

این پایان نامه با همیاری پژوهشکده گیاهان
دارویی جهاد دانشگاهی تدوین شده است



دانشکده کشاورزی
نام مرکز تهران مرکز

پایان نامه
برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته : بیوتکنولوژی کشاورزی

گروه : کشاورزی

عنوان

**بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف گل راعی *Hypericum*
Perforatum L. بوسیله نشانگرهای مولکولی AFLP**

لیلا رضایی

اساتید راهنما

دکتر محمدرضا نقوی دکتر حسنعلی نقدی بادی

استاد مشاور

دکتر محمدعلی ابراهیمی

مهر ۱۳۹۰

اینجانب لیلا رضایی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می‌نمایم چنانچه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته‌ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده‌ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می‌دانم و جوابگوی آن خواهم بود.

دانشجو تأیید می‌نماید که مطالب مندرج در این پایان نامه (رساله) نتیجه تحقیقات خودش می‌باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو لیلا رضایی
تاریخ و امضاء ۱۳۹۰/۷/۱۷

اینجانب لیلا رضایی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی گواهی می‌نمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو لیلا رضایی
تاریخ و امضاء ۱۳۹۰/۷/۱۷

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

ماه و سال

مهر ماه ۱۳۹۰

خداوندا به من شهامتی عطا فرما ، آنچه را که نمی توانم تغییر دهم ، بپذیرم
توانی عطا فرما ، آنچه را می توانم ، تغییر دهم و درکی که تفاوت بین این دو را درک نمایم .

تقدیم به او :

که من زندگی کردن ، علم آموختن و عشق ورزیدن را ارزانی فرمود .

تقدیم به :

ستاره های درخشان دنیای من ،

❖ **پدر و مادر مهربانم که همواره واسطه فیض الهی بر من بوده اند و
دعاهایشان همیشه در مسیر پر تلاطم زندگیم معجزه آفرین بوده
است .**

❖ **همسر عزیز و وفادارم که پیوسته تکیه گاهم بوده و در طول دوران
تحصیل با شکیبایی و صبر مرا یاری نموده است .**

❖ **فرزند دلبندم آقا مهرشاد**

چکیده:

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف گل راعی *Hypericum* (*Perforatum*) بوسیله نشانگرهای مولکولی AFLP

گل راعی یکی از گیاهان مهم دارویی، ایران است. که برای درمان افسردگی ملایم تا متوسط و همچنین میگرن می باشد و ترکیبات مؤثر اصلی آن هیپرفورین و هیپریسین می باشد این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ های گل راعی جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور که در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کشت شده بودند، صورت گرفت. در این بررسی DNA از برگ ها استخراج شده و با استفاده از ۱۲ ترکیب آغازگری AFLP تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۲۲۵ آلل قابل نمره دهی مشاهده شد که ۹۷ درصد چند شکل بودند و تعداد آلل برای هر آغازگر از ۸ تا ۴۸ مشاهده شد. میزان تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ ها از ۰/۲۹ تا ۰/۸۹ متغیر بود. کمترین تشابه بین ژنوتیپ ۹ که متعلق به منطقه (نهاوند) و ژنوتیپ ۱۲ (عاشقلو به وانیا) مشاهده شد. بیشترین تشابه نیز بین ژنوتیپ های ۶ (نور) و ۷ (الموت ۴۵ کیلومتری قزوین) مشاهده شد. تجزیه کلاستر مشخص کرد که تنوع ژنتیکی بالایی بین اکوتیپ های گل راعی وجود دارد و همچنین معلوم شد که بین تنوع مولکولی و پراکنش جغرافیایی ارتباطی وجود ندارد. تجزیه مولفه های اصلی PC1 و PC2 به ترتیب ۱۲/۸ و ۸/۳ درصد از واریانس کل را نشان می دهد و این نتایج در مدیریت ژرم پلاسما گل راعی می تواند مفید باشد.

