

بررسی تنوع ژنتیکی گیاه دارویی پنج‌انگشت (*Vitex agnus-castus* L.) بر اساس نشانگر مولکولی ISSR

عبدالجبار سعیدیانی^۱، زهرا بقایی‌فر^۲، محسن فرشادفر^{۳*}، پوریا پورنقی^۲ و هومن شیروانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- نویسنده مسؤل مکاتبات: دانشیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، پست الکترونیک: farshadfarmohsen@yahoo.com

۴- کارشناس ارشد گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۱۵

چکیده

گیاه پنج‌انگشت یکی از مهمترین گیاهان دارویی است که نقش مهمی در سلامت زنان دارد. با توجه به تنوع بالا بین نمونه‌های این گیاه، تنوع ژنتیکی تعداد ۱۹ ژنوتیپ با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR بررسی شد. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۷۴ باند تولید کنند که از این تعداد، ۴ باند یک‌شکل و مابقی چند شکل بودند. میانگین درصد چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۹۵٪ بود که درصد چندشکلی برای آغازگرهای UBC824 (۸۰٪)، IS14 (۸۳٪)، UBC851 (۸۳٪) و IS11 (۸۹٪) و برای سایر آغازگرها برابر با ۱۰۰٪ بود. در مجموع بر اساس کلیه شاخص‌ها، مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی پنج‌انگشت، آغازگرهای IS16، IS5 و UBC807 معرفی شدند. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب دایس از ۰/۱۹۵ تا ۰/۵۹۳ متغیر بود. نتایج حاصل از دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضرایب فاصله دایس، ژنوتیپ‌ها را در ۳ گروه قرار داد. ژنوتیپ‌ها بر اساس روش تجزیه به مختصات اصلی اول و دوم پراکنش داده شدند که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای کاملاً مطابقت داشت. همچنین نتایج حاصل از گروه‌بندی‌ها، با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR، گیاه دارویی، *Vitex*

مقدمه

پاکدامنی، بنگرو، پنج‌انگشت، فلفل کوهی و دل‌آشوب است (Donald & Brown, 1994). درخت پاکدامنی از کلمه یونانی "Hagnos" و لاتین آن "Castus" مشتق شده است (Palmer & Pitman, 1972). مطالعات و بررسی‌های علمی نشان می‌دهد فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، دی‌ترپنوئیدها، ویتکسین، کاستیسین و پیش‌ماده هورمون‌های استروئیدال

گیاه *Vitex* از دیرباز در طب سنتی مورد توجه بوده و مصارف دارویی داشته است. این نام برگرفته از کلمه لاتین *Vitilium* به معنی نوار بافته که نامگذاری آن به دلیل انعطاف‌پذیری شاخه‌های این گیاه می‌باشد و نام‌های دیگر آن شامل: فلفل راهبه‌ها "Monks pepper" درخت

لوکوس‌های چندگانه ژنومی را برای تکثیر توالی‌ها بین ریزماهورهای با اندازه‌های مختلف هدف می‌گیرد، بهره می‌برد. تکرارهای ریزماهوره مورد استفاده به‌عنوان آغازگر می‌تواند دو، سه، چهار یا پنج نکلئوتیدی باشند. آغازگرهای مورد استفاده می‌توانند به هر نقطه از DNA متصل شوند. گرچه معمولاً در انتهای ۳' یا ۵' خود به یک تا چهار باز متصل بوده و بر اساس آنها گسترش می‌یابند (Sarla et al., 2002). هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی در ۱۹ ژنوتیپ گیاه دارویی پنج‌انگشت با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱۹ ژنوتیپ بذر گیاه پنج‌انگشت (جدول ۱) از مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور همراه با شناسنامه و مختصات محل رویش گیاه تهیه و در گلخانه کاشته شدند. بعد از رشد نمونه‌ها، استخراج DNA ژنومی از برگ آنها در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام شد.

استخراج DNA به روش (Torres et al., 1993) برای هر ژنوتیپ انجام شد. بعد از انتقال ۲۰ تا ۵۰ میلی‌گرم برگ خرد شده با ازت مایع به تیوب، ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۴ گرم CTAB، ۱۶/۳۶ گرم NaCl، ۳/۱۵ گرم Tris-HCl، ۱/۴۸ گرم EDTA، ۴۰۰ میکرولیتر β -mercaptoetchnanol با pH=۸) به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت نمونه‌ها در حمام آب با دمای ۶۵°C قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل (۱:۲۴) اضافه گردید و به مدت دو دقیقه بهم زده شد تا محلول داخل تیوب یکنواخت شود. سپس نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و فاز رویی به یک تیوب تمیز منتقل گردید و به هر تیوب مقدار ۶۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت یک ساعت در فریزر در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و

درون ترکیبات شیمیایی گیاه پنج‌انگشت شناسایی شده‌اند (Ziaee et al., 2008) مطالعات بیشتر نشان می‌دهد این ترکیبات روی غده هیپوفیز تأثیر گذاشته و تغییرات سطوح هورمونی آن را می‌توان در ارتباط با این ترکیبات توضیح و توجیه کرد (Ziaee et al., 2008).

