بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای وحشی و زراعی زرشک (*Berberis sp.*) استانهای خراسان با استفاده از نشانگرهای مولکولیAFLP

سمیه حیدری* - حسن مرعشی - محمد فارسی - امین میرشمسی کاخکی[1]

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۹

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 می‌شود. منشأ این واریته مشخص نیست و هیچگونه مطالعه ای در زمینه شناسایی روابط خویشاوندی آن با دیگر گونه‌های وحشی کشور انجام نگرفته است. در این تحقیق از نشانگر مولکولی AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی ۳۰ نمونه مختلف زرشک وحشی و زراعی متعلق به استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی به همراه دو نمونه زرشک زینتی و یک نمونه از جنس ماهونیا جهت بررسی جدایی دو جنس زرشک و ماهونیا، توسط ۴ ترکیب آغازگری (*EcoRI/Tru1I*) استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای نشان داد که دو جنس ماهونیا و زرشک در دو گروه کاملاً مجزا و با فاصله ژنتیکی قابل توجهی از یکدیگر قرار گرفته اند. شاخص تنوع h، تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی(PCoA)، شاخص Fst و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، همگی حاکی از تفاوت قابل توجه بین جمعیت‌های زرشک وحشی استانهای خراسان و میزان نسبتاً پایین تنوع در داخل جمعیت‌ها می‌باشد. بطوریکه تنوع مشاهده شده داخل جمعیت زرشک زراعی همانطور که انتظار می‌رفت نزدیک به صفر و بسیار اندک بود. همچنین نتایج نشان دادند که گونه*Berberis integerrima* گونه غالب در استان‌های خراسان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: زرشک، زرشک بی دانه، ماهونیا، تنوع ژنتیکی و AFLP

مقدمه

زرشک (*Berberis sp.*) به عنوان یک گیاه دارویی مهم از گذشته‌های دور در ایران و بسیاری از تمدن‌های بزرگ دنیا شناخته شده و مورد استفاده بوده است (۳). زرشک بی دانه یکی از معدود محصولات ویژه و منحصر به فردی است که فقط در کشور ایران تولید می‌شود (۲۴). 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 رودخانه‌ها، اهمیت بالای آن در حفظ منابع آب و خاک و پوشش گیاهی منطقه خراسان

۱- به ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی ، استادیار، دانشیار، دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی،دانشگاه فردوسی مشهد

*نویسنده مسئول Email: Soma-cerec@yahoo.com

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، با این حال ابهامات و اختلاف نظرهایی در موارد مختلف وجود دارد که نیاز به استفاده از روشها و ابزارهای جدید را ضروری می‌سازد. از آن جمله می‌توان به رابطه خویشاوندی دو جنس زرشک و ماهونیا اشاره کرد. مطالعات سیتولوژیکی (۹)، ریخت شناسی چوب (۲۳)، شکل گل (۲۵) و مطالعات سرولوژیکی (۱۳) آنها را از یک جنس می‌دانند، اما مطالعات جنین شناسی (۲۳) 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 (۴). بنابراین با توجه به پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنوم و تکنیک‌های مولکولی، علاوه بر مطالعات فوق انگشت نگاری DNA می‌تواند راه حل مناسبی جهت تعیین دقیق این رابطه باشد.

مطالعه گونه‌های زرشک در مناطق مختلف دنیا نشان می‌دهد که ممکن است فرایندهای جهش و نوترکیبی در اثر تلاقی‌های بین گونه ای به صورت طبیعی سبب ایجاد تنوع و ظهور واریته‌های متعدد و متنوع در این گیاه شده باشد که در اکثر موارد روابط خویشاوندی آنها ناشناخته باقی مانده است (۲). از آن جمله می‌توان به منشاء نامشخص زرشک بی دانه ای که در جنوب خراسان پرورش می‌یابد و به نام *B. vulgaris* C. K. Schn. Var. asperma Don. خوانده می‌شود، اشاره کرد (۱۹؛ مکاتبات شخصی با دکتر جولین‌هاربر[1]). این امکان وجود دارد که این نوع زرشک یک دورگ و یا حاصل یک جهش باشد. بررسی روابط خویشاوندی بین زرشک دانه دار و بی دانه و نیز بررسی تنوع ژنتیکی زرشک بی دانه اطلاعات مفیدی را در اختیار به نژادگران قرار خواهد داد (۲).

در مطالعه ای که توسط بوتینی و همکاران بر روی جنس زرشک در کشورهای دیگر انجام شده است، نشان داده که تنوع مورفولوژیکی در بین گونه‌های زرشک زیاد است (۶). در مطالعه ای که بر روی گونه‌های مختلف زرشک بومی آرژانتین صورت گرفت (۱۹۹۹) نشان داد که علاوه بر وجود تنوع زیاد در محتوای ژنومی بین گونه‌های زرشک ، گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در این جنس وجود دارد (۵). 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. این نتایج رابطه فیلوژنتیکی نزدیک آنها را که قبلا داده‌های کروموزومی، مورفولوژیکی و سرولوژیکی بیان کرده بود، تأیید می‌کند (۱۴). بوتینی و همکاران (۲۰۰۲) تنوع ژنتیکی ۱۳ گونه زرشک در جنوب آرژانتین و شیلی و رابطه میان جمعیت‌های پلی پلوئید و دیپلوئید را با تکنیک AFLP مورد بررسی قرار دادند. دندوگرام تهیه شده از انگشت نگاری AFLP نشان داد که در مجموع، جمعیت‌های گونه‌های مشابه، گروههای وابسته نزدیکی با ضریب تشابه بالا تشکیل داده اند (۷).

