

بررسی تنوع توده های وحشی و زراعی زرشک استان های خراسان با استفاده از نشانگرهای

مورفولوژیکی و مقایسه کارایی آن با نشانگرهای مولکولی AFLP

Assessment of variation of wild and cultured *Berberis* populations of khorasan provinces using morphological markers and comparison to data resulted from AFLP markers

سمیه حیدری^۱، سید حسن مرعشی^۲، محمد فارسی^۳، امین میرشمسی کاخکی^۴
^۱ کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، ^۲ ^۳ اعضا هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ^۴ دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

زرشک بی دانه (*Berberis vulgaris* L. var. *asperma*) یکی از معدود گیاهان زراعی است که فقط در کشور ایران و جنوب استان خراسان، کشت می شود. با این حال هیچگونه تحقیقاتی در زمینه شناسایی، بررسی تنوع و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت های زرشک بی دانه و گونه های خویشاوند آن در کشور انجام نگرفته است. همچنین با وجود مطالعات کلاسیک انجام شده مبتنی بر گیاه شناسی و سیستماتیک در نقاط مختلف دنیا، ابهامات و اختلاف نظرهایی در رابطه با روابط خویشاوندی گونه های موجود در این خانواده وجود دارد که اغلب ناشی از اختلاف کارایی روش های مختلف می باشد. بدین منظور برای اولین بار در کشور از نشانگرهای مورفولوژیکی جهت بررسی تنوع و رابطه خویشاوندی توده های زرشک استان های خراسان استفاده شد و با داده های حاصل از نشانگرهای مولکولی AFLP توسط آزمون Mantel مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که همبستگی بسیار کمی بین داده های نشانگرهای AFLP و نشانگرهای مورفولوژیکی وجود دارد. از آنجا که صفات مورفولوژیکی مورد بررسی، حدود ۹۰٪ صفات موجود در کلید شناسایی فلور ایران را شامل می شوند و اکثراً صفات رویشی هستند، ارزیابی ضعیف تنوع و همبستگی پایین بین نتایج حاصل از داده های مورفولوژیکی بر اساس صفات کلید و نتایج بدست آمده از نشانگر AFLP می تواند دلیل بر کارایی پایین کلید شناسایی فلور ایران در طبقه بندی و بررسی های فیلوژنتیکی خانواده زرشک باشد. بنابراین بررسی مولکولی بیشتر با هدف درک بهتر از روابط خویشاوندی بین جنسها و گونه های خانواده زرشک ضروری به نظر می رسد.

کلمات کلیدی: زرشک، نشانگر، AFLP، صفات مورفولوژیکی

زرشک (*Berberis sp.*) به عنوان یک گیاه دارویی مهم از گذشته های دور در ایران و بسیاری از تمدن های بزرگ دنیا شناخته شده و مورد استفاده بوده است (۴) و هم اکنون با شناخت مواد مؤثره دارویی آن همانند بربرین کاربرد وسیعی در صنایع دارویی پیدا کرده است (۱). زرشک بی دانه یکی از معدود محصولات ویژه و منحصر به فردی است که فقط در کشور ایران تولید می شود (۲۰). بسیاری از زمینهای کشاورزی شهرستانهای قاین و بیرجند در جنوب خراسان به دلیل شوری خاک و آب، برای کشت اغلب محصولات کشاورزی مناسب نیستند، لذا در این مناطق و بویژه طی ۲۰ سال اخیر زرشک بی دانه به عنوان محصول اصلی مطرح شده، بطوریکه بیش از ۹۵ درصد سطح زیر کشت و تولید زرشک کشور را به خود اختصاص داده است (۱). همچنین با توجه به رویش این گیاه سازگار و کم توقع در شیب کوهها و مسیر رودخانه ها، اهمیت بالای آن در حفظ منابع آب و خاک و پوشش گیاهی منطقه خراسان قابل تأمل است.

