5	CAACAATGGCTACCACGC	12	12	90.55%	0.57	5.29	9.29	5.33
SCoT-12	AAGCAATGGCTACCACCA	11	11	97.30%	0.44	4.25	10.31	4.11
SCoT-14	ACGACATGGCGACCACGC	11	11	100.00%	0.46	4.77	10.50	5.22
SCoT-15	ACGACATGGCGACCGCGA	13	7	85.59%	0.53	4.22	6.22	5.85
SCoT-16	CCATGGCTACCACCGGCC	18	18	100.00%	0.64	4.77	7.51	3.44
SCoT-17	CATGGCTACCACCGGCC	17	17	100.00%	0.37	4.44	8.29	4.33
SCoT-20	ACCATGGCTACCACCGCG	21	20	100.00%	0.58	4.33	8.16	5.11
SCoT-21	GCAACAATGGCTACCACC	12	11	100.00%	0.52	4.11	8.70	3.22
Mean		14.2	13.5	98.38%	0.50	4.3	9.5	4.7
Total		142	135					

TNB - the number of total bands, NPB: the number of polymorphic bands, PPB (%): the percentage of polymorphic bands, PI: polymorphism index, EMR, effective multiplex ratio; MI, marker index; PIC, polymorphism information content for each of the CBDP primers.

جدول ۷- پارامترهای تنوع ژنتیکی در گونه‌های مورد مطالعه *Hypericum*

Table 7. Genetic diversity parameters in the studied *Hypericum* species.

Species	No.	Na	Ne	I	He	UHe	P%
<i>H. perforatum</i> L.	5	0.40	1.042	0.39	0.39	0.41	65.13%
<i>H. triquetrifolium</i> Turra	4	0.39	1.054	0.21	0.20	0.39	23.18%
<i>H. lysimachoides</i> Boiss. & Noe in Boiss.	8	0.30	1.077	0.27	0.18	0.33	49.13%
<i>H. asperulum</i> Jaub. & Spach.	4	0.35	1.033	0.30	0.27	0.22	43.88%
<i>H. scabrum</i> L.	6	0.43	1.022	0.34	0.32	0.26	24.66%
<i>H. hirtellum</i> (Spach) Boiss.	7	0.41	1.044	0.29	0.35	0.30	59.55%

No = number of samples, Na= number of different alleles; Ne = number of effective alleles, I= Shannon's information index, He = gene diversity, UHe = unbiased gene diversity, P%= percentage of polymorphism.

5 بیشتر و میانگین میزان تمایز ژنتیکی آن کمتر از سایر نشانگرها بود. کمینه میانگین تنوع ژنی کل مربوط به نشانگر SCoT-17 و کمینه میانگین تنوع ژنی درون جمعیتی و میانگین میزان جریان ژنی جمعیت‌ها مربوط به نشانگر SCoT-16 بود (جدول ۷). میانگین تمایز ژنتیکی به دست آمده حاصل از نشانگرها در جمعیت‌ها ۰/۷۶ بود که بیانگر تمایز ژنتیکی کم بین آنها می‌باشد.

آزمون مانتل با ۵۰۰۰ جایگشت نشان داد که بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی همبستگی معنی‌داری (r=۰/۷۶)، (p<0.01) وجود دارد، بنابراین جداسازی براساس فاصله جغرافیایی (IBD) در میان گونه‌های *Hypericum* مورد مطالعه رخ داد.

آزمون AMOVA تفاوت ژنتیکی معنی‌داری (p<0.001) را در بین گونه‌های مورد مطالعه نشان داد. ۶۷ درصد از کل تنوع در بین گونه‌ها و ۳۳ درصد در داخل گونه‌ها بود (جدول ۸). همچنین تمایز ژنتیکی این گونه‌ها با مقادیر معنی‌دار Nei's (0.436, P<=0.01) و GST (0.76, P<0.01) نشان داده شد. این نتایج نشان‌دهنده توزیع بالاتر تنوع ژنتیکی در میان گونه‌های *Hypericum* در مقایسه با درون گونه‌ها بود. آنالیز Nm بوسیله نرم‌افزار Popgene نیز میانگین Nm=0.654 را به دست آورد که مقدار بسیار پایینی از جریان ژن در بین گونه‌های مورد مطالعه در نظر گرفته می‌شود. میانگین تنوع ژنی کل، میانگین تنوع ژنی درون جمعیتی و میانگین میزان جریان ژنی جمعیت‌ها در نشانگر SCoT-