در این مطالعه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP روابط خویشاوندی، تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بومی زرشک استانهای خراسان و زرشک بی دانه و همچنین دو نمونه زرشک زینتی و یک نمونه از جنس ماهونیا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های زرشک بومی مورد استفاده در این تحقیق از ۷ منطقه واقع در استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی جمع آوری گردید. همچنین نمونه‌های

۱- عضو هیات علمی هرباریوم دانشگاه‌هاروارد

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). نمونه‌های جمع آوری شده در هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد مورد شناسایی قرار گرفت. با این حال نمونه‌های منطقه کلات، به علت نبود نمونه هرباریومی مناسب، از لحاظ نوع گونه ناشناخته باقی ماند. تعداد نمونه در هر منطقه با توجه به وسعت و تراکم هر جمعیت طوری جمع آوری شدند تا نماینده مناسبی از کل نمونه‌ها باشند و نمونه‌های هر منطقه به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شدند.

جدول (۱) نمونه‌های زرشک مورد آزمون و منطقه جمع آوری آنها

نام جمعیت	نام گونه	نام نمونه‌های داخل هر جمعیت
رشتخوار	*B. integerrima*	Ro1, Ro2, Ro3, Ro4
بجنورد	*B. integerrima*	Bo1, Bo2, Bo3,
شیروان	*B. integerrima*	Sh1, Sh2, Sh3, Sh4
قائن	*B. integerrima*	Gh1, Gh2, Gh3, Gh4
کاشمر	*B. integerrima*	Ka1, Ka2, Ka3, Ka4, Ka5, Ka6
باجگیران	*B. integerrima*	Bj1, Bj2, Bj3
کلات	*Berberis sp.*	Ca1,Ca2
بی دانه	*B. vulgaris*	V1, V2, V3, V4
زینتی ۱	*B. gagnepaini*	Ga
زینتی ۲	*B. Thunbergii*	Th
جنس ماهونیا	*M. aquifolium*	Ma

برگهای تازه به صورت توده از هر درختچه جمع آوری و پس از پودر شدن با ازت مایع تا زمان استخراج در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

استخراج DNA: استخراج DNA بر مبنای روش سقایی معروف و همکاران صورت گرفت (۲۰). ۰/۱ گرم از برگ پودر شده به همراه ۹۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (NaCl 700 mMTris-HCl 100 mM, pH 7.5; EDTA 100 mM pH 8.0 ; CTAB 1% (w/v); β-Mercaptoethanol 1% (v/v) PVP 4% (w/v) با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در میکروتیوپ ۱/۵ ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه بن ماری و دمای ۶۵ درجه انکوبه شد. سپس ۴۵۰ میکرولیتر محلول کلروفرم ایزوآمیل الکل (۱ : ۲۴) به میکروتیوپ اضافه و به خوبی مخلوط شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی جدا و دو سوم حجم محلول (۶۰۰ میکرولیتر) ایزوپروپانول ۲۰ °C- به آن اضافه شد. محلول حاصل به آرامی تکان داده شد تا کلاف DNA مشاهده شود. سپس میکروتیوب‌ها بعد از قرار گرفتن به مدت نیم ساعت در ۲۰°C-، به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند تا قرص DNA تشکیل شود. پس قرص DNA با اتانول ۷۰٪ شستشو و پس از تبخیر اتانول، DNA در محلول TE حل گردید.

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت.

مراحل AFLP بر پایه روش وس و همکاران با کمی تغییرات بر اساس روش بهینه شده در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج (مکاتبات شخصی با آقای

مهندس پیرسیّدی[1]) انجام گردید (۲۶).

اجـرای مراحـل AFLP : DNA ژنـومی (۵۰۰ ng) بـا ۵ واحد از هر کدام از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *Tru1I* مـورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. سپس دو نوع آداپتور آنزیم‌هـای برشی *EcoRI* و *Tru1I* به انتهای قطعات برش خورده ژنومی اتـصال یافـت. آداپتـور *EcoRI* از ترکیـب دو آغـازگر 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' و 5'-AATTGGTAGGCAGTCTAC-3' و آداپتور *Tru1I* از ترکیـب دو آغـازگر 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' و 5'-TACTCAGGACTCAT-3' تـشکیل شـده بودنـد. مرحله تکثیر پیش انتخابی با استفاده از آغازگرهایی بـا یـک نوکلئوتید اضافی در انتهای 3' (*EcoR*I: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' و *Tru1*I: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') انجام شد.