بررسی و تحلیل تنوع ژنتیکی در ذخائر توارثی موجود از مهمترین مراحل پروژه‌های به‌نژادی است که امکان گروه‌بندی و توصیف دقیق نمونه‌ها را فراهم کرده و به‌نژادگرها را در تشخیص زیرمجموعه‌ها و نمونه‌هایی که امکان استفاده مؤثر آنها در برنامه‌های اصلاحی آینده وجود دارد، یاری می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). در بیشتر جوامع طبیعی چندشکلی‌های به نسبت بالایی وجود دارد که در اثر تغییرات کوچکی در توالی‌های DNA مانند جهش‌های نقطه‌ای جایگزین‌های بازی، حذف و تبادل حادث شده‌اند و فنوتیپ مشخصی هم ندارند. اطلاع از میزان چندشکلی یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف، به‌منظور کاهش حجم نمونه‌های ذخائر توارثی نگهداری شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر بسیار مفید خواهد بود. بررسی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی یکی از شاخص‌های مهم برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی است. یکی از روش‌های اصلاح گیاهان، گزینش همراه با آزمایش نسل است. موفقیت در گزینش، بستگی به تنوع با ایجاد نوترکیبی ژنتیکی و هتروزیس دارد. با افزایش فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها احتمال هتروزیس در برنامه‌های تلاقی افزایش می‌یابد. (Peters and Martinelli, 1989).

نشانگرهای DNA به دلیل دارا بودن کاربردهای فراوان در انواع مطالعات مولکولی، امروزه در سطح گسترده‌ای مورد استفاده پژوهشگران شاخه‌های مختلف علوم زیستی قرار می‌گیرند (Gupta, 1996; Farshadfar et al., 1995). نشانگر ISSR یک آغازگر مبتنی بر PCR است که شامل تکثیر یک قطعه DNA حاضر در فاصله تکثیرپذیر میان دو ناحیه تکراری ریزماهوره منحصر به فرد با جهات مخالف می‌باشد. این تکنیک معمولاً از میکروستلایت‌ها با طول bp ۱۶-۲۵ به‌عنوان آغازگر یک واکنش تک آغازگری که

بعد از آن فاز مایع به آرامی خالی و به هر تیوب مقدار ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۸۰٪ سرد اضافه و یک سانتریفیوژ کوتاه انجام شد و به آرامی فاز مایع خالی شد (این مرحله دو بار تکرار شد). در پایان نیز تیوب‌ها را در دمای اتاق قرار داده تا خشک شوند و بعد به هر تیوب میزان ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل اضافه گردید.

جدول ۱- لیست ژنوتیپ‌های مورد بررسی

کد ژنوتیپ	کد بانک ژن	منطقه جمع‌آوری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا به متر
G1	۲۰۲۴۵	لرستان	۲۸' ۳۸"	۳۳° ۰۰"	۹۴۳
G2	۲۰۲۷۸	کردستان-مریوان	۲۲' ۳۷"	۳۵° ۲۱"	۱۱۷۴
G3	۲۳۱۶۳	لرستان	۳۹' ۳۹"	۳۳° ۱۴"	۱۳۸۵
G4	۲۳۱۷۲	لرستان-الشتر	۳۹' ۷۷"	۳۳° ۴۸"	۱۴۳۰
G5	۲۵۵۷۴	هرمزگان - بندرعباس	۱۱' ۲۰"	۲۷° ۳۵"	۵۰
G6	۲۵۶۵۸	هرمزگان - حاجی‌آباد	۱۷' ۱۵"	۲۸° ۰۵"	۱۰۰۰
G7	۲۵۶۹۷	هرمزگان - میناب	۰۴' ۰۵"	۲۷° ۴۱"	۶۰
G8	۲۶۸۷۰	هرمزگان - روداب	۲۶' ۰۲"	۲۷° ۴۲"	۱۰۰
G9	۲۶۸۷۸	هرمزگان - بندرعباس	۴۶' ۴۸"	۲۷° ۳۵"	۵۰۰
G10	۲۸۲۹۷	اصفهان - خور و بیابانک	۴۰' ۰۰"	۳۳° ۰۰"	۱۳۵۰
G11	۲۸۳۲۸	اصفهان - نجف‌آباد	۳۶' ۹۳"	۳۲° ۲۷"	۱۶۴۲
G12	۳۱۰۱۶	فارس - فیروزآباد	۵۳' ۰۵"	۲۸° ۵۲"	۱۴۰۰
G13	۳۱۳۹۶	خوزستان - باغملک	۴۲' ۶۰"	۳۱° ۰۱"	۸۸۷
G14	۳۱۹۶۶	کهگیلویه و بویراحمد - گچساران	۱۶' ۴۷"	۳۰° ۲۱"	۸۰۰
G15	۳۱۹۷۲	کهگیلویه و بویراحمد - دهدشت	۵۷' ۰۲"	۳۰° ۳۷"	۸۷۰
G16	۳۴۱۰۰	ایلام - دهلران	۵۱' ۵۱"	۳۲° ۷۹"	۳۸۹
G17	۳۷۷۲۴	قم - جعفریه	۴۴' ۴۰"	۳۴° ۴۴"	۱۰۴۱
G18	۳۸۲۸۲	ایلام - ایوان	۵۵' ۱۰"	۳۳° ۵۶"	۷۳۸
G19	۳۸۹۴۱	ایلام - شیروان	۳۳' ۳۲"	۳۳° ۴۴"	۹۶۶

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بصورت چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل ۰/۸ درصد آگارز و دستگاه اسپکتوفتومتر انجام شد.

در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Ntsys 6، DARwin و GenAEx6.2 ماتریس تشابه، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه واریانس مولکولی انجام شد.

نتایج

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR بررسی شد. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۷۴ باند تولید کنند که از این تعداد، ۴ باند یک‌شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۹ ژنوتیپ برابر ۳/۸۹ به دست آمد. آغازگرهای UBC859، IS5 و IS6 با ۱۰ باند بیشترین و آغازگرهای UBC841، UBC844، UBC848 و UBC857 با ۳ باند کمترین تعداد باند را تکثیر نمودند. ژنوتیپ (G۳) بیشترین باند (۵۰ باند) و ژنوتیپ (G۱۳) کمترین باند (۲۱ باند) را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند. شکل ۱ الگوی باندهای ۱۹ ژنوتیپ مورد بررسی را به ترتیب با استفاده از آغازگرهای IS11 نشان می‌دهد.

