



DNA barcoding and biosystematics study of *Vitex agnus-castus* L. in Golestan province

Fahimeh Niazpoor Gonbadi¹, Ali Sattarian², Abolfazl Daneshvar² and Elham Amini^{3*}

1- M.Sc. graduated, Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

4*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

E-mail: Elham_amin1494@yahoo.com

Received: January 2024

Revised: April 2024

Accepted: July 2024

Abstract

Background and objectives: As a member of the Lamiaceae family native to Europe, Asia, and North Africa, *Vitex agnus-castus* is a popular medicinal plant. Despite much research, it is always essential to verify the safety of this valuable species, as it is among the world's best-selling plants. Several species in the genus *Vitex* do not exhibit recognizable morphologies, confusing their identification. The medicinal use of *V. agnus-castus* differs from that of other species. For effective pharmaceutical performance, the identification of this species is essential. This study used morphological, micromorphological, and molecular approaches to identify this medicinal plant.

Methodology: A total of 17 populations of the target species were investigated in Maraveh Tappeh, a city in the Golestan province located in the eastern region. Pollen samples were collected directly from the natural habitat of the target area. After acetolysis, 30-40 pollen grains were photographed from the polar and equatorial views with a light microscope and 40 and 100 magnification and with the help of a Canon digital camera. In order to study the seed morphology, fully ripe fruits were collected from each studied population during the fruiting season. Twenty seeds from each population were kept for photography with light microscopy and Scanning electron microscopy (SEM). Electron micrographs were prepared from suitable seeds and pollen at the Razi Metallurgical Research Center (RMRC) using an SEM electron microscope. Leaf cells from herbarium samples were extracted from DNA using a DNA extraction kit. Plastid trnL-trnF sequences and nrDNA ITS region sequences were used as barcodes. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in 20 microliters with desired primers and a specific temperature program in a thermocycler. After performing the polymerase chain reaction, in order to ensure the amplification of fragments, the final product was electrophoresed. Strong single bands were sent to Codon Genetics Company in Tehran for sequencing.

Results: Pollen grains of all species are small (12-28 micrometers). According to Ertman's classification, Ghazan ghayeh pollen grains are prolate spheroidal (elongated spherical), and Ghoshe Tappeh pollen grains are subprolate (semi-elongated). All pollen grains are tricolporate. Ghazan ghayeh ornamentation is micro-perforated, while Ghoshe Tappeh ornamentations are reticulated-micro-perforated. With an average length of 3.84 mm and width of 1.52 mm, Ghazan ghayeh seeds are the largest. They are all almond-shaped, but in the Ghazan Ghayeh



population, the outer surface of the seed is hollow; in the Ghoshe Tappeh population, the surface is wrinkled and striated. The *trnL-trnF* gene locus was found to have a multiplication success rate of 85% in the examined plants. There were 516 nucleotides in the amplified fragment in this species. For final registration, the sequence was sent to the GenBank. A 675 nucleotide fragment amplified from this species' ITS marker was sequenced, and the chromatograms were compared with the NCBI database. The gene bank has been notified of the sequence determination. The results showed the highest similarity (98%) with *the Vitex agnus-castus* species reported from America.

Conclusion: Local herbal medicines are gaining popularity in different countries and play a significant role in treating diseases today. In order to make medicinal plants more accessible, we need to pay more attention to trust, marketing, and consumption. Barcoding and molecular approaches serve this purpose effectively. To compare plant samples available on the market with natural medicinal plants using DNA barcoding of correctly identified medicinal species. Hence, the sequences used in this study are essential for barcoding *Vitex agnus-castus*. The medicinal species has been correctly identified and can be used as a standard for evaluating the plants available on the market.

Keywords: ITS nuclear barcode, *trnL-trnF* chloroplast barcode, Seed, pollen, *Vitex*.

بارکد گذاری DNA و مطالعه بیوسیستماتیک گیاه دارویی پنج انگشت (*Vitex agnus-castus* L.) در استان گلستان

فهیمة نیازپور گنبدی^۱، علی ستاریان^۲، ابوالفضل دانشور^۳ و الهام امینی^{۴*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاوس، گنبدکاوس، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاوس، گنبدکاوس، ایران

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاوس، گنبدکاوس، ایران

۴- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاوس، گنبدکاوس، ایران

پست الکترونیک: Elham_aminii1494@yahoo.com

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۲

چکیده

سابقه و هدف: گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus-castus*) یک گیاه دارویی محبوب متعلق به تیره Lamiaceae، بومی مدیترانه و پراکنده در اروپا، آسیا و شمال آفریقا است. این گیاه جزو پر فروش ترین گیاهان دارویی در جهان است؛ با وجود تحقیقات زیاد، همواره بررسی این گونه با ارزش حائز اهمیت است. چندین گونه که در حال حاضر در سرده *Vitex* شناخته شده اند، مورفولوژی قابل تشخیصی از خود نشان نمی دهند که منجر به سردرگمی در شناسایی آنها می شود. از آنجا که کاربرد دارویی *V. agnus-castus* با سایر گونه ها متفاوت است، بنابراین، شناسایی مناسب این گونه برای عملکرد دارویی مؤثر ضروریست. در این مطالعه از رویکردهای کلی در شناسایی این گیاه دارویی از جمله تکنیک های مورفولوژیکی و میکرومورفولوژی و مولکولی استفاده شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۱۷ جمعیت از گونه مورد نظر در شهرستان مراوه تپه واقع در ناحیه شرقی استان گلستان بررسی شد. نمونه های گرده به طور مستقیم از رویشگاه طبیعی منطقه مورد نظر جمع آوری گردید. پس از استفاده از روش استولیز، از ۳۰-۴۰ دانه گرده از نماهای قطبی و استوایی با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ و با کمک دوربین دیجیتال عکس برداری انجام شد. برای مطالعه ریخت شناسی دانه، میوه های کاملاً رسیده از هر یک از جمعیت های مورد مطالعه در فصل میوه دهی جمع آوری شد. از هر جمعیت ۲۰ دانه برای عکس برداری با لوپ و میکروسکوپ الکترونی نگه داری شد. میکروگراف های الکترونی از دانه ها و گرده های مناسب در مرکز متالورژی رازی تهران توسط میکروسکوپ الکترونی SEM تهیه شد. استخراج DNA از سلول های برگ نمونه های هر بار بومی با استفاده از کیت گیاهی انجام گردید. از توالی ناحیه nrDNA ITS ژنوم هسته ای و *trnL-trnF* کلروپلاستی به عنوان بارکد استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با آغازگرهای مورد نظر و برنامه دمایی مشخص در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز، به منظور حصول اطمینان از تکثیر قطعات، محصول نهایی الکتروفورز شد. تک باندهای قوی برای تعیین توالی به شرکت ژنتیک کدون در تهران ارسال گردید. توالی های کروماتیدی حاصل، با اطلاعات موجود در بانک ژنی سایت NCBI تطبیق داده شدند و میزان شباهت گونه ها بررسی شد.