مطالعات انجام شده تا به امروز عموماً روی خواص دارویی زرشک تأکید داشته است و تحقیقات در زمینه شناسایی، بررسی تنوع و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیتها در این گیاه محدود و انگشت شمار است. هر چند مطالعات کلاسیک مبتنی بر گیاهشناسی و سیستماتیک در این گیاه هم اکنون مورد توجه قرار گرفته است. با این حال ابهامات و اختلاف نظرهایی در موارد مختلف وجود دارد که نیاز به استفاده از روشها و ابزارهای مختلف را ضروری می سازد. از آن جمله می توان به رابطه خویشاوندی دو جنس زرشک و ماهونیا اشاره کرد. مطالعات سیتولوژیکی (۹)، ریخت شناسی چوب (۱۹)، شکل گل (۲۱) و مطالعات سرولوژیکی (۱۰) این دو را از یک جنس می دانند، اما مطالعات جنین شناسی (۱۸) و همچنین تفاوتهای مورفولوژیکی بین دو گیاه، یعنی داشتن خار و برگهای ساده در جنس زرشک و عدم وجود آنها در جنس ماهونیا این دو را جنسهای مستقل معرفی می کند (۵).

همچنین منشأ زرشک بی دانه ای که در جنوب خراسان پرورش می یابد و به نام *B. vulgaris* C. K. Schn. Var. *asperma* Don خوانده می شود، (۱۷) مشخص نیست و این امکان وجود دارد که این نوع زرشک یک دورگ و یا حاصل یک جهش باشد. با توجه به اینکه بخشی از این ابهامات و اختلاف نظرها در مطالعات اخیر ناشی از اختلاف کارایی روشهای مختلف می باشد، مقایسه روشها و شناسایی نقاط ضعف و قوت در الگوریتمهای مختلف می تواند جهت تلفیق روشها یا استفاده از روشهای برتر مفید فایده باشد.

در مطالعه انجام شده توسط بوتینی و همکاران (۲۰۰۰) بر روی جنس زرشک، نشان داده شده که تنوع مورفولوژیکی در بین ۱۳ گونه زرشک در جنوب آرژانتین و شیلی به میزان قابل توجهی بالاست (۶). آنها در ادامه (۷) تنوع ژنتیکی و رابطه میان جمعیت های زرشک در این گونه ها را با تکنیک AFLP مورد بررسی قرار دادند. دندروگرام تهیه شده از انگشت نگاری AFLP نشان داد که در مجموع، جمعیت گونه های مشابه، گروههای وابسته نزدیکی با ضریب تشابه بالا تشکیل داده اند. اما در مقایسه با نتایج حاصل از صفات مورفولوژیکی و داده های حاصل از نشانگر آیزوزایمی مشخص

شد که رابطه معنی داری بین دندروگرام های حاصل از این داده ها وجود ندارد. کیم و جانسون (۱۹۹۴) کتابخانه DNA کلروپلاستی (cpDNA) گیاه ماهونیا را تهیه و نقشه برداری دقیق آن را با استفاده از آنزیمهای برشی انجام دادند و یک رونوشت معکوس (IR) را شناسایی و جداسازی کردند و توزیع فیلوژنتیک این IR را در ۲۵ گونه از زرشک و ماهونیا و ۲۰ گونه دیگر از خانواده زرشک و ۴ گونه از خانواده های نزدیک دیگر مورد بررسی قرار دادند. مطالعات آنها نشان داد که تنها جنس های زرشک و ماهونیا در این توالی مشترک هستند. این نتایج رابطه فیلوژنتیکی نزدیک آنها را که قبلا داده های کروموزومی، ریخت شناسی و سرولوژیکی بیان کرده بود، تأیید می کند (۱۱).

همچنین در مطالعه ای که حیدری (۱۳۸۶) بر روی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت های زرشک استانهای خراسان و دیگر گونه های موجود در خانواده زرشک با استفاده از مارکر مولکولی AFLP انجام داد، جدایی دو جنس زرشک و ماهونیا تأیید شد و مشخص گشت که گونه غالب در استانهای خراسان *Berberis integerrima* می باشد که بین جمعیت های مختلف آن در استانهای خراسان تنوع قابل ملاحظه ای وجود دارد. همچنین این تحقیقات نشان داد که در جمعیت زرشک های بی دانه تنوع نزدیک به صفر می باشد (۳).