به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز دو درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. به منظور تزریق نمونه در ژل، ابتدا میزان پنج میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و بعد میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز بارگذاری و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت انجام شد و بعد ژل را برای رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایند (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document برای نمایان شدن نوارها استفاده شد.

محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) از طریق فرمول

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2$$

(Hou et al., 2005) محاسبه شد

شاخص نشانگری (MI) از رابطه $MI = PIC \times E$

بدست آمد (Powell et al., 1996)

شاخص نسبت چندگانه مؤثر (EMR) از رابطه

$$EMR = NPB \times \beta$$

(Kumar et al., 2009)

قدرت تفکیک (RP) از رابطه $RP = \sum IB$ محاسبه

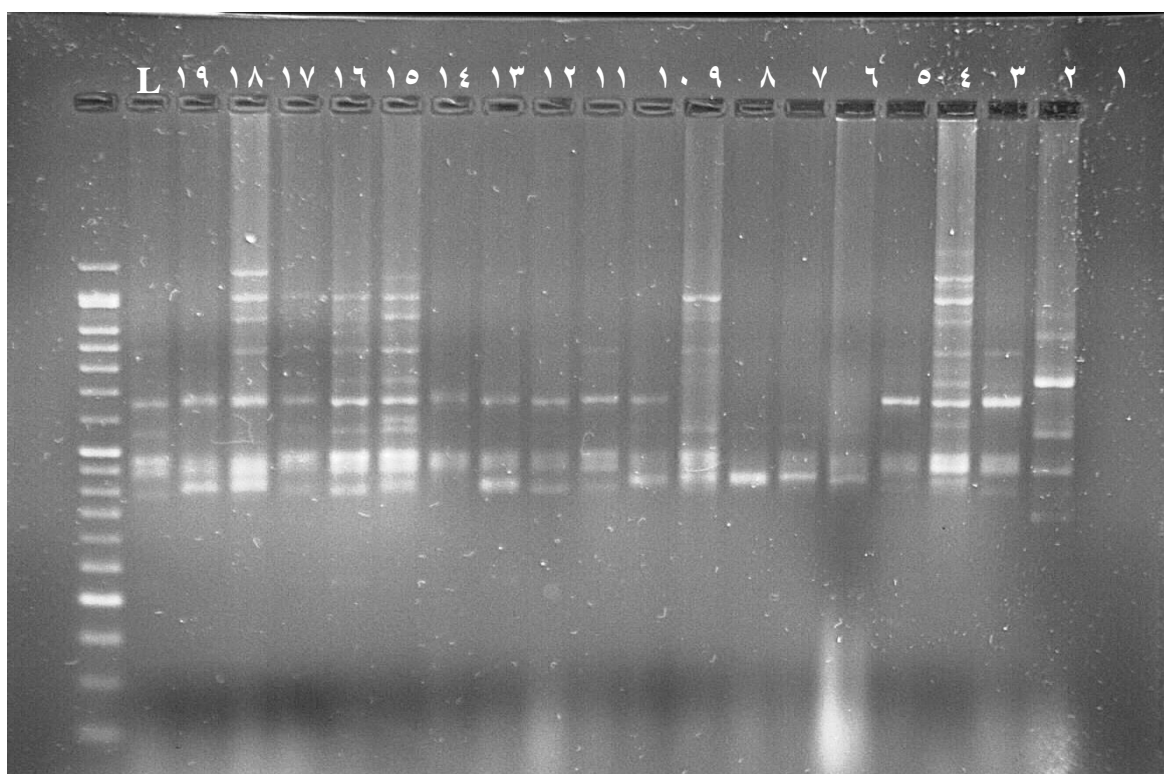
گردید (Altıntas et al., 2008).

∧ Polymorphic information content

‡ Marker Index

‡ Effective multiplex ratio

‡ Resolving power



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورزی ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای آغازگر IS11

نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین درصد چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۹۵/۰۴ بود که درصد چندشکلی برای آغازگرهای UBC824 (۸۰٪)، IS14 (۸۳٪)، UBC851 (۸۳٪) و IS11 (۸۸٪) و برای سایر آغازگرها میزان چندشکلی برابر ۱۰۰ درصد بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر بالا بودن قابلیت بالای آغازگر مورد استفاده یا مارکر مورد استفاده در غربال نمودن ژنوتیپ‌ها می‌باشد. میانگین PIC در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۳۶ بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای IS16 (۴۰٪)،

IS5 (۴۷٪) و UBC807 (۴۹٪) بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کنند. آغازگرهای UBC824 (۲۹٪) و UBC857 (۲۴٪) با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشتند. میانگین شاخص RP برابر ۴/۵۸ بود که آغازگرهای IS6، IS5، IS11 و UBC859 بیشترین میزان و آغازگرهای IS9 و UBC824 دارای کمترین میزان بودند. همچنین میانگین شاخص‌های MI و EMR به ترتیب برابر ۱/۹۱ و ۵/۰۲ بود. بیشترین میزان MI و EMR را آغازگرهای IS5، IS6 و UBC859 داشتند، همچنین کمترین میزان مربوط به آغازگرهای UBC848 و UBC824 بود.

جدول ۲- تعداد مکان تکثیر شده، تعداد مکان چند شکل، درصد چندشکلی، PIC، MI، EMR و RP در آغازگرها

کد آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چندشکلی	PIC محتوی اطلاعات چند شکلی	MI شاخص نشانگری	EMR شاخص نسبت چندگانه مؤثر	RP قدرت تفکیک
IS6	۹	۹	۱۰۰	۰/۴	۳/۵۹	۷/۵۸	۹
UBC824	۵	۴	۸۰	۰/۲۹	۰/۹۳	۳/۲	۲/۱۱
UBC841	۳	۳	۱۰۰	۰/۳۸	۱/۱۵	۳	۲/۴۲
UBC859	۹	۹	۱۰۰	۰/۳۵	۳/۱۴	۹	۷/۰۵
UBC807	۵	۵	۱۰۰	۰/۴۹	۲/۴۴	۵	۴/۴۲
UBC857	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۴	۰/۷۱	۳	۲/۴۲
IS11	۹	۸	۸۸/۸	۰/۳۲	۲/۲۹	۷/۱۱	۸/۲۱
UBC844	۳	۳	۱۰۰	۰/۳۸	۱/۱۵	۳	۴/۱۱
IS14	۶	۵	۸۳/۳	۰/۳۶	۱/۵	۴/۱۷	۴/۹۵
IS5	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۷	۴/۱۹	۹	۶/۷۴
UBC848	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۹	۰/۸۶	۳	۲/۸۴
IS9	۴	۴	۱۰۰	۰/۳۷	۱/۵	۴	۲/۱۱
UBC851	۶	۵	۸۳/۳	۰/۳۵	۱/۴۴	۴/۱۷	۳/۱۶
میانگین	۵/۶۹	۵/۳۸	۹۵	۰/۳۶	۱/۹۱	۵/۰۲	۴/۵۸

بررسی میزان فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها
 فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از
 ضریب دایس از ۰/۱۹۵ تا ۰/۵۹۳ متغیر بود (جدول
 ۳). میانگین فاصله بین ژنوتیپ‌ها برابر ۰/۴۰۹ بود که این
 موضوع نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی خوب و قابل قبول در بین

ژنوتیپ‌ها بر اساس آغازگرهای مورد بررسی می‌باشد.
 بیشترین فاصله را ژنوتیپ‌های (G۱۳ باغملک خوزستان) و
 (G۱۷ قم) (۰/۵۹۳) و کمترین فاصله را ژنوتیپ (G۱۶
 دهلران-ایلام) با (G۱۹ شیروان-ایلام) (۰/۱۹۵) داشت.

جدول ۳- ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها برای پرایمرهای ISSR استفاده شده بر اساس ضریب دایس

نام	منشاء	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19
G1	لرستان	0																		
G2	مریوان	-/324	0																	
G3	لرستان	-/256	-/293	0																
G4	الشر	-/263	-/250	-/311	0															
G5	بندرعباس	-/397	-/391	-/356	-/429	0														
G6	حاجی‌آباد	-/370	-/333	-/402	-/299	-/405	0													
G7	میناب	-/475	-/474	-/547	-/323	-/387	-/323	0												
G8	روداب	-/545	-/419	-/425	-/433	-/373	-/382	-/433	0											
G9	بندرعباس	-/541	-/368	-/467	-/415	-/419	-/452	-/491	-/280	0										
G10	خور و بیابانک	-/403	-/288	-/341	-/210	-/410	-/282	-/455	-/437	-/364	0									
G11	نصف‌آباد	-/437	-/433	-/435	-/360	-/333	-/417	-/300	-/446	-/300	-/263	0								
G12	فیروز‌آباد	-/500	-/500	-/439	-/417	-/478	-/449	-/474	-/516	-/479	-/463	-/463	0							
G13	باغملک	-/439	-/509	-/493	-/508	-/552	-/517	-/435	-/49	-/478	-/581	-/393	-/547	0						
G14	گجساران	-/405	-/316	-/273	-/41	-/520	-/360	-/524	-/353	-/460	-/291	-/479	-/571	-/525	0					
G15	دهدشت	-/390	-/385	-/375	-/349	-/470	-/277	-/465	-/316	-/521	-/241	-/333	-/513	-/433	-/214	0				
G16	دهلران	-/407	-/403	-/347	-/427	-/415	-/317	-/457	-/467	-/486	-/279	-/377	-/373	-/393	-/275	-/275	0			
G17	قم	-/494	-/467	-/290	-/470	-/375	-/500	-/529	-/425	-/500	-/429	-/410	-/440	-/594	-/358	-/393	-/250	0		
G18	ایوان	-/541	-/509	-/493	-/415	-/516	-/419	-/44	-/527	-/440	-/364	-/433	-/263	-/565	-/460	-/493	-/343	-/471	0	
G19	شیروان	-/397	-/391	-/379	-/273	-/432	-/297	-/387	-/403	-/484	-/282	-/389	-/362	-/483	-/360	-/301	-/195	-/400	-/258	0

تجزیه خوشه‌ای حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب فاصله دایس برای ژنوتیپ‌ها در شکل ۲ ارائه شده است. همان‌طورکه ملاحظه می‌گردد ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های (G۱)، (G۲)، (G۳)، (G۴)، (G۵)، (G۶)، (G۸)، (G۱۰)، (G۱۴) و (G۱۵) بود. ژنوتیپ‌های (G۱۲)، (G۱۶)، (G۱۷)، (G۱۸) و (G۱۹) در گروه دوم قرار گرفتند. در گروه سوم ۴ ژنوتیپ (G۷)، (G۹)، (G۱۱) و (G۱۳) قرار گرفتند (جدول ۴).