نتایج: دانه های گرده تمام گونه ها از لحاظ اندازه کوچک (۲۸-۱۲ میکرومتر) می باشند. شکل دانه گرده طبق طبقه بندی ارتمن در جمعیت های قازان قایه به شکل Prolate spheroidal (کروی کشیده) و در جمعیت های قوشه تپه از نوع Subprolate (نیمه کشیده) هستند. تمام دانه های گرده دارای سه شیار می باشند. تزیینات آگزین از نوع ریزمنفذدار در جمعیت قازان قایه و شبکه ای ریزمنفذدار در جمعیت قوشه تپه هستند. بزرگترین دانه ها مربوط به جمعیت قازان قایه با میانگین طول ۳/۸۴ میلی متر و عرض ۱/۵۲ میلی متر می باشد. از نظر شکل همه بادامی شکل هستند اما تزیینات سطح خارجی دانه در جمعیت قازان قایه حفره دار است؛ ولی در جمعیت های قوشه تپه سطح دانه چروکیده و مخطط است. میزان موفقیت تکثیر در مکان ژنی *trnL-trnF* در نمونه های گیاهی مورد بررسی ۸۵٪ محاسبه شد. طول قطعه تکثیر شده در این گونه ۵۱۶ نوکلئوتید بود. توالی آن به بانک ژن به منظور ثبت نهایی ارسال شد. طول قطعه

تکثیر شده در این گونه با استفاده از نشانگر ITS ۶۷۵ نوکلئوتید توالی‌یابی شد و کروماتوگرام‌های حاصل، با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI) تطبیق داده شدند.

نتیجه‌گیری: امروزه داروهای گیاهی محلی در کشورهای مختلف نقش سازنده‌ای در درمان بیماری‌ها دارند. از این رو بازاریابی حقیقی و مصرف گیاهان دارویی توجه بیشتری می‌طلبد. بارکدینگ این هدف را به درستی محقق می‌کند. به طوری که بارکدگذاری DNA گونه‌های دارویی که صحیح شناسایی شده‌اند، می‌توانند به‌عنوان یک استاندارد برای مقایسه نمونه‌های گیاهی موجود در بازار با گیاهان دارویی حقیقی استفاده شوند. بنابراین توالی‌های به‌کاررفته این تحقیق برای بارکدگذاری گیاه دارویی پنج‌انگشت مهم است. این گونه دارویی به‌درستی شناسایی شده است و می‌تواند به‌عنوان استاندارد برای ارزیابی گیاهان موجود در بازار استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بارکد هسته‌ای ITS، بارکد کلروپلاستی *trnL-trnF*، دانه، گرده، *Vitex*.

مقدمه

گیاهان دارویی قرن‌هاست که به‌دلیل سهولت استفاده و مقرون به‌صرفه بودن در مقایسه با داروهای شیمیایی سنتز شده، به‌عنوان ابزار ارزشمندی در مدیریت بیماری‌های مختلف در سراسر جهان استفاده می‌شود (Nigam et al., 2018). گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus-castus* L.) به‌عنوان یکی از گیاهان بومی ایران، متعلق به تیره Lamiaceae با پراکنش در مدیترانه، اروپا، آسیا و شمال آفریقا (Rani & Sharma, 2013). این گیاه با فرم زیستی درختچه‌ای به رنگ خاکستری، آرایش برگ از نوع مرکب پنجه‌ای، رنگ گل‌ها آبی متمایل به بنفش با آرایش گل خوشه‌گزن است و میوه آن نیز کروی بوده و از نوع سته نیمه‌خشک و دارای قسمت درون‌بر سفت می‌باشد. در فلور ایران (Ghahreman, 2003) ذکر گردیده‌است که گیاه مورد مطالعه جزء گیاهان بومی ایران بوده و دارای پراکنش در استان‌های خراسان، گلستان و البرز است.

این یک گیاه مشهور در سطح جهانی است و با نام‌های مختلف شناخته می‌شود، به‌عنوان مثال، Fruit de gattilier (فرانسوی)، Sauzgatillo (اسپانیایی)، Mönchspfefferfrüchte (آلمانی)، پنج‌انگشت (فارسی) و Frutto di Agnocasto (ایتالیایی). گیاه پنج‌انگشت به دلیل دارا بودن خاصیت کاهش‌دهنده میل جنسی در زنان، به نام‌های مختلفی مانند درخت عفت و فلفل کاهن نیز شهرت یافته است (Daniele et al., 2005; Newall et al., 1996).

برگ‌ها و ساقه درخت پنج‌انگشت همراه با گل‌ها و دانه‌های رسیده، برای اهداف دارویی جایگزین استفاده

می‌شوند. اعتقاد بر این است که میوه‌های این درخت، دارای یک ترکیب مقوی برای سیستم‌های تولیدمثلی هستند. برگ‌ها نیز تأثیر مشابهی دارند، اما در درجه کمتری قرار دارند (Blumenthal, 2000). میوه‌های *Vitex agnus-castus* سنتی به‌عنوان غذا برای افزایش حجم شیر، درمان نفخ و اسهال و درد سینه، یائسگی، آکنه، ناباروری و اختلالات قاعدگی استفاده می‌شده است (Girman, et al., 2003). آژانس دارویی اروپا و کمیسیون بهداشت آلمان موارد زیادی از جمله تنظیم چرخه قاعدگی و درمان سندرم پیش از قاعدگی را برای استفاده دارویی این گیاه گزارش کرده‌اند (Gilman, 1994). در مورد ظرفیت‌های مختلف مفید این گیاه برای ارتقای سلامت، داده‌های بسیاری گزارش شده است. از جمله آنتی‌اکسیدان، تعدیل‌کننده ایمنی، سیتوتوکسیک، ضد جهش‌زا، ضد میکروبی، ضد قارچ، ضد درد، ضد صرع و ضد التهاب (Mari et al., 2015; Chan et al., 2018; Nigam et al., 2018).

گیاه‌شناسان در مطالعات رده‌بندی گیاهان، درباره اهمیت ریخت‌شناسی این گیاه مطالعاتی را انجام داده‌اند. به‌عنوان مثال، به پوشش خارجی بذر (درون‌بر) گونه‌های گیاهی، در سطح گونه و سرده (جنس)، تأکید فراوانی دارند (Salmaki et al., 2008).

در برخی موارد وجود نام‌های گیاه‌شناسی متفاوت در مورد یک گیاه، همچنین گاهی شباهت ظاهری بین گونه‌ها، در نواحی مختلف جهان، مشکل‌ساز می‌باشد (Chen et al., 2010). روش بارکدگذاری DNA روشی ساده برای شناسایی گونه‌ها با استفاده از یک توالی کوتاه ژنتیکی است (Guo et al.,