انگشت نگـاری AFLP بـا اسـتفاده از آغازگرهـایی بـا ۳ نوکلئوتیـــد اضـــافی در انتهـــای 3' (*EcoR*I: 5'-GACTGCGTACCAATTC + NNN-3' و *Tru1*I: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA + NNN-3') صـــورت گرفت. بدین منظور ابتدا ۴۰ جفت ترکیب آغازگر با استفاده از سه نمونه‌ی DNA (دو نمونه نزدیک بـه‌هـم و یـک نمونـه دور از لحاظ مورفولوژی) غربال شـدند. ایـن ۴۰ ترکیـب بـر اساس محاسبه‌ی ۵ ترکیب برای آغـازگر انتخـابی مـرتبط بـا *Eco*RI (*Eco*RI+ACG، *Eco*RI+ACT، *Eco*RI+AGC، *Eco*RI+AAC، *Eco*RI+AGG) و ۸ ترکیب بـرای آغـازگر انتخـابی مـرتبط بـا *Tru1*I (*Tru*1I+CCG ، *Tru*1I+CGA، *Tru*1I+CCT، *Tru*1I+CAA، *Tru*1I+CTG، *Tru*1I+CAG، *Tru1*I+CTC، *Tru1*I+CGG) مورد آزمون قرار گرفتند. در نهایـــــت، ۴ جفـــــت ترکیـــــب آغـــــازگری (*Eco*RI+AGC/*Tru*1I+CCT، *Eco*RI+ACG/*Tru1*I+CAG، *Eco*RI+ACG/*Tru1*I+CGG و *Eco*RI+ACT/*Tru*1I+CAA) کـه وضـوح بانـدی بهتـر، تعداد باند و چند شکلی بیشتری تولید کردند، گزینش شدند. قطعات DNA تکثیر شده بر روی ژل پلی اکریلامید ۶٪ جدا شدند (شکل ۱). الکتروفورز به مدت ۲ ساعت با بـافر TBE 1x و ولتاژ ۱۲۰۰ ولت انجام و رنگ آمیزی به روش نیتـرات نقره صورت گرفت (۲۱).

تجزیه داده‌های AFLP: هر یک از قطعات DNA تکثیـر شده به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عـدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر نمـایش داده شـد. داده‌ها پس از ورود بـه نـرم افـزار Excel بـه منظـور محاسـبه ماتریس شباهت و تجزیه خوشه ای به کمـک ضـریب تـشابه Nei و روش UPGMA بـه نـرم‌افـزار Ntsys منتقـل شـدند. همچنین جهت تعیین میزان پلی مورفیسم و شاخص h[2] (تنوع ژنـی) در هـر جمعیـت از نـرم افـزار Popgene 32[3] اسـتفاده گردیـد (۲۸). تجزیـه بـر اسـاس محورهـای مختـصات (PCoA)[4] بـا اسـتفاده از نـرم افـزار GenALEx 6.1[5] (۱۸) انجام گرفت (۱۲) و با دو مؤلفه اول که بیشترین درصد تنوع را توجیه می‌کردند نمـودار دو بعـدی جهـت گـروه بنـدی و بررسی روابـط بـین نمونـه‌هـا ترسـیم شـد. مـاتریس شـباهت ژنتیکی بـین جمعیـت‌هـا نیـز بـر اسـاس ضـریب نـی (۱۹۷۲) بدست آمد (۱۶). همچنین با استفاده از این نرم افـزار تجزیـه واریانس مولکولی (AMOVA)[6] با ۹۹۹ نمونه برداری مجدد تصادفی (permutation) انجام گرفـت (۱۰؛ ۱۲). در نهایـت شاخص Fst (Wright's F statistics) برای تعیین تنـوع کـل (Fixation Index)، Fst هر جمعیت (Population specific indices Fst) و جدول آنالیز واریانس مولکولی توسط نـرم

۱- کارشناس ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی بخش ژنومیکس

2 - Nei's (1973) gene diversity
3 - Version 1.31
4 - Principal Co-ordinate Analysis
5 - Genetic Analysis in Excel Dec 2007
6 - Analysis of molecular variance (AMOVA)

افزار Arlequin (۱۱) مورد محاسبه قرار گرفت. بر اساس Fst بدست آمده برای هر جمعیت، میزان جریان ژنی (Nm) طبق فرمول $Nm = (Fst \times 4)^{-1}$ N محاسبه گردید. بطوریکه N تعداد افراد در یک جمعیت و m سهم آن افراد از میزان مهاجرت می‌باشد.

نتایج و بحث

آغازگرهای بکار رفته، در مجموع ۲۲۳ باند قابل امتیازدهی در محدوده ۵۰ تا ۱۰۰۰ bp ایجاد کردند. از این تعداد باند، ۲۰۴ باند چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۵۵/۷ و میانگین تعداد باندهای چند شکل به ازای هر جفت آغازگر ۴۱/۵ بود (۹۱/۴۸٪) (جدول ۲).