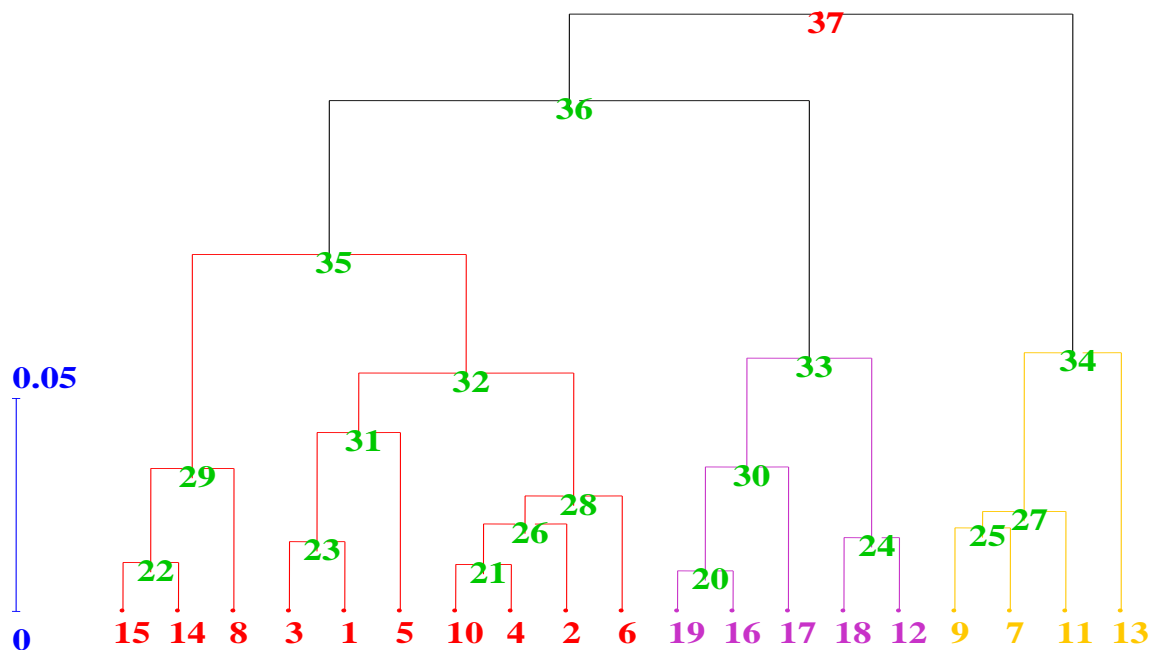
تجزیه خوشه‌ای در این تحقیق برای مشخص کردن بهترین شاخص تشابه و تشخیص بهترین الگوریتم برای ترسیم مناسب‌ترین دندروگرام برای گزارش نتایج، شاخص‌های تشابه شامل دایس و جاکارد با روش‌های اتصال میانگین (UPGMA) و اتصال مجاور (NJ) محاسبه و بر اساس ضرایب کوفنتیک حاصل از آزمون مانتل مقایسه شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده الگوریتم UPGMA و شاخص دایس در آزمون مانتل ضریب کوفنتیک بالاتری نشان داد (۸۷٪). دندروگرام

جدول ۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در خوشه‌ها بر اساس منشأ جغرافیایی

خوشه ۱	خوشه ۲	خوشه ۳
G۱ لرستان	G۱۲ فارس- فیروزآباد	G۷ هرمزگان- میناب
G۲ مریوان	G۱۶ ایلام- دهلران	G۹ هرمزگان- بندرعباس
G۳ لرستان	G۱۷ قم- جعفریه	G۱۱ اصفهان- نجف‌آباد
G۴ لرستان- الشتر	G۱۸ ایلام- ایوان	G۱۳ خوزستان- باغملک
G۵ بندرعباس	G۱۹ ایلام- شیروان	
G۶ حاجی‌آباد		
G۸ روداب		
G۱۰ خور و بیابانک		
G۱۴ -گچساران		
G۱۵ -دهدشت		

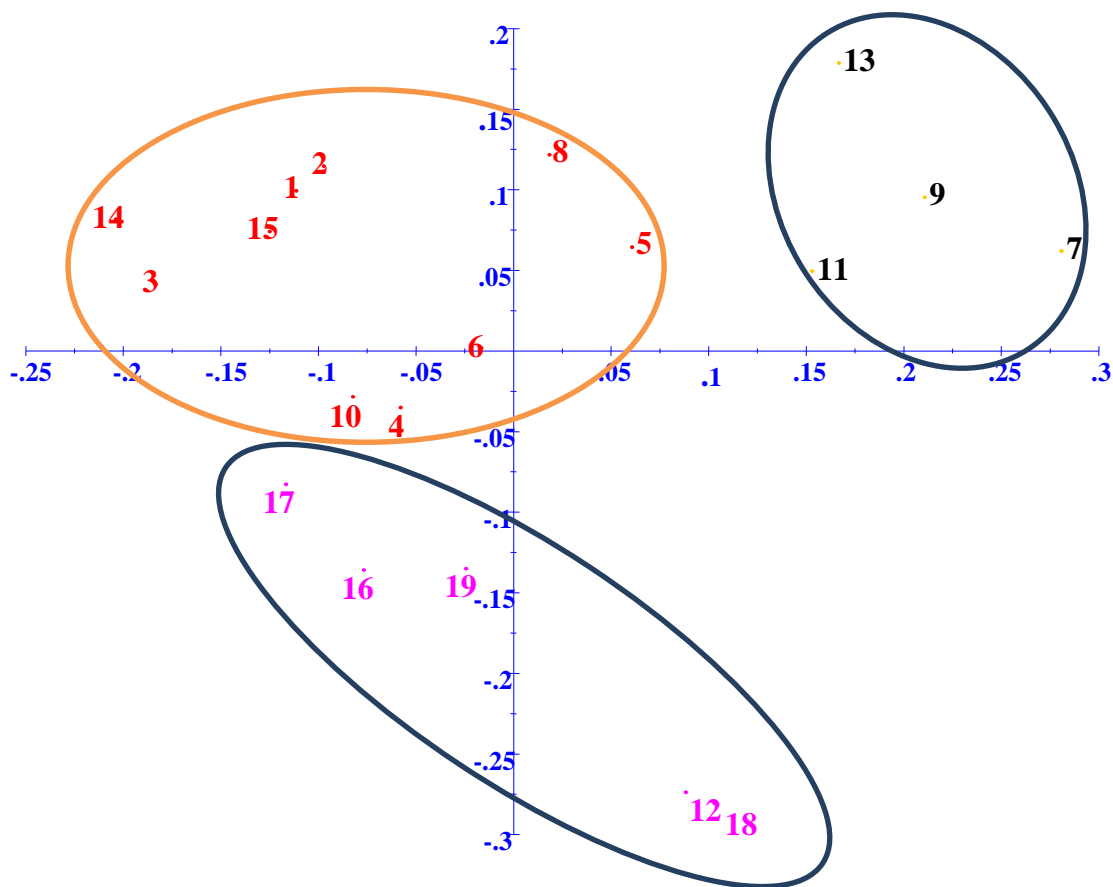
بیان گردید. دیاگرام پراکنشی ژنوتیپ‌ها بر اساس مختصات اول و دوم رسم گردید (شکل ۳) که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه‌ای کاملاً مطابقت داشت و ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند

تجزیه به مختصات اصلی بر اساس داده‌های حاصل از آغازگرهای مورد بررسی تجزیه به مختصات اصلی برای ژنوتیپ‌ها انجام شد که نتایج نشان داد محور مختصات اول و دوم به ترتیب ۲۲/۲۱ و ۱۸/۱۹ درصد از واریانس موجود را توجیه نمودند، در مجموع ۴۱ درصد از واریانس با این دو محور



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Factorial analysis: Axes 1 / 2



شکل ۳- بای پلات ژنوتیپ‌ها برای نشانگر ISSR بر اساس محور مختصات اصلی اول و دوم

به عبارت دیگر گروه بندی به صورت صحیح انجام شده بود. نتایج به دست آمده نشان داد که در میان خوشه ها تنوع بیشتر از بین گروه ها می باشد. بر این اساس تنوع در درون خوشه ها برابر ۹۲ درصد و در بین خوشه ها برابر ۸ درصد مشاهده گردید.

تجزیه واریانس مولکولی
تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه بندی تجزیه خوشه ای انجام شد (جدول ۵)، به طوری که ژنوتیپ ها در داخل ۳ گروه قرار گرفتند. بر اساس آماره PhiPT در بین جمعیت ها در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار وجود داشت،

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR

PhiPT	درصد از واریانس	واریانس برآورد شده	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۷۸*	۰/۰۸	۱/۱۲	۱۹/۸۱	۳۹/۶۳	۲	بین گروه
	۰/۹۲	۱۳/۳۱	۱۳/۳۱	۲۱۳	۱۶	درون گروه
	۱	۱۴/۴۳		۲۵۲/۶۳	۱۸	کل

*: اختلاف در سطح ۵ درصد معنی دار

بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (Rp) است، زیرا هم از تعداد افراد دارای نوار و هم از تعداد آلل تأثیر می پذیرد. قدرت تفکیک (Rp) پارامتری است که توانایی تفکیک آغازگرهای انتخابی را نشان می دهد (Kavis et al., 2010).

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 می شود (Milbourne et al., 1997). بالا بودن شاخص نشانگر، نشان از فراهم کردن اطلاعات بیشتر از ژنوم با توجه به تولید تعداد نوار چندشکلی بیشتر است.

در مجموع بر اساس کلیه شاخص ها، مناسب ترین آغازگرها برای بررسی پنج انگشت، آغازگرهای IS5، IS16 و UBC807 تعیین گردید. در پژوهش Zanganeh و همکاران (۲۰۱۷)، تنوع ژنتیکی ۱۷ ژنوتیپ رازیانه ایرانی با استفاده از ۵ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نشانگرهای ISSR در کل تعداد ۵۱ قطعه DNA ژنومی تکثیر کردند که ۴۵ باند چندشکل را آشکار نمود. میانگین تکثیر هر باند چند شکل به ازای هر آغازگر، میانگین محتوای چندشکلی (PIC) و شاخص مارکری (MI) به ترتیب ۹/۴۷ و ۵/۹۲ محاسبه گردید. دندروگرام بر اساس نتایج

بحث

تغییرات ژنتیکی در جمعیت های گیاهی می تواند به وسیله سازوکارهای مختلف از قبیل جهش، نوترکیبی ژنتیکی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده شدگی ژنتیکی و گزینش به وجود آید. از آنجا که تنوع منای گزینش است، می توان این تنوع را در گیاهان وحشی جستجو کرد. با استفاده از نشانگر ISSR تنوع قابل ملاحظه ای در بین ژنوتیپ ها وجود داشت (جدول ۲) و چندشکلی مطلوبی بر اساس این نشانگر مشاهده گردید. در مطالعه Rahim Malek (۲۰۱۱) بر روی شانزده نمونه جمعیتی متعلق به سه گونه *M. M. piperata* و *M. M. longifolia* با استفاده از نشانگر جدید و ترکیبی R-ISSR گونه های مورد بررسی بصورت کامل از یکدیگر تفکیک شدند.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، یکی از شاخص های مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری داشته که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهای با محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بالا برای تمایز ژنوتیپ های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Thimmappaiah et al., 2008).

گرفتند. این حالت ممکن است به دلیل جابجایی فیزیکی ژرم پلاسم باشد. این جابجایی می‌تواند به صورت انتقال بذرها از منطقه‌ای به منطقه دیگر توسط انسان‌ها و حیوانات انجام شود. همچنین Ahmadi و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی بر روی نوروزک (*Salvia leriifolia*) که گیاهی دوطپه و چندساله از خانواده نعناعیان است با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR را مطالعه کردند. بر اساس تجزیه کلاستر، جمعیت‌های مربوط به استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و سمنان در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. اگرچه نشانگر ISSR به خوبی توانست تفاوت بین جمعیت‌ها را آشکار کند، اما بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها با فاصله جغرافیایی موجود در رویشگاه‌های طبیعی نوروزک مطابقت نداشت (Ahmadi et al., 2016).