جدول ۸. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بین و درون گونه‌های مورد مطالعه

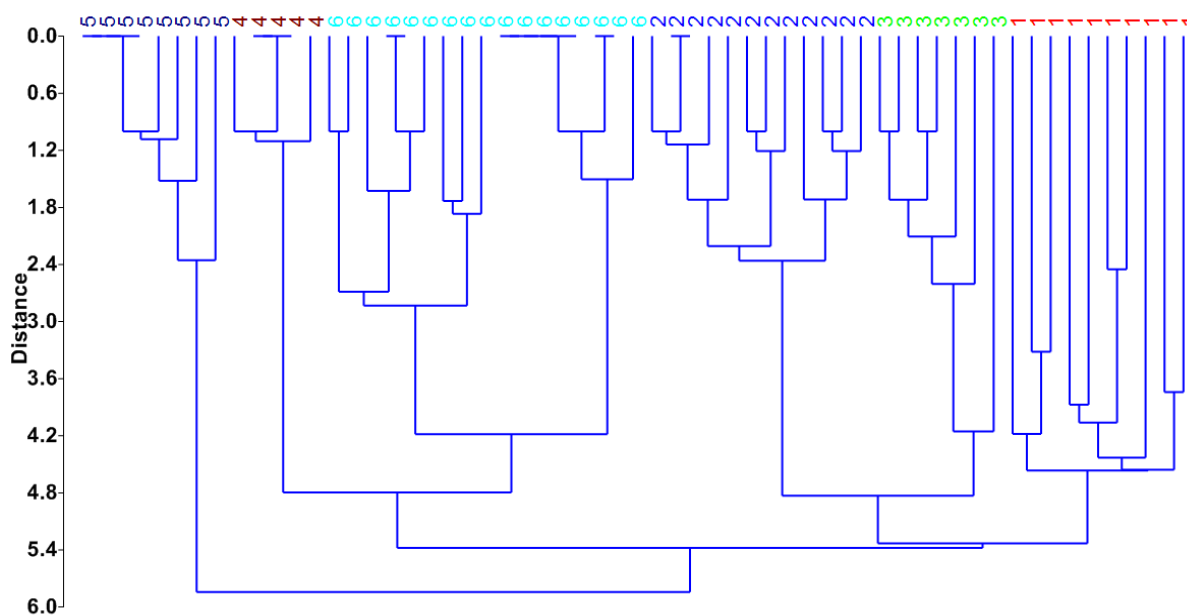
Table 8. Analysis of molecular variance (AMOVA) between and within the studied species.

Source	df	SS	MS	Est. Var.	Var%	Φ_{PT}
Among Pops	40	2071.26	44.55	30.15	67%	67%
Within Pops	120	354.28	1.66	7.32	33%	
Total	160	3433.11		37.46	100%	

 Φ_{PT} = نسبت کل واریانس ژنتیکی بین افراد درون یک جمعیت ($p < 0.001$) Φ_{PT} : proportion of the total genetic variance among individuals within a population ($p < 0.001$)

گونه‌های *Hypericum* را در شش خوشه یا گروه مختلف از هم متمایز شدند. در نمونه‌های مورد مطالعه با فرم‌های میانی مواجه نشدیم. به‌طور کلی، دو خوشه اصلی در درخت UPGMA تشکیل شد (شکل ۳)، جمعیت‌های متعلق به گونه *H. Scabrum* (گونه شماره ۵) در اولین خوشه اصلی و با فاصله زیادی از گونه‌های دیگر قرار گرفتند.

تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد انجام شد و دندروگرام منعکس‌کننده درجه شباهت جمعیت‌های مورد مطالعه است (شکل ۳). به‌طور کلی، نمونه‌های گیاهی هر گونه متعلق به یک بخش مجزا، در کنار هم قرار گرفتند و خوشه‌های جداگانه تشکیل دادند. این نتیجه نشان داد که براساس ویژگی‌های مولکولی

شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه ای داده‌های SCoT به روش UPGMA بمنظور تقارب گونه‌های *Hypericum*Figure 3. Dendrogram derived by UPGMA method using SCoT data to classify the *Hypericum* species.

شماره گذاری نام گونه‌ها مطابق جدول ۱ می باشد. The numbering of the species is shown in Table 1.

گیاهان *H. triquetrifolium* و *H. perforatum* و *H. lysimachioides* دومین زیرخوشه را تشکیل دادند.

دومین خوشه اصلی شامل دو زیرخوشه بود. گیاهان *H. hirtellum* و *H. asperulum* شامل اولین زیرخوشه و

ویژگی‌های PIC و MI یک پرایمر به تعیین اثربخشی آن در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی کمک می‌کند. [Sivaprakash و همکاران \(۲۰۰۴\)](#) پیشنهاد کردند که توانایی یک تکنیک نشانگر برای حل تنوع ژنتیکی ممکن است به‌طور مستقیم با درجه چندشکلی مرتبط باشد. به‌طور کلی، مقدار PIC بین صفر تا ۰/۲۵ نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بسیار پایین در بین ژنوتیپ‌ها، بین ۰/۲۵ تا ۰/۵۰ سطح متوسط تنوع ژنتیکی و مقدار بیشتر از ۰/۵۰ نشان‌دهنده سطح بالایی از تنوع ژنتیکی است ([Tams et al., 2005](#)). در این تحقیق، مقادیر PIC پرایمرهای SCoT از ۰/۳۷ تا ۰/۶۴ با میانگین ۰/۵۰ متغیر بود که نشان‌دهنده توانایی سطح متوسط پرایمرهای SCoT در تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های *Hypericum* بود. هر ۱۰ جفت آغازگر پلی‌مورفیسم خوبی در گونه‌های *Hypericum* نشان دادند. در مجموع ۱۴۲ آلل برای گونه مورد مطالعه شناسایی شد. تعداد کل باندها در آغازگرها بین ۷ تا ۲۲ نوار چندشکل و میانگین تعداد آلل در جایگاه ۱۳/۵ بود.

در بیشتر مطالعات، اندازه جمعیت به چندین نمونه گیاهی محدود می‌شود ([Uotila, 1996](#); [Meusel et al., 1965](#)). این جمعیت‌ها می‌توانند نشان‌دهنده رانش ژنتیکی باشند که تأثیر آن در سطح بالای FIS (ضریب درون آمیزی) و سطح پایین تنوع ژنتیکی مشاهده می‌گردد. رانش ژنتیکی را می‌توان به عنوان از دست دادن آلل‌های یک جمعیت به‌طور تصادفی تعریف کرد. همه جمعیت‌ها رانش ژنتیکی را تجربه می‌کنند، با این حال، جمعیت‌های کوچک بیشتر تحت تأثیر آن قرار می‌گیرند. تغییرات تصادفی در فراوانی آلل در جمعیت‌های کوچک، تنوع ژنتیکی را محدود می‌کند، هموزیگوسیتی را افزایش می‌دهد و ظرفیت یک ارگانیزم را برای سازگاری از طریق تکامل کاهش می‌دهد.

ایزوله شدن جمعیت‌ها و عدم وجود جریان ژنی بین جمعیت‌ها منجر به تکه‌تکه شدن یا منزوی شدن جمعیت *Hypericum* می‌شود. بین پارامترهای تنوع ژنتیکی و اندازه جمعیت‌ها همبستگی مثبتی وجود دارد که مطالعات مختلف آن را تأیید می‌کند ([Leimu et al., 2006](#)). دو دلیل برای همبستگی مثبت بین تنوع ژنتیکی و اندازه جمعیت وجود

به‌طور کلی، روابط به‌دست‌آمده از داده‌های SCoT به‌خوبی با رابطه گونه‌ای به‌دست‌آمده از مورفولوژیک مطابقت داشت (شکل ۱). این در توافق با AMOVA و پارامترهای تنوع ژنتیکی ارائه شده در قبل است. این گونه‌ها از نظر ژنتیکی به خوبی از یکدیگر متمایز شدند. این نتایج نشان داد که می‌توان از نشانگر مولکولی SCoT در طبقه‌بندی گونه‌های *Hypericum* استفاده کرد.