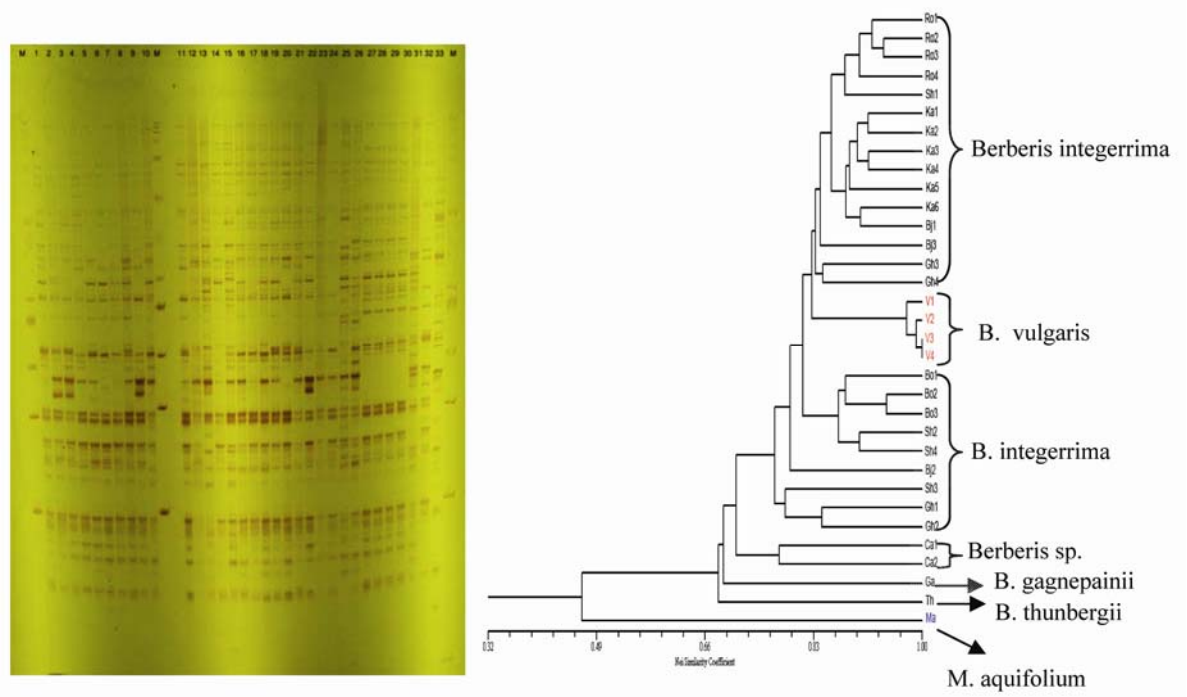
آنالیزهای مولکولی در نمونه‌های مورد آزمون: به منظور محاسبه شباهت ژنتیکی بر مبنای ضریب نی میزان تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها، از ماتریس شباهت بر مبنای ضریب نی (۱۹۷۲) استفاده شد (جدول آورده نشده است). جفت نمونه‌های V3 و V4 (*Berberis vulgaris*) بیشترین شباهت نسبت به هم (۱/۰) و نمونه‌های Ma (*Mahonia aquifolium*) و Bj2 (*Berberis integerrima*) کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۴) را نسبت به هم داشتند. در مجموع گونه ماهونیا بیشترین فاصله ژنتیکی را با دیگر نمونه‌ها نشان داد.

نتایج تجزیه خوشه ای بر اساس شباهت ژنتیکی (۱۶) و به روش UPGMA حاکی از وجود دو گروه اصلی با ضریب شباهت ۰/۴۸ است که دو جنس ماهونیا و زرشک را از هم جدا می‌کند. گروه اول شامل *Mahonia aquifoluim* است که از خانواده زرشک و جنس ماهونیاست. گروه دوم شامل دو زیر گروه گونه‌های زینتی *Berberis thunbergii* و *B. gagnepaini* می‌باشد که در دو گروه جداگانه قرار گرفته اند. زیرگروه سوم نمونه‌های منطقه کلات را تشکیل می‌دهند که در کنار هم و بطور جداگانه در ضریب شباهت ژنتیکی ۰/۷۷ قرار گرفته اند. در ضریب شباهت ژنتیکی ۰/۷۹ تا ۰/۹۲ نمونه‌های متعلق به گونه *B. integerrima* و مناطق بجنورد، شیروان، باجگیران و قاین قرار گرفته اند. زیرگروه بعدی در ضریب شباهت ۰/۹۶ نمونه‌های زرشک بی دانه (*B. vulgaris*) است که با وجود فاصله زیاد مناطق رویش آنها در زمان جمع آوری، شباهت بسیار زیادی با هم دارند و در یک گروه قرار گرفته اند (شکل ۲). زیرگروه دیگر نمونه‌های متعلق به گونه *B. integerrima* می‌باشند که ضریب شباهت نی در آنها بین ۰/۸۵ تا ۰/۹ است و نشان دهنده میزان بالای شباهت ژنتیکی بین آنها می‌باشد.

تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی[1]: نمودار دو بعدی که جهت گروه بندی و بررسی روابط بین نمونه‌ها ترسیم شد (شکل ۳)، بیانگر فاصله قابل ملاحظه میان نمونه‌های *Mahonia aquifolui*، *Berberis gagnepaini* و *B. thunbergii* و نمونه‌های متعلق به منطقه کلات (*Berberis sp.*) از دیگر نمونه‌هاست. داده‌های این تجزیه به همراه نتایج گروه بندی بر پایه تجزیه خوشه ای (Cluster analysis) و شباهت ژنتیکی (Genetic Similarity) بدست آمده از ضریب نی در ماتریس شباهت، نشان داد که گونه *Mahonia aquifolium* در فاصله ای دور از دیگر نمونه‌ها و گروهی کاملاً مجزا قرار گرفته است. هر چند جنس ماهونیا به تازگی طی بررسی‌های مورفولوژیکی از جنس زرشک جدا گشته است اما رابطه خویشاوندی آن با جنس زرشک درهاله ای از ابهام قرار دارد (۱۵). مطالعه حاضر نیز نشان داد که جنس ماهونیا حقیقتاً جنسی جدا از جنس زرشک می‌باشد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که با توجه به فاصله زیادی که نمونه‌های زرشک منطقه کلات از دیگر

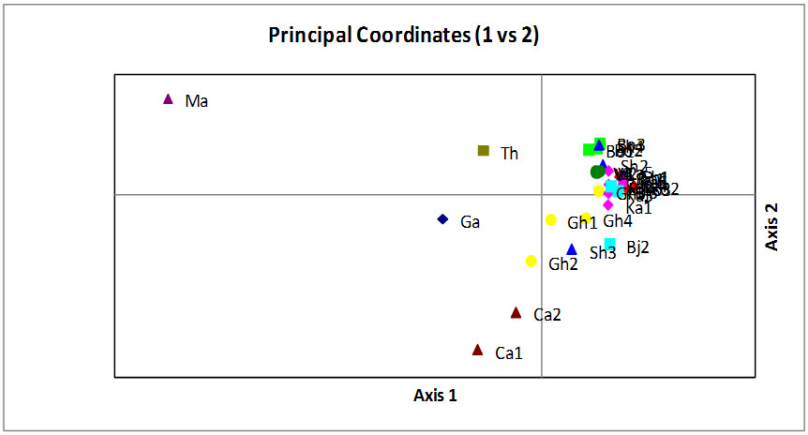
1- Principal Co-ordinate Analysis

نمونه‌ها دارند، احتمالا گونه ای متفاوت از دیگر نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه خراسان هستند که نیاز به مطالعات گیاهشناسی بیشتر برای شناسایی دقیق آن می‌باشد.