گل واژگان: نشانگرهای AFLP، تنوع ژنتیکی، *Hypericum perforatum L.*

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول : کلیات
۱	مقدمه و هدف
۲	۱-۱ گیاه شناسی و اهمیت هوفاریقون
۴	۱-۲ سابقه و ضرورت تحقیق
۸	۱-۳ تنوع ژنتیکی و ضرورت مطالعه آن
۱۰	۱-۴ کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان
۱۰	۱-۴-۱ - بررسی فیلوژنتیکی
۱۱	۱-۴-۲ - ژنتیک جمعیت
۱۱	۱-۴-۳ - مدیریت گیاهان وحشی
۱۱	۱-۴-۴ - مدیریت منابع ژنتیکی
۱۲	۱-۴-۵ - کلکسیون‌های ذخایر ژنتیکی گیاهی
۱۲	۱-۴-۶ - کنترل بیماریهای گیاهی
۱۳	۱-۵ - روشهای ارزیابی تنوع ژنتیکی
۱۳	۱-۵-۱ - نشانگرهای مورفولوژیکی
۱۴	۱-۵-۲ - نشانگرهای مولکولی
۱۵	۱-۵-۳ - نشانگرهای پروتئینی
۱۶	۱-۵-۴ - نشانگرهای DNA

۱-۶- چند شکلی طولی قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) ۱۸

۱-۶-۱- تئوری و اصول مراحل AFLP ۱۹

۱-۶-۲- مزایای تکنیک AFLP ۲۷

۱-۶-۳- معایب تکنیک AFLP ۲۷

فصل دوم: مرور منابع

۲-۱- کاربرد نشانگرهای DNA در بررسی تنوع ژنتیکی سایر گیاهان ۲۹

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱- مواد گیاهی ۳۷

۳-۲- استخراج DNA ۳۸

۳-۳- تعیین کیفیت و گمیت DAN استخراج شده ۴۰

۳-۴- مراحل کار AFLP ۴۱

۳-۴-۱- هضم آنزیمی ۴۱

۳-۴-۲- دوررشته کردن سازگار سازها ۴۳

۳-۴-۳- اتصال سازگار سازها به قطعات حاصل از هضم ۴۴

۳-۴-۴- تکثیر اولیه و انتخابی ۴۵

۳-۴-۵- تجزیه و تحلیل قطعات حاصل از تکثیر بر روی ژل ۴۸

۳-۴-۶- تجزیه و تحلیل داده ها ۵۵

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- کیفیت و کمیت DAN استخراج شده ۵۷

۲-۴ نتایج حاصل از واکنش AFLP ۵۸

۳-۴ تشابه ژنتیکی ۶۱

۴-۴ تجزیه کلاستر ۶۱

۵-۴ تجزیه و به مختصات اصلی (PCO) ۶۴

۶-۴ نتایج مورفولوژیکی ۶۶

۷-۴ نتیجه گیری کلی و پیشنهادات ۶۷

فصل پنجم: منابع

منابع ۶۹

فهرست اشکال و جداول

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱ دسته بندی نشانگر های مولکولی	۱۷
جدول ۱-۳ نمونه های استفاده شده در تحقیق همراه با مشخصات جغرافیایی آنها	۳۷
جدول ۲-۳ مواد متشکله با فرا استخراج	۴۰
جدول ۳-۳ دستورالعمل مواد مورد استفاده در مرحله هضم آنزیمی	۴۲
جدول ۴-۳ دستورالعمل مواد مورد استفاده برای تهیه master mix مرحله اتصال	۴۵
جدول ۵-۳ ترکیبات مورد استفاده در PCR اولیه	۴۶
جدول ۶-۳ برنامه PCR اولیه مارکر AFLP	۴۶
جدول ۷-۳ ترکیبات مورد استفاده در PCR انتخابی	۴۷
جدول ۸-۳ برنامه PCR انتخابی مارکر AFLP	۴۸
جدول ۹-۳ ترکیبات مورد نیاز برای اکرلامید ۶٪ برای حجم 1lit	۵۰
جدول ۱۰-۳ مراحل رنگ آمیزی نیترات نقره	۵۵
شکل ۱-۴ DNA استخراج شده تعدادی از ژنوتیپ ها بر روی ژل آگاروز	۵۷
شکل ۲-۴ قسمتی از الگوی نواری تعداد از نمونه های هوفاریقون بر اساس جفت آغاز گر	
ETG/M17	۵۹
جدول ۱-۴ ترکیب پرایمری	۶۰
شکل ۳-۴ نمودار خوشه ای ۲۳ نمونه هوفاریقون با استفاده از ۱۲ ترکیب آغازگری AFLP و	
ضریب دایس و الگوریتم UPGMA	۶۴
شکل ۴-۴ پلات مختصات اصلی PCO ژنوتیپ های مورد مطالعه	۶۶

