فیلوژنی مولکولی گونه‌های مختلف گیاه دارویی ولیک (*Crataegus* spp.) در ایران بر اساس توالی‌های هسته ای nrDNA ITS

ابوالفضل علیرضالو*[۱]، سرنا آشتو[۲]، نوراله احمدی[۳]، پیمان صالحی[۴]، علی سنبلی[۴]، مهدی عیاری[۳]، حمید حاتمی ملکی[۵]، زهرا اکبری[۶]

۱-استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه ارومیه. ۲- استاد گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه فدریکو دوم ناپولی ایتالیا. ۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس تهران. ۴- به ترتیب استاد و دانشیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی. ۵- استادیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

*نویسنده مسئول: a.alirezalu@urmia.ac.ir

چکیده

سرده ولیک (*Crataegus* L.) متعلق به تیره گل سرخ (Rosaceae) می باشد. کشور ایران یکی از اصلی ترین مراکز تنوع این گیاه دارویی ارزشمند محسوب می‌شود. اندام‌های مختلف ولیک (برگ، گل و میوه) به دلیل برخورداری از انواع فلاونوئیدها و پروآنتوسیانین‌ها اهمیت زیادی در صنایع دارویی دارند. بنابراین با هدف شناخت و بهره‌برداری از پتانسیل ژنوتیپ‌های بومی در کارهای اصلاحی، تنوع ژنتیکی این گیاه در ایران بر اساس توالی های هسته ای nrDNA ITS (۵۶ نمونه گیاهی از ۱۱ استان) مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز مولکولی نشان داد که توالی یابی ناحیه ITS به‌خوبی توانسته، ژنوتیپ ها و گونه‌های مختلف سرده *Crataegus* spp. را از هم جدا نماید که از لحاظ اصلاحی بسیار ارزشمند می‌باشد. در ایران فقط گونه‌های مربوط به Sect. *Crataegus* موجود می‌باشد که از پنج سری (Ser. *Pentagynae*، Ser. *Erianthae*، Ser. *Orientalis*، Ser. *Microphyllae*، Ser. *Crataegus*) تشکیل شده‌اند. در تحقیق حاضر به‌جز Ser. *Microphyllae* بقیه مشاهده شدند. بر اساس نتایج بدست آمده با نرم افزار MEGA6 در شاخه اول از درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌ها، سری Ser. *Orientalis*، در شاخه دوم Ser. *Pentagynae* و Ser. *Erianthae* و در شاخه‌های سوم و چهارم مربوط به Ser. *Crataegus* می‌باشد.

کلمات کلیدی: ولیک، گیاهان دارویی، تنوع ژنتیکی، MEGA6

مقدمه

سرده ولیک (*Crataegus* L.) متعلق به تیره گل سرخ (Rosaceae) می باشد که ۱۵۰ تا ۱۲۰۰ گونه در جهان دارد و پراکنش آن عموما در مناطق معتدل نیمکره شمالی است. اصلی ترین مرکز تنوع آن آسیای صغیر و ایران است (Christensen, 1992). گونه های مختلف ولیک و عصاره های آنها به عنوان داروهای گیاهی در طب سنتی و طب نوین معرفی می شود و عامل اصلی استفاده از آنها در فرآورده های دارویی عموماً به دلیل داشتن اثرات آنتی اکسیدانی، محافظ قلب و عروق، افزایش دهنده جریان خون کرونری و پایین آورنده فشار خون می‌باشد. این گیاهان به طور معمول غنی از انواع پروسیانیدین ها، فلاونوئیدها و تری ترپن ها هستند که ترکیبات اصلی موثره در فعالیت های بیولوژیکی آنها محسوب می شوند (Melikoglu *et al*., 2004). از اندام های مختلف این گیاه، محصولات متنوع به تنهایی و یا در ترکیب با سایر گیاهان دارویی در سراسر اروپا تهیه شده است.

داده‌های مولکولی مخصوصاً توالی DNA برای بازسازی روابط خویشاوندی تکاملی نسبت به سایر روش‌های دیگر از صحت بیشتری برخوردار است. به همین دلیل امروزه به‌ویژه از زمان پیدایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز این روش با استقبال محققین مواجه شده است. در گیاهان سه نوع اصلی از توالی‌های DNA در دسترس هستند. این توالی‌ها شامل توالی‌های هسته‌ای (nDNA)، توالی‌های کلروپلاستی (cpDNA) و توالی‌های میتوکندریایی می‌باشد. توالی‌های میتوکندریایی به علت سرعت تکاملی پایین،