شکل(۲) دندروگرام بدست آمده از روش UPGMA و ضریب نی برای ۳۳ نمونه زرشک با استفاده از نشانگرهای AFLP

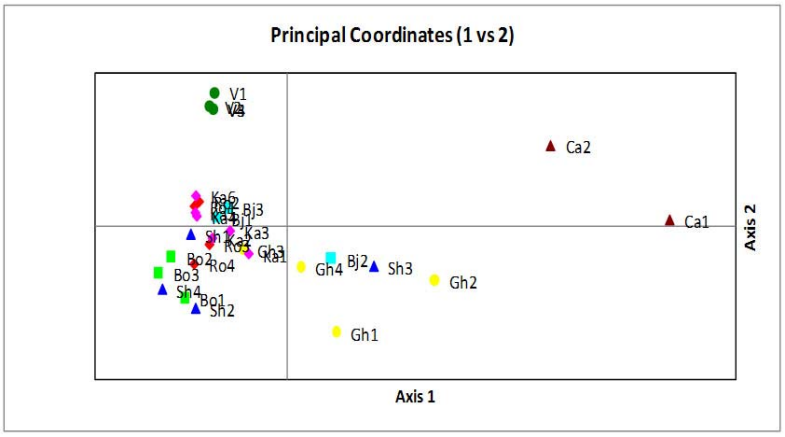
شکل (۱) نیمرخ ژل پلی‌اکریلامید واسرشت نشاندهنده‌ی الگوی باندی AFLP ۳۳ نمونه با ترکیب آغازگری (M-CCT/E-AGC



شکل (۳) رابطه میان ۳۳ نمونه زرشک مورد آزمون با استفاده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار GenAlExe و ضریب نی. مؤلفه اول (PC1) و دوم (PC2) که در مجموع ۶۵٪ کل تنوع را در بر می‌گیرند.

به منظور مطالعه بهتر تنوع، ساختار ژنتیکی و رابطه میان جمعیت‌های زرشک بومی استانهای خراسان و به علت تفاوت فاحشی که ۳ نمونه *Mahonia aquifoluim*، *B. gagnepaini* و *B. thunbergii* با بقیه نمونه‌ها نشان دادند،

در آنالیز دوم PCoA ، این نمونه‌ها حذف شدند تا فاصله میان دیگر نمونه‌ها آشکارتر گردد. بنابراین با ۳۰ نمونه و ۸ جمعیت مربوط به استان خراسان تجزیه PCoA انجام و نمودار دو بعدی آن رسم شد. در این حالت فاصله قابل توجه نمونه‌های منطقه کلات و نمونه‌های زرشک بی دانه از دیگر نمونه‌ها آشکارتر گردید (شکل ۴). بطوریکه شباهت میان نمونه‌های هر منطقه نیز نمایان تر می‌باشد. گونه *Berberis integerrima* طبق بررسی‌های مهندس جوهرچی، گونه زرشک وحشی غالب در خراسان شمالی، رضوی و جنوبی می‌باشد و به نظر می‌رسد آنچه که در این مطالعه بدست آمد نزدیک به واقعیت است و نمونه‌های جمع آوری شده احتمالاً نمونه ای مناسب از گونه‌های موجود در این مناطق هستند و نتایج حاضر را می‌توان با اطمینان نسبی در مورد جمعیت‌های موجود در منطقه بکار برد. همچنین تنوع قابل توجه بین جمعیت‌های گونه *B. integeriima* که طی آنالیزهای مختلف در این پروژه مشاهده شد، با آنچه که بررسی‌های مورفولوژیکی نشان می‌دهد (۲) مطابقت دارد و احتمالاً این تفاوتها مربوط به زیرگونه‌های مختلف این گونه می‌باشد. در واقع علی رغم آنکه شش جمعیت رشتخوار، کاشمر، باجگیران، بجنورد، شیروان و قاین متعلق به یک گونه می‌باشند، اما احتمالاً جدایی جغرافیایی همراه با درصد بالای خودگشنی، باعث تفاوت هرچه بیشتر بین توده‌های وحشی این گونه شده است.



شکل (۴) رابطه میان ۳۰ نمونه زرشک استان‌های خراسان با استفاده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار GenAlExe و ضریب نی. مؤلفه اول (PC1) و دوم (PC2) در مجموع ۶۰٪ کل تنوع را در بر می‌گیرند.