بحث

این پژوهش اطلاعات جالبی در مورد تنوع ژنتیکی، طبقه‌بندی ژنتیکی و واگرایی مورفولوژیک آن در شمال و غرب ایران نشان داد. درجه تنوع ژنتیکی در یک گونه ارتباط زیادی با حالت تولیدمثلی آن دارد، درجه بالاتر گرده‌افشانی باز اصلاح متقابل سطح بالاتری از تنوع ژنتیکی را در تاکسون مورد مطالعه به ارمغان می‌آورد ([Meusel et al., 1965](#)). بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (Rp) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای نوار و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد. قدرت تفکیک (Rp) پارامتری است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می‌دهد ([Tams et al., 2005](#)). شاخص نشانگر (MI) یک برآورد مناسب برای کارایی آغازگرها است که به تعداد نوارهای چندشکلی به دست آمده و به پوشش بالای ژنوم توسط نشانگر نسبت داده می‌شود ([Duminil, 2007](#)). بالا بودن شاخص نشانگر MI، نشان از فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد نوار چندشکلی بیشتر است. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنهاست. مقادیر بالای این شاخص، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به‌سزایی دارد. در مجموع پیشنهاد می‌گردد با توجه به این شاخص‌ها از آغازگرهای SC14، SC15، SC16 و SC17 که میزان بالا را نشان دادند، برای آنالیز مجموعه ژرم پلاسما گونه‌های *Hypericum* در تحقیقات بعدی استفاده گردد.

توزیع *H. perforatum* عامل مهمی در این رابطه است. با توجه به پایین بودن سرعت جریان ژن در جمعیت‌های وحشی مورد مطالعه *H. perforatum*، بنابراین، رانش ژنتیکی ممکن است اجتناب‌ناپذیر باشد. در *H. perforatum* میزان پایین جریان ژن ممکن است به دلیل عواملی مانند آپومیکس‌های غالب و فاصله کوتاه پراکندگی دانه باشد که توسط [Hazler Pilepic و همکاران \(۲۰۰۸\)](#) بیان شده است. از نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و بیولوژی تولیدمثل *H. perforatum* است ([Arnholdt-Schmitt, 2000](#); [Halušková & Košuth, 2003](#); [Barcaccia et al., 2007](#); [Percifield et al., 2006](#)). اما به دلیل عدم وجود سیستم نشانگر مشخص برای این گیاهان، در بیشتر مطالعات از سیستم‌های نشانگر مانند RAPD و ISSR استفاده شده است. در این پژوهش، ما از فراگیر بودن و فراوانی روش SCoT در ژنوم گیاهان و نقش آنها در تنوع ژنومی استفاده کردیم.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از کارایی نشانگر SCoT در ژنوم گیاهان و نقش آن در تنوع ژنومی گونه‌های *H. perforatum* استفاده شده است. نتایج این تحقیق سطح بالایی از تنوع ژنتیکی و جریان ژنی را در توده‌های ۶ گونه *Hypericum* نشان داد و توانست با استفاده از هر دو ویژگی ریخت‌شناسی و مولکولی، گونه‌های مورد مطالعه را به گروه‌های مجزا تقسیم نماید و در این تمایز با فرم‌های میانی مواجه نشدیم. نتایج داده‌های نشانگر SCoT به‌خوبی با داده‌های مورفولوژیک مطابقت داشت. این نتایج نشان داد که نشانگر SCoT را می‌توان در طبقه‌بندی گونه‌های *Hypericum* استفاده کرد و این اطلاعات می‌تواند در راهبردهای برنامه‌های شناسایی گونه‌ها، اصلاح نبات و حفاظت ژرم‌پلاسما مفید باشد.