castus) را در غرب مدیترانه بررسی نمودند و گزارش کردند که خصوصیات خاک محل رشد این گیاه در غرب مدیترانه، لومی خنثی و کمی قلیایی، غیر شور، عاری از کربنات کلسیم و پتاسیم، دارای مواد آلی و غنی از فسفر و نیتروژن است. گیاه پنج‌انگشت نسبت به آب و هوای گرم و خشک سازگاری بالایی دارد و از نظر دارویی پراهمیت است. با توجه به اینکه تاکنون گزارشی در زمینه حضور، بیوسیستماتیکی و مولکولی از گیاه پنج‌انگشت در استان گلستان ارائه نشده است؛ این مطالعه به بررسی ریزریخت‌شناسی گرده، دانه و مولکولی این گیاه می‌پردازد. نتایج این مطالعه می‌تواند به‌عنوان یک مرجع مناسب برای آگاهی از خصوصیات ذکرشده گیاه پنج‌انگشت باشد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه دو روستای قازان‌قایه و قوشه‌تپه در شهرستان مراوه‌تپه واقع در ناحیه شرقی استان گلستان می‌باشد (شکل ۱). این شهرستان در شرقی‌ترین شهر شمال ایران در مرز ترکمنستان واقع شده است. آخرین امتداد رشته کوه البرز شرقی و جنگل‌های سرسبز و هیرکانی شمال ایران به ارتفاعات جنوب این شهر در منطقه‌ای به نام گلیداغ در این شهر ختم می‌شود. شهرستان مراوه‌تپه از شمال به کشور ترکمنستان، از شرق به شهرستان بجنورد استان خراسان شمالی، از جنوب به شهرستان کلاله و از غرب به شهرستان گنبد کاووس منتهی می‌شود. متوسط بارندگی ۳۳۰ میلی‌متر و میزان دمای متوسط سالانه در این مناطق برابر ۱۷/۱ درجه سانتی‌گراد، حداکثر آن در مردادماه (۴۷ درجه سانتی‌گراد) و حداقل آن در بهمن‌ماه (۷- درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. کمترین میزان تبخیر در دی‌ماه و بیشترین آن مربوط به مردادماه است که با توجه به ریزش اندک باران در تیرماه و تبخیر و تعرق زیاد، کاهش رطوبت در فصل تابستان محسوس می‌باشد؛ بنابراین می‌توان گفت که این مراتع دارای زمستان‌های معتدل و تابستان‌های گرم و طولانی می‌باشند. به منظور جمع‌آوری نمونه‌ها، ابتدا با مراجعه به منابع موجود از جمله فلور ایران تیره نعناعیان و

در این روش گونه‌ها با سرعت، دقت و هزینه پایینی، شناسایی و تفکیک می‌گردند. امروزه پیشرفت در علم بیوانفورماتیک سبب شده بارکدگذاری DNA به‌عنوان یک ابزار جدید برای مطالعه روابط تکاملی، شناسایی گونه‌های ناشناخته، بررسی تنوع زیستی و ترسیم درخت‌های خویشاوندی استفاده شود (Shneyer, 2009). تاکنون بارکدهای *trnH-psbA*، *rbcL* و ITS بیشترین کاربرد را در شناسایی گیاهان داشته‌اند (Chen *et al.*, 2010). فاصله‌دهنده رونویسی داخلی (ITS) یک نشانگر هسته‌ای است که تقسیم توالی بالایی را نشان می‌دهد و به‌سرعت در طیف وسیعی از گیاهان گل‌دهنده تکثیر می‌شود (Kress & Erickson, 2007).

تاکنون مطالعات مولکولی و بیوسیستماتیکی محدودی بر روی گیاه پنج‌انگشت انجام شده است که می‌توان به مطالعه Phoolcharoen و Sukrong (۲۰۱۳) اشاره کرد، در این مطالعه ژن *matK* و بارکد *psbA-trnH* توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل شدند تا پنج گونه مختلف *Vitex* را شناسایی کنند که در پزشکی استفاده می‌شوند. Sevindik و همکاران (۲۰۱۹) مطالعه تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD برای تعدادی از جمعیت‌های پنج‌انگشت را در ترکیه انجام دادند.

بیشتر مطالعات انجام‌شده متمرکز بر اثر ضد میکروبی، عصاره‌گیری و خواص دارویی *Vitex* بوده است (Saden-Krehula & Wollenweber & Mann, 1983؛ Kustrak, 1991). Souto و همکاران (۲۰۲۰)، گیاه پنج‌انگشت را جزو پر فروش‌ترین و پر مصرف‌ترین گیاهان دارویی در جهان معرفی کردند و بیان نمودند که با وجود تحقیقات زیاد روی انسان و حیوان، همواره بررسی این گونه با ارزش، حائز اهمیت است.

در یک پژوهش دیگر، Khoshshima و همکاران (۲۰۱۶) برخی از ویژگی‌های اکولوژیکی گونه پنج‌انگشت را در دو رویشگاه مهم آن در استان قم با نمونه‌برداری به روش تصادفی - سیستماتیک بررسی کردند. نتایج کلی نشان داد که مهمترین عوامل مؤثر در تشکیل رویشگاهی این گونه فسفر، ماسه و هدایت الکتریکی است. Dogan و Mert (۱۹۹۸) جنبه‌های آت‌اکولوژیک گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus-*)

(جدول ۱). این جمعیت‌ها از زیستگاه‌های مختلف جمع‌آوری و با کمک فلور ایران (Ghahreman, 2003) شناسایی گردید (شکل ۲). تمامی نمونه‌های مطالعه‌شده در هرباریوم دانشگاه گنبد کاووس (GKUH) نگهداری می‌شوند.

کتاب درختان و درختچه‌های ایران، پراکنش این گونه در استان گلستان ارزیابی شده است، سپس با پایش منطقه‌ای رویشگاه گیاه پنج‌انگشت مشخص گردید و بعد با توجه به شرایط دو رویشگاه، انتخاب و نمونه‌برداری انجام شده است. در این مطالعه، ۱۷ جمعیت از گونه مورد نظر بررسی شد



شکل ۱- موقعیت منطقه مورد مطالعه در استان گلستان

Figure 1. Region location studied in Golestan province

جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی جمعیت‌های مورد مطالعه پنج‌انگشت

Table 1. Geographical data of *Vitex agnus-castus* populations studied

No.	Location	Altitude (m)	Longitude and latitude	Voucher number*
1	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	342	43°53'51"-41°99'82"	803898
2	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	343	43°52'43"-41°99'93"	803899
3	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	340	43°55'08"-41°99'94"	803900
4	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	347	43°55'41"-41°99'50"	803901
5	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	352	43°48'62"-42°00'09"	803902
6	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	347	43°55'77"-41°99'68"	803903
7	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	346	43°54'34"-41°99'79"	803904
8	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	340	43°55'13"-41°99'47"	803905
9	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	352	43°48'68"-42°00'09"	803906
10	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghazan ghayeh	339	43°55'28"-41°99'81"	803907
11	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	296	43°44'00"-41°96'50"	803914
12	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	300	43°43'45"-41°96'49"	803915
13	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	303	43°43'57"-41°96'49"	803916
14	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	306	43°43'94"-41°96'48"	803917
15	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	307	43°44'11"-41°96'43"	803918
16	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	305	43°43'94"-41°96'46"	803919
17	Golestan.Mareveh Tappeh. Ghoshe Tappeh	309	43°43'94"-41°96'46"	803920

*: GKUH (Gonbad Kavous University Herbarium)



شکل ۲- جمع‌آوری نمونه‌های گیاه پنج‌انگشت در استان گلستان

Figure 2. *Vitex agnus-castus* samples collecting in Golestan province

شد. برای تعیین اندازه و شکل گرده از طبقه‌بندی ارتمن (Erdtman, 1943) و برای واژه‌شناسی از سایت معتبر گرده‌شناسی PalDat (paldat.org) استفاده گردید.