فصل اول

کلیات

مقدمه

استفاده از گیاهان داروئی به عنوان محصولات فرعی مرتع، در کشور ایران دارای سابقه ای بسیار طولانی است و تعیین ویژگیهای ژنتیکی، فیزیولوژیکی، اکوفیزیولوژی و اکولوژیکی این گیاهان بمنظور بهره برداری پایدار و اقتصادی همراه با حفظ تنوع موجود در عرصه های طبیعی مراتع ایران بسیار حائز اهمیت می باشد تا از انقراض گونه های منحصر به فرد و متفاوت از لحاظ ژنتیکی جلوگیری بعمل آورده و ضمن ایجاد اشتغال و افزایش درآمد مرتعداران این گونه ها را برای نسلهای آینده و ایجاد توازن در طبیعت حفظ کرد و لذا زراعت و روشهای اهلی کردن این گیاهان در مناطق کوهستانی و بیابانی نه تنها یک توصیه بلکه یک ضرورت است که باید نسبت به آن اقدام نمود. گیاهان داروئی و معطر در زندگی بشر نقش بسزائی دارند. این گیاهان مواد زیستی خاصی را با مقادیر بسیار اندک در خود ذخیره می کنند که این مواد، اغلب از گروههای اصلی ترکیبات سازنده گیاه نیستند، بلکه از پنج یا شش گروه ترکیبات فرعی آن هستند که نقش مستقیم آنها در حیات گیاه روشن نبوده و متابولیتهای ثانویه خوانده می شوند.

Hypericum perforatum L یکی از گیاهان داروئی، صنعتی و علوفه ای مهم ایران است ولی در حال حاضر زعفران و زیره رتبه اول و دوم صادرات گیاهان داروئی را دارا هستند.

تنوع ژنتیکی مهمترین عامل بقاء موجودات از جمله گیاهان زراعی در برابر تغییرات شرایط محیطی و آفات است و اساس برنامه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی و ماده خام ضروری برای آن است. بیوتکنولوژی مدرن به دنبال استفاده گسترده تر از تنوع ژنتیکی می باشد. بهره برداری از مخازن ژن گیاهی خصوصاً از اجداد وحشی و جستجوی منابع ژنتیکی جدید، تولید واریته هایی با عملکرد بالا،

کیفیت مطلوب و مقاوم به تنش‌های محیطی، از اهداف اولیه بیوتکنولوژی می‌باشند. با استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک و تهیه کتابخانه ژنومی، امکان حفظ و ذخیره ژرم پلاسما میلیاردها ژنوتیپ در حجم کم و با هزینه نگهداری کم، وجود دارد. در این راستا، آگاهی از میزان تنوع ذخایر توارثی و روابط ژنتیکی بین افراد یکی از اهداف ارزشمند اصلاح گونه‌های گیاهی است.

اهداف انجام این تحقیق عبارتند از:

(۱) تعیین اینکه آیا جمعیت های گل راعی گرفته شده از مناطق مختلف ایران از نظر ژنتیکی

با یکدیگر مشابه میباشند یا خیر

(۲) تعیین ارتباط بین تنوع ژنتیکی (در صورت وجود) با پراکنش جغرافیایی

(۳) امکان طبقه بندی، تمایز و تعیین روابط بین جمعیت های مختلف گل راعی بومی

۱-۱- گیاه شناسی و اهمیت گل راعی

گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum L.* یک گیاه علفی دائمی از خانواده *Hypericaceae* است که بومی غرب اروپا، آسیا و شمال آفریقا می باشد. اهمیت این گیاه در چند سال اخیر به عنوان یک داروی گیاهی به خصوص برای درمان افسردگی ملایم تا متوسط به طور قابل توجهی افزایش یافته است. ترکیبات مؤثر اصلی این گیاه شامل هیپرفورین و هیپریسین می باشد. البته ترکیبات مؤثر بیولوژیکی دیگری نظیر فلاونوئید، تانن نیز در این گیاه وجود دارد. هر چند هیپریسین به عنوان یک ترکیب کلیدی در اندازه گیری کیفیت و ارزیابی گل راعی مورد استفاده قرار می گیرد ولی مطالعات اخیر نشان داده که هیپرفورین ممکن است عامل ضد افسردگی این گیاه باشد. به هر حال گل راعی یک گیاه پرفروش است که دارای جایگاه ارزشمندی در بازار جهانی می باشد.