از آنجایی که اصلاح گران وجود تنوع مورفولوژیکی را از بدیهی ترین و ارزشمندترین ضروریات شروع کار اصلاح می دانند، علی رغم وجود ابزارها و تکنیکهای بسیار دقیق تر، توجه به تنوع صفات مورفولوژیکی و استفاده از آن برای بررسی تنوع ژنتیکی هنوز جایگاه مطلوب خود را حفظ نموده است. به همین دلیل و در ادامه مطالعات گذشته در این مطالعه تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی موجود در برخی گونه های جنس زرشک استان های خراسان به همراه دو نمونه زینتی و یک نمونه از جنس ماهونیا با استفاده از صفات مورفولوژیکی بررسی و با نتایج حاصل از مارکرهای مولکولی AFLP (۳) مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: نمونه های زرشک بومی مورد استفاده در این تحقیق از ۷ منطقه واقع در استان های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی بودند. همچنین نمونه های زرشک بی دانه از باغات زرشک اطراف شهرستان قاین و ۲ نمونه زینتی و یک نمونه جنس ماهونیا از پارک علم و فناوری خراسان واقع در مشهد تهیه شد (جدول ۱). در فاصله اردیبهشت تا خردادماه که زمان شکوفایی گل های زرشک می باشد و همچنین در اواخر تابستان که میوه ها می رسند، ۴۰ صفت مختلف شامل بیش از ۹۰ درصد صفات موجود در کلید شناسایی زرشک و حتی با جزئیات بیشتر، انتخاب و در ۳۳ نمونه از خانواده زرشک مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). انتخاب نوع صفات از روی کلید شناسایی زرشک صورت گرفت، بطوریکه حدود ۹۰٪ صفات موجود در کلید مورد بررسی قرار گرفت.

Assessment of variation of wild and cultured *Berberis* populations of khorasan provinces using morphological markers and comparison to data resulted from AFLP markers

Somayeh Heidary*¹ Seyed Hasan Marashi² Mohammad Farsi³ Amin Mirshamsi Kakhki⁴

1- MSc of plant biotechnology (soma_cerec@yahoo.com) 2,3-Professor of Ferdowsi university of Mashhad, Faculty of agriculture, department of plant biotechnology 4- PhD student of plant biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Faculty of agriculture, department of plant biotechnology

Seedless berberis is one of the few crops which are cultured only in Iran and south khorasan. However, there has been no effort in the field of identification, polymorphism evaluation and study of genetic structure of seedless *Berberis* populations and its relative existing in Iran. In addition, despite the classical studies made based on botany and systematics around the world, there are still ambiguities and debates about the phylogenetic relationships within species existing in this family, mainly due to different efficiency of different methods. So in this paper- for the first time in Iran- morphological markers were used to evaluate variation and phylogenetic relationships among *Berberis* populations of khorasan provinces compared to data resulted from AFLP markers by means of Mantel correspondence test. The results showed that there is a low correlation between AFLP data and morphological markers. Since experimented morphological traits comprise about 90% of the traits existing in identification key of Flora Iranica and are often vegetative, weak evaluation and correlation between AFLP data and morphological markers based on identification key can indicate low efficiency of identification key of Flora Iranica for classification and phylogenetic consideration of berberis family. Therefore further molecular and morphological investigations aiming better understanding of the relationships between species and genera of *Berberis* family looks necessary.