آنالیز مولکولی ساختار جمعیت‌های زرشک استان‌های خراسان: شاخص برآورد تنوع ژنتیکی و میزان چند شکلی برای هر جمعیت با استفاده از نرم افزار Popgene 32 محاسبه گردید (جدول۲). تنوع ژنی (h) که شاخصی از میزان تنوع می‌باشد، در مجموع ۳۳ نمونه مورد آزمون برابر با ۰/۱۸۱ می‌باشد. این در حالی است که در هر جمعیت h دارای مقادیر ۰/۱ و کمتر می‌باشد. حداقل میزان h (تنوع ژنی) و چند شکلی مربوط به جمعیت زرشک زراعی (۰/۰۰۸ و ۲/۶۹٪) می‌باشد و جمعیتهای شیروان (۰/۱۱۶ و ۳۴/۵۳٪)، قاین (۰/۱۱۵ و ۳۲/۲۹٪) و کلات (۰/۱۱۰ و ۲۶/۴۶٪) بیشترین میزان تنوع ژنی و چند شکلی را دارا می‌باشند. قرار گرفتن نمونه‌های زرشک بی دانه در یک گروه و با حداقل فاصله ژنتیکی نسبت به یکدیگر و میزان بسیار پایین تنوع در داخل جمعیت آنها با وجود فاصله قابل توجهی که نمونه‌ها

در زمان جمع آوری از یکدیگر داشته اند، مؤید این فرضیه است که حتی پس از گذشت دهها سال کشت و کار این گیاه در باغات مختلف استان خراسان جنوبی، به علت تکثیر غیر جنسی آن، تنوع ژنتیکی میان این نمونه‌ها بسیار کم و تفاوتهای ظاهری بین نمونه‌های مختلف واقعی نیستند.

جدول(۲) شاخصهای تنوع و میزان چند شکلی برای هر جمعیت

جمعیت	h	تعداد مکانهای چند شکل	درصد چند شکلی
رشتخوار	۰/۰۵۷	۳۵	٪۱۵/۷۰
بجنورد	۰/۰۵۰	۲۹	٪ ۱۳/۰۰
شیروان	۰/۱۱۶	۷۷	٪۳۴/۵۳
قائن	۰/۱۱۵	۷۲	٪ ۳۲/۲۹
کاشمر	۰/۰۸۸	۵۶	٪۲۵/۱۱
باجگیران	۰/۰۹۱	۵۰	٪ ۲۲/۴۲
کلات	۰/۱۱۰	۵۹	٪۲۶/۴۶
زراعی	۰/۰۰۸	۶	٪۲/۶۹
کل	۰/۱۸۱	۱۶۶	٪۷۴/۴۴

مقایسات دوبدوی جمعیت‌های استانهای خراسان در ماتریس شباهت نی (جدول آورده نشده) نشان دهنده میزان شباهت ژنتیکی آنها می‌باشد. بر این اساس دو جمعیت بجنورد و شیروان (۰/۹۴۰) و رشتخوار و شیروان (۰/۹۳۰) دارای بیشترین شباهت ژنتیکی و دو جمعیت بجنورد و کلات (۰/۷۲۹) و زرشک بی دانه و کلات (۰/۷۳۸) دارای کمترین شباهت ژنتیکی نسبت به همدیگر می‌باشند. در مجموع طبق آنچه انتظار می‌رفت، هر کدام از گونه‌های *Berberis sp.* (نمونه منطقه کلات) و *Berberis vulgaris* (نمونه‌های زرشک زراعی) در گروههای جداگانه و طبق ترتیب قبل قرار گرفته اند و جمعیتهای مربوط به گونه *Berberis integerrima* دریک گروه جدا در ضریب شباهت ۰/۹ قرار گرفته اند. این دندروگرام به خوبی نشان دهنده رابطه میان جمعیتها و گونه‌های موجود در منطقه خراسان می‌باشد.

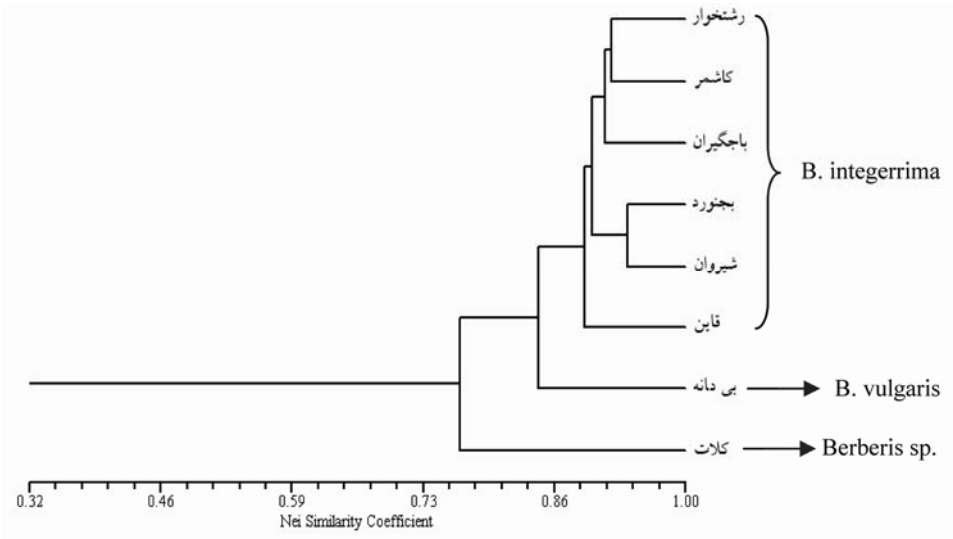
برای مطالعه ساختار جمعیتهای زرشک منطقه خراسان، شاخص Fst [1] (Fixation Index Fst) (۱۷) محاسبه گردید. بر این اساس Fst در مجموع برابر با ۰/۴ بدست آمد. بیشترین میزان Fst جمعیتها را جمعیت زرشک زراعی دارا می‌باشد و کمترین آن مربوط به جمعیتهای شیروان، قاین و کلات است (جدول۳). همچنین میزان جریان ژنی Gene (Flow) یا Nm در هر جمعیت نشان داد که جمعیتهایی که میزان Fst آنها کمتر و تنوع ژنتیکی داخل آنها زیاد است دارای جریان ژنی بیشتری می‌باشند (جدول ۳). در واقع زمانی که میزان Fst بیشتر از ۰/۲۵ باشد میزان Nm کمتر از ۱ خواهد شد که چندان زیاد نیست (۲۷).