کمتر در بررسی روابط خویشاوندی گیاهان مورد بررسی قرار می‌گیرند. اما توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی در ابعاد وسیعی بدین منظور به کار می‌روند (امیراحمدی، ۱۳۸۹). ناحیه فاصله گذار رونویسی شونده درونی یا ITS، بخشی از DNA ریبوزومی هسته می‌باشد. در این ناحیه، نواحی کدگذار بسیار حفاظت شده (18S nrDNA, 5.8S nrDNA, 26S nr DNA) به همراه نواحی غیر کدگذار (ITS, ETS) قرار دارند. نواحی ITS1 و ITS2 در بالغ شدن و پردازش ریبوزوم نقش مهمی را ایفا می‌کنند (ناحیه ITS ترجمه نمی‌شود به همین دلیل کمتر تحت فشار عملکردی می‌باشد و سرعت بالای تکاملی آن این ناحیه را برای بررسی روابط فیلوژنتیکی مناسب کرده است) (Alvarez and wendel, 2003). در دهه‌های اخیر از داده‌های توالی ITS به عنوان ابزاری برای تعیین روابط فیلوژنتیکی در سطوح پایین تاکسونومی و مخصوصاً سرده‌های نزدیک استفاده شده است (Soltis and Soltis, 2003). بنابراین با هدف شناخت و بهره‌برداری از پتانسیل ژنوتیپ‌های بومی در کارهای اصلاحی، تنوع ژنتیکی این گیاه در ایران بر اساس توالی های هسته ای nrDNA ITS مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این پژوهش ۵۶ نمونه برگی از ۱۱ استان کشور از مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از برگ‌های کاملاً جوان انتخاب و در ازت مایع فریز شدند و نهایتاً به فریز ۸۰- تا زمان استخراج DNA منتقل شدند. قبل از استخراج DNA نمونه‌ها با فریز درایر خشک شده و برای ارزیابی های ژنتیکی به دانشگاه فدریکو دوم ناپولی ایتالیا منتقل شدند.

- استخراج DNA

DNA ژنومی به روش CTAB از نمونه‌های برگی استخراج گردید.

- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA

کیفیت DNA استخراج شده از نظر خصوصیات کمی و کیفی شامل شکستگی و وجود یا عدم وجود RNA همراه مولکول های DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. برای سنجش کمیت DNA نمونه‌های مورد مطالعه از روش اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer) استفاده شد.

- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به کمک دستگاه ترموسایکلر تولیدی شرکت بیومترا (Biometra T-Personal Thermocycler) انجام گرفت.

- آغازگرهای مورد استفاده و شرایط بهینه انجام واکنش PCR

به منظور انجام واکنش PCR برای توالی های هسته ای nrDNA ITS از آغازگرهای JK14 و JK11 استفاده شد (Aceto, 2014). توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای PCR

نام قطعه	توالی
JK14-F	GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG
JK11-R	GCTATGAACCACACTTAACGTCTTA

- الکتروفورز فرآورده های PCR

برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. الکتروفورز به مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت انجام گرفت. سپس از ژل حاصله توسط نور UV با استفاده از دستگاه Gel documentation (Gel Logic 212 PRO, USA) عکس‌برداری صورت گرفت.

- توالی یابی رشته های DNA

بعد از مشاهده ژل محصول PCR با دستگاه ژل داک، تک باندهای قوی از ژل جدا و برش داده شده و خالص سازی DNA انجام گرفت. بعد از انجام مراحل توالی یابی، نمونه‌ها در مرحله پایانی داخل تیوب‌های مخصوصی ریخته شده و در دستگاه توالی یاب (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) قرار داده شدند. در این مرحله عمل توالی یابی رشته‌های DNA انجام گرفت.

پس از اینکه توالی یابی نمونه‌های DNA به اتمام رسید، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار کروماس در قالب فستا ذخیره شده و آنالیزهای مورد نیاز روی داده ها انجام گرفت.

- هم ردیف سازی توالی های DNA

توالی های مناطق هسته با فرمت فستا توسط نرم افزار BioEdit هم ردیف سازی گردیدند.

- آنالیزفیلوژنی

ماتریس داده‌های هم‌ردیف سازی شده برای هر دو قطعه DNA موردنظر با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