دارد: ۱- یک همبستگی مثبت می‌تواند دلالت بر وجود انقراض داشته باشد که در آن کاهش اندازه جمعیت تنوع ژنتیکی را کاهش می‌دهد که منجر به درون‌زایی درون جمعیت می‌شود؛ دلیل دوم این واقعیت است که سازش گیاهان، جمعیت‌ها را براساس تغییرات در کیفیت زیستگاه متمایز می‌کند ([Vergeer et al., 2003](#)). در تحقیقی [Booy و همکاران \(۲۰۰۰\)](#) نشان دادند سطوح پایین تنوع ژنتیکی می‌تواند سازش گیاه را کاهش دهد و توانایی جمعیت‌ها را در پاسخ به شرایط محیطی در حال تغییر از طریق انتخاب و سازگاری محدود کند. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۶۷ درصد تنوع ژنتیکی در بین گونه‌ها و ۳۳ درصد در داخل گونه‌ها بود. یکی از عوامل کلیدی تعیین‌کننده توزیع تنوع ژنتیکی، سیستم گرده‌افشانی در گونه‌های گیاه است ([Duminil, 2007](#)). سطح بالایی از تنوع در میان جمعیت‌های *H. perforatum* نیز توسط [Percifield و همکاران \(۲۰۰۷\)](#) گزارش شده است که نتایج این مطالعه را تأیید می‌کند. نتایج مشابهی در مورد این گونه با استفاده از نشانگرهای RAPD توسط [Hazler Pilepic و همکاران \(۲۰۰۸\)](#) گزارش شده است. تنوع ژنتیکی بالایی جمعیت‌های *H. perforatum* به دلیل سیستم‌های گرده‌افشانی آن است. در واقع روش‌های تکثیر گونه‌های گیاهی به عنوان یکی از مهمترین عوامل تعیین‌کننده سطوح تنوع ژنتیکی آنها در نظر گرفته می‌شود ([Hamrick, 1982](#); [Hamrick & Godt, 1989](#)). خود ناسازگاری یک پدیده گسترده در جنس *Hypericum* است ([Robson, 1981](#)) که منجر به سطوح بالایی تنوع ژنتیکی می‌شود ([Barnes, et al. 2001](#)). علاوه بر این، این گیاه چند ساله است و هر ساله تعداد زیادی بذر در راستای افزایش تنوع در این گونه تولید می‌کند ([Zhao et al., 2007](#)). از آنجایی که گونه‌های با گستره وسیع ممکن است دارای سطوح بالاتری از تنوع ژنتیکی نسبت به گیاهان با توزیع محدود باشند ([Singh et al., 1998](#))، طیف گسترده