۱. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۸۴-۸۳ ۱۳۸۵. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات.
<http://213.176.84.4/baghat/viewostan.asp?o=20502&y=1384>
۲. بالندری، الف. و کافی، م. ۱۳۸۱. زرشک فناوری تولید و فرآوری. چاپ اول، ناشر زبان و ادب، مشهد.
۳. حیدری، س. ۱۳۸۶. بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی زرشک زراعی و وحشی استانهای خراسان با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.
۴. زرگری، ع. (۱۳۶۰-۱۳۶۹). گیاهان دارویی. ویرایش ۳، انتشارات دانشگاه تهران، تهران
5. Ahrendt, L. W. A. 1961. *Berberis and Mahonia: a taxonomic revision. Journal of Linnian Society Botany*, 57: 1-410.
6. Bottini, M. C. J., Greizerstein E. J., Alicino M. B., and Poggio. L. 2000. Relationships among genome size, environmental conditions and geographical distributions in natural populations of NW patagonian species of *Berberis*. *Annals of Botany*, 86(3): 565-573.
7. Bottini, M. C. J., De Bustos, A., Jouve, N., Poggio, L. 2002. AFLP characterization of natural populations of *Berberis* (*Berberidaceae*) in Patagonia, Argentina. *Plant systematic and evolution journal*, 133-142.
8. Dermen, H. 1931: A study of chromosome number in Two genera of *Berberidaceae*: *Mahonia* and *Berberis*. *Journal of Arnold Arbor*, 12: 281-287.
9. Huff, D.R., Peakall, R., Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelman). *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 827-834.
10. Jensen, U. 1973. The interpretation of comparative serological results: *Nobel symposium* 25. In BENDZ, G. Santesson, J. (Eds): *Chemistry in botanical classification*, 217-227. New York: Academic Press.
11. Kim, Y. D., Jansen R. K. 1994. Characterization and phylogenetic distribution of a chloroplast DNA rearrangement in the *Berberidaceae*. *plant systematic and evolution*, 193:107-114.
12. Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Researches*. 27: 209-220.
13. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Nature* 106: 283-292.
14. Palsboll, P. J., B'erub'e, M. and Allendorf, F. W. 2006 Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecological. Evolutionar*, 22: 11-16.
15. Peakall, R., Smouse, P. E. 2007. GenAlEx V6.1: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. Canberra: Australian National University.
16. Ranales and Rhoeadales, 1970. *Flora of the U.S.S.R. Berberidaceae*. Vol. VII. Keter press. Israel program for scientific translations. Jerusalem.
17. Rechinger, K. 1975. *Flora Des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden gebirge*, *Berberidaceae*. Vol 11. Academische Druck-U-verganstalt. Graz, Austria. No. 111.
18. Sastrl, R. L. N. 1969. Floral morphology, embryology, and relationships of the *Berberidaceae*. *Australian Journal of Botany*, 17: 69-79.
19. Shen, Y. 1954. Phylogeny and wood anatomy of *Nandina*. *Taiwania*, 5: 85-92.
20. Tehranifar, A. 2003. Barberry growing in Iran, *Acta Horticulture.(ISHS)*, 620: 193-195.
21. Terabayashi, S. 1978. studies in morphology and systematics of *Berberidaceae*, II: Floral anatomy of *Mahonia japonica* (THUNB.) DC. and *Berberis thunbergii* DC. *Acta Phytotaxonomy Geobotany*, 29: 106-118.

صفات مستقل از تغییرات اکولوژیکی از وزن بیشتری نسبت به سایر صفات برخوردارند. همانطور که در همبستگی بین مؤلفه های اول که بیشترین تنوع ژنتیکی را توجیه می کنند با صفات مورد بررسی ملاحظه شد، تنها صفاتی که مربوط به اندامهای زایشی مورد بررسی قرار گرفته بودند، با مؤلفه اول بیش از ۵۰٪ همبستگی دارند. در حالی که صفات رویشی در درجه دوم اهمیت قرار گرفته اند. وجود بیش از ۶ مؤلفه توجیه کننده کمتر از ۶۰٪ تنوع نشان می دهد که صفات مورد بررسی حتی در مجموع قادر به توجیه تنوع موجود بین نمونه های مورد بررسی نبوده و این امر می تواند دلیلی دیگر برای نامناسب بودن صفات در بررسی تنوع ژنتیکی خانواده زرشک باشد. بطوریکه این امر می تواند دلیلی بر وجود تعداد زیاد مترادف برای بسیاری از گونه های خانواده زرشک باشد. بخصوص گونه *B. integerrima* که در فلور ایرانیکا دارای ۱۱ گونه مترادف می باشد و این نشاندهنده تنوع زیاد در زیرگونه ها و همچنین عدم شناسایی درست این گونه می باشد. چنانکه گونه های موجود در منطقه کلات با توجه به کلید شناسایی فلور ایرانیکا گونه *B. integerima* می باشد و بررسی آن با نشانگرهای مورفولوژیک این امر را تأیید می کند. اما تجزیه و تحلیل به کمک نشانگرهای مولکولی AFLP آن را در گروهی کاملاً جداگانه قرار داده است (۳) که شمالی بودن منطقه کلات و نزدیکی آن به منطقه ترکمنستان این احتمال را قوت می بخشد که این نمونه ها متعلق به گونه *B. turcomanica* باشند که در فلور ترکمنستان با گونه *B. integerrima* مترادف است (۱۶).

