تنوع ژنتیکی گیاه داروئی *Vitex* براساس مارکر مولکولی ISSR

عبدالجبار سعیدیانی[۱]، زهرا بقایی فر[۲] ، محسن فرشادفر[۳]

[۱]کارشناسی ارشد رشته ژنتیک، دانشگاه پیام نور همدان

[۲]استاد یار گروه زیست شناسی- دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور تهران ایران، دانشگاه پیام نور تهران ایران

[۳]دانشیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور

مسئول مکاتبه: jabarsaedyani1984@gmail.com

چکیده

گیاه *Vitex* از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که در جامعه دارویی جایگاه والایی به دست آورده است. تنوع بالایی بین این نمونه‌ها گیاه وجود دارد، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های موردمطالعه با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR موردبررسی قرار گرفت. آغازگرهای ISSR درمجموع توانستند ۷۴ باند تولید کنند که از این تعداد، ۴ باند یک‌شکل مشاهده شد و سایر باندها چند شکل بودند. میانگین درصد چندشکلی در بین ژنوتیپ های موردبررسی برابر ۹۵/۰۴ درصد بود که درصد چندشکلی برای آغازگرهای UBC824 (۸۰ درصد)، IS14 (۸۳/۳۳ درصد)، UBC851 (۸۳/۳۳ درصد) و IS11 (۸۸/۸۹ درصد) و برای سایر آغازگرها میزان چندشکلی برابر ۱۰۰ درصد بود. درمجموع بر اساس کلیه شاخص‌ها، مناسب‌ترین آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه پنج‌انگشت، آغازگرهای IS16، IS5 و UBC807 تعیین گردید. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ های موردبررسی با استفاده از ضریب دایس از ۱۹۵ درصد تا ۵۹۳ درصد متغیر بود. بیشترین فاصله در بین ژنوتیپ ها در محدوده ۶۴ درصد و کمترین فاصله در ۲۴ درصد می‌باشد. نتایج حاصل از دندرو گرام تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب فاصله دایس برای ژنوتیپ ها نشان داد که ژنوتیپ ها در ۳ گروه قرار گرفتند. بر اساس مختصات اول و دوم دیاگرام پراکنشی ژنوتیپ ها رسم گردید که این دیاگرام با نتایج تجزیه خوشه ای کاملاً مطابقت داشت و ژنوتیپ ها به سه گروه تقسیم شدند. همچنین نتایج حاصل از گروه بندی‌ها، با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی تأیید گردید.

کلمات کلیدی: فاصله ژنتیکی، پنج‌انگشت، نشانگر مولکولی

مقدمه

گیاه *Vitex* از دیر باز در طب سنتی مورد توجه بوده و مصارف دارویی داشته است. این نام برگرفته از کلمه ی لاتین Vitilium" به معنی نوار بافته که نامگذاری آن به دلیل انعطاف پذیری شاخه های این گیاه می باشد و نام های دیگر آن شامل: فلفل راهبه‌ها" Monks pepper " درخت پاکدامنی، بنگرو، پنج‌انگشت، فلفل کوهی ودل آشوب است؛ (مظفریان، ۱۳۷۷)؛(Donald & Brown1994))، (میرحیدر، ۱۳۷۳). درخت پاکدامنی از کلمه یونانی"Hagnos" ولاتین آن"Castus مشتق شده است. (Palmer & Pitman1972). درخت پاکدامنی برای برگزاری جشنهای قدیمی یونانیان و بزرگداشت و احترام به Demeter الهه ی یونانی، خدای کشاورزی و آبادانی و ازدواج مورد توجه بوده است (اصلانیان،۱۳۸۱)