References

- Arnholdt-Schmitt., B. 2000. RAPD analysis: A method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. Theoretical and Applied Genetics, 100: 906–911.
- Azadi, R. 1999. Guttiferae. In: Assadi, M. (Eds.), Flora of Iran. 27: 1–62. R.I.F.R. –Tehran.
- Agostinis, P., Vantieghe, A., Merlevede, W., de Witte, P.A. 2002. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 34(3):221–241
- Barcaccia, G., Arzenton F., Sharbel T., Varotto S., Parrini P., and Lucchin, M. 2006. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L. Heredity, 96(4):322–334.
- Barnes, J., Anderson, L.A., and Phillipson, J.D. 2001. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 53(5):583–600.
- Booy, G., Hendriks, R.J.J., Smulders, M.J.M., Van Groenendael, J.M., and Vosman, B. 2000. Genetic diversity and the survival of populations. Plant Biology, 2: 379–395.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter, 27:86–93.
- Campbell, M.H., May, C.E., Southwell, I.A., Tomlinson, J.D. and Michael, P.W. 1997. Variation in *Hypericum Perforatum* L. (St. John's wort) in New South Wales. Plant Protection Quarterly, 12:(2)64-66.
- Crockett, S.L. and Robson, N.K.B., 2011. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. In: MS, O., Cirak, C. (Eds.), *Hypericum*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 5 (1): 1–13.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., and Vendramin, G.G. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits? The American Naturalist, 169: 662–672.
- Glisic, S.B., Popadic, S.V., Skala, D.U. 2006. St. John's Wort *Hypericum perforatum* L.: supercritical extraction, antimicrobial and anti-depressant activity of extract and some component. Hemijska Industrija 60(3–4):61–71
- Halusková, J. and Kosuth, J. 2003. RAPD analysis of soma clonal and natural DNA variation in *Hypericum perforatum* L. Acta Biologica Cracoviensia, 45: 101–104.
- Hammer, O., Harper, D.A. and Ryan, P.D. 2012. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4: 9-16.
- Hamrick, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. American Journal of Botany, 69:1685-1693
- Hamrick, J.L., and Godt, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds.) Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates Inc., Sunderland, 2: 43–63.
- Hazler Pilepic, K., Males, Z., and Plazibat, M. 2008. Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. population. Periodicum Biologorum, 110(4):367–371.
- Jacard, P. 1912. The distribution of the flora in the alpine zone, New Phytologist 11(2), 37-50.
- Kalendar, R. 2007. Fast PCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. Available at www.biocenter.helsinki.fi/programs/fastpcr.htm.
- Leimu, R., Mutikainen, P., Koricheva, J., and Fischer, M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? Journal of Ecology, 94: 942–952.
- Meusel, H., Jäger, E.J., and Weinert, E. 1965. Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora. Text u. Karten. Bd. 1. VEB Fischer, Jena (In German).
- Morshedloo, M., Ebadi, A., Fatahi, Moghadam, M., and Yazdani, D. 2014. Genetic relationships of Iranian *Hypericum perforatum* L. wild populations as evaluated by ISSR markers, Plant Systematics and Evolution, 40:134-142.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288–295.
- 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. Planta Medica, 73(15):1614–1621.
- Pilepić, K.H., Maleš, Ž., and Plazibat, M. 2008. Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. population. Periodicum biologorum, 110: 367– 371.
- Podani, J. 2000. Introduction to the Exploration of Multivariate Data English translation. Backhuyes' publisher, Leiden, 407 pp.
- Powell, W., Morgante, M., Doyle, J.J., McNicol, J.W., Tingey, S.V. and Rafalski, A.J. 1996. Gene pool variation in genus Glycine subgenus Soja revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites.

- Genetics, 144: 793–803.
- Radusiene, J., Judzentiene, A., and Bernotiene, G. 2005. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(2):113–124.
 - Robson, N. K. B. 1968: *Hypericum* L. In: Rechinger, K. H. (Ed.), *Flora Iranica*. 2–20. –Graz.
 - Robson, N. K. B. 1977. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae): 1. Infrageneric classification. –*Bull. Brit. Mus. (Nat. Hist.) Bot.* 5: 291–355.
 - Schulz, V., Hansel, R. and Tyler, V.E.1998. *Rational phytotherapy*. Springer- Verlag. Berlin Heidelberg.
 - Singh, A., Smartt, J., Simpson, C., and Raina, S. 1998. Genetic variation vis-à-vis molecular polymorphism in groundnut, *Arachis hypogaea* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45(2): 119–126.
 - Sivaprakash, K.R., Prasanth, S. R., Mohanty, B.P. and Parida, A. 2004. Genetic diversity of black gram landraces as evaluated by AFLP markers. *Current Science*, 86: 1411–1415.
 - Tams, S. H., Melchinger, A.E. and Bauer, E. 2005. elite germplasms was assessed with AFLP, and comparisons were made with SSR and pedigree data. *Plant Breeding*. 124: 154–160.
 - Uotila, P. 1996. Decline of *Anemone patens* (Ranunculaceae) in Finland. *Symb. Bot. Ups.* 31: 205–210.
 - Vergeer, P., Rengelink, R., Copal, A., Ouborg, N.J. 2003. The Interacting Effects of Genetic Variation, Habitat Quality, and Population Size on Performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology*. 91:18–26.
 - Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1997. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta, Canada*.
 - Zhao, Y., Chen, X.Y., Wang, X.R., Pian, R.Q. 2007. ISSR analysis of genetic diversity among *Lespedeza bicolor* populations. *Plant Genetic Resources*, 8: 195–199.