از آنجا که ژنوتیپ‌های گل راعی از لحاظ ترکیبات شیمیایی و پارامترهای مورفولوژیکی متفاوت می‌باشند با بررسی مورفولوژیکی و مولکولی ژنوتیپ‌های مختلف به‌مراه ترکیبات مؤثره آنها می‌توان به وضعیت تنوع در نمونه‌های مختلف آنها پی برد. در حقیقت از آنجا که تنوع ژنتیکی نقش بسزایی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی دارد بایستی در گام نخست در آغاز هر برنامه اصلاحی و زراعی، تنوع ژنتیکی و پتانسیل بالقوه موجود در جمعیت‌های مختلف یک گونه ارزیابی قرار گیرد. بررسی این تنوع ما را در شناخت توان ژنتیکی نهفته موجود، امکان برنامه‌ریزی صحیح در جهت انتخاب صفات مؤثره یاری خواهد نمود. در واقع بهبود هر گیاهی وابسته به وجود و ماهیت و وسعت تنوع ژنتیکی در دسترس برای دستکاری آن می‌باشد. گل راعی گیاهی است که جمعیت‌های زیادی از آن در کشور ایران وجود دارد ولی در زمینه شناخت این جمعیت‌ها، مطالعات کمی صورت گرفته‌است. به‌رحال این گیاه دارای پراکنش بسیار وسیعی در ایران می‌باشد و بنظر می‌رسد که این تحقیق بتواند با بررسی تنوع ژنتیکی گل راعی، در بهینه‌سازی تولید و عملکرد کمی و کیفی این گیاه مؤثر باشد. در این راستا در نظر است در این تحقیق از آغاز گره‌های اولیه و انتخابی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی توسط تکنیک *AFLP* استفاده شود. در این طرح استخراج *DNA* از برگ‌های جمعیت‌های مختلف گل راعی انجام می‌شود و سپس به منظور بررسی و یافتن تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف گل راعی از آغاز گره‌های اولیه و سپس انتخابی استفاده می‌شود و سپس توسط الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید باندهای چند شکل را شناسایی کرده و پس از آن با انجام نمره دهی باندها به صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند) میزان چند شکلی هر ترکیب پرایمری تعیین و در نهایت گروه‌بندی جمعیت‌های مختلف گل راعی با استفاده از تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) انجام خواهد شد.

۱-۲- سابقه و ضرورت انجام تحقیق

هوفاریقون، علف چای، هزار چشم یا گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum L.* یک گیاه دارویی ارزشمند از خانواده هوفاریقون (*Hypericaceae* یا *Clusiaceae*) می باشد (۱۴، ۶۴) این گیاه یک علف هرز خطرناک برای احشام و یک محصول با ارزش برای جمع آوری کنندگان گیاهان دارویی- وحشی، برای صنعت داروسازی می باشد. استفاده از این گونه به عنوان یک داروی گیاهی مخصوصاً برای درمان افسردگی ملایم تا متوسط استفاده آن را در چند سال اخیر به طور قابل توجهی افزایش داده است (۶۵). این گیاه حاوی ترکیبات متعدد شیمیایی می باشد که از مهمترین ترکیبات آن می توان به هیپریسین و هیپرفورین اشاره نمود. هیپریسین به عنوان ترکیب کلیدی جهت ارزیابی کیفیت گل راعی مطرح است (۷۰).

گل راعی گیاهی علفی و پایا است که در سال اول دارای رشد بطئی رویشی و خزنده است و رشد مطلوب و گل دهی آن از سال دوم به بعد آغاز می شود (۶۴، ۱۴) این گیاه دارای ساقه های علفی و دایمی زیادی با ارتفاع ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی متر و قطر ۳ تا ۵ میلی متر می باشد (۶۸، ۶۷). مقطع عرضی ساقه کروی و دارای دو برآمدگی است که آن را از سایر گونه ها متمایز می کند. ساقه های گل دهنده که هر ساله از روی طوقه خارج شده و معمولاً قرمز رنگ و دارای انشعابات فراوانی در انتها می باشد. این ساقه ها در اواخر زمستان شروع به رشد کرده و در بهار به گل می روند. ساقه های رویشی که بدون گل بوده و در اواخر تابستان یا پاییز از روی طوقه خارج شده و به طول ۳۰ سانتیمتر رشد می نمایند (۶۸).

