بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های گیاه دارویی دم شیر در ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

ابوذر سورنی [1*]، وحیده ناظری [2]، محمد رضا فتاحی مقدم [3]، الهه احدی دولت‌سرا [4]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. ۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

*نویسنده مسئول: آدرس، کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، صندوق پستی: ۷۸۷۱-۳۱۵۸۷ تلفن: ۰۹۳۶۳۶۲۳۰۲۰ پست الکترونیک: soorni64@ut.ac.ir

چکیده

Leonurus cardiaca (دم شیر) گیاهی علفی پایا از خانواده Lamiaceae (نعناییان) و زیر خانواده Lamioideae تنها گونه موجود از جنس *Leonurus* در ایران است. وجود ترکیبات ثانویه فراوان اهمیت فراوانی جهت درمان بیماری‌های قلبی به این گیاه داده است. در این آزمایش ۴۷ ژنوتیپ از ۶ جمعیت وحشی جمع‌آوری شده گیاه دارویی دم شیر در ایران با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. دی ان ای ژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با ۱۷ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند که از بین آنها ۱۱ آغازگر قطعات چند شکل تولید کردند. از کاربرد ۱۱ آغازگر انتخابی در کل ۱۲۶ نوار دی.ان.ای بدست آمد که از این تعداد ۱۱۳ نوار چند شکل بودند. شاخص تنوع ژنتیکی نی با میانگین ۰/۱۸ (محدوده بین ۰/۰۶ تا ۰/۱۰) در میان جمعیت‌ها برآورد شد. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی به طور عمده در بین جمعیت‌ها (۶۱٪) وجود داشت، اما واریانس درون جمعیت تنها ۳۹٪ بود. ضریب تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌ها (G_{st}) به مقدار ۰/۶۱ (۶۱٪) برآورد شد که تایید کننده سطح نسبتا بالایی از تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌ها است. تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت. میزان حداقل تشابه ژنتیکی در این تحقیق معادل صفر بین نمونه‌های درگز ۳ با خوانسار ۳ و سراب ۱، درگز ۶ با کرمان ۲ و ۳ و حداکثر آن بین نمونه‌های ساری ۳ و ساری ۴ معادل ۰/۹۴ بدست آمد.

کلمات کلیدی: گیاه دم شیر، نشانگرهای مولکولی، چند شکلی، جریان ژنی

مقدمه

Leonurus cardiaca (دم شیر) از خانواده Lamiaceae (نعناییان) و زیر خانواده Lamioideae تنها گونه موجود از جنس *Leonurus* در ایران است (مظفریان، ۱۳۷۵). نام جنس این گیاه (*Leonurus*) از یک بخش Leo (کلمه لاتین) به معنی شیر نر و یک بخش Oura (کلمه یونانی) به معنی دم تشکیل شده است. این نام گذاری به خاطر برگ‌های پر از کرک و مو است که به دم شیر شباهت دارد. نام گونه *Cardiaca* از کلمه یونانی Kardiaca به معنی قلب گرفته شده است.

دم شیر گیاهی علفی پایا با ریزوم‌های گسترده به ارتفاع ۰/۵ تا ۱/۵ متر با ساقه مستقیم، منشعب، چهارگوش، کم و بیش تو خالی با بافت نسبتا چوبی شده و ۲۰ تا ۲۵ چرخه گل در هر ساقه است. برگ‌ها مخروطی، متقابل، پوشیده از کرک‌های تک سلولی با کوتیکول زگیل مانند یا مرکب از دو تا چهار سلول با کوتیکول صاف، بزرگ و منقسم به سه لوب با بریدگی‌های عمیق به طوری که برگ‌های واقع در وسط ساقه آن منقسم به ۵ تا ۷ لوب جلوه می‌کنند. گل‌ها پوشیده از کرک‌های تک سلولی با کوتیکول نازک به رنگ قرمز با خال‌های ارغوانی که به شکل مجتمع (۸ تا ۱۱ گل) در زاویه برگ‌های قسمت فوقانی ساقه قرار دارند (زرگری، ۱۳۶۹; امید بیگی، ۱۳۸۹; ;Popescu, 2009 Ali and Nasir, 1990) .

فلاونوئیدهایی از جمله کیورستین، کیورسترین، هیپروسید، روتین و کامفرول از مهمترین ترکیبات این گیاه هستند که برای درمان و پیشگیری بیماری‌های قلبی عروقی استفاده می‌شود. (Trumbeckaite, 2006).

با توجه به نیاز برای تامین داروهای گیاهی با کیفیت مناسب و قابل اعتماد، روش هایی اصلاحی برای کشت تجاری و فرآیندهای پس از برداشت در دست بررسی است. Heuberger و همکاران (۲۰۱۰) برنامه‌های برای روش‌هایی اصلاحی، کشت تجاری و فرآیندهای پس از برداشت در شرایط جنوب آلمان برای انتخاب گونه‌های گیاهی جنس *Leonurus* مورد استفاده در چین از سال ۱۹۹۹ توسعه دادند. نتایج حاصل از آزمایشات مزرعه‌ای، روش‌های اصلاحی، خصوصیات گیاهی و شیمیایی مواد آزمایشی، مقایسه تجربی (آزمایشی) و وارداتی مواد گیاهی با توجه به کیفیت دارویی آن‌ها، انتقال روش‌های تولید و مواد گیاهی به کشاورزان متخصص، کاربرد دارویی و در نهایت اطلاع رسانی برای کاربران در زنجیره تولید در مورد مزایای تولید محلی مواد گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. Heuberger و همکاران از روش انتخاب کلون برای اصلاح گونه‌های *Leonurus* استفاده کردند. از آنجایی که اهلی کردن یک گیاه دارویی فرآیندی طولانی است ولی اگر کار از یک ژنوتیپ مناسب آغاز شود فرآیند کوتاه‌تر خواهد شد. یکی از مهمترین ابزارها برای تعیین ارقام و توده‌های مناسب استفاده از نشانگرهای مولکولی است.

در گزینش یک نشانگر مولکولی موارد مهمی مثل تکرار پذیری، سادگی و کم هزینه بودن آن را باید در نظر داشت. از سال ۱۹۹۴ میلادی نشانگر مولکولی جدیدی به نام ISSR مطرح شد که می‌توانست هدف‌های یاد شده را به خوبی برآورده سازد (Zietkiewicz et al., 1994). این نشانگر استوار بر پس.سی.آر بوده و می‌تواند قطعه‌هایی از دی.ان.ایرا که بین دو ریز ماهواره قرار گرفته‌اند افزایش دهد. نشانگرهای ISSR به عنوان آغازگر از یک ریز ماهواره که خود از ۱۶ تا ۲۵ جفت باز تشکیل شده است استفاده می‌کند. این آغازگر با ۲ تا ۴ نوکلئوتید به انتهای '3 یا '5 دی.ان.ای می‌چسبد و آن را تکثیر می‌کند (Bornet and Branchard., 2001).

Chen و همکاران از نشانگر مولکولی ISSR جهت بررسی تنوع در ۱۹ ژنوتیپ *Leonurus japonicus* یکی دیگر از گونه مهم جنس *Leonurus* استفاده کردند که در نتیجه تولید ۱۶۴ نوار، ۱۱۷ نوار چند شکلی نشان دادند. آنالیز کلاستر توانست نمونه را در سه گروه جای دهد که به طور قابل توجهی با ویژگی های مورفولوژیک و موقعیت جغرافیایی ۱۹ نمونه ارتباط داشت. (Chen et al., 2009).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش شامل ۴۷ نمونه گیاهی از ۶ جمعیت جمع آوری شده از ۶ استان مختلف ایران است. نام، علامت اختصاری و محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های مورد مطالعه جمعیت‌های دم شیر

ردیف	استان	جمع- محل آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	کرمان	مادون	۲۶۰۰	E۵۶ °۵۰'۳۱/۴۹"	N۲۹ °۱۸'۳۶/۷۱"
۲	خراسان شمالی	درگز	۲۱۹۴	E۵۸ °۴۲'۱/۴۷"	N۳۷ °۳۴'۴۲/۹۱"
۳	البرز	طالقان	۱۸۵۰	E۵۰ °۴۵'۳۴/۵۱"	N۳۶ °۱۰'۲۷/۸۰"
۴	اصفهان	خوانسار	۲۲۱۰	E۵۰ °۱۷'۵۷/۶۵"	N۳۳ °۱۵'۵۰/۶۳"
۵	اردبیل	سراب	۱۶۸۷	E۴۷ °۳۱'۴۰/۲۴"	N۳۷ °۵۵'۵۹/۲۸"
۶	مازندران	ساری	۲۱۷۰	E۵۳ °۱۲'۳/۵۸"	N۳۶ °۳'۳۷/۷۸"

در رشد بهاره، نمونه‌های برگی در بهار جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. پس از چند بار شستشو با آب مقطر و خشک کردن آب روی برگ‌ها، با استفاده از ازت مایع منجمد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج دی.ان.ای نگهداری شد.

استخراج دی.ان.ای:

با استفاده از روش تغییر یافته پیرتیلا و همکاران (Pirttila et al., 2001) (استفاده از زغال فعال در مرحله اضافه کردن بافر جهت حذف ترکیبات فنلی و استات پتاسیم در بین دو مرحله شستشو با کلروفورم ایزوآمیل الکل) از برگ‌های جوان، سالم و تازه ۸ ژنوتیپ از هر ۶ جمعیت گیاه دم شیر به طور جداگانه دی.ان.ایاستخراج شد. کمیت و کیفیت دی.ان.ایبا استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ تعیین شد و به کمک آن‌ها غلظت یکسان از دی.ان.ای نمونه‌ها (۱۰ نانوگرم در میکرو لیتر) آماده شد.

شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (پس.سی.آر):

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, i Cycler, USA) انجام شد. برای بررسی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ۱۷ آغازگر تصادفی استفاده شد که در میان آن‌ها ۱۱ آغازگر نوارهای چند شکلی تولید نمودند. از این ۱۱ آغازگر به عنوان آغازگرهای مناسب برای بررسی تنوع گیاه دم شیر استفاده شد. هر مخلوط واکنش پس.سی.آر شامل ۳ میکرو لیتر دی.ان.ای ژنومی با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرو لیتر، ۲ میکرو لیتر از آغازگر با غلظت ۱۰ پیکو مول و ۷ میکرو لیتر کیت پس.سی.آر با غلظت 2X از شرکت سیناژن بود که در نهایت با اضافه کردن ۳ میکرو لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل حجم مخلوط واکنش پس.سی.آر به ۱۵ میکرو لیتر رسانده شد. چرخه‌های حرارتی شامل $94^{\circ}C$ برای واسرشت سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه، تعداد ۳۵ چرخه به صورت $92^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال $55^{\circ}C$-49 به مدت یک دقیقه (دمای اتصال بسته به نوع آغازگر متغییر بود) و $72^{\circ}C$ به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه برای تکمیل بسط انجام شد.

الکتروفورز دی.ان.ای محصول پس.سی.آر :

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصول واکنش در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲ درصد تهیه شده در بافر TBE بارگیری و به مدت ۱۵۰ دقیقه و شدت ۱۱۰ ولت الکتروفورز شد. بدین صورت که برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از سایز مارکر ۱kb مربوط به شرکت فرمنتاز (Fermentas) در چاهک اول و آخر استفاده شد و در بقیه چاهک‌ها دی.ان.ای حاصل از پس.سی.آر مربوط به بوته‌های هر جمعیت بارگذاری شد. پس از الکتروفورز به منظور رنگ‌آمیزی، ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار گرفته و پس از شستشو با آب مقطر در دستگاه مخصوص عکس‌برداری از ژل (دستگاه ژل داک)، تحت نور اشعه فرابنفش نوارهای تکثیر یافته دی.ان.ای مشاهده و عکس‌برداری شدند.

تجزیه داده‌ها و آنالیز آماری:

پس از انجام مراحل آزمایشگاهی، برای بررسی مراحل چند شکلی بین نمونه‌ها به حضور یک نوار عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYSpc (Ver 2.02) و استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA محاسبه گردید. تجزیه پلات به صورت سه بعدی صورت گرفت. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار TreeView ترسیم شد. ماتریس فاصله جمعیت‌ها به روش نی (نی، ۱۹۷۲) و با استفاده از نرم افزار PopGene, Ver 1.31 صورت گرفت. تنوع ژنتیکی برای همه مکان‌های آللی با کمک آنالیز نی محاسبه شد (نی، ۱۹۷۲). قدرت تفکیک آغازگرها (Rp) به روش زیر محاسبه شد (جدول شماره ۲).

$$Rp= \sum I_b$$

$$Ib= 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

نتایج و بحث

چند شکلی ژنتیکی

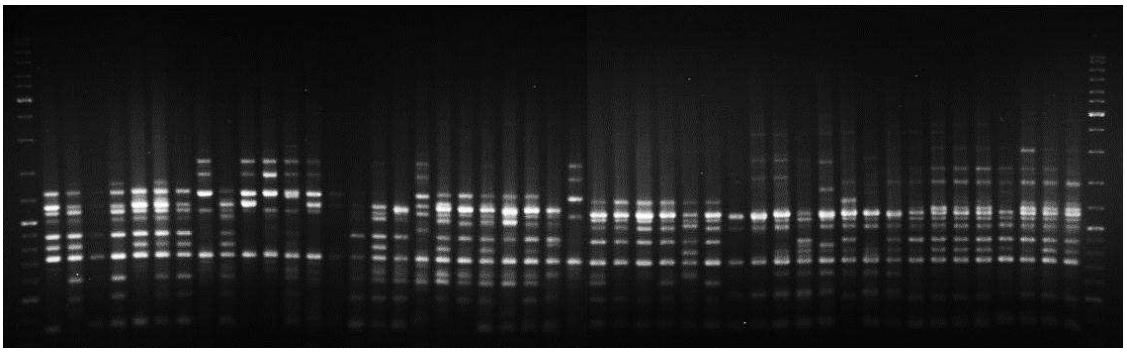
در این تحقیق به منظور تشخیص و ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی گیاه دارویی دم شیر از نشانگرهای مولکولی ISSR استفاده گردید. از مجموع ۱۱ آغازگر بکار رفته، ۱۲۶ نوار با وضوح بالا تولید گردید. از این تعداد، ۱۳ نوار یک شکل و ۱۱۳ (۸۹٪) نوار دارای چند شکلی بودند (جدول شماره۲). به طور میانگین تعداد ۱۱/۴ نوار به ازای هر آغازگر بدست آمد که تعداد ۱۰/۲ نوار از آن‌ها چند شکل بودند. کم‌ترین تعداد نوار تکثیر شده با آغازگر ISCS-11 با تعداد ۵ نوار و بیشترین تعداد نوار تکثیر شده با آغازگرهای ISCS-07 و ISCS-14 با ۱۷ نوار حاصل گردید. بیشترین تعداد نوار چند شکل مربوط به آغازگر ISCS-07 با تعداد ۱۷ نوار بود. محدوده نواری تشکیل شده از ۲۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز تغییر بود. بالاترین قدرت تفکیک به آغازگر ISCS-05 به مقدار ۵/۶ اختصاص یافت.

جدول ۲. نوع، توالی و درصد چند شکلی آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز ISSR جمعیت‌های طبیعی دم شیر

ردیف	آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	تعداد کل قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چند شکل	درصد چند شکلی	قدرت تفکیک
۱	ISCS-01	5'TCCTCCTCCTCCTCCTCCC3'	۵۲/۹	۷	۶	٪۸۵	۲/۴
۲	ISCS-02	5'TCTCTCTCTCTCTCTCTCC3'	۵۳	۸	۶	٪۷۵	۳/۰
۳	ISCS-05	5'ACACACACACACACACC3'	۵۲	۱۵	۱۴	٪۹۳	۵/۶
۴	ISCS-07	5'TTGTTGTTGTTGTTGTTGC3'	۵۵	۱۷	۱۷	٪۱۰۰	۳/۸
۵	ISCS-08	5'GACAGACAGACAGACA3'	۵۱	۱۶	۱۴	٪۸۷	۴/۶
۶	ISCS-09	5'GAGAGAGAGAGAGAGAA3'	۵۱	۹	۶	٪۶۶	۲/۳
۷	ISCS-11	5'TCTCTCTCTCTCTCTCG3'	۴۹/۸	۵	۳	٪۶۰	۰/۴
۸	ISCS-13	5'TCTCTCTCTCTCTCTCRT3'	۵۱	۹	۹	٪۱۰۰	۲/۹
۹	ISCS-14	5'ACACACACACACACACYT3'	۵۱/۱	۱۷	۱۶	٪۹۴	۴/۲
۱۰	ISCS-15	5'ACACACACACACACACYG3'	۵۴/۷	۱۴	۱۳	٪۹۲	۳/۰
۱۱	ISCS-16	5'GAAGAAGAAGAAGAAGAA3'	۴۹	۹	۹	٪۱۰۰	۴/۴
		میانگین	-	۱۱/۴	۱۰/۲	٪۸۹	-
		جمع کل	-	۱۲۶	۱۱۳	-	-

درصد چند شکلی بالای بدست آمده (۸۹٪)، نشان از تنوع بالای این گیاه و توانایی زیاد آغازگرها در تفکیک جمعیت‌های این گونه است. نتایج حاصل نشان می‌دهد کلیه آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به جز آغازگرهای ISCS-09 و ISCS-10 از قدرت تفکیک بالا و توانایی تولید چند شکلی بالایی در بین جمعیت‌های گیاه دم شیر برخوردار هستند. درصد چند شکل بالای بدست آمده را می‌توان به دلیل نحوه گرده افشانی (دگرگشن) در این گیاه دانست که نشان از تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های گیاه دارویی دم شیر است.

Smo321 Smo321



شکل شماره ۱: الگوی نواری حاصل از قطعات تکثیر ۶ جمعیت گیاه دم شیر. آغازگر ISCS-05

میزان تشابه ژنتیکی و گروهبندی نمونه‌های مورد آزمایش:

تکنیک ISSR در طبقه بندی و مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های دم شیر بسیار موفقیت آمیز بود. انگیزه انتخاب این تکنیک عدم اطلاعات از توالی دی.ان.ایدر مورد جنس و گونه دم شیر بود. میزان حداقل تشابه ژنتیکی در این تحقیق صفر بین نمونه‌های درگز ۳ با خوانسار ۳ و سراب ۱، درگز ۶ با کرمان ۲ و۳ و حداکثر آن بین نمونه‌های ساری ۳ و ساری ۴ معادل۰/۹۴ بدست آمد. عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت درگز با جمعیت‌های خوانسار و سراب حکایت از فاصله زیاد ژنتیکی جمعیت درگز از جمعیت-های فوق دارد. دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه با استفاده از نرم افزار Bootstrap تنوع ژنتیکی بالای بین جمعیت‌ها و یکنواختی و شباهت بین ژنوتیپ‌های درون جمعیت‌های مورد بررسی را تایید می‌کند. به طوری که در ضریب پایداری ۱۰۰ گروهبندی ژنوتیپ‌ها را در ۲ گروه اصلی تقسیم جای داد. جدایی ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت درگز از دیگر جمعیت‌ها در سطح پایداری ۱۰۰و تفکیک این جمعیت از جمعیت‌های دیگر با تفاوت فاحش را می‌توان به طور قطع به دلیل جدایی در زیر گونه (subsp. *Persicus*) و اختلافات اساس در شرایط آب و هوایی، توپوگرافی و خاک منطقه دانست. اختلافات اساسی در صفات مورفولوژیکی این زیر گونه از قبیل ارتفاع ساقه، تعداد ساقه اصلی و فرعی و تراکم بوته‌ها به طور واضح در زمان نمونه برداری مشخص بود. جدایی ژنوتیپ‌های جمعیت سراب از ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های خوانسار، ساری و کرمان در سطح پایداری ۹۹ را با توجه به آنکه به یک زیر گونه (*Cardiaca*) تعلق دارند می‌توان به تفاوت فاحش در شرایط اقلیمی منطقه سراب با سه منطقه دیگر نسبت داد. اقلیم منطقه خوانسار و طالقان بسیار به هم شبیه بود چرا که نمونه‌ها فقط در باغات و در پای درختان رشد می‌کردند ولی شرایط آب و هوایی منطقه ساری متفاوت از مناطق کرمان، طالقان و خوانسار بود. به دلیل دگرگشنی بین ژنوتیپ‌ها، فاصله بین گیاهان دم شیر یک منطقه با گیاهان بین جمعیت‌ها به وضوح قابل مشاهده است. بر این اساس می‌توان از ژنوتیپ‌های مناطق مختلف که دارای صفات مطلوبی هستند و از نظر ژنتیکی دو از هم هستند برای دو رگ گیری استفاده کرد. این تنوع بالا در بین دیگر گیاهان دگرگشن خانواده نعناع از جمله آویشن (Helena et al., 2009) با درصد چند شکلی ۹۲٪ به وضوح قابل مشاهده است.

آنالیز منطقه‌ای نمونه‌ها:

بررسی تنوع در درون جمعیت‌های دم شیر به کمک میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت سراب (I =۰/۱۵ , h = ۰/۱۰) نسبت به سایر جمعیت‌ها، بیشترین و در جمعیت خوانسار (I = ۰/۱۰, h = ۰/۰۶) کم‌ترین بوده است. شاخص تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعاتی شانون روندی مشابه با درصد نوارهای چند شکل نشان می‌دهد به گونه‌ای که با افزایش دو پارامتر h و I درصد نوارهای چند شکل آن جمعیت افزایش می‌یابد. ضریب تمایز ژنتیکی در میان جمعیت‌ها (G_{st}, $G_{st}=(H_t-H_s)-/H_t$) به مقدار ۰/۶۱ (۶۱٪) و برآورد جریان ژنی (Nm = 0.5 $G_{st}/(1_ G_{st})$)، به طور متوسط تعداد مهاجرت رد و بدل شده در هر نسل در میان جمعیت‌ها برابر ۰/۳۵ (۳۵٪) با فرض تعادل هاردی واینبرگ محاسبه شد. مقدار پایین Nm نشان از تبادل پایین ژن در بین جمعیت‌های دم شیر است که می‌تواند به دلیل فاصله زیاد بین رویشگاه‌های این گیاه باشد.

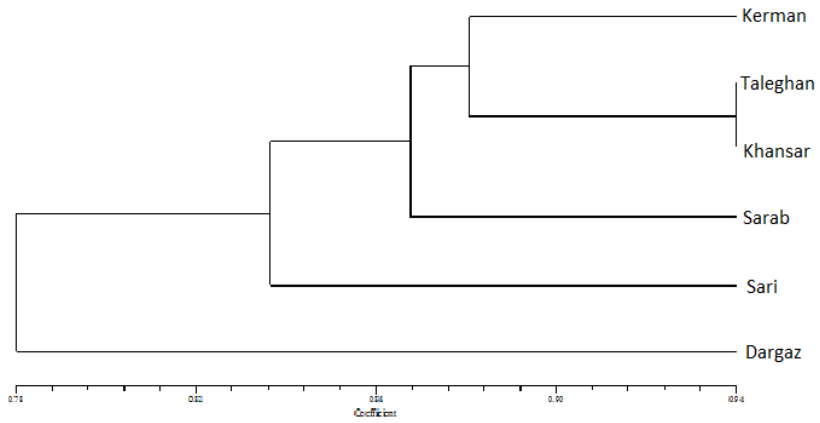
تجزیه خوشه‌ای مناطق:

تجزیه خوشه‌ای یکی از متداول‌ترین روش‌های آماری چند متغیره در بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد و جمعیت‌ها می‌باشد. این روش در مواردی استفاده می‌شود که الگوی گروه‌بندی قبلی در مورد مواد ژنتیکی مورد مطالعه وجود نداشته باشد. متداول‌ترین الگوریتم برای تجزیه خوشه‌ای UPGMA می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای مناطق تطابق کامل با دندروگرام حاصل از تفکیک ژنوتیپ‌ها را تایید می‌کند. بررسی ماتریس تشابه در این مطالعه بیشترین همسانی را در بین توده‌های خوانسار و طالقان و کم‌ترین همسانی را

در بین توده‌های کرمان و سراب نشان داد که به ترتیب حاکی از میزان نزدیکی و دوری ژنتیکی این جمعیت‌ها نسبت به یکدیگر می‌باشد (جدول۳).

جدول ۳. میزان تشابه بین شش جمعیت مورد مطالعه گیاه دم شیر

جمعیت مورد بررسی	کرمان	درگز	طالقان	خوانسار	سراب	ساری
کرمان	۱/۰۰					
درگز	۰/۷۷	۱/۰۰				
طالقان	۰/۸۸	۰/۷۸	۱/۰۰			
خوانسار	۰/۸۸	۰/۷۹	۰/۹۴	۱/۰۰		
سراب	۰/۸۵	۰/۷۹	۰/۸۷	۰/۸۸	۱/۰۰	
ساری	۰/۸۲	۰/۷۶	۰/۸۳	۰/۸۵	۰/۸۴	۱/۰۰



شکل ۲. گروه‌بندی شش جمعیت دم شیر مورد مطالعه بر اساس ماتریس تشابه

تجزیه واریانس داده‌های مولکولی:

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (AMOVA) نشان می‌دهد تنوع بین جمعیت‌ها در حدود ۶۱٪ و تنوع موجود در درون جمعیت‌ها در حدود ۳۹٪ می‌باشد (جدول ۴).

شاخص تنوع ژنتیکی نی و تجزیه و تحلیل AMOVA، درصد تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها ۶۱/۹٪ (G_{st}) و درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۳۸/۱٪ (F_{st})، نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها بیشتر از درون جمعیت‌های گیاه دم شیر است. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد گونه‌های چند ساله و دگرگشن تنوع ژنتیکی بالاتری در درون جمعیت نسبت به گیاهان یک ساله و خودگشن نشان می‌دهند (Nybom., 2004). سیستم گرده افشانی و فاصله زیاد رویشگاه‌ها می‌تواند دلیل تنوع بالای درون و بین جمعیت‌های دم شیر باشد.

جدول ۴۷ : نتایج تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های دم شیر

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس تخمینی	درصد واریانس
بین جمعیت‌ها	۵	۴۱۴/۳۹	۸۲/۸۷	۹/۸۰	٪۶۱
درون جمعیت‌ها	۴۱	۲۵۲/۰۷	۶/۱۴	۶/۱۴	٪۳۹
کل	۴۶	۶۶۶/۴۶		۱۵/۹۴	٪۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری کلی

مدیریت موفق و حفاظت از جمعیت گونه‌های در معرض خطر به درک مناسبی از توزیع تنوع ژنتیکی در گونه‌ها بستگی دارد. یافته‌های ما اطلاعات مهم ژنتیکی را برای توسعه استراتژی‌های حفاظت و کشت گیاه دارویی دم شیر فراهم خواهد کرد. یکی از اهداف اصلی حفاظت از طبیعت، حفظ تنوع ژنتیکی است. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای میان و درون جمعیت‌ها، استراتژی حفاظت باید شامل هر دو روش درون جا و برون جا باشد. روش درون جا بیشتر به بازگرداندن و تهیه زیستگاه با اندازه جمعیت مناسب می‌پردازد. جدا افتادن رویشگاه درگز از دیگر جمعیت‌ها می‌تواند ناشی از فاصله زیاد جغرافیایی زیاد آن‌ها با یکدیگر می‌باشد که موجب کاهش جریان ژنی این رویشگاه با رویشگاه‌های دیگر می‌شود. همین امر این جمعیت را از نظر تاکسونومی از دیگر جمعیت‌ها جدا می‌کند. جمعیت درگز متعلق به زیرگونه *persicus* در صفات مورفولوژیکی از قبیل ارتفاع ساقه، تعداد ساقه اصلی و فرعی و تراکم بوته‌ها به طور واضح از دیگر جمعیت‌ها متمایز است. سطح بالای تنوع ژنتیکی این جمعیت نشان می‌دهد که می‌بایست این زیستگاه مورد حفاظت قرار شدیدی قرار گیرد و با توجه به اندازه بسیار کوچک این جمعیت برداشت از آن ممنوع شود. نزدیکی دو جمعیت خوانسار با شرایط اقلیمی نسبتاً مشابه و افزایش جریان ژنی موجب نزدیکی این دو رویشگاه از نظر ژنتیکی شده است هر چند از نظر تاکسونومی به زیر گونه‌های متفاوتی تعلق دارند. خوپذیری این جمعیت و سازگاری ژن‌ها با شرایط اقلیمی منطقه خوانسار و احتمالاً تبادل مواد رویشی موجب شباهت بسیار آن با رویشگاه طالقان شده است. دوری رویشگاه کرمان از سراب و نیز شرایط متفاوت اقلیمی میزان تبادل ژنی بین این دو جمعیت را کاهش داده و موجب فاصله زیاد این دو جمعیت از نظر ژنتیکی شده است. در خصوص جمعیت‌هایی که تنوع کمتری نشان می‌دهند و از فراوانی بیشتری برخوردار هستند حفاظت برون جا توصیه می‌شود. برای حفاظت برون جا نیاز به طراحی دقیق و ایجاد یک بانک ژرم پلاسم برای این گونه‌هاست. جمع آوری بذر و انتقال دانهال از جمعیت‌های مختلف به رویشگاه مناسب و افزایش مصنوعی جریان ژنی بین جمعیت‌ها از پارامترهای حفاظت برون جا برای این جمعیت‌ها است. با توجه به بررسی‌های انجام شده در خصوص جمعیت‌های رو به انقراض درگز، طالقان، خوانسار، ساری و کرمان به علت مبارزه و حذف این گیاه توسط کشاورزان در اثر عدم آگاهی از خواص دارویی این گیاه و مشکلات ایجاد کننده گیاه مذکور در باغات حفاظت درون جا در اولویت برنامه‌های اصلاحی این گیاه قرار دارد. علاوه بر این، اطلاعات بیشتر در مورد کشت، که می‌تواند موجب حفظ تنوع موجود در جامعه شود، مورد نیاز است. در نهایت با شناسایی و انتخاب جمعیت‌هایی که از نظر ژنتیکی فاصله زیادی دارند می‌توان برای انجام کارهای اصلاحی استفاده کرد. تلاقی ژنوتیپ‌های جمعیت درگز با جمعیت‌های دیگر می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید هیبریدهایی با عملکردهای مورد نظر باشد.

منابع:

امید بیگی، ر.، ۱۳۸۹. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد چهارم، انتشارات آستان قدس رضوی، ۴۲۳ صفحه.

زرگری، ع، ۱۳۶۹. گیاهان دارویی. جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، ۹۲۳ صفحه.

مظفریان، و.، ۱۳۷۵. فرهنگ نام‌های گیاهان ایران .انتشارات فرهنگ معاصر، ۷۴۰ صفحه.

Ali SI and Nasir YJ (1990) Flora of Pakestan 192:152-154.

Bornet, B. and Branchard. M. 2001. Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol, Rep. 19:209-215.

Chen, L., Zhao, L., Bai, Y., Hu, R.. and Si, J. 2009. Genetic relationship analysis of different provenances of *Leonurus japonicus* by ISSR marker. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 341: 343-5.

Helena, T., Monya, M.C., Sofia, B.L. and Luis, G.P. 2009. A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). Biochemical Systematics and Ecology 37: 670–677.

Heuberger, H., Bauer, R., Friedl, F., Heuble, G., Hummelesberger, j., Nogel, R., Seidenberger, R. and Londono, T.P., 2010. Cultivation and breeding of Chines medicinal plant in Germany. Planta Med, 76: 1956-1962.

Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol. Ecol, 13, 1143–1155.

Pirttila, A.M., Hirsikorpi, M., Kamarainen, T., Jaakola, L. and Hohtola, A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 273a-273f.

Popescu, M.L., Dinu, M. and Toth, O. 2009. Contibutions to the pharmacognostical and phytobiological study on Leonurus cardiac (Lamiaceae). Farmacial, 57: 4.

Trumbeckaite, S. 2006. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60: 245-248.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20:176.

Evaluation of genetic variability of medicinal plant *Leonurus cardiaca* populations in Iran using ISSR molecular markers

Aboozar Soorni,[1,*] Vahide Nazeri,[2] Mohammad Reza Fatahi[2], Elahe ahadi

[1,3]MSc student of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran

[2]Associate Professor of department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran

*Corresponding author: soorni64@ut.ac.ir

Motherwort (*Leonurus cardiaca*) a herbaceous perennial plant of Lamiaceae family is the only species of the genus Leonurus in Iran. There are many plant secondary compounds that are used to treat heart disease. In this study, ISSR molecular markers were used to evaluate genetic diversity among 47 accessions from six wild populations of motherwort in Iran. Totally 17 random primers that were tested initially where 11 produced polymorphic and high resolution bands. In total, 126 DNA fragments were obtained, from which 113 were polymorphic. The Nei's gene diversity (He) was estimated to be 0.18 within populations (ranging from 0.06 to 0.10). Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic variation was mainly found within populations (61%), but variance among populations was only 39%. In addition, Nei's differentiation coefficients (G_{st}) was found to be high (0.61), confirming the relatively high level of genetic differentiation among populations. Mantel test revealed a significant correlation between genetic and geographic distances. Cluster analysis of genotype based on the Dice similarity coefficient and UPGMA method was performed. The mins and maxs populations values of genetic similarity was recorded between Dargaz1, Khansar3 and Sarab1, Dragaz6 and Keman2 and 3 (0) and Sari 3 and Sari 4 (0/94) respectively.

Keywords: *Leonurus cardiaca*, Molecular markers, Polymorphism, Gene flow