مطالعات مولکولی

در این پژوهش از توالی ناحیه nrDNA ITS ژنوم هسته‌ای و *trnL-trnF* کلروپلاستی به‌عنوان بارکد استفاده گردید (جدول ۲). روش استخراج بر مبنای روش کیت استخراج DNA گیاهی شرکت تیان ژن چین (TIANGEN) است. به منظور تعیین کمیّت و کیفیت DNA از دستگاه نانودراپ مدل ND-One-C-W استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر و برنامه دمایی واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه؛ ۳۲ چرخه واکنش PCR (واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، بسط اولیه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه) و در پایان بسط نهایی

مطالعات ریزریخت‌شناسی دانه و گرده

برای مطالعه دانه گرده، نمونه‌های گرده به‌طور مستقیم از رویشگاه طبیعی منطقه مورد نظر جمع‌آوری گردید. پس از استفاده از روش استولیز (Erdtman, 1943)، از ۳۰-۴۰ دانه گرده از نماهای قطبی و استوایی با میکروسکوپ نوری VANOX AHBS3 و با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ و با کمک دوربین دیجیتال Canon (مدل ۶۳a و ۸ مگاپیکسل) عکس‌برداری انجام شد. برای مطالعه ریخت‌شناسی دانه، میوه‌های کاملاً رسیده از هر یک از جمعیت‌های مورد مطالعه در فصل میوه‌دهی جمع‌آوری شد. از هر جمعیت ۲۰ دانه برای عکس‌برداری با لوپ و میکروسکوپ الکترونی نگهداری شد. از دانه‌ها و گرده‌های مناسب در مرکز متالورژی رازی تهران توسط میکروسکوپ الکترونی SEM مدل VEGA// TESCAN-LMU تحت ولتاژ 15 KV و 22KV، میکروگراف‌های الکترونی تهیه شد. اندازه‌گیری‌های مربوط به صفات طول محور قطبی (P)، طول محور استوایی (E)، نسبت P/E، ضخامت و نوع تزئینات اگزین دانه‌گرده توسط نرم‌افزار Image tools نسخه ۳ و Axio vision با نسخه ۴/۳ انجام

قطبی دایره‌ای شکل می‌باشند. میانگین طول محور قطبی در جمعیت قازان‌قايه، ۱۷/۹۲ میکرومتر و طول محور استوایی ۱۳/۸۰ میکرومتر اندازه‌گیری شده است. در جمعیت‌های قوشه‌تپه، میانگین طول محور قطبی ۱۹/۸۰ میکرومتر و طول محور استوایی ۱۴/۳۷ میکرومتر است. اندازه دانه گرده قازان‌قايه نسبت به گرده قوشه‌تپه کوچکتر می‌باشد. نسبت طول محور قطبی به طول محور استوایی (P/E) در اندازه‌گیری میکروگراف‌ها در جمعیت قازان‌قايه برابر ۱/۲۴ است؛ بنابراین شکل دانه گرده طبق طبقه‌بندی ارتمن (Erdtman, 1943) در این گونه به شکل Prolate spheroidal (کروی کشیده) می‌باشد. نسبت P/E در جمعیت‌های قوشه‌تپه نیز ۱/۳۳ است. با توجه به این نسبت‌ها شکل گرده در جمعیت‌های قوشه‌تپه از نوع Subprolate (نیمه‌کشیده) می‌باشد (جدول ۳). تمام دانه‌های گرده در جمعیت‌های مختلف دارای سه شیار یا Tricolpate می‌باشد. طول شیار در جمعیت قازان‌قايه ۱۶/۶۸ میکرومتر است که نسبت به جمعیت‌های قوشه‌تپه کمتر می‌باشد. فاصله بین شیارها (Distance of colpi) در جمعیت قازان‌قايه، ۷/۹۸ میکرومتر و در جمعیت‌های قوشه‌تپه ۸/۲۵ میکرومتر است. تزئینات اگرین از نوع ریزمنفذدار در جمعیت قازان‌قايه و شبکه‌ای - ریزمنفذدار در جمعیت قوشه‌تپه می‌باشد (شکل ۳).

در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، با آغازگرهای مورد نظر و دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany; Astec, Japan) دارای ۹۶ چاهک انجام شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، به منظور حصول اطمینان از تکثیر قطعات، محصول نهایی الکتروفورز شد. تک باندهای قوی توسط شرکت ژنتیک کدون تعیین توالی گردید. توالی‌های حاصل از تعیین توالی با کمک نرم‌افزار Finch TV 1.4 بررسی شده و به صورت قالب FASTA درآمدند. توالی‌های کروماتیدی حاصل، با اطلاعات موجود در بانک ژنی سایت NCBI تطبیق داده شدند و میزان شباهت گونه‌ها بررسی شد. با استفاده از فاصله p-distance، روش Neighbor joining و Bootstrapping ۱۰۰۰ بار مربوط به نمونه‌های مورد بررسی در بارکدها توسط نرم‌افزار MEGA 7 (Tamura et al., 2011) درخت خویشاوندی ترسیم گردید. در این نرم‌افزار کلیه پارامترهای لازم برای مقایسه توالی‌ها اندازه‌گیری شد.

نتایج

مطالعات گرده‌شناسی

نتایج اندازه‌گیری دانه‌های گرده SEM نشان داده که تمام گونه‌ها از لحاظ اندازه کوچک (۲۸-۱۲ میکرومتر) هستند. از نظر شکل معمولاً از دید استوایی به شکل بیضوی و از دید

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز

Table 2. Sequence of primers used for polymerase chain reactions

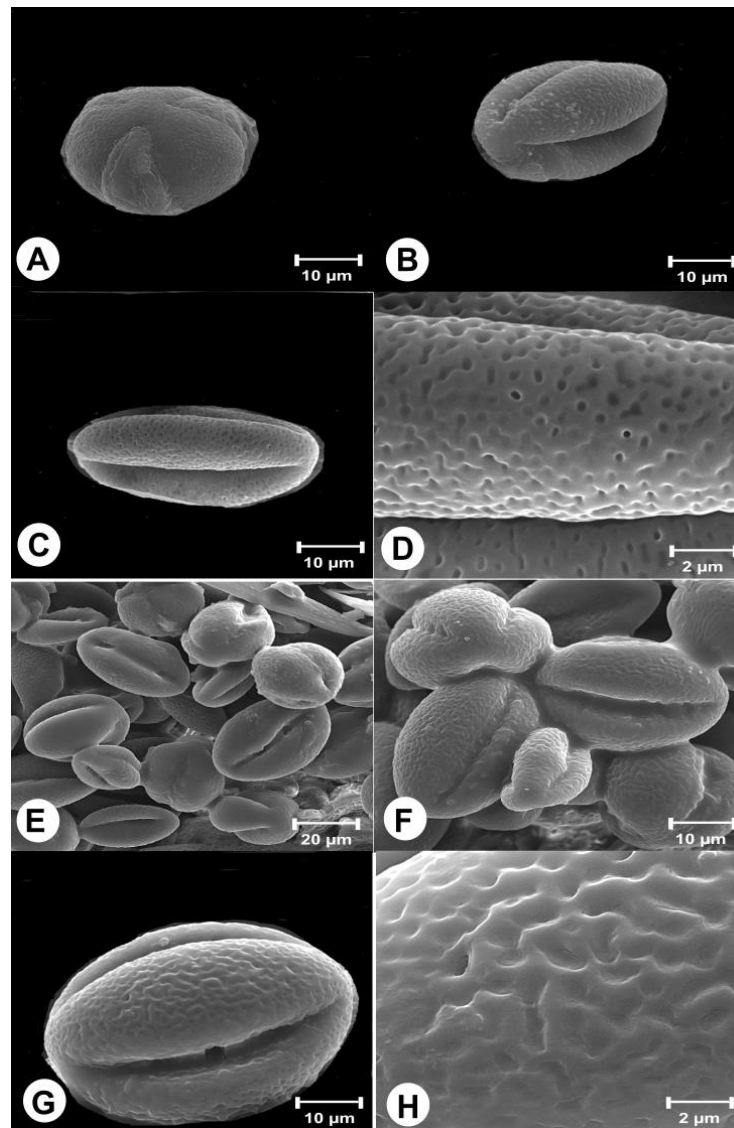
Primer	Direction	Sequence
ITS5m	Forward	5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'
ITS4	Reverse	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
trnLe	Forward	5'-GGTCAAGTCCCTCTATCCC-3'
trnFf	Reverse	5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