این گیاه در کشورهای مختلف جهان به عنوان علف هرز مراتع مطرح بوده و به انواع آب و هوا و خاک‌ها سازگار می‌باشد. شرایط کلی سایه و آفتاب کامل را ترجیح می‌دهد و خاک‌های سبک بازه‌کشی خوب دارای PH بین ۶ تا ۷ برای کشت این گیاه مناسب است (۷۸). عوامل محیطی مختلفی بر رشد و عملکرد کمی و کیفی این گیاه تأثیر دارند که تأثیر فاکتورهای اقلیمی، درجه حرارت و نور به شرح ذیل می‌باشد: درجه حرارت بر میزان هیپریسین گیاه نیز تأثیر داشته و یک رابطه خطی فزاینده بین میزان هیپریسین و درجه حرارت مشاهده شده است (۷۸). بیشترین هیپریسین و تانن موجود در گل راعی در دمای بیشتر از ۱۴ درجه سانتیگراد حاصل می‌شود (۶۹). گل راعی گیاهی است روز بلند که حداکثر گل و ماده مؤثر را در اوایل تابستان تولید می‌کند (۷۴). متابولیت‌های ثانویه در گیاه به طور غیر یکنواخت یافت می‌شود که عمدتاً در گل‌ها تجمع یافته‌اند و برای بهبود کیفیت اندام خشک گل راعی بایستی مراحل نمو گل را در برداشت مورد توجه قرار داد (۷۵). در تحقیقی دیگر مشخص شد که با شروع بهار و فصل جدید رشد و ظهور گل آذین، غلظت هیپریسین سریعاً افزایش یافته و در اوایل تابستان یعنی زمانی که گل‌دهی تقریباً به پایان رسیده و کپسول‌ها در حال تشکیل شدن هستند به حداکثر می‌رسد. سپس میزان هیپریسین همچنان که گل‌ها و کپسول‌ها طی تابستان می‌رسند کاهش می‌یابد (۷۶). در تحقیقی مشخص شد که برداشت سرشاخه گل راعی برای حصول میزان مناسب هیپریسین و پسودوهیپریسین زمانی است که گیاهان، مرحله گرده افشانی را گذرانده و گل آذین‌ها به طور عمده دارای گل باز هستند (۷۶). مطالعه دیگری نشان داد که جمع‌آوری در مرحله غنچه موجب افزایش مرغوبیت می‌شود زیرا غلظت هیپریسین و پسودوهیپریسین در بافت برگ که بخش عمده بیوماس گیاه است (۲۴ درصد) افزایش یافته است (۷۰).

در تحقیقی نشان داده شده که بیشتر میزان هیپریسین و پسدوهیپریسین در طی خشکه کردن توسط ماکروبو بدست می آید (۷۷).

گل راعی گیاهی است تتراپلوئید با عدد کروموزومی $X = 8$ ($2n = 32$) که سطوح مختلف پلوئیدی از خود نشان داده است (۷۳). در تحقیقی بر روی جمعیت های مختلف گل راعی در شرایط مزرعه ای در کرج مشخص شد اثر توده (ژنتیک) بر عملکرد وزن تر و ماده خشک از نظر آماری معنی دار بوده ولی روی میزان هیپریسین تأثیری نداشته است. از طرفی مشاهده شد که میزان هیپریسین تحت تأثیر سال (شرایط محیطی) قرار گرفته است، به عبارت دیگر، عملکرد کمی تأثیر ژنتیک (توده) و عملکرد کیفی تحت تأثیر شرایط محیطی (سال) بوده است. به هر حال توده ها از نظر عملکرد کمی با هم متفاوت ولی از نظر عملکرد کیفی (میزان هیپریسین) مشابه بوده اند و توده کشور مجارستان دارای بالاترین عملکرد کمی و کیفی بوده است (۱۵، ۱۶). البته در تحقیقی بر روی توده های مختلف گل راعی در شرایط مزرعه ای مشخص شد که توده و منطقه روی میزان ترکیبات تأثیر دارند. توده روی میزان همه ترکیبات به استثنای بی آپی ژنین و هیپروفورین تأثیر دارد و یک فاکتور کلیدی برای کشت موفق و اقتصادی این گیاه می باشد. همچنین ژنتیک و محیط بر پارامترهای گل و طول گیاه تأثیر داشته و اثر متقابل توده و محیط نیز بسیار معنی دار است. البته محیط بیشتر بر اندازه گیاه تأثیر دارد و اثر متقابل منطقه و توده بر عملکرد ماده خشک گل و گیاه بسیار معنی دار می باشد (۶۶). نتایج تحقیقی در لیتوانی نشان داده که تنوع مورفولوژیکی و شیمیایی در جمعیت های وحشی گل راعی وجود دارد و جمعیت های وحشی برای پروژه های اصلاحی و توسعه واریته های مناسب هستند. این جمعیت ها از نظر ارتفاع گیاهان، طول کاسبرگ، وزن ماده خام، عرض گل آذین، مشخصات برگ ها، تراکم غدد تیره متفاوت می باشند. همچنین این بررسی ها نشان داده که طول

