بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ های ایرانی زرشک با استفاده از نشانگر اس اس آر

مهدی رضائی (١)، علی عبادی (٢)، محمد رضا فتاحی مقدم (٣)، احمد بالندری (٤)

١- استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود ٢- دانشیار و ٣- استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران ٤- عضو هیأت علمی سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران- پارک علم و فن آوری مشهد مرکز خراسان

رقم باغی زرشک بی دانه و زرشک های وحشی در مناطق مختلف ایران استفاده های غذایی، صنعتی و دارویی دارند. مشخص نبودن منشاء زرشک بی دانه و همچنین عدم وجود اطلاعات کافی در مورد تنوع گونه های وحشی از مسائل پیش روی اصلاح این محصول می باشد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ٤٥ نمونه زرشک جمع آوری شده از منطقه خراسان شامل گونه های وحشی و رقم بی دانه به همراه دو گونه *Berberis vulgaris* و *B. thunbergii* با استفاده از هفت جفت آغازگر ریزماهواره طراحی شده برای گیاه ماهونیا مورد بررسی قرار گیرد. در مجموع ١٠١ آلل با میانگین ١٤/٢٨ آلل در هر مکان ریز ماهواره به‌دست آمد. تعداد آلل در مکان های ژنی در محدوده ٦ تا ٣٥ عدد قرار گرفت. قدرت تفکیک کنندگی آغازگرها با میانگین ٠/٨٠ در محدوده بین ٠/٦٦ تا ٠/٩٢ قرار داشت. شاخص شانون برای هر مکان ژنی بین ١/٨ تا ٤/١٢ برآورد گردید. نتایج نشان داد که آغازگرهای GA33 و CA04 کارایی بالاتری نسبت به بقیه آغازگرها در تفکیک ژنوتیپ ها داشتند. ضریب تشابه بین ژنوتیپ ها در محدوده ٠/٠٩ تا ٠/٩٨ به‌دست آمد. نتایج تجزیه خوشه ای و تجزیه به مختصات اصلی نشان دهنده قرابت بالای زرشک های باغی بی دانه و گونه *B. khorasanica* به گونه *B. integerrima* بود و همچنین تنوع ژنتیکی بالایی در گونه های زرشک منطقه شاهرود مشاهده شد. نتایج نشان داد که نشانگر ریزماهواره با چند شکلی بالا ابزار مناسبی در شناسایی ارقام، بررسی تنوع ژنتیکی، تعیین روابط درون و بین گونه ای زرشک می باشد.

واژهای کلیدی: زرشک، تجزیه خوشه ای، تنوع ژنتیکی، نشانگر ملکولی ریزماهواره

مقدمه

در ایران طبق نظر گیاهشناسان، پنج گونه وحشی زرشک وجود دارد که شامل زرشک معمولی (*Berberis vulgaris*)، زرشک راست خوشه (*B. orthobotrys*)، زرشک خراسانی (*B. khorasanica*)، زرشک زالزالکی (*B. crataegina*) و زرشک زرافشانی (*B. integerrima*) می باشند (Kafi & Balandari, 2002). در مورد گونه های زرشک موجود در ایران به خصوص زرشک های زرافشانی و زالزالکی اسامی علمی مشابه زیادی وجود دارد و به نظر می رسد زرشک خراسانی بومی ایران باشد (Kafi & Balandari, 2002). گونه باغی زرشک که در خراسان کشت و کار می شود تحت نام های مختلف گزارش شده است؛ قهرمان (١٣٧٥)این گونه را تحت نام *B. khorasanica* معرفی کرد و ثابتی (١٣٧٦) آن را به عنوان یک گونه ناشناخته معرفی و تحت نام *Berberis Sp.* آورده است. این گیاه تحت نام های *B. vulgaris* L. var *asperma* و *B. orientalis* Ck Schn *var asperma* نیز گزارش شده است و منشاء این گیاه مورد تردید می باشد (Sabeti, 1966; Ghahreman, 1997; Kafi & Balandari, 2002). کاربرد نشانگرهای ملکولی در بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام روشی معمول است.

در این مطالعه با استفاده از هفت جفت آغازگر ریزماهواره طراحی شده برای ماهونیا، تنوع زرشک های طبیعی موجