مطالعه تنوع ژنتیکی نمونه‌های طبیعی و باززایی شده گیاه وج (*Acorus calamus* (Acoraceae با نشانگرهای مولکولی ISSR

عباس قلی‌پور[۱،*]، سید کمال کاظمی‌تبار[۲] و سارا شریفی سلطانی[۳]

۱- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران

۲- دانشیار، گروه اصلاح‌نباتات و پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۳- دانشجوی دکتری، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۲)

چکیده

گیاه دارویی وج (*Acorus calamus*) گیاهی چندساله، نیمه‌آبزی و معطر از تیره Acoraceae است که علاوه‌بر خواص دارویی متعدد، در صنایع بهداشتی، غذایی و کشاورزی (دفع آفات) کاربرد دارد. این تحقیق به‌منظور مطالعه مقایسه‌ای تنوع ژنتیکی نمونه‌های طبیعی و باززایی شده از کشت‌بافت سه جمعیت ارزِفون، پِلسک و اَلَندان این گیاه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR انجام شد. از ۱۵ آغازگر استفاده شده، ۹ آغازگر بیشترین تعداد نوارهای چندشکل را در نمونه‌های مورد مطالعه تولید کردند. از مجموع ۸۳ نوار تولید شده، تعداد ۵۲ (٦٢/٦٥ درصد) نوار چندشکلی بودند. درصد لوکوس‌های چندشکلی برای گیاهان گروه طبیعی و باززایی شده به‌ترتیب ٤٣/٣٧ درصد و ٥٥/٤٢ درصد بود و ضریب تنوع ژنتیکی نی (H) برای دو گروه نمونه طبیعی و باززایی شده ۰/۲۳۹ محاسبه شد. ضریب شانون (I) برای گیاهان گروه طبیعی و باززایی شده به‌ترتیب ۰/۰۳۳ ± ۰/۲۵۱ و ۰/۰۳۱ ± ۰/۲۹۹ محاسبه شد. در بین نمونه‌های طبیعی و باززایی شده، بیشترین تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های جمعیت الندان (۰/٦٣) و کمترین مقدار آن بین نمونه‌های جمعیت پلسک (۰/٤٤) مشاهده شد. نتایج حاصل از تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۹٤ درصد تغییرات ژنتیکی یافت شده مربوط به درون گروه‌ها و ٦ درصد در بین گروه‌ها بود. مطابق شاخص‌های محاسبه شده، میزان تنوع ژنتیکی نمونه‌های باززایی شده گیاه وج در مقایسه با نمونه‌های طبیعی بیشتر بود. کمترین میزان واگرایی ژنتیکی بین نمونه‌های طبیعی و باززایی شده در جمعیت الندان مشاهده شد، بنابراین گیاهان این جمعیت برای اهلی‌سازی و پرورش در ایران می‌تواند مناسب باشد.

واژگان کلیدی: اهلی‌سازی، تشابه ژنتیکی، ضریب تنوع ژنتیکی نی، گیاه دارویی، *Acorus calamus*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **a.gholipour@pnu.ac.ir**

مقدمه

در سال‌های اخیر گیاهان دارویی به خاطر پتانسیل بالای درمانی، بهداشتی و اقتصادی در بازارهای جهانی به‌طور ویژه مورد توجه قرار گرفته‌اند. کشور ایران نیز با توجه به پیشینه تاریخی غنی در زمینه طب سنتی و استفاده از گیاهان در درمان، در این زمینه شاهد تحولات گسترده‌ای شده است. از طرف دیگر گیاهان دارویی یکی از منابع ارزشمند در گستره وسیع منابع طبیعی ایران هستند که در صورت شناخت علمی، توسعه، کشت و بهره‌برداری صحیح، می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه و اشتغال‌زایی داشته باشند. رشد روزافزون تقاضای فراورده‌های گیاهان دارویی، تنوع ژنتیکی این گیاهان را به‌خاطر بهره‌برداری بی‌رویه از طبیعت، تخریب زیستگاه و تجارت بدون نظارت، در معرض تهدید قرار داده است (Bhagat, 2011). برای جلوگیری از فرسایش این منابع ژنتیکی با ارزش و در معرض خطر انقراض، اعمال رویکرد مدیریتی جدید در زمینه کشت و پرورش گیاهان دارویی به‌عنوان موضوعی کاملاً جدی باید مورد توجه قرار گیرد. در این راستا رویکرد استفاده از تکنیک کشت‌بافت گیاهان دارویی علاوه‌بر دسترسی به گیاه سالم و عاری از بیماری برای کشت در مزرعه، از نظر حفاظت از گیاهان دارویی نیز اهمیت دارد (Bhagat, 2011).

گیاه دارویی وج (*Acorus calamus*)، گیاهی معطر با خواص دارویی متعدد است که در صنایع بهداشتی و آرایشی، غذایی و دفع آفات کاربردهای فراوانی برای آن ذکر شده است (Motley, 1994; Mozaffarian, 2013; Kumar *et al.*, 2014). حضور این گونه گیاهی به‌صورت طبیعی پس از حدود نیم‌قرن از آخرین گزارش آن در ایران تأیید شده است (Gholipour and Sonboli, 2013). وج گیاه علفی چندساله، نیمه‌آبزی، با ریزوم ضخیم و منشعب و برگ‌های شمشیری بلند از تیره Acoraceae است (Gholipour and Sonboli, 2013). تاکنون این گیاه در سه رویشگاه (آب‌بندان) با اندازه جمعیت کوچک در مساحت کمتر از ۵۰ مترمربع در استان مازندران (ساری) شناسایی شد. مطالعات انجام شده در زمینه ترکیبات شیمیایی اسانس و تعداد کروموزوم این گیاه در ایران، وجود تنوع در ترکیبات شیمیایی اسانس و اعداد کروموزومی بین این سه جمعیت را نشان داد (Gholipour *et al.*, 2015; Gholipour, 2019). گیاهان دارویی اغلب براساس خصوصیات ریختی و ظاهری شناسایی و رده‌بندی می‌شوند، اما ممکن است در بین آن‌ها تفاوت‌های ژنتیکی وجود داشته باشد که مورد توجه قرار نگرفته باشد، در این صورت مطالعه گوناگونی‌های ژنتیکی این گیاهان علاوه‌بر اینکه می‌تواند به رده‌بندی آن‌ها با روش سنتی کمک کند، برای حفاظت و همچنین اهلی‌سازی نمونه‌های ژنتیکی برتر گیاه نیز مفید است (Ginwal *et al.*, 2011; Rana *et al.*, 2013; Kasture *et al.*, 2016).

دلایل زیادی برای ارزیابی دقیق تنوع ژنتیکی در گیاهان وجود دارد. از این دلایل می‌توان به حمایت صحیح از تنوع ژنتیکی گیاهان (Dwevdi and Gaibriyal, 2009)، شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی در بانک‌های ژن (Zheleva *et al.*, 2007)، برنامه‌های به‌نژادی (Laurentin, 2009; Amiri *et al.*, 2017; Tahani *et al.*, 2019) و انتخاب صحیح والدهای برتر برای تلاقی‌ها (Tahir and Karim, 2011) اشاره کرد. نشانگرهای مولکولی ISSR (Inter simple sequence repeat) به‌خاطر چندشکلی و تغییرپذیری بسیار بالا، قابلیت تکثیر و تکرارپذیری بالا، قیمت نسبتاً ارزان و فراوانی زیاد در ژنوم گیاهان، یکی از نشانگرهای مهم برای ارزیابی گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی به‌شمار می‌آید (Pai, 2005; Abdul Kareem *et al.*, 2012; Rana *et al.*, 2013). تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاه دارویی در معرض خطر انقراض *Acorus calamus* در هند با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ریزماهواره کلروپلاستی (Ginwal *et al.*, 2011)، نشانگر مولکولی ISSR (Abdul Kareem *et al.*, 2012; Rana *et al.*, 2013) و نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR (Liao and Hsiao, 1998; Kasture *et al.*, 2016; Devi *et al.*, 2018) مطالعه شدند که بر مفید بودن نشانگرهای مولکولی ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *A. calamus* تأکید داشتند.

مطالعاتی در زمینه ریزازدیادی این گیاه دارویی ارزشمند از طریق کشت‌بافت ریزنمونه ریزوم با هدف تکثیر انبوه در شیشه

و استفاده از گیاهچه‌های حاصل در کشت آن در مزرعه با موفقیت در جهان انجام شد (Anu *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2007; Sandhyarani *et al.* 2011; Verma and Singh, 2012; Babar *et al.*, 2020). پس از بازیابی گیاه دارویی وج در ایران، کشت‌بافت این گیاه به‌منظور تولید انبوه گیاهچه‌ها برای کشت و پرورش در ایران در راستای برطرف نمودن محدودیت‌های بهره‌برداری آن از طبیعت و همچنین حفاظت گیاه انجام شد. با توجه به تکثیر رویشی این گیاه از طریق ریزوم و عدم تولید دانه، تهیه گیاهچه برای کشت در فصل مناسب یکی از مسائل اساسی در زراعت آن محسوب می‌شود. در این راستا، مطالعه مقایسه‌ای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی و گیاهان باززایی شده حاصل از کشت‌بافت این گیاه دارویی در ایران برای شناخت بهتر این گنجینه ژنتیکی با ارزش و همچنین مقایسه تنوع ژنتیکی گیاهان طبیعی با گیاهان باززایی شده از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی منابع علمی موجود نشان داد که تاکنون مطالعه علمی در زمینه تنوع ژنتیکی گیاه دارویی وج با استفاده از نمونه‌های طبیعی در ایران انجام نشده است. هدف این تحقیق مطالعه مقایسه‌ای تنوع ژنتیکی نمونه‌های طبیعی و باززایی شده این گیاه با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR است.

مواد و روش‌ها

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان طبیعی و گیاهچه‌های باززایی شده و تعیین میزان احتمالی تنوع ژنتیکی گیاه حاصل در مقایسه با والد اصلی، از نشانگرهای مولکولی ISSR استفاده شد. نمونه برگ تازه از گیاهان با اندازه حدود ۲۵–۱۵ سانتی‌متر سه جمعیت ارزِفون، پِلسک و آلندان از رویشگاه طبیعی به‌عنوان گیاهان والد (گروه اول) و از نمونه‌های حاصل از کشت‌بافت (گروه دوم) تهیه و در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (جدول ۱). با استفاده از ریزنمونه‌های ریزوم، آزمایش کشت‌بافت گیاهان سه جمعیت مذکور در آزمایشگاه اصلاح مولکولی گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۸ انجام شد. برای استخراج DNA، از برگ‌های گیاهچه‌های حاصل از باززایی مستقیم با اندازه حدود ۲۵–۱۵ سانتی‌متر استفاده شد.

۲ گرم از نمونه برگ تازه گیاهان طبیعی و باززایی شده از کشت‌بافت سه جمعیت گیاه وج در یک هاون چینی به همراه نیتروژن مایع به‌خوبی پودر گردید. به‌منظور استخراج DNA از روش CTAB با اندکی تغییرات استفاده شد (Doyle and Doyle, 1987; Ginwal and Mittal, 2010). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Eppendorf AG 22331 (Eddinburge) در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر بررسی گردید. در این تحقیق از تعداد ۱۵ آغازگر مخصوص واکنش ISSR در مرحله غربالگری استفاده شد که در نهایت ۹ آغازگر با چندشکلی بالا برای انجام آزمایش مولکولی ISSR انتخاب شدند (جدول ۲). تمام آغازگرهای مورد استفاده از شرکت آرین‌ژن گستر تهیه شدند. واکنش تکثیر DNA ژنومی در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر شامل Master Mix (6 µl)، H_2O (3.25 µl)، Primer (0.75 µl با غلظت 10 µM) و DNA (2 µl با غلظت 50 ng) انجام واکنش‌ها از Master Mix شرکت سیناکلون استفاده گردید.

جدول ۱– محل جمع‌آوری، اطلاعات هرباریومی و کد نمونه‌های گیاهی مطالعه شده *Acorus calamus*

Table 1. Localities, herbarium information and code of studied accessions of *Acorus calamus*

کد Code	رویشگاه Locality	شماره هرباریومی Hebarium number
Lane 1	Mazandaran, Sari, Arzefon village, Malepeshte Ab-bandan, 3 Nov. 2017, 331 m, Gholipour A.	SPNH-5919
Lane 2	Mazandaran, Sari, Shahid Rajaii dam road, Pelesk village, Ab-bandane Pelesk, 5 June. 2018, 660 m, Gholipour A.	SPNH-5991
Lane 3	Mazandaran, Sari to Kiasar road, before kiasar, Alandan, Ab-bandane Alandan, 9 June. 2018, 1350 m, Gholipour A.	SPNH-5997
Lane 4	Regenerated plantlet of Arzefon population	---
Lane 5	Regenerated plantlet of Pelesk population	---
Lane 6	Regenerated plantlet of Alandan population	---

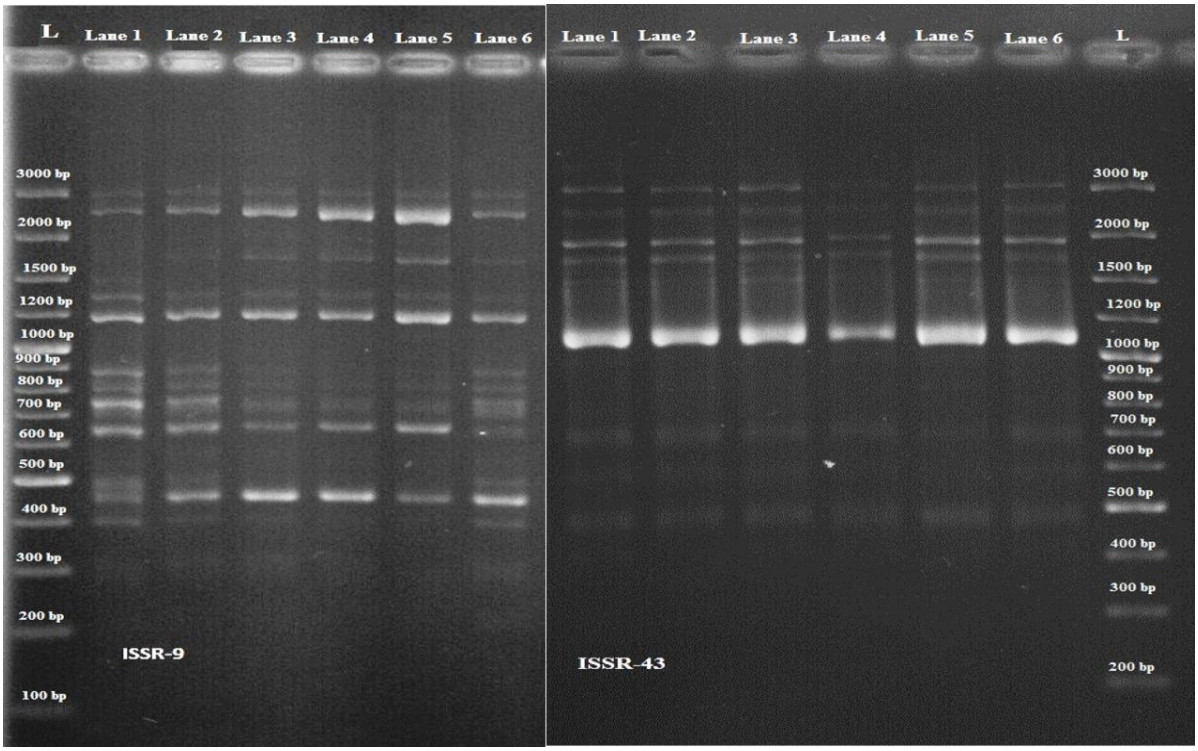
بر اساس منابع اطلاعاتی موجود (Ahlawat *et al.*, 2010; Abdul Kareem *et al.*, 2012) و پس از آزمایش‌های اولیه، برنامه دمایی بهینه برای واکنش PCR به‌صورت واسرشت‌سازی اولیه (به‌مدت ٤ دقیقه در دمای ٩٤°C)، ٣٥ سیکل (١ دقیقه ٩٤°C، ١ دقیقه ٦٠°C و ٢ دقیقه ٧٢°C) و مرحله بسط نهایی (٧ دقیقه در ٧٢°C) تنظیم شد. آزمایش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل Palm-Cycler GP-001 (Corbet Research, Australia) انجام گرفت. برای بررسی محصولات تکثیر شده در واکنش PCR از ژل آگارز ٢ درصد استفاده شد. در این تحقیق از نشانگر وزن مولکولی 100 bp از شرکت سیناکلون استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی، ژل آگارز به‌مدت ١٥ دقیقه در ظرف حاوی اتیدیوم‌بروماید با غلظت $0/5\ \mu gml^{-1}$ قرار داده شد. برای مشاهده نوارها از دستگاه آشکارساز UV مدل UVItec BTS-15.M استفاده شد. با استفاده از دستگاه Gel document عکس‌برداری از ژل‌ها انجام گرفت. الگوی نواری حاصل از تجزیه ISSR بر اساس وجود یا عدم وجود نوار خاص در نمونه‌ها، به‌صورت یک یا صفر نمره‌دهی شد. بدین ترتیب هر نوار به‌عنوان یک لوکوس جداگانه منظور شد و برای هر نمونه بر اساس حضور (١) و عدم حضور (٠) باند، امتیازدهی و ماتریس داده‌ها تشکیل شد. امتیازدهی نوارها با استفاده از نرم‌افزار Total lab gel analysis (http://totallab.com) انجام شد. ماتریس شباهت بین نمونه‌ها با استفاده از ضرایب تشابه Jaccard و Simple matching تهیه شد. به‌منظور محاسبه ماتریس تشابه و آزمون مانتل از نرم‌افزار NTSYS v.2.02 استفاده گردید. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار Gen-Alex v.2.02 انجام شد. شاخص تنوع ژنی و فراوانی نوارها توسط نرم‌افزار Popgen v.32 محاسبه شدند (Yeh *et al.*, 1999).

نتایج و بحث

پروفیل ISSR: براساس نتایج حاصله، از مجموع ١٥ آغازگر ISSR استفاده شده، تعداد ٩ آغازگر بیشترین تعداد نوارهای چندشکل را در نمونه‌های مورد مطالعه تولید کردند (جدول ٢). دامنه تغییرات اندازه نوارهای نمره‌دهی شده بر اساس نشانگر وزن مولکولی ١٠٠ تا ٣٠٠٠ جفت‌بازی، از ٢٥٠ جفت‌باز تا ٣٠٠٠ جفت‌باز بود. در مجموع ٨٣ نوار، با میانگین ٩/٢ نوار در هر آغازگر تولید شد. از کل نوارهای شمارش شده برای نمونه‌های جمعیت‌های مختلف، تعداد ٥٢ نوار (٦٢/٦٥ درصد) چندشکل و تعداد ٣١ نوار (٣٧/٣٥ درصد) یک‌شکل بودند. به‌طور میانگین تعداد ٥/٧ نوار به ازای هر آغازگر، چندشکل بودند. بیشترین تعداد نوار تکثیر شده مربوط به آغازگر ISSR-43 با ١٦ نوار و کمترین نوار تکثیر شده مربوط به آغازگر ISSR-32 با تعداد ٤ نوار بود (جدول ٢ و شکل ١). ٢٢/٢ درصد از آغازگرها بیشترین درصد چندشکلی (١٠٠ درصد) را داشتند، در حالی که ٧٧/٨ درصد از آن‌ها با تولید تعدادی نوار یک‌شکل، چندشکلی کمتری را نشان دادند.

تنوع ژنتیکی: درصد لوکوس‌های چندشکلی برای گیاهان گروه طبیعی و باززایی شده به‌ترتیب ٤٣/٣٧ درصد و ٥٥/٤٢ درصد و میانگین درصد لوکوس‌های چندشکلی ٦/٠٢ ± ٤٩/٤٠ درصد بود. ضریب تنوع ژنتیکی نی (H) برای دو گروه نمونه طبیعی و باززایی شده ٠/٢٣٩ محاسبه شد. ضریب شانون (I)، برای گیاهان گروه طبیعی و باززایی شده به‌ترتیب ٠/٠٣٣ ± ٠/٢٥١ و ٠/٠٣١ ± ٠/٢٩٩ و مقدار کل این ضریب ٠/٠٢٢ ± ٠/٢٧٥ محاسبه شد (جدول ٣).

ضرایب تشابه نمونه‌های مورد مطالعه براساس ماتریس داده‌های ISSR با روش‌های مختلف محاسبه گردید و نتایج حاصل از روش جاکارد در جدول ٤ ارائه شده است. در بین نمونه‌های طبیعی مطالعه شده، بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت پلسک با الندان (٠/٧) و پلسک با ارزفون (٠/٧) و کمترین تشابه بین ارزفون و الندان (٠/٥٦) مشاهده شد. در بین نمونه‌های باززایی شده بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت پلسک با الندان (٠/٥٧) و کمترین تشابه بین ارزفون و الندان (٠/٤٤) مشاهده شد. در مجموع میزان تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های طبیعی بیشتر از نمونه‌های حاصل از کشت‌بافت بود. در بین نمونه‌های طبیعی و باززایی شده، بیشترین تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های جمعیت الندان (٠/٦٣) و کمترین مقدار آن بین نمونه‌های جمعیت پلسک (٠/٤٤) مشاهده شد.



شکل ۱- الگوی تکثیر DNA ژنومی توسط آغازگرهای ISSR-9 و ISSR-43. نام نمونه‌ها بر اساس جدول ۱ می‌باشد.

Figure 1. Banding pattern of reproduced genomic DNA by ISSR-9 and ISSR-43 primers. Samples names are according to table 1.

جدول ۲- نوع، ترادف و وضعیت نوارهای هر یک از آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز ISSR گیاه وج

Table 2. Type, sequence and reproduced bands of each primer in ISSR analysis of *Acorus calamus*

نام آغازگر Primer	ترادف (3'–5') Sequence (5'-3')	تعداد کل نوارها Total bands number	تعداد نوارهای چندشکل No. of polymorphic bands	درصد باندهای چندشکل Percentage of polymorphic bands
ISSR-1	GAGAGAGAGAGAGAGAGAA3	10	5	50
ISSR-8	CTCTCTCTCTCTCTCTG	8	8	100
ISSR-9	AGAGAGAGAGAGAGAGC	14	6	42.8
ISSR-11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	7	3	42
ISSR-24	CCCGGATCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	9	6	66.6
ISSR-32	GATCGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGGGAGG	4	4	100
ISSR-36	HBHAGAGAGAGAGAGAG	7	6	85.7
ISSR-39	VHVGTGTGTGTGTGTGT	8	3	37.5
ISSR-43	GGGTCGGGTCGGGTC	16	11	68.75
کل (Total)		83	52	62.65

جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی گروه‌های مورد مطالعه گیاه وج (*A. calamus*). (میانگین ± انحراف استاندارد)

Table 3. Genetic diversity indices in studied groups of *Acorus calamus* (mean values ± standard error).

گروه‌ها Groups	ضریب نی Nei's genetic diversity	ضریب شانون Shannon's information index	درصد لوکوس‌های چندشکلی Percentage of polymorphic loci	تعداد آلل‌های متمایز Number of different alleles	تعداد آلل‌های مؤثر Number of effective alleles
نمونه‌های طبیعی Wild samples	0.239	0.251 ± 0.033	43.37	1.337 ± 0.071	1.3 ± 0.042
نمونه‌های باززایی شده Rgenerated samples	0.239	0.299 ± 0.031	54.42	1.53 ± 0.06	1.326 ± 0.038
میانگین Mean	0.239	0.275 ± 0.022	49.4 ± 6.02	1.434 ± 0.047	1.313 ± 0.028

برای تعیین همبستگی بین ماتریس‌های حاصل از آنالیز داده‌ها بر اساس ماتریس تشابه، از آزمون مانتل استفاده شد (جدول ۵). بر اساس این آزمون همبستگی نسبتاً بالایی بین ماتریس‌های تشابه مختلف وجود دارد که نشان می‌دهد ماتریس‌ها نتایج تقریباً یکسانی را ارائه داده‌اند.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) که در آن تغییرات مشاهده شده داخل و بین گروه‌ها با استفاده از فاصله‌های ژنتیکی دسته‌بندی می‌شود، محاسبه شد. بر اساس نتایج این تحقیق ۹٤ درصد تغییرات ژنتیکی یافت شده مربوط به درون گروه‌ها و ٦ درصد در بین گروه‌ها بود (جدول ٦).

تجزیه خوشه‌ایی: دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ایی با روش UPGMA بر اساس ماتریس داده‌های ISSR تعیین و در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه ضریب تشابه جاکارد بر اساس روش خوشه‌بندی UPGMA دارای بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۸۷) بود که نشان دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی براساس ضریب تشابه جاکارد می‌باشد (جدول ۵). نمونه‌های مطالعه شده از گیاه وج در سطح ضریب تشابه حدود ۰/۵۷ در دو خوشه اصلی A و B توزیع شدند. خوشه A به‌نوبه خود در سطح ضریب تشابه حدود ۰/٦۷ به دو زیر خوشه A1 و A2 تجزیه شده است. نمونه‌های مربوط به جمعیت‌های طبیعی ارزفون و پلسک با نشان دادن بیشترین تشابه در زیرخوشه A1 قرار گرفتند. زیرخوشه A2 متشکل از نمونه طبیعی جمعیت الندان و نمونه باززایی شده جمعیت ارزفون است. در خوشه اصلی B نمونه‌های باززایی شده جمعیت‌های پلسک و الندان حضور دارند.

جدول ٤- ضرایب تشابه جاکارد نمونه‌های طبیعی و باززایی شده گیاه وج بر اساس نشانگرهای ISSR. نام نمونه‌ها بر اساس جدول ۱ می‌باشد.

Table 4. Jaccard similarity coeficient of natural and regenerated accessions of *Acorus calamus* based on ISSR markers. Name of samples are according to table 1

نمونه Sample	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6
Lane 1	1					
Lane 2	0.70	1				
Lane 3	0.56	0.70	1			
Lane 4	0.59	0.68	0.71	1		
Lane 5	0.51	0.44	0.56	0.56	1	
Lane 6	0.54	0.60	0.63	0.55	0.57	1

جدول ۵- همبستگی بین ضرایب تشابه به‌دست آمده با روش‌های مختلف بر اساس نشانگرهای مولکولی ISSR

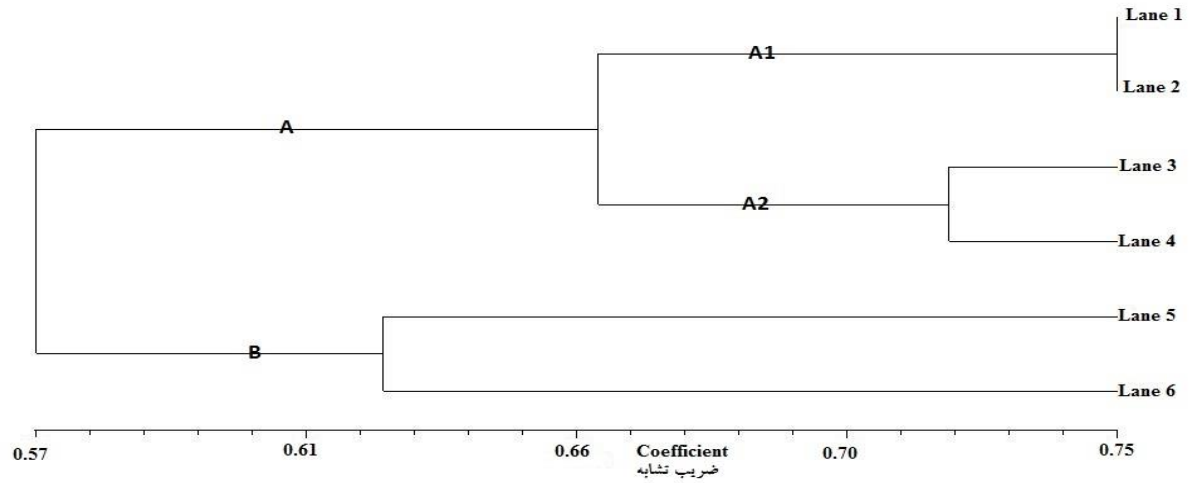
Table 5. Correlation between similarity coefficients obtained by different methods based on ISSR molecular markers

Similarity index/Method	UPGMA	Complete linkage	Single linkage
Dice	0.865	0.846	0.750
Jaccard	0.874	0.858	0.761
Simple	0.833	0.831	0.66

جدول ٦- تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های گیاه دارویی وج با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

Table 6. Analysis of molecular variance (AMOVA) of populations of *Acorus calamus* using ISSR markers data

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	درصد واریانس % Variance
بین گروه‌ها Between Groups	1	16.33	16.333	6%
درون گروه‌ها Within Groups	4	54.667	13.667	94%
کل Total	5	71.000	30	100%



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های نشانگرهای مولکولی ISSR در گیاه دارویی وج با روش UPGMA. نام نمونه‌ها مطابق جدول ۱ می‌باشد.

Figure 2. UPGMA dendrogram of cluster analysis of ISSR marekers data in *Acorus calamus*. Name of samples are according to table 1.

اطلاعات تنوع و ساختار ژنتیکی برای توسعه راهبردهای حفاظت گونه‌های گیاهی در معرض تهدید انقراض بسیار اساسی هستند. گوناگونی ژنتیکی برای سازگاری گونه‌ها با شرایط زیست‌محیطی حیاتی هستند و گونه‌ای که به اندازه کافی تنوع ژنتیکی نداشته باشد، نمی‌تواند با تغییرات شرایط محیطی سازگار شود (Schaal *et al.*, 1991). نشانگرهای مولکولی به‌خصوص نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی در گونه‌های مختلف از جمله گیاه وج (*A. calamus*) مورد استفاده قرار گرفت (Ginwal *et al.*, 2011; Abdul Kareem *et al.*, 2012; Kasture *et al.*, 2016). در این پژوهش تنوع ژنتیکی نمونه‌های طبیعی و نمونه‌های حاصل از کشت‌بافت گیاه دارویی وج با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR برای اولین بار در ایران مطالعه شد. نتایج این پژوهش نشان داد درصد لوکوس‌های چندشکلی در گیاهان گروه طبیعی در مقایسه با گیاهان باززایی شده (به‌ترتیب ٤٣/٣٧ درصد و ٥٥/٤٢ درصد) کمتر است؛ در نتیجه میزان گوناگونی در نمونه‌های باززایی شده از والدهای طبیعی بیشتر است. یکی از دلایل این موضوع می‌تواند اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد در شرایط محیط کشت روی نمونه‌های باززایی شده باشد (Noormohammadi *et al.*, 2014). عبدالکریم و همکاران (Abdul Kareem *et al.*, 2012) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های جنوب و شمال شرق هند گونه *A. calamus*، میزان درصد لوکوس‌های چندشکلی را به‌ترتیب ٤٢/٧٢ درصد و ٧/٧٧ درصد گزارش نمودند. ضریب تنوع ژنتیکی نی (H) برای دو گروه نمونه طبیعی و باززایی شده ۰/۲۳۹ و ضریب شانون (I) برای گیاهان گروه طبیعی و باززایی شده به‌ترتیب ۰/۰۳۳ ± ۰/۲۵۱ و ۰/۰۳۱ ± ۰/۲۹۹ بود. در پژوهش عبدالکریم و همکاران (Abdul Kareem *et al.*, 2012) شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) و نی (H) برای تمام جمعیت‌های چهار ناحیه مورد مطالعه به‌ترتیب ۰/۲۹٤٦ (SD = ۰/۳۱) و ۰/۲۰۰۵ (SD = ۰/۲۱۱) محاسبه شدند. شاخص تنوع ژنتیکی شانون (I) و نی (H) برای تمام جمعیت‌های مطالعه شده از سرتاسر هند برای نشانگر ISSR به‌ترتیب ۰/۵۰ (SD = ۰/۱۳) و ۰/۳۳ (SD = ۰/۱۱) گزارش شدند (Kasture *et al.*, 2016). بر اساس مطالعات انجام شده میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف این گونه پائین است که یکی از دلایل اصلی آن تکثیر رویشی این گیاه از طریق ریزوم می‌باشد (Abdul Kareem *et al.*, 2012; Kasture *et al.*, 2016).

یکی از اهداف پژوهش حاضر مقایسه تنوع ژنتیکی گیاهان طبیعی و باززایی شده گیاه وج برای ریزازدیادی، کشت و برنامه‌های حفاظتی این گیاه در ایران بود. مطابق شاخص‌های شانون، نی و آنالیز خوشه‌ای، میزان تنوع ژنتیکی نمونه‌های باززایی شده گیاه وج در مقایسه با نمونه‌های طبیعی بیشتر

است. براساس این نتایج برای کشت این گیاه دارویی باارزش با استفاده از نمونه‌های باززایی شده حاصل از کشت‌بافت در ایران انجام مطالعات مقایسه‌ای در زمینه ترکیبات شیمیایی این نمونه‌ها ضروری است.

با توجه به اینکه گیاه وج بیشتر با روش تولیدمثل غیرجنسی و از طریق ریزوم تکثیر می‌شود، یافته‌های این پژوهش نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین نمونه‌های طبیعی سه جمعیت ارزفون، پلسک و الندان می‌باشد. وجود این تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های یک گونه از اهمیت زیادی برخوردار است، به‌طوری که در سازگاری گیاه با شرایط زیستگاهی متغیر و بقاء آن تأثیر دارد. نمونه‌های طبیعی جمعیت الندان و ارزفون بیشترین فاصله ژنتیکی را نسبت به یکدیگر نشان دادند. گیاهان جمعیت ارزفون در ارتفاع ۳۳۱ متر از سطح دریا رویش دارند، در حالی‌که رویشگاه گیاهان جمعیت الندان در ارتفاع ۱۳۵۰ متر بالاتر از سطح دریا می‌باشد. این تفاوت در موقعیت توپوگرافیکی رویشگاه می‌تواند یکی از دلایل این گوناگونی باشد. نوع و میزان ترکیبات اسانس جمعیت‌های ایرانی گیاه وج با یکدیگر و همچنین با نمونه‌های جمعیت‌های دیگر نقاط دنیا تفاوت دارند، که احتمالاً عوامل ژنتیکی و تغییر رویشگاه گیاه بر اساس ارتفاع از سطح دریا بر میزان و نوع ترکیبات شیمیایی گیاه مؤثر هستند (Gholipour *et al.*, 2015).

از طرف دیگر قلی‌پور (Gholipour, 2019) در مطالعه کروموزومی جمعیت‌های ایرانی گونه *A. calamus*، تفاوت کروموزومی بین جمعیت‌های ایرانی و همچنین بین نمونه ایران با هند را گزارش نمود.

بر اساس نتایج این پژوهش بیشترین میزان تشابه با ضریب ۰/۶۳ بین نمونه طبیعی جمعیت الندان با نمونه باززایی شده این جمعیت مشاهده شد؛ در حالی‌که کمترین میزان تشابه، با ضریب ۰/٤٤ بین نمونه طبیعی و باززایی شده جمعیت پلسک مشاهده گردید (جدول ٤). ضرایب تشابه بالا بین نمونه‌های طبیعی و نمونه‌های حاصل از کشت‌بافت جمعیت الندان بیانگر تنوع ژنتیکی پائین بین آن‌ها است. در مجموع در بین جمعیت‌های مورد مطالعه کمترین میزان واگرایی ژنتیکی بین نمونه‌های طبیعی و باززایی شده الندان مشاهده شد، بنابراین این جمعیت برای اهلی‌سازی و پرورش در ایران می‌تواند مناسب باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران ایران (Iran National Science Foundation: INSF) و دانشگاه پیام نور طی اعتبار پژوهشی شماره ۹۶۰۰۳۵۱۹ انجام شد.

References

Abdul Kareem, V.K., Rajasekharan P.E., Ravish B.S., Mini S., Sane A. and Vasantha Kumar, T. (2012). Analysis of genetic diversity in *Acorus calamus* populations in South and North East India using ISSR markers. *Biochemical Systematics Ecology*, **40:** 156-161.

Ahlawat, A., Katoch M., Ram G. and Ahuja, A. (2010). Genetic diversity in *Acorus calamus* L. as revealed by RAPD markers and its relationship with ß-asarone content and ploidy level. *Scientia Horticulturae* **124:** 294-297.

Ahmed, M.B., Ahmed, S., Salahin, M., Sultana, R., Khatun, M., Razvy, M.A., Hannan, M.M., Islam, R., and Hossain, M.M. (2007). Standardization of a suitable protocol for in vitro clonal propagation of *Acorus calamus* L. an important medicinal plant in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research* **2(2):** 136-140.

Anu, A., Babu, K.N., John, C.Z. and Peter, K.V. (2001). In vitro clonal multiplication of *Acorus calamus*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **10:** 53-55.

Amiri, P., Ismaili, A. and Hadian, H. (2017). Evaluation of genetic diversity of styrian pumpkin (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) populations, using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **4(2):** 17-28.

Babar, P.S., Deshmukh, A.V., Salunkhe S.S., and Chavan, J.J. (2020). Micropropagation, polyphenol content and biological properties of Sweet Flag (*Acorus calamus*): a potent medicinal and aromatic herb. *Vegetos*, **33:** 296–303.

Bhagat, N. (2011). Conservation of endangered medicinal plant (*Acorus calamus*) through plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy*, **2(1):** 21-24.

Devi, N.S., Kishor, R. and Sharma, G.J. (2018). RAPD and ISSR molecular marker variations in *Acorus calamus* Linn. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, **5(1):** 651-658.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19:** 11-15.

Dwevdi, K.K. and Gaibriyal, M. (2009). Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Asian Journal of Agriculture Science*, **1(1):** 7-8.

Gholipour, A. and Sonboli, A. (2013). Rediscovery of *Acorus calamus* (Acoraceae) in Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, **5(15):** 113-116 (In Persian).

Gholipour, A., Sonboli, A. and Golshahi, M. (2015). Comparative study of essential oil composition of the aerial parts of three populations of *Acorus calamus* in Iran. *Journal of Medicinal Plants*, **4(56):** 87-94 (In Persian).

Gholipour, A. (2019). Chromosome number variation in Iranian populations of *Acorus calamus*. *Journal of Genetic Resources*, **5(1):** 17-21.

Ginwal, H.S. and Mittal, N. (2010). An efficient genomic DNA isolation protocol for RAPD and SSR analysis in *Acorus calamus* L. *Indian Journal of Biotechnology*, **9:** 213-216.

Ginwal, H.S., Mittal, N., Tomar, A. and Varshney, V.K. (2011). Population genetic structure and diversity of high value vulnerable medicinal plant *Acorus calamus* in India using RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Journal of Forestry Research*, **22(3):** 367-377.

Kasture, A., Krishnamurthy, R. and Rajkumar, K. (2016). Genetic variation in the endangered Indian sweet flag (*Acorus calamus* L.) estimated using ISSR and RAPD markers. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, **3(3):** 112-119.

Kumar, A., Kumar, P., Kumar, V. and Kumar, M. (2014). Traditional uses of wetland medicinal plant *Acorus calamus*: review and perspectives. *International Referred Online Research Journal*, **2(5):** 37-67.

Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56(2):** 277-292.

Liao, L.C. and Hsiao, J.Y. (1998). Relationship between population genetic structure and riparian habitat as revealed by RAPD analysis of the rheophyte *Acorus gramineus* Soland. (Araceae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, **7(10):** 1275-1281.

Motley, T.J. (1994). The ethnobotany of sweet flag, *Acorus calamus* (Araceae). *Economic Botany*, **48:** 397-412.

Mozaffarian, V. (2013). *Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran*. Farhange Moaser, Tehran, IR (In Persian).

Noormohammadi, Z., Kangarlo-Haghighi, B., Sheidai, M., Farahani, F. and Ghasemzadeh-Baraki, S. (2014). Genetic stability versus somaclonal variation in tissue culture regenerated olive plants (*Olea europea* cv. Kroneiki). *European Journal of Experimental Biology*, **4(3):**135-142.

Pai, A. (2005). The population ecology of a perennial clonal herb *Acorus calamus* L. (Acoraceae) in South East Ohio. Ph.D. Thesis, Ohio University, Ohio, USA.

Rana, T.S., Mahar, K.S., Pandey, M.M., Srivastava. S.K. and Rawat, A.K.S. (2013). Molecular and chemical profiling of 'sweet flag' (*Acorus calamus* L.) germplasm from India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **19(2):** 231-237.

Sandhyarani, N., Kishor, R., and Sharma, G.J. (2011). Clonal propagation of triploid *Acorus calamus* Linn. using dual-phase culture system. *Journal of Crop Science and Biotechnology* **14(3):** 213-217.

Schaal, B.A., Leverich, W.J. and Rogstad, S.H. (1991). Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: Falk, D.A. and Holsinger, K.E., Eds., *Genetics and Conservation of Rare Plants*. pp. 123-134. Oxford University Press, New York, USA.

Tahani, L., Koohi Dehkordi, M. and Dehghanzadeh, H. (2019). Evaluation of genetic diversity among cultivated matricaria chamomilla populations in Iran using SCoT markers. *Plant Genetic Researches*, **6(1):** 87-98.

Tahir, N.A.R. and Karim, H.F.H. (2011). Determination of genetic relationship among some varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Sulaimani by RAPD and ISSR markers. *Jordan Journal of Biological Sciences*, **4:** 77-86.

Verma, S. and Singh, N. (2012). In vitro Mass multiplication of *Acorus calamus* L. - an endangered medicinal plant. *Amerian-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, **12(11):** 1514-1521.

Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. (1999). *POPGENE 3.2, User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, CA.

Zheleva, D., Todorovska, E., Chirstov, N., Ivanov, P., Ivanov, I. and Todorov, I. (2007). Assessing the genetic variation in Bulgarian bred wheat varieties by biochemical and moleculars. *Biotechnology and Biotechnologcal Equipment*, **21(3):** 311-321.

Study of Genetic Diversity of Wild and Regenerated Accessions of *Acorus calamus* (Acoraceae) by ISSR Markers

Abbas Gholipour[1,*], Seyed Kamal Kazemitabar[2] and Sara Sharifi Soltani[3]

1-Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran
2-Associated Professor, Department of Plant Breeding and Research Institute of Medicinal Plants Biotechnology (RIMPBio), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3- Ph.D. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: May 23, 2020 – Accepted: February 10, 2021)

Abstract

Sweet flag (*Acorus calamus*) is a perennial, semi-aquatic and aromatic plant of the family Acoraceae that, in addition to its multiple medicinal properties, is used in health, food and agricultural industries (as pest control). This research was conducted to comparasion study of genetic diversity of natural and regenerated plants from tissue culture of Arzefon, Pelesk and Alandan populations of Sweet flag by using ISSR molecular markers. Out of 15 screened primers, 9 primers produced the most polymorphic bands. Totally, these primers generated 83 bands, of which 52 bands (62.65%) were polymorphic. The percentage of polymorphic locus for natural and regenerated plants was 43.37% and 55.42%, respectively, and Nei's genetic diversity (H) was calculated to be 0.239 for the two studied groups. The Shannon's index (I) for natural and regenerated plants was estimated to be 0.251 ± 0.033 and 0.299 ± 0.031, respectively. Among the natural and regenerated groups, the highest genetic similarity was observed between the samples of Alandan population (0.63), and the lowest value was observed between the samples of Pelesk population (0.44). Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 94 % of genetic variation attributed to whithin groups and 6 % to between groups. Based on the results, the genetic diversity of the regenerated plants was higher than the natural plants. According to the results of the present research, the lowest rate of genetic divergence was observed between natural and regenerated plants of Alandan populatiuon, so the plants of this population could be suitable for domestication and cultivation in Iran.

Keywords: Domestication, Genetic similarity, Nei's genetic diversity, Medicinal plant, *Acorus calamus*

* **Corresponding Author, E-mail: a.gholipour@pnu.ac.ir**