بر اساس طبقه‌بندی کریستنسن (۱۹۹۲) پنج بخش برای سرده *Crataegus* در سراسر دنیا در نظر گرفته شده است که شامل Sect. *Mexicanae* Loudon (= Sect. *Oxyacanthae* Loudon)، Sect. *Crataegus*، Sect. *Sanguineae* Schneider، Sect. *Cuneatae* Schneider و Sect. *C. hupehensis* Sarg و *C. shensiensis* Pojarkova می‌باشند. در ایران فقط گونه‌های مربوط به Sect. *Crataegus* موجود می‌باشد که از پنج سری (Ser. *Pentagynae*، Ser. *Erianthae*، Ser. *Orientalis*، Ser. *Microphyllae*، Ser. *Crataegus*) تشکیل شده‌اند. در تحقیق حاضر به جز Ser. *Microphyllae* بقیه مشاهده شدند. در شاخه اول از دندروگرام حاصل از آنالیز داده‌ها، سری Ser. *Orientalis* قرار داشت. از خصوصیات مهم ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مربوط به Ser. *Orientalis* رنگ میوه است، که زرد یا نارنجی (قرمز کم‌رنگ) بوده و بخش خوراکی متمایل به زرد می‌باشد. ارزش خوراکی ژنوتیپ‌های این سری بیشتر از ارزش دارویی آنها می باشد. در شاخه دوم دندروگرام Ser. *Pentagynae* و Ser. *Erianthae* قرار گرفته‌اند. رنگ میوه‌های مربوط به Ser. *Pentagynae* سیاه بوده و از لحاظ اندازه میوه بسیار کوچک می‌باشند. در این سری بذر، بخش اعظم میوه را فراگرفته است. میوه‌های سری Ser. *Erianthae* سیاه متمایل به ارغوانی بوده و از نظر اندازه بزرگتر از Ser. *Pentagynae* می‌باشند. شاخه های سوم و چهارم مربوط به Ser. *Crataegus* می‌باشد که از نظر جمعیت پراکندگی بیشتری نسبت به سری‌های دیگر در ایران دارند. رنگ میوه‌های این سری سرخ و سرخ تیره می‌باشد. اندازه میوه در این سری متوسط می‌باشد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد توالی یابی ناحیه ITS به‌خوبی توانسته، ژنوتیپ ها و گونه‌های مختلف سرده *Crataegus* spp. را از هم جدا نماید که از لحاظ اصلاحی بسیار ارزشمند می‌باشد.

منابع

1. Christensen, K. (1992). Systematic botany monographs (Revision of *Crataegus* and Nothosect). Crataeguineae (Rosaceae-Maloideae) in the old world, vol:35 THE. American society of plant taxonomists.
2. Melikoglu, G., Bitis, L. and Mericli, A.H. (2004). Flavonoids of Crataegus microphylla. Natural Product Research, Vol. 18, No. 3, pp. 211–213.
3. Soltis, D. E. and Soltis, P. S. (2003). The Role of phylogenetics in Comparative Genetics. Plant Physiology, 132:1790-1800.
4. Alvares, L. and Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29(3): 417-434.
5.

Molecular phylogeny of *Crataegus* spp. based on nrDNA ITS sequences in Iran

A. Alirezalu[*1], S. Aceto[2], N. Ahmadi[3], P. Salehi[4], A. Sonboli[4], M. Ayyari[3], H. Hatami Maleki[5], Z. Akbari[6]

1-Department of Horticultural Sciences, Urmia University. 2- Department of Genetics, University of Naples Federico II. 3- Department of Horticultural Sciences, Tarbiat Modares University. 4- Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University. 5- Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Maragheh.

*Corresponding author: a.alirezalu@urmia.ac.ir

Abstract

The genus *Crataegus* L. (Hawthorn) belongs to the Rosaceae family. Iran is one of the biodiversity centers of *Crataegus* and there are more than 27 species found in Iran. Due to its positive effects on the cardiovascular system, hawthorn has recently become quite a popular herbal medicine in phytotherapy. This study was undertaken in order to examine the genetic diversity (based on internal transcribed spacer (ITS) regions) in 56 accessions of *Crataegus* spp. The accessions belonged to several species; *C. pentagyna*, *C. pseudomelanocarpa*, *C. monogyna*, *C. meyeri*, *C. songarica*, C. *azarolus* var. *aronia*, C. *azarolus* var. *pontica*, *C. curvisepala*, *C. pseudoheterophylla*, *C. szovitisii*, *C. persica*, *C. arosanguinea*, *C. orientalis*, *C. sakranensis*, *C. turkestanica*. We constructed a phylogenetic tree based on ITS sequence data. Result showed that DNA sequencing is a good tool for species identification and estimation of genetic distance. In Iran, the only species of Sect. *Crataegus* is available in five series Ser. *Pentagynae*, Ser. *Erianthae*, Ser. *Orientalis*, Ser. *Microphyllae*, Ser. *Crataegus*. In this study, except Ser. *Microphyllae* other series were detected. Based on the results obtained with the MEGA6 software, in the first branch of the phylogenetic tree had the series Ser. *Orientalis*, the second branch Ser. *Pentagynae* and Ser. *Erianthae* and the branches of the third and fourth series were Ser. *Crataegus*.

Key words: Hawthorn, Medicinal plants, Genetic diversity, MEGA 6