بنابراین لازم است تا تحلیل محتاطانه بر اساس صفات مورفولوژیک صورت گیرد و گونه های موجود در کشور به طور دقیق با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی مورد شناسایی قرار بگیرند و با توجه به آنها کلید شناسایی زرشک مورد اصلاح و تجدید نظر قرار گیرد. چنانکه حتی می بایست موجودیت گونه (*B. khorassanica*) که در فلور ایرانیکا به عنوان گونه بومی استان خراسان یاد شده است، مورد بررسی قرار گیرد. چراکه خصوصیات مورفولوژیکی که برای آن ذکر شده و مهمترین آنها وجود خارهای زیاد در حاشیه برگ می باشد، تفاوت اندکی با دیگر گونه های جنس زرشک دارد و به نظر واقعی نمی رسند (مکاتبات شخصی با جوهرچی، م. ر.). ضمن آنکه شناسایی این گونه توسط یک گیاهشناس آلمانی حدود ۵۰ سال قبل انجام شده و تا کنون نمونه دیگری از این گونه مشاهده و جمع آوری نشده و هیچگونه بررسی در این زمینه انجام نگرفته است.

با توجه به نتایج مطالعات بوتینی و همکاران (۲۰۰۲) که هیچ رابطه معنی داری بین داده های AFLP و صفات مورفولوژیکی مشاهده نکردند (۷)، به نظر می رسد صفات مورفولوژیکی و بویژه صفات موجود در کلید شناسایی فلورها برای شناسایی و بررسی های فیلوژنتیکی در خانواده زرشک از کارایی لازم برخوردار نیستند. بنابراین با توجه به دقت بیشتر نشانگرهای مولکولی، بررسی های بیشتر در زمینه سیستماتیک این خانواده و تجدید نظر بر روی صفات موجود در کلید شناسایی موجود در فلور هر منطقه ضروری به نظر می رسد.

جدول ۱- نمونه های زرشک مورد آزمون و منطقه جمع آوری آنها

نام جمعیت	نام گونه	نام نمونه های داخل هر جمعیت	جمعیت
رشتخوار	<i>Berberis integerrima</i>	Ro1, Ro2, Ro3, Ro4	Pop1
بجنورد	<i>B. integerrima</i>	Bo1, Bo2, Bo3,	Pop2
شیروان	<i>B. integerrima</i>	Sh1, Sh2, Sh3, Sh4	Pop3
قائن	<i>B. integerrima</i>	Gh1, Gh2, Gh3, Gh4	Pop4
کاشمر	<i>B. integerrima</i>	Ka1, Ka2, Ka3, Ka4, Ka5, Ka6	Pop5
باجگیران	<i>B. integerrima</i>	Bj1, Bj2, Bj3	Pop6
کلات	<i>B. integerrima</i>	Ca1, Ca2	Pop7
بی دانه	<i>B. vulgaris</i>	V1, V2, V3, V4	Pop8
زینتی ۱	<i>B. gagnepaini</i>	Ga	Pop9
زینتی ۲	<i>B. thunbergii</i>	Th	Pop10
ماهونیا	<i>Mahonia aquifolium</i>	Ma	Pop11

بدین منظور برای هر صفت اندازه گیری ها در حدود ۱۵ اندام انجام و میانگین آنها در هر نمونه قرار داده شد. برای حالات (رتبه های) مختلف هر صفت یک دامنه مشخص شد، بطوریکه صفات به صورت کیفی قابل بررسی باشند. سپس صفات مربوط به هر نمونه در دامنه خاص آن نمونه قرار گرفت. نمونه های جمع آوری شده در هر بار یوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد مورد شناسایی قرار گرفت. تعداد نمونه در هر منطقه با توجه به وسعت و تراکم هر جمعیت طوری جمع آوری شدند تا نماینده مناسبی از کل نمونه ها باشند و نمونه های هر منطقه به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شدند.

به منظور محاسبه ماتریس فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه ای و برای تعیین نقش و اهمیت هر صفت در تنوع کل، داده های خام به نرم افزار Statistica V5.5A منتقل گردید. ماتریس فاصله حاصل بر اساس ضریب اقلیدسی به نرم افزار GenALEx 6.1 منتقل و در نهایت با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) و با در نظر گرفتن مؤلفه اول که بیشترین درصد تنوع را توجیه می کند نمودار مؤلفه اولی جهت گروه بندی و بررسی روابط بین نمونه ها ترسیم شد. سپس ماتریس فاصله حاصل از صفات مورفولوژیک و ماتریس فاصله حاصل از نشانگرهای مولکولی AFLP با استفاده از آزمون Mantel (1967) و نرم افزار GenALEx 6.1 مورد مقایسه قرار گرفتند.