برگ، فاکتور اصلی تأثیر گذارنده روی غلظت فلاونوئید در گونه *H. perforatum* مورد مطالعه بوده است (۷۱). در جمعیت های طبیعی *H. perforatum*، تنوع زیادی در میزان هیپریسین (۰/۰۳ تا ۰/۱۲۴ درصد)، پسودوهیپریسین (۰/۰۴۹ تا ۰/۲۴۷ درصد) روتین (۰/۱۹۵ تا ۰/۹۴۱ درصد)، هیپروزید (۱/۰۵۱ تا ۱/۷۱۱ درصد)، کوئرستین (۱/۲۵۸ تا ۲/۰۳۸ درصد) و کامفرول (۰/۱۹۲ تا ۰/۳۴۳ درصد) گزارش شده است. همچنین مشاهده شده که بین میزان نفتودیانترون ها و تیپ مورفولوژی گیاه *H. perforatum* رابطه معنی داری گزارش شده است (۱۷). که نتایج حاصل از والدین دیپلوئید گل راعی دارای سطح پلوئیدی ثابت و بیشترین میزان هیپریسین هستند. تنوع مشاهده شده در نتایج والدین دارای سطح پلوئیدی بالاتر ممکن است ناشی از ویژگی های مشخصه تکثیر برای این گونه ها باشد (۷۲). به هر حال شناخت رابطه بین مشخصات مورفولوژیکی و وجود ترکیبات ثانویه می تواند کمک مؤثری به تشخیص علت اصلی تفاوت جمعیت های گل راعی بنماید (۷۰).

گل راعی گیاهی است که کشت آن در سالهای اخیر رو به افزایش بوده ولی در زمینه شناخت جمعیت های موجود در ایران مطالعات کمی صورت گرفته است و از آنجا که این گیاه دارای پراکنش وسیعی در ایران است بنظر می رسد که این تحقیق بتواند در بهینه سازی تولید و عملکرد کمی و کیفی این گیاه مؤثر باشد.

۱-۳- تنوع ژنتیکی و ضرورت مطالعه آن

به ترکیب ژنتیکی ناهمگون که در مقابل شرایط محیطی واکنش‌های متفاوت را ایجاد می‌کند، تنوع ژنتیکی می‌گویند. واژه حفاظت^۱ گیاهی بطور کلی به معنی اطمینان از حضور یک گونه‌خاص در فلور گیاهی یک منطقه معین می‌باشد. ابتدایی‌ترین هدف برای نیل به این مقصود شناسایی و حفظ تنوع ژنتیکی موجود در یک گونه‌گیاهی است که امکان دستیابی به یک مخزن ژنتیکی را فراهم می‌آورد. در برنامه‌ای اصلاحی دو دیدگاه کلی حائز اهمیت است. ابتدا، مسأله استفاده مؤثر از منابع ژرم پلاسمی مد نظر می‌باشد. زیرا بررسی‌های دقیق‌تر از روابط ساختار و هویت ژنتیکی بانک‌های ژنی اداره مؤثر آنها را برای محققین امکان پذیر خواهد ساخت. از سوی دیگر تعیین سطح تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی در جهت انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی و حداکثر بهره‌وری از پدیده هتروسیس از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۹).