از تجزیه به مختصات اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای که منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود، استفاده می‌گردد. در مجموع ۴۱ درصد از واریانس با این دو محور بیان گردید، این موضوع به نوبه خود می‌تواند نشان‌دهنده پراکنش گسترده آغازگرهای مختلف بر روی سطح ژنوم و همه کروموزوم‌های پنج‌انگشت باشد. در تحقیق دیگری Biabani (۲۰۱۶) به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه آویشن دناپی، از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده کرد. همه ۱۰ آغازگر، چندشکلی بالا و نوارهای واضح برای کلیه ژنوتیپ‌ها بجز ژنوتیپ شماره ۷۷ نشان دادند. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ژنوتیپ مورد بررسی را در ۱۵ گروه قرار داد که با نتایج به‌دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت داشت.

همچنین از کاربردهای تجزیه واریانس مولکولی می‌توان به تعیین تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و تعیین حد مطلوب خوشه در تجزیه خوشه‌ای اشاره کرد، به این صورت که در هر گروه در نقطه برش دندروگرام به‌عنوان یک جمعیت و جمعیت‌های درون آن به‌عنوان افراد جمعیت در نظر گرفته

UPGMA و ماتریس جاکارد رسم گردید. در گروه‌بندی حاصل از نشانگر ISSR، ژنوتیپ‌های مورد بررسی به سه گروه اصلی طبقه‌بندی شدند.

میانگین فاصله بین ژنوتیپ‌ها در این مطالعه برابر ۰/۴۰۹ بود. استفاده از نتایج این تحقیق برای تلاقی نمونه‌های با فواصل زیاد ژنتیکی در جهت هتروزیس به‌منظور اصلاح و افزایش ترکیبات می‌تواند بسیار مؤثر باشد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای درون ژنوتیپ‌های پنج‌انگشت کشور، حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم پلاسم و استفاده از روش‌های تکثیر مناسب این گیاه توصیه می‌شود. بیشترین فاصله را ژنوتیپ‌های (G۱۳) باغملک خوزستان) و (G۱۷) قم (۰/۵۹۳) و کمترین فاصله را ژنوتیپ (G۱۶) دهلران-ایلام) با (G۱۹) شیروان-ایلام) (۰/۱۹۵) داشتند. بنابراین پیشنهاد می‌گردد از ژنوتیپ‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی را بر اساس نشانگر مورد استفاده داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. Gravand و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌های توده‌های نعناع ایرانی، با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و برخی خصوصیات مورفولوژیک انجام گرفت. بیشترین تشابه ژنتیکی بین مراکز جمع‌آوری نعناع، مناطق مرکزی با غرب و کمترین تشابه ژنتیکی بین مناطق مرکزی با جنوب بود. نمودار خوشه‌ای ۵۰ ژنوتیپ گونه‌های نعناع را بر اساس صفات مورفولوژیک به ۳ گروه تقسیم کرد.

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند. همچنین بخش‌هایی از خوشه‌بندی حاصل از دندروگرام، بیانگر آن است که تنوع ژنتیکی با منشأ جغرافیایی آنها در برخی موارد مطابقت و در برخی موارد مطابقت نداشت. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های متعلق به لرستان، هرمزگان، کردستان، کهگیلویه و بویراحمد و اصفهان بود. در گروه دوم ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق فارس، ایلام و قم بودند و در گروه سوم ۴ ژنوتیپ (G۷)، (G۹)، (G۱۱) و (G۱۳) متعلق به خوزستان، هرمزگان و اصفهان قرار

می‌گردد از ژنوتیپ‌هایی که حداکثر فاصله ژنتیکی را بر اساس نشانگر مورد استفاده داشتند در جهت استفاده از حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی استفاده شود. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه قرار گرفتند. همچنین بخش‌هایی از خوشه‌بندی حاصل از دندروگرام، بیانگر آن است که تنوع ژنتیکی با منشأ جغرافیایی آنها در برخی موارد مطابقت و در برخی موارد مطابقت نداشت. این حالت ممکن است به دلیل جایجایی فیزیکی ژرم‌پلاسم باشد.

منابع مورد استفاده

- Ahmadi, M., S., M., Kaffi, M., Whitecane, F., Melkzadeh Shahareti, S. 2016. Valuation of genetic diversity in several populations of medicinal plant Nowruzak (*Salvia leriifolia*) using ISSR markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 23(1): 1-12.
- Altıntas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and zkan, H.O. 2008. Estimating Genetic Diversity in Durum and Bread Wheat Cultivars from Turkey Using AFLP and SAMPL Markers. Plant Breeding, 127: 9-14.
- Biabani, Kh. 2016, A study on the genetic diversity of thyme populations in the Boyer Ahmad cold region using the ISSR molecular marker and features of appearance, Yasouj University, Iran (In Persiam).
- Donald, J. and Brown, N.D., 1994. *Vitex agnus castus*, Clinical Monograph. Experimental Gerontology, 29 (3-4): 319-321.
- Farshadfar, M., Kissimon, T. and Sutka. J. 1995. Genetic distance between *Triticum timopheery* zhuk, *T. araraticum* Jakubz, Plant Breeding, 114: 401-405.
- Gravand, T. 2012. Investigation of intrinsic and interspecific genetic variation in Iranian pepper masses using ISSR molecular marker, Master's thesis, Plant Breeding, Isfahan University of Technology, Faculty of Agriculture.
- Gupta, P.K. 1996. Cytogenetic. Rastogi publication. Shvaji Road. Meerut-250002, India
- Hou, Y., Yan, Z. and Wei, Y., 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR analysis Barely. Genetics Newsletter, 35:9-22.
- Kayis, S. A., Hakki, E. E., and Pinarkara, E. 2010. Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African Journal of Agricultural Research, 5 (21): 2925-2933.
- Kumar, M., Mishra, G P., Singh, R., Kumar, J., Naik,

می‌شود و برای هر نقطه برش یک تجزیه واریانس انجام می‌گیرد. نقطه‌ای که بیشترین تمایز بین گروه‌ها به وجود آید، به‌عنوان نقطه مناسب برش دندروگرام انتخاب خواهد شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که در درون گروه‌ها تنوع بیشتر از بین گروه‌ها می‌باشد. بر این اساس تنوع در درون گروه‌ها برابر ۹۲ درصد و در بین گروه‌ها تنوع برابر ۸ درصد مشاهده گردید. در بررسی Nikkedar و همکاران (۲۰۱۵) تنوع ژنتیکی بین ۱۶ توده ایرانی رازیانه (*Fueniculum vulgare*) با استفاده از ۱۵ آغازگر SCOT¹ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد توده‌ها را در ۴ گروه قرار داد که بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (PCo) و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای تأیید گردید. طبق این گروه‌بندی واریانس بین گروه‌ها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود، اما براساس واریانس برآورد شده سهم واریانس بین گروه‌ها تنها ۲۴ درصد از تنوع کل بود.

نتیجه‌گیری کلی

با استفاده از نشانگر ISSR تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد و چندشکلی مطلوبی بر اساس این نشانگر مشاهده گردید. در مجموع بر اساس کلیه شاخص‌ها، مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی پنج‌انگشت، آغازگرهای IS16، IS5 و UBC807 تعیین شدند. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای درون ژنوتیپ‌های پنج‌انگشت کشور، حفاظت در محل رویشگاه نمونه‌ها برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه و ایجاد بانک ژرم‌پلاسم و استفاده از روش‌های تکثیر مناسب این گیاه توصیه می‌شود. بیشترین فاصله ژنتیکی را ژنوتیپ‌های (G۱۳ باغملک خوزستان) و (G۱۷ قم) (۰/۵۹۳) و کمترین فاصله را ژنوتیپ (G۱۶ دهلران-ایلام) با (G۱۹ شیروان-ایلام) (۰/۱۹۵) داشتند. بنابراین پیشنهاد

¹ Start codon targeted

- (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
- Rahim Malek, M., 2011. Study of genetic relationships of some species of mint using the R-ISSR marker. *Journal of Biotechnology in Agriculture*. 10(1): 11-17
 - Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D., and Melwyn, GS. 2008. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sciatica Horticulture*, 118: 1-7.
 - Torres, AM., Weeden, NF. and Martin, A., 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 935-945.
 - Zanganeh, K., Fakheri, B., Aruji, F., Afzali Far, A., Makhdoomi, M., A. 2017. Study of genetic diversity of ecotypes of *Forniculum Gulgare* Mill in Iran using Molecular ISSR. *Journal of Biotechnology of Medicinal Plants*, 2(4):10-19
 - Ziaee, A., Mesgarpour, B., Shabestari, A. 2008. The Caution of Drug Use and Drug Interactions Based on Evidence and Documentation. Publications Taimorzadeh, Tehran, 466 pages.
 - Sarla, N., Mallikarjuna Swamy, BP., Sudhakar, T., Prasad Babu, A., Kaladhar, K., Surendhar Reddy, C., Ashok Reddy, G., Ramesha, MS., Shobha Rani, N. & Viraktamath .(2009). High yielding rice lines from elite × wild crosses. *Directorate of Rice Research, Newsletter*, 7(2):15-21.
 - P K. and Singh, Sh B., 2009. correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of Trans-Himalayas. *physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3): 225-236.
 - Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3: 127-136.
 - Mohammadi, S A. and Prasanna, B M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plant: Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43: 1235-1248.
 - Nikkedar, F., Farshadfar, M., Ebrahimi, M., Shirvani, H., 2015. Evaluation of the efficiency of SCOT molecular marker in assessing the genetic diversity of fennel herb. *Journal of Crop Breeding*. 24(4): 95-102
 - Palmer, E. and Pitman, N. 1972. Tree of Southern Africa, Covering all known indigenous species in the Republic of South Africa, South- West Africa
 - Peters, J.P. and Martinelli J.A. 1989. Hierarchical cluster analysis as a tool manages variation in germplasm collection. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 42-48
 - Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR

Genetic Diversity Evaluation of *Vitex agnus -castus* based on ISSR Molecular Marker

A.J. Saedyani¹, Z. Baghaee Far², M. Farshadfar³, P. Pournaghi² and H. Shirvani⁴

1- Ms.C., Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R. Iran.

2- Assist. Prof., Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, I.R. Iran.

3- Corresponding Author; Assoc. Prof., Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. Iran.

Email: farshadfarmohsen@yahoo.com)

4-Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 26.02.2019

Accepted: 06.07.2019

Abstract

Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) is one of important medicinal plant that plays a key role in the women health. Due to high variation within the specimens of this plant, genetic diversity between 19 genotypes was investigated using 13 ISSR primers. The ISSR primers were able to produce a total of 74 bands, of which four were single bundle, and the rest were polymorphic. The mean of polymorphism percentage among the genotypes was 95%. The polymorphism rate observed for primers of UBC824 (80%), IS14 (83%), UBC851 (83%) and IS11 (89%) and for other primers were 100%. In total, based on all the indices, the most suitable primers for assessment of genetic diversity of *Vitex agnus-castus* were IS16, IS5, and UBC807. Genetic distance of the genotypes ranged from 0.195 to 0.593 using Dice coefficient. The results of cluster analysis using UPGMA method based on Dice coefficient, the genotypes classified into three groups. Based on the first and second coordinates, the distribution diagram of the genotypes were in agreement with the results of cluster analysis. The results of grouping was also confirmed the analysis of molecular variance.

Key words: Genetic Diversity, ISSR Marker, Medicinal plant, *Vitex*