شاخص Fst در تمام جمعیتها نیز محاسبه گردید. بالا بودن میزان Fst جمعیتهای زرشک وحشی بومی استان‌های خراسان مانند توده‌های منطقه رشتخوار، بجنورد، کاشمر و باجگیران و به ویژه جمعیت زرشک زراعی بدان معناست که این جمعیتها دارای پراکندگی ژنی کم بوده و فراوانی ژنی آنها رو به کاهش است. به عبارت دیگر افراد داخل هر جمعیت مشابه یکدیگرند و جمعیتها بطور قابل توجهی از هم متفاوتند.

تنوع ژنتیکی به موجودات زنده کمک می‌کند تا با تغییرات محیطی موجود مقابله کنند. در نتیجه هتروزایگوسیتی کم، تولید مثل و بقاء موجودات زنده

1 - Wright's F statistics

کاهش می‌یابد. گونه‌هایی مانند زرشک که جمعیتهای کوچک پراکنده ای را در برخی مناطق کشور و بخصوص استان خراسان، تشکیل داده اند و دارای درصد بالای خودگشنی نیز می‌باشند، در معرض هموزایگوسیتی و فرسایش ژنتیکی قرار دارند. با یکسان در نظر گرفتن سایر شرایط، گونه‌هایی که ژنهای آنها به طور وسیعی پراکنده شده و فراوانی ژنی آنها حفظ می‌شود، باید Fst پایینی داشته و جمعیتها مشابه هم باشند (۸).



شکل (۵) دندروگرام حاصل از روش UPGMA و ضریب شباهت نی برای ۸ جمعیت استان‌های خراسان.

جدول (۳) میزان شاخص Fst ویژه جمعیت، در ۸ جمعیت مورد آزمون

جمعیت	رشتخوار	بجنورد	شیروان	قاین	کاشمر	باجگیران	کلات	بی دانه
Fst	۰/۴۴	۰/۴۵	۰/۳۳	۰/۳۲	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۳۲	۰/۵۴
Nm	۰/۵۶۸	۰/۵۵۵	۰/۷۵۷	۰/۷۸۱	۰/۶۴۱	۰/۶۵۸	۰/۷۸۱	۰/۴۶۳

آنالیز واریانس مولکولی[1]: در آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) که با نرم افزار GenAlExe 6.1 انجام گرفت، این امکان وجود دارد تا اجزاء واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل تعیین شود. این تجزیه نیز به دلایلی که در بالا ذکر شد، تنها بر روی جمعیتهای بومی استان‌های خراسان انجام گرفت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در مجموع سهم تنوع درون جمعیتها از تنوع بین آنها بیشتر است (جدول ۴).

جدول (۴) جدول آموا (AMOVA)

منابع تغییر	df	SS	MS	Est. Var.	%Var
بین جمعیتها	۷	۳۳۲/۷۵۰	۴۷/۵۳۶	۹/۱۴۱	٪۴۰
داخل جمعیتها	۲۲	۳۰۰/۷۵۰	۱۳/۶۷۰	۱۳/۶۷۰	٪۶۰
کل	۲۹	۶۳۳/۵۰۰		۲۲/۸۱۱	٪۱۰۰

Est.Var.: واریانس محاسبه شده برای داخل و بین جمعیتها

% Var. : درصد واریانس هر منبع تغییر به واریانس کل

1 - Analysis of molecular variance

گر چه نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بیان می‌دارد که از میزان کل واریانس مشاهده شده (۲۲) در مجموع حدود ۴۰٪ (۹/۱۴۱) آن مربوط به بین جمعیتها و ۶۰٪ (۱۳/۶۷۰) آن مربوط به تنوع در داخل جمعیتها می‌باشد، اما این مسئله به دلیل اختلاف اندک میزان Fst دو جمعیت کاشمر (۰/۳۹) و باجگیران (۰/۳۸) با Fst کل (۰/۴) می‌باشد و نشان دهنده آن است که تنوع درون این جمعیتها از تنوع بین جمعیتها چندان زیادتر نیست و این فاصله اندک باعث بالا رفتن سهم تنوع بین جمعیتها نسبت به درون جمعیتها شده است.

بالا بودن میزان Fst جمعیت زرشک زراعی (۰/۵۴) و برخی دیگر از جمعیتهای زرشک وحشی بومی استان‌های خراسان مانند توده‌های منطقه رشتخوار، بجنورد، کاشمر و باجگیران، بدان معناست که این جمعیتها در هر منطقه یک خزانه ژنی بسته را تشکیل داده اند که فراوانی ژنی و تنوع ژنتیکی آن رو به کاهش است و به سمت هموزایگوسیتی و در نتیجه فرسایش ژنتیکی پیش می‌رود. این مسئله از میزان h (شاخصی از تنوع ژنی) در میان نمونه‌های مورد بررسی نیز به خوبی قابل استنباط است (جدول ۲). این در حالی است که در این جمعیتها امکان ایجاد سازگاری‌های کوتاه مدت و بلند مدت به تنشهای محیطی وجود نداشته و این امر می‌تواند به عنوان خطری برای بقاء گونه‌هایی که سازگاری محلی منحصر به فردی با منطقه محل رویش خود پیدا کرده است، محسوب شود. چنانکه طبق مشاهدات عینی رویشگاههای طبیعی این گونه‌ها در خطر تبدیل شدن به مزارع هستند. برای مثال در ناحیه بین مراوه تپه و بیرجند که به عنوان رویشگاه طبیعی *Berberis khorassanica* (گونه بومی استان خراسان) در فلور ایران معرفی شده است (۱۹)، دیگر هیچ نشانی از زرشک وجود ندارد.