جدول ۳- صفات اندازه‌گیری شده دانه گرده جمعیت‌های مختلف پنج‌انگشت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

Table 3. Pollen traits of different *Vitex agnus-castus* populations measured by scanning electron microscopy

Population	Px (μm)	Ex (μm)	P/E	Length of colpi (μm)	Distance of colpi (μm)	Exin (μm)	Ornamentation
Ghazan ghayeh	17.31	13.95	1.24	16.68	7.98	2.51	micro-perforated
Ghoshe Tappeh	19.80	14.37	1.33	21.17	8.25	2.81	reticulated-micro-perforated

P: Polar axis, E: Equatorial axis, and P/E: ratio of polar axis to equatorial axis.



شکل ۳- تصاویر گرده گیاه پنج‌انگشت توسط میکروسکوپ الکترونی در جمعیت‌های قازان‌قایه (A, B, C, and D) و قوشه‌تپه (E, F, G, and H) از دید قطبی و استوایی با بزرگ‌نمایی‌های ۱۰ و ۲ میکرون

Figure 3. *Vitex agnus-castus* pollen images by scanning electron microscopy in Ghazan ghayeh (A, B, C, and D) and Ghoshe Tappeh (E, F, G, and H) populations from polar and equatorial views with 10 and 2 micron magnifications

مطالعات ریزریخت‌شناسی دانه مطالعه دانه نشان داد که بزرگترین دانه‌ها مربوط به جمعیت قازان‌قایه با میانگین طول ۳/۸۴ میلی‌متر و عرض ۱/۵۲ میلی‌متر می‌باشند. جمعیت‌های قوشه‌تپه دارای طول حدود ۲/۷۰ میلی‌متر و عرض ۱/۳۰ میلی‌متر هستند (جدول ۴). از نظر شکل همه بادامی‌شکل می‌باشند و بین جمعیت‌ها تفاوت وجود ندارد اما تزئینات سطح خارجی دانه بین جمعیت‌های متفاوت است. در جمعیت قازان‌قایه سطح دانه حفره‌دار است؛ ولی در جمعیت‌های قوشه‌تپه سطح دانه چروکیده و مخطط است. بنابراین دانه‌های جمعیت‌های مورد بررسی از لحاظ اندازه و تزئینات سطح خارجی از یکدیگر متمایز هستند (شکل ۴).

مطالعات ریزریخت‌شناسی دانه مطالعه دانه نشان داد که بزرگترین دانه‌ها مربوط به جمعیت قازان‌قایه با میانگین طول ۳/۸۴ میلی‌متر و عرض ۱/۵۲ میلی‌متر می‌باشند. جمعیت‌های قوشه‌تپه دارای طول حدود ۲/۷۰ میلی‌متر و عرض ۱/۳۰ میلی‌متر هستند (جدول ۴). از نظر شکل همه بادامی‌شکل می‌باشند و بین

جدول ۴- صفات اندازه گیری شده دانه جمعیت های مختلف پنج انگشت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

Table 4. Seed traits of different *Vitex agnus-castus* populations measured by scanning electron microscopy

Population	Length (mm)	Width (mm)	Length/ Width	Shape	Ornamentation
Ghazan ghayeh	3.84	1.52	2.52	almond	hollow
Ghoshe Tappeh	2.70	1.30	2.07	almond	wrinkled