تا کنون تنوع ژنتیکی در سه سطح جمعیت، گونه و ژن مورد بررسی قرار گرفته است. صرف نظر از اهمیت ارزیابی‌های مربوط به تنوع‌های اکولوژیکی و ریخت شناسی، اهمیت تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی در تمام تحقیقات ذکر شده است. ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح گونه به سه دلیل عمده حائز اهمیت است: (۱) ارتباط درجه تغییرات تکاملی با میزان تنوع ژنتیکی مشاهده شده (۲) هتروزیگوسیتی^۲ (۳) خزانه ژن جهانی که نماینده تمام اطلاعات موجود درباره فرآیندهای بیولوژیکی است (۴۵).

^۱. Conservation

^۲. Heterozygosity

تنوع ژنتیکی در گیاهان و جمعیت های گیاهی از نظر کاربردی مورد توجه است. کشاورزی و تولید غذا بستگی به استفاده از ژنوتیپ های گیاهی پر محصول دارد و روش های متداول اصلاح گیاهان زراعی بر اساس گزینش ژنوتیپ های مورد علاقه از بین تنوع ژنتیکی موجود و دست ورزی همه یا تعدادی از صفات ممکن و مورد علاقه در یک ژنوتیپ به منظور تولید یک وارسته تجاری می باشد.

تنوع گونه ها در یک محیط به توانایی تولید و پایداری اکوسیستم^۱ وابسته است (۵۶). روش های مولکولی ابزار مناسبی برای مطالعه اثر تنوع ژنتیکی گیاهی روی پایداری اکوسیستم هاست. این تنوع را ممکن است در چند سطح مورد بررسی قرار داد. تنوع حیاتی یک اکوسیستم معمولا^۲ 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 ای را برای ارزیابی تنوع حیاتی ارائه می دهند و می تواند روش کلیدی برای ایجاد راهبردهای حفاظتی مناسب باشد (۵۳).

در رابطه با اهمیت مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان، باید به این نکته مهم اشاره شود که یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی نامطلوب است، زیرا: (۱) گیاهانی تولید می شوند که نسبت به اپیدمی ها و متغیرهای محیطی آسیب پذیرند و این باعث کاهش عملکرد می شود و (۲) خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی که دارای منابع ژنی مفید هستند، از دست می روند (۵۲).

کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه های مورد نظر در برنامه های اصلاحی، امکان سازمان دهی ژرم پلاس و نمونه گیری مؤثر از ژنوتیپ ها را فراهم می سازد (۱۱). تنوع ژنتیکی در جمعیت های گیاهی ممکن است از طریق ساز و کارهای

^۱ . Ecosystem Productivity

متفاوتی نظیر جهش، نوترکیبی جنسی، مهاجرت و جریان ژن، رانده شدن ژنتیکی و گزینش ایجاد شود (۱).

چنانچه اشاره شد تنوع ژنتیکی در اصلاح نباتات بسیار حائز اهمیت است. در واقع اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانش و فن آوری‌هایی هستند که ساختار ژنتیکی گیاه را در جهت منافع اقتصادی انسان تغییر می‌دهند. لازمه هر تغییر وجود تنوع است، پس لازمه تغییر ژنتیکی نیز وجود تنوع ژنتیکی است. تنوع ژنتیکی یک صفت معین اندازه پراکنش ارزش‌های همان صفت است، بطوریکه تأثیر محیط بر آن زدوده شده باشد. تنوع، اساس برنامه‌های اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی و ماده خام ضروری برای آن است. یک به نژادگر در صورتی می‌تواند امید به موفقیت زیادی در برنامه‌های اصلاحی خود داشته باشد که شانس انتخاب مواد مناسب برای او موجود باشد. از این روست که منابع ژنتیک گیاهی یکی از مهمترین، پر ارزشترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شود (۱۳).

۱-۴- کاربردهای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان

۱-۴-۱- بررسی‌های فیلوژنتیکی

بررسی‌های فیلوژنتیکی به منظور توصیف تاریخ تکاملی گیاهان بکار می‌رود. جمعیت‌های گیاهی فعلی بر این اساس گروه‌بندی شده‌اند که نحوه پیدایش آنها از اجدادشان را نشان می‌دهد. ارزش عملی چنین بررسی‌هایی در استفاده از آن اطلاعات در به‌گزینی ژنتیکی گیاهان است. با دانستن روابط ژنتیکی بین گیاهان، از اطلاعات رده‌بندی می‌توان به عنوان راهنمایی برای بهره‌گیری از منابع ژنتیکی در استفاده از آنها در تلاقی‌ها و جدا سازی ژن‌های مفید استفاده کرد.