از سوی دیگر کم بودن تنوع ژنتیکی در گونه زراعی نشان می‌دهد که امکان اصلاح این گونه بدون استفاده از گونه‌های وحشی خویشاوند بسیار کم و محدود است. این اولین مطالعه در زمینه بررسی ژنتیکی زرشک ایران می‌باشد و می‌تواند به عنوان اولین گام برای انجام مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

۱. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۸۴-۸۳. ۱۳۸۵. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات.

۲. بالندری، الف. و کافی، م. ۱۳۸۱. زرشک فناوری تولید و فرآوری. چاپ اول، ناشر زبان و ادب ، مشهد.

۳. زرگری، ع. (۱۳۶۹). گیاهان دارویی. ویرایش ۳، انتشارات دانشگاه تهران، تهران

4. Ahrendt, L. W. A. 1961. *Berberis* and *Mahonia*: a taxonomic revision. *Journal of Linnian Society Botany*, 57(369): 1-410.
5. Bottini, M. C. J., Greizerstein E. J., and Paggio L. 1999. Ploidy levels and their relationships with the rainfall in several populations of Patagonian species of *Berberis*. *Caryologia*, 52(1-2): 75-80.
6. Bottini, M. C. J., Greizerstein E. J., Aulicino M. B., and L. Poggio. 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. Crow, J. F. 1986. *Basic concepts in population, quantitative, and evolutionary genetics*. New York: W. H. Freeman & Co.
9. Dermen, H. 1931: A study of chromosome number in Two genera of *Berberidaceae*: *Mahonia* and *Berberis*. *Journal of Arnold Arbor*, 12: 281-287.

10. Excoffier, L., Smouse, PE., Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
11. Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Kim, Y.D., Kim, S. H. and Landrum, L. R. 2004. Taxonomic and phytogeographic implications from ITS phylogeny in *Berberis* (*Berberidaceae*). *Journal of Plant Research*, 117 (3): 175-182.
16. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Nature*, 106: 283–292.
17. 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.
18. Peakall, R., Smouse, P. E. 2007. GenAlEx V6.1: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. Canberra: Australian National University.
19. Rechinger, K. 1975. *Flora Des Iranischen Hochlandes und der umrahmenden gebirge*,, Berberidaceae. Vol 11. Academische Druck-U-verganstalt. Graz, Austria. No. 111.
20. Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard R.W. 1984. Ribosomal DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA, 81: 8014-8018.
21. Sanguinetti, C. J., Dias Neto, E. and Simpson, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 17: 915-919.
22. Sastrl, R. L. N. 1969. Floral morphology, embryology, and relationships of the *Berberidaceae*. *Australian Journal of Botany*, 17: 69-79.
23. Shen, Y. 1954. Phylogeny and wood anatomy of *Nandina*. *Taiwania*, 5: 85-92.
24. Tehranifar, A. 2003. Barberry growing in Iran, *Acta Horticulture.(ISHS)*, 620: 193-195.
25. 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.
26. Vos, P. Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, .M .1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
27. Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19:395–420.
28. Yeh, F. C. Yang, R. C. and Boyle, T. 1999. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology center, University of Alberta, Canada. http://www.ulberta.ca/~fyeh/

Assessment of genetic structure and variation of cultured and wild *Berberis* populations of Khorasan provinces located in Iran using AFLP markers

S. Heidary* - H. Marashi - M. Farsi - A. Mirshamsi[1]

Abstract

Seedless barberry (*Berberis vulgaris* L. var. asperma) is one of the few crops that is cultured only in Iran and southern parts of Khorasan provinces. The Origin of this variety is unknown and there has not been any study aiming to identify phylogenic relationships of this plant with other species existing in Iran. In this study, AFLP markers based on four primer combinations (*EcoR*I/*Tru1*I) were used to evaluate genetic variation and Phylogenic relationship among 30 different samples of wild and cultured barberry belonging to Khorasan provinces namely: Shomali (north), Razavi and Jonubi (south), together with 2 species of ornamental barberry and one sample *Mahonia aquifolium*. Data resulted from cluster analysis, showed that these two genera (*Berberis* and *Mahonia*) form 2 completely distinct groups with a significant genetic distance. These results can clarify the ambiguity of separation procedure between *Mahonia* and *Berberis* genera. Heterozygosity index, Principal co-ordinates analysis (PCoA), Fst Index and analysis of molecular variance (AMOVA) revealed significant difference among wild barberry populations existing in Khorasan provinces; so that, as was expected, observed variation within cultured barberry population was very low and near zero. The results also showed that *Berberis integerrima* is the predominant species in Khorasan provinces. Therefore further molecular and morphological investigations aiming better understanding of the relationships between species and genera of *Berberis* family looks necessary.

Key words: Berberis, AFLP, Genetic diversity

*- Corresponding author Email: soma_cerec@yahoo.com
1- Contribution from College of Agriculture, ferdowsi University of Mashhad