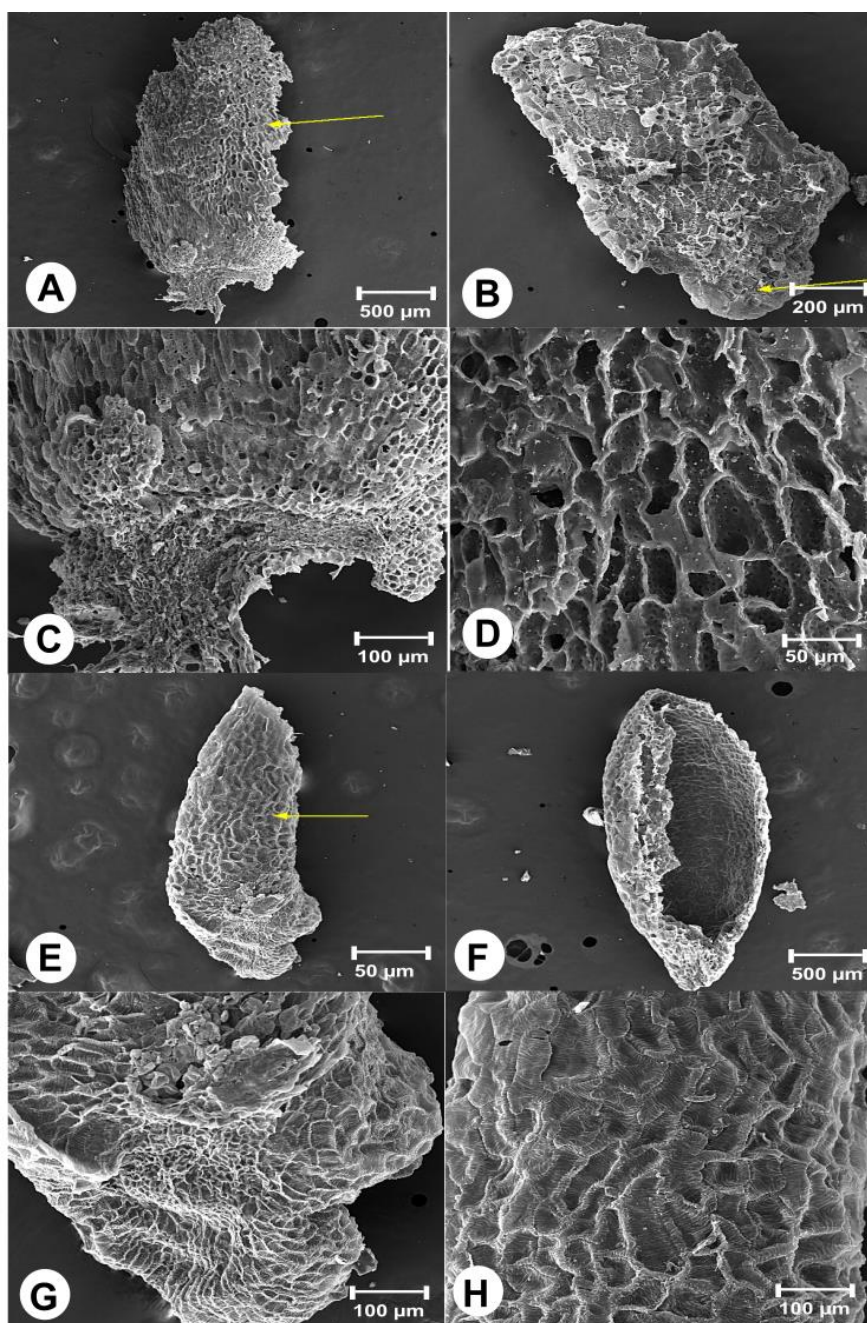
مطالعات مولکولی

بارکد *trnL-trnF*

میزان موفقیت تکثیر در مکان ژنی *trnL-trnF* در نمونه های گیاهی مورد بررسی ۸۵٪ محاسبه شد. طول قطعه تکثیر شده در این گونه ۵۱۶ نوکلئوتید بود. توالی آن به بانک اطلاعاتی (NCBI) به منظور ثبت نهایی ارسال گردید.

اطلاعات مربوط به توالی های استفاده شده از بانک اطلاعاتی (NCBI) در جدول ۵ ارائه شده است. نتایج هم ردیفی (BLASTn) توالی *trnL-trnF* نمونه های مورد بررسی را به گیاهان همان گونه نسبت داد. در درخت

خویشاوندی براساس این بارکد، گونه های مربوط به این جنس به درستی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۵). تنوع درون گروهی (میزان شباهت توالی *trnL-trnF* گونه مورد مطالعه با گونه های هم جنس خود موجود در سایت NCBI) ۸۹٪ محاسبه شد. تعداد جایگاه های متغیر (SNP) با استفاده از این توالی در این گیاه ۸ عدد شمارش شد. بنابراین می توان از این بارکد برای شناسایی نمونه های گیاهی استفاده کرد. در واقع این بارکد با مزیت میزان جایگزینی بالا برای تمایز گونه های نزدیک کارایی بالایی دارد.



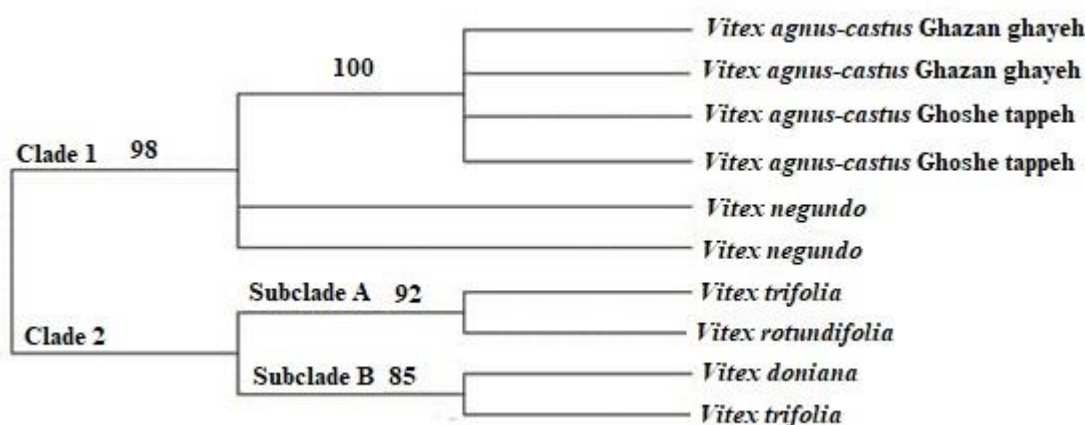
شکل ۴- تصاویر دانه گیاه پنج‌انگشت توسط میکروسکوپ الکترونی در جمعیت‌های قازان‌قایه (A, B, C, and D) و قوشه‌تپه (E, F, G,)

(and H) از دید قطبی و استوایی با بزرگ‌نمایی‌های ۱۰ و ۲ میکرون

Figure 4. *Vitex agnus-castus* pollen images by scanning electron microscopy in Ghazan ghayeh (A, B, C, and D) and Ghoshe Tappeh (E, F, G, and H) populations from polar and equatorial views with 10 and 2 micron magnifications

جدول ۵- اطلاعات توالی‌های بانک اطلاعاتی (NCBI) مربوط به *Vitex* spp.
Table 5. Database sequence information (NCBI) on *Vitex* spp.

Species	Accession number	Barcode
<i>Vitex rotundifolia</i>	MG822403.1	ITS
<i>Vitex lucens</i>	DQ499150.1	ITS
<i>Vitex cofassus</i>	DQ499149	ITS
<i>Vitex negundo</i>	MT227710	ITS
<i>Vitex negundo</i>	DQ304787.1	<i>trnL-trnF</i>
<i>Vitex negundo</i>	DQ304786.1	<i>trnL-trnF</i>
<i>Vitex trifolia</i>	MK797715.1	<i>trnL-trnF</i>
<i>Vitex rotundifolia</i>	OK064552.1	<i>trnL-trnF</i>
<i>Vitex doniana</i>	MK187249.1	<i>trnL-trnF</i>
<i>Vitex trifolia</i>	AJ505539.1	<i>trnL-trnF</i>



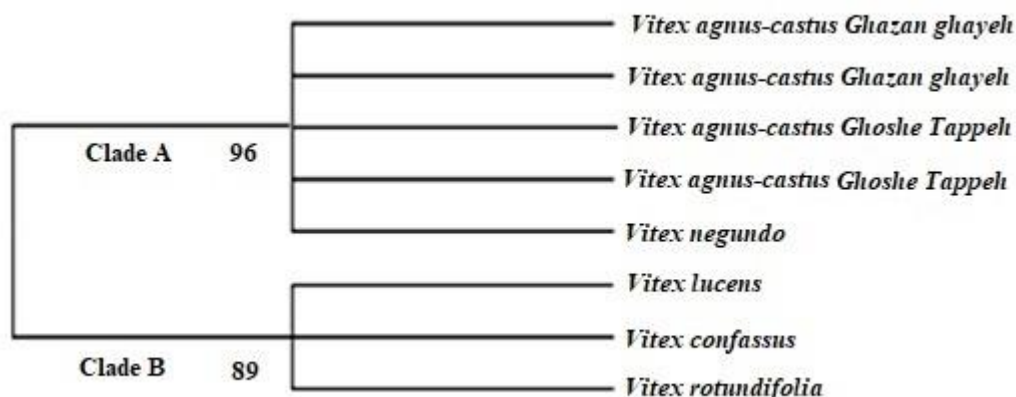
شکل ۵- درخت خویشاوندی (Neighbor-joining) گونه‌های مختلف جنس *Vitex* مبتنی بر هم‌ردیفی توالی بارکد *trnL-trnF*

Figure 5. Neighbor-joining tree of different *Vitex* species based on *trnL-trnF* barcode sequence alignment
 Numbers on branches are posterior probability based on Bayesian inference analysis (Values <50% were not shown).

بارکد ITS

تمام توالی‌های تکثیر شده با استفاده از نشانگر ITS با موفقیت توالی‌یابی شدند. طول قطعه تکثیر شده در این گونه ۶۷۵ نوکلئوتید توالی‌یابی شد و کروماتوگرام‌های حاصل، با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI) تطبیق داده شدند. در نهایت توالی آن به بانک ژن (NCBI) به منظور ثبت نهایی ارسال شد.

همچنین جایگاه گونه مورد مطالعه در بین سایر گونه‌های جنس *Vitex* با رسم درخت فیلوژنی حاصل از نشانگر هسته‌ای مشخص گردید (شکل ۶). نتایج هم‌ردیفی، توالی نمونه‌ی جمع‌آوری شده از دو منطقه مورد مطالعه، این گیاه را به همان جنس و همان گونه (*Vitex agnus-castus*) نسبت داد.



شکل ۶- درخت خویشاوندی (Neighbor-joining) گونه‌های مختلف جنس *Vitex* مبتنی بر هم‌ردیفی توالی بارکد ITS

Figure 6. Neighbor-joining tree of different *Vitex* species based on ITS barcode sequence alignment
Numbers on branches are posterior probability based on Bayesian inference analysis (Values <50% were not shown).

بحث

به دلیل تخریب زیستگاه‌ها و خطر کاهش و انقراض گونه گیاهی *Vitex agnus-castus*، مطالعه گیاه‌شناسی و ثبت ویژگی‌های زیستی در جهت حفاظت از این گیاه ارزشمند دارویی در چهارچوب مدیریت بهینه موضوعی ضروری به نظر می‌رسد. با استفاده از رویکردهای مولکولی، کارایی شناسایی گیاهان تحت تأثیر سن یا شرایط محیطی قرار نمی‌گیرد. در این بین، بارکد DNA روش خوبی است که برای شناسایی گیاهان از طریق مقایسه توالی‌های DNA پیشنهاد شده است.

چندین گونه که در حال حاضر در جنس *Vitex* شناخته شده‌اند، مورفولوژی قابل تشخیصی از خود نشان نمی‌دهند که منجر به سردرگمی در شناسایی آنها می‌شود (Nigam et al., 2018). از آنجا که کاربرد دارویی *V. agnus-castus* با سایر گونه‌ها متفاوت است، بنابراین، شناسایی مناسب این گونه برای عملکرد دارویی مؤثر ضروریست. در این مطالعه از رویکردهای کلی در شناسایی گیاهان دارویی از جمله تکنیک‌های مورفولوژیکی، میکرومورفولوژی و مولکولی استفاده شد که مزایا و معایب متفاوتی دارند. مورفولوژی گرده در بازسازی‌های فیلوژنتیکی و رده‌بندی تیره Lamiaceae مفید گزارش شده است (Salmaki et al., 2008a). نتایج نشان داد که تمام دانه‌های گرده در هر دو جمعیت، دارای سه‌شیار هستند؛ شکل گرده در

جمعیت‌های قازان‌قاپه کروی کشیده با اندازه کوچک و در قوشه‌تپه نیمه کشیده با اندازه بزرگتر می‌باشند. وجود دانه‌های گرده کشیده و سه‌شیاره که در این گیاه مشاهده شد، بیشتر نه تنها در اعضای این جنس (Munsif et al., 2007)، بلکه در برخی دیگر از اعضای جنس‌های خویشاوند آن (*Verbena Stachys*, Erkara, 2007؛ Salmaki et al., 2008b؛ Tabaripour et al., 2019؛ Tabaripour, 2022) که نشان‌دهنده اهمیت شکل دانه گرده در کمک به تأیید شناسایی این گیاه می‌باشد.

مطالعات بر روی میکرومورفولوژی Lamiaceae نشان می‌دهد که ویژگی‌های ریزریخت‌شناسی جنس‌های مختلف آن، به‌طور بالقوه در سطوح مختلف طبقه‌بندی مفید هستند (Salmaki et al., 2008a). طبق نتایج این مطالعه دانه این گیاه بادامی شکل بوده و بین جمعیت‌ها تفاوت وجود ندارد. Khalaf و همکاران (۲۰۱۹) در عراق، بذر بالغ گیاه پنج‌انگشت را قهوه‌ای تیره تا سیاه و کروی بیضی‌شکل بیان کردند که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. با توجه به داده‌های بدست آمده، می‌توان گفت که دانه‌های جمعیت‌های مورد بررسی در دو رویشگاه، از لحاظ اندازه و تزئینات سطح خارجی از یکدیگر متمایز هستند، در صورتی که در جمعیت قازان‌قاپه سطح دانه حفره‌دار است، در حالی که در

استفاده در شناسایی، باید براساس توالی‌های حفاظت شده طراحی شوند و کوتاه باشند تا تکثیر توالی‌های DNA آسیب‌دیده امکان‌پذیر باشد (Kress & Erickson, 2007). در بسیاری از تحقیقات، نشانگر ITS به دلیل طول بالای ژنوم و نیز تکامل غیریکنواخت، به‌عنوان نشانگر مکمل در نظر گرفته می‌شود؛ ولی در این مطالعه، نشانگر ITS به‌عنوان نشانگری مناسب برای گونه مورد بررسی، نشان داده شد. این ناحیه به‌دلیل داشتن بخشهای ترجمه نشدنی، بسیار ناهمگون است؛ این خصوصیت این ناحیه را به ابزار ارزشمندی برای بارکدینگ مولکولی و شناسایی گونه‌ها و تفکیک گونه‌های مرتبط و نزدیک تبدیل کرده است.

امروزه داروهای گیاهی محلی در کشورهای مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و نقش سازنده‌ای در درمان بیماری‌ها ایفاء می‌کنند (Sheidai et al., 2019). به‌طوری که بارکدگذاری DNA گونه‌های دارویی که صحیح شناسایی شده‌اند، می‌توانند به‌عنوان استاندارد برای مقایسه نمونه‌های گیاهی موجود در بازار با گیاهان دارویی حقیقی استفاده شوند. بنابراین توالی‌های بکاررفته در این تحقیق برای بارکدگذاری گیاه دارویی پنج‌انگشت مهم است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از مسئولان و استادان محترم دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاوس برای انجام این تحقیق، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

جمعیت‌های قوشه‌تپه سطح دانه چروکیده و مخطط است که به نظر می‌رسد به دلیل شرایط اقلیمی و دسترسی کمتر این منطقه به آب باشد. Khalaf و همکاران (۲۰۱۹)، پوشش بذر را متشکل از سلول‌هایی پنج یا شش وجهی دانسته که در دیواره‌های مماسی داخلی عمدتاً ضخیم‌تر شده است و نسبت به دیواره‌های جانبی، دیواره‌های فرعی ضخیم است که با داده‌های این تحقیق مطابقت دارد. Otalakosk و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی *Vitex megapotamica* ضخامت دانه‌ها را متغیر گزارش کردند و بیان نمودند که تجزیه و تحلیل ویژگی‌های مورفولوژیکی علاوه بر شناخت گیاه در مزرعه به دانش بوم‌شناسی گونه‌ها نیز کمک می‌کند.