مندک و همکاران (۱۳۹۳) در پژوهشی مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۳ جمعیت آویشن دنایی در ایران را با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR بررسی کردند. بهاری زینب و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه ی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه ی هفده توده ی شوید.) بومی مناطق مختلف ایران را با استفاده از پنج نشانگر ISSR بررسی کردند. در مجموع ۲۹باند چند شکل ایجاد شد. میانگین کل چندشکلی۵۴/۷٪ بود. بیشترین و کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و۱۲ به ترتیب ۴۶٪ در آغاز گر (CA)sG و ۴/. در آغاز گر (AG)sT/37 و میانگین ۴۳/. بود. بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص های درصد مکان های ژنی چندشکل به ترتیب۶۲/۰۷ و ۹۳/۱۰، هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب ۲۴۸/. و ۳۹۲/. وشاخص اطلاعات شانون به ترتیب ۳۶۰/.. ۵۶۷/. در میان توده ی اردبیل و توده ی آذرشهر مشاهده شد.. دمبلیدوس و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۳۲ نمونه گیاه جعفری (متعلق به خانواده چتریان) را با استفاده از ۶ آغازگر ISSR بررسی کردند و به

IrHC2019

طور متوسط ۱۰/۲ باند پلی مورف مشاهده کردند. آنها نشان دادند این نشانگر از کارایی بالایی برای بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه برخوردار است.

مواد و روش‌ها

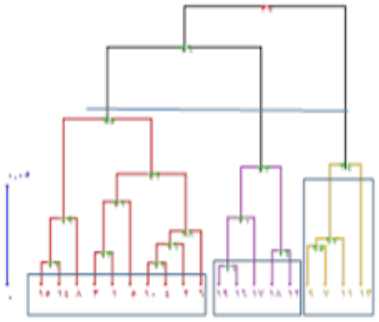
۱۹ جمعیت بذر گیاه پنج‌انگشت از موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور همراه با شناسنامه و مختصات محل رویش گیاه تهیه شد و در گلخانه کاشته شدند بعد از رشد ۲ الی ۳ هفته کار تهیه و سپس استخراج DNA ژنومی از برگ آنها در آزمایشگاه دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه انجام گرفت. روش استخراج.از برگ تازه، سالم و تمیز ۱۸۰ میلی‌گرم در نیتروژن مایع در هاون چینی کاملاً کوبیده و به شکل پودر در آورده شد.پودر برگ را در گوشه ی هاون جمع کرده و بلافاصله پیش از آب شدن یخ آن، ۸۰۰ میکرولیتر بافر CTAB به هاون اضافه و خوب با پودر برگ مخلوط گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز ۸ درصد درصد استفاده شد بدین ترتیب که از هر نمونه مقدار ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده را با دو میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری روی سطح تمیز مخلوط و سپس بارگذاری (load) شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ تا ۱۲۰ تا رسیدن رنگ آبی به انتهای ژل صورت گرفت، سپس ژل را پس از شستشوی چند ثانیه‌ای با آب مقطر به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در داخل محلول سیف ویو جهت رنگ آمیزی قرار داده شد و در پایان ژل را درون دستگاه Gel Document قرار داده و وضعیت DNA بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ماتریس تشابه دایس، تجزیه کلاستر به روش UPGMA و تجزیه به مختصات اصلی انجام شد. میانگین درصد چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۹۵/۰۴ بود که درصد چندشکلی برای آغازگرهای ۸۲۴UBC)۸۰ درصد)، ۱۴IS)۸۳/۳۳ درصد)، ۸۵۱UBC)۸۳/۳۳ درصد) و ۱۱IS)۸۸/۸۹ درصد) و برای سایر آغازگره 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 پرایمر مورد استفاده یا مارکر مورد استفاده در غربال نمودن ژنوتیپ ها می‌باشد. میانگین PIC در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۳۶ درصد بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای ۶IS)۴۰ درصد)، ۵IS)۴۷ درصد) و ۸۰۷UBC)۴۹ درصد) بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کند. آغازگرهای ۸۲۴UBC)۲۹ درصد) و ۸۵۷UBC)۲۴ درصد) با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشت. بهترین شاخص برای انتخاب پرایمر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تأثیر پذیری دارد. میانگین شاخص RP برابر ۴/۵۸ بود که آغازگرهای ۶IS، ۵IS، ۱۱IS و ۸۵۹UBC بیشترین میزان و آغازگر های ۹IS و ۸۲۴UBC 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 ۶IS،۵IS و ۸۵۹UBC داشتند همچنین کمترین میزان مربوط به آغازگرهای ۸۴۸UBC و ۸۲۴UBC بود.

نتایج

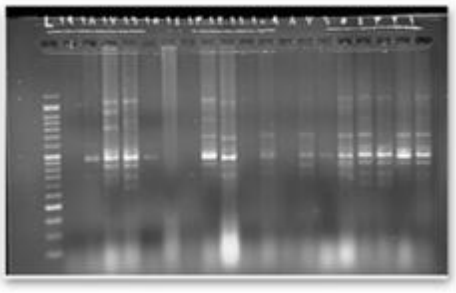
میانگین تعداد باند تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۹ ژنوتیپ برابر ۳/۸۹ به دست آمد. آغازگرهای ۸۵۹UBC، ۵IS و ۶IS با ۱۰ باند بیشترین تعداد و آغازگرهای ۸۴۱UBC، ۸۴۴UBC، ۸۴۸UBC و ۸۵۷UBC با ۳ باند کمترین تعداد باند را تکثیر نمودند. ژنوتیپ (G۳) بیشترین باند (۵۰ باند) و ژنوتیپ (G۱۳) کمترین باند (۲۱ باند) را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی داشتند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر بالا بودن قابلیت بالای پرایمر مورد استفاده یا مارکر مورد استفاده در غربال نمودن ژنوتیپ ها می‌باشد. میانگین PIC در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۳۶ درصد بود که بیشترین میزان PIC مربوط به آغازگرهای ۶IS)۴۰ درصد)، ۵IS)۴۷ درصد) و ۸۰۷UBC)۴۹ درصد) بود که این آغازگرها بهتر از سایر آغازگرها بر اساس شاخص PIC توانست فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کند. آغازگرهای ۸۲۴UBC)۲۹ درصد) و ۸۵۷UBC)۲۴ درصد) با کمترین میزان PIC توانایی خوبی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشت. بهترین شاخص برای انتخاب پرایمر مناسب، شاخص قدرت تفکیک (RP) می‌باشد، زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم تعداد آلل تأثیر پذیری دارد. میانگین شاخص RP برابر ۴/۵۸ بود که آغازگرهای ۶IS، ۵IS،

IrHC2019

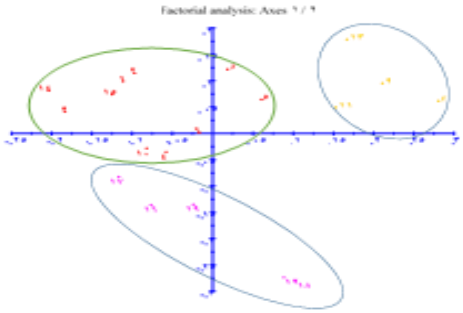
۱۱IS و ۸۵۹UBC بیشترین میزان و آغازگر های ۹IS و ۸۲۴UBC دارای کمترین میزان بودند. همچنین میانگین شاخص‌های MI و EMR به ترتیب برابر ۱/۹۱ و ۵/۰۲ بود. بیشترین میزان MI و EMR را آغازگرهای ۶IS،۵IS و ۸۵۹UBC داشتند همچنین کمترین میزان مربوط به آغازگرهای ۸۴۸UBC و ۸۲۴UBC بود.



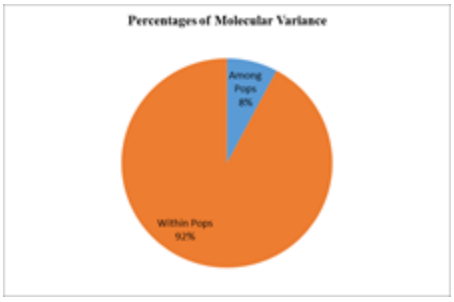
دندروگرام حاصل از داده های نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه



تصویر ژل الکتروفورزی ژنوتیپ‌های مورد بررسی برای آغازگر UBC857



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



نمودار سهم تنوع درون و بین جمعیتی با اساس نجزیه واریانس مولکولی

بحث

تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی می‌تواند به‌وسیله مکانیسم‌های مختلف از قبیل جهش، نوترکیبی ژنتیکی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده‌شدگی ژنتیکی و گزینش به وجود آید. از آنجا که تنوع مبنای گزینش است، می‌توان این تنوع را در گیاهان وحشی جستجو کرد. با استفاده از نشانگر ISSR همانطور که مشاهده شد تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌ها وجود داشت و چندشکلی مطلوبی بر اساس این نشانگر مشاهده گردید.

محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC)، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف، از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود. مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری داشته که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. بنابراین، نشانگرهایی با محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Thimmappaiah et al.,۲۰۰۸). 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 (Kayis et al.2010). شاخص نشانگر (MI) یک برآورد مناسب برای کارآیی آغازگرها است که به تعداد نوارهای چندشکلی به‌دست‌آمده و به پوشش بالای ژنوم توسط نشانگر نسبت داده می‌شود (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.

IrHC2019

منابع

اصلانیان، ف.، ۱۳۸۱. گیا ه شناسی، تجزیه و شناسائی اساس پنجانگشت *Vitex agnus-castus L*. رساله دکترای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

مظفریان، و.، (۱۳۷۷). فرهنگ نام های گیاهان ایران. چاپ دوم، انتشارات فرهنگ معاصر, ۷۴۰ صفحه

میر حیدر، ح.، ۱۳۷۳. معارف گیاهی، کاربرد گیاهان درپیشگیری و درمان بیماریها. جلد ۶، چاپ اول، انتشارات دفترفرهنگی اسلامی. تهران، ۵۸۳ صحفه.

Donald, J. and Brown, N.D., ۱۹۹۴. (Vitex agnus castus) Clinical Monograph. Experimental Gerontology.

Newall C, Anderson L, Phillipson J. Herbal medicines, ۳rd ed, London, The Pharmaceutical Press ۱۹۹۶; pp: ۱۹-۲۰.

Domblides, A. S. E. A. Domblides, V. A. and Kharchenko, G. A. ۲۰۱۰. Study of Genetic Variation Among Parsley (Petroselinum Crispum Mill.) Samples Using RAPD and ISSR Markers. Moscow University Biological Sciences Bulletin, ۶۵(۴): ۱۴۲-۱۵۴

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.

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.

Palmer, E. and Pitman, N. 1972. Tree of Southern Africa, Covering all known indigenous species in the Republic of South Africa, South- West Africa.

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.

Genetic variation of the vitex drug according to the molecular marker issr

Abdoljabar Sabidiyan[1], Zahra Baghaei Far[2], Mohsen Farshadfar[3]
[1]MSc in Genetics, Payame Noor Hamedan
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University Kermanshah
E-mail address: jabarsaedyani1984@gmail.com

Abstract

The five-fingered plant is one of the most important medicinal plants that has gained a high status in the pharmaceutical community. There is a high variation between these plant specimens, the genetic variation of the genotypes studied using the 13 issr initiators was investigated. The issr initiators in total could produce 74 bands, of which 4 bands were observed in the same way, and the other bands were multivariate. The average polymorphic percentage among the genotypes examined was 95.44%, the polymorphism of the primers of ubc824 (80%), is14 (83.33%), ubc851 (83.33%) and is11 (88.88%) and for Other primers had a polymorphism of 100%.In sum, based on all indices, the most suitable primers were used to evaluate the genetic diversity of the five-finger plant, the is16, is5 and ubc807 primers were determined. The genetic distance of the studied genotypes varied from 195% to 593% using the Dies coefficient. Maximum distance between genotypes is in the range of 64% and the lowest is 24%.The results of cluster analysis using upgma method based on Dyase distance coefficient for genotypes showed that genotypes were classified into 3 groups. Based on the first and second coordinates, the distribution pattern of genotypes was drawn. The diagram was completely consistent with cluster analysis and genotypes were classified into three groups. The results of groupings were also confirmed using molecular variance analysis.

Keywords: Genetic distance, Fingerprint, Molecular marker

IrHC2019