محققان کشور ترکیه با بررسی مولکولی که انجام دادند، نشانگرهای RAPD را ابزار مفیدی برای تعیین روابط بین ژنوتیپ‌های *Vitex agnus-castus* بیان کردند (Sevindik et al., 2019). در مطالعه‌ای که در تایلد انجام شد، ژن *matK* و بارکدهای DNA فاصله بین ژنی *psbA-trnH* توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل شدند تا پنج گونه مختلف ویتکس را که در پزشکی استفاده می‌شوند شناسایی کنند. همچنین از توالی‌های ژن *matK* برای تفکیک گونه *V. glabrata* از سایر گونه‌های *Vitex* استفاده شد. نتایج گویای کاربردی بودن نشانگرها و نقاط بین‌ژنی استفاده شده در این تحقیق بود (Phoolcharoen et al., 2013). در مطالعات مختلف، مناطق ژنومی متفاوتی برای نشانگرگذاری پیشنهاد شده است و به نظر می‌رسد که بیشتر مناطق ژنومی می‌توانند برای شناسایی گیاهان دارویی استفاده شوند (Techen et al., 2014). توالی نشانگرهای مورد

References

- Blumenthal, M., 2000. Herbal medicine, Expanded Commission E Monographs. Integrative Medicine Communications, 519p.
- Chan, E.W.C., Wong, S.K. and Chan, H.T., 2018. Casticin from *Vitex* species: A short review on its anticancer and anti-inflammatory properties. *Journal of Integrative Medicine*, 16(1): 147-152.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C. and Song, J., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5: e8613.
- Daniele, C., Thompson Coon, J. and Pittler, M.H., 2005. *Vitex agnus-castus*: a systematic review of adverse events. *Drug Safety*, 28(4): 319-332.
- Mert, H. and Dogan, Y., 1998. An autecological study on the *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) distributed in West Anatolia. *Turkish Journal of Botany*, 22: 327-334.
- Erdtman, G., 1943. An Introduction to Pollen Analysis. Chronica Botanical Company Waltham, Mass., USA, 239p.
- Erkara, P., 2007. The first observations on the pollen morphology of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae). *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 8(2): 351-354.

- Ghahreman, A., 2003. Color flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran.
- Gilman, E.F. and Watson, D.G., 1994. *Vitexagnus-castus*: Chastetree. Fact Sheet ST-664, US Forestry Service, Department of Agriculture, Florida, 3p.
- Girman, A., Lee, R. and Kligler, B., 2003. An integrative medicine approach to premenstrual syndrome. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 188: S56-S65.
- Guo, X., Wang, X., Su, W., Zhang, G. and Zhou, R., 2011. DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(8): 1198-1203.
- Khalaf, F.K. and Al-obeidi, B.M.R., 2019. Anatomical study of the vegetative parts and seeds of *Vitex agnus-castus* plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3): 905-908.
- Khoshshima, E., Asri, Y., Bakhshi Khaniki, Gh.R. and Adnani, S.M., 2016. Study of some ecological characteristics of *Vitex agnus-castus* L. in Qom province. *Journal of Plant Research*, 30(4): 807-816.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS one*, 2: e508.
- Mari, A., Montoro, P., D'Urso, G., Macchia, M., Pizza, C. and Piacente, S., 2015. Metabolic profiling of *Vitex agnus castus* leaves, fruits and sprouts: Analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102: 215-221.
- Munsif, S., Khan, M.J., Ahmad, M., Zafar, M., Shah, GM. and Yasmin, G., 2007. Comparative Pollen Studies of the Genera *Lantana*, *Verbena* and *Vitex* of Family Verbenaceae from Pakistan. *International Journal of Agriculture & Biology*, 9(4): 1-12.
- Newall, C.A., Anderson, L.A. and Phillipson, J.D., 1996. *Herbal Medicines. A Guide for Health-Care Professionals*. The Pharmaceutical Press, London, 530p.
- Nigam, M., Saklani, S., Plygun, S. and Mishra, A.P., 2018. Antineoplastic potential of the *Vitex* species. *An overview Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 17: 492-502.
- Otalacosk, J., Dasilva, J.B., Franco, M.S., Silva, M.A., Rodrigues, D.B., Almeida, A. and Tunes, L.V.M., 2020. Morphometry of fruits, seeds and seedlings of *Vitex megapotamica* (Lamiaceae). *Acta Biológica Catarinense*, 7(4): 58-64.
- Phoolcharoen, W. and Sukrong, S., 2013. Molecular analysis of *Vitex* species using candidate DNA barcoding and PCR-RFLP of the *matK* gene for authentication of *Vitex glabrata*. *Natural Product Communications*, 8: 1125-1128.
- Rani, A. and Sharma, A., 2013. The genus *Vitex*: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 7(1): 188.
- Saden-Krehula, M. and Kustrak, D., 1991. Ketosteroids in flowers and leaves of *Vitexagnus-castus*. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*, 41: 237-241.
- Salmaki, Y., Zarre, S. and Jamzad, Z., 2008a. Nutlet morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. *Feddes Repert*, 119: 631-645.
- Salmaki, Y., Jamzad, Z., Zarre, S. and Bräuchler, C., 2008b. Pollen morphology of *Stachys* (Lamiaceae) in Iran and its systematic implication. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(8): 627-639.
- Sevindik, E., Caner, S. and Coskun, M., 2019. Molecular characterization of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) populations grown in Aydin, Turkey. *Notulae Scientia Biologicae*, 11(2): 218-221.
- Sheidai, M., Tabaripour, R., Talebi, S.M., Noormohammadi, Z. and Koohdar, F., 2019. Adulteration in medicinally important plant species of *Ziziphora* in Iran market: DNA barcoding approach. *Industrial Crops and Products*, 130: 627-633.
- Shneyer, V.S., 2009. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russian Journal of Genetics*, 45(11): 1267-1278.
- Souto, E., Durazzo, A., Nazhand, A., Massimo Lucarini, M., Zaccardelli, M., Souto, S., Silva A. and Patricia Severino, P., 2020. Ettore Novellino 12 and Antonello Santini, 2020. *Vitex agnus-castus* L. Main Features and Nutraceutical Perspectives, 11(7): 761.
- Tabaripour, R., Sheidai, M., Talebi, S.M. and Noormohammadi, Z., 2019. The pollen morphological diversity of *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae). *Acta Botanica Hungarica*, 61(4): 441-457.
- Tabaripour, R., Sheidai, M. and Talebi, S.M., 2022. Pollen morphological traits analysis in the genus *Hymenocrater* Fisch. & C. A. Mey. (Lamiaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 45: 1297-1306.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
- Techen, N., Parveen, I., Pan, Z. and Khan, I.A., 2014. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25: 103-110.
- Wollenweber, E. and Mann, K., 1983. Flavonole aus Flüchten von *Vitex agnus-castus*. *Planta Medica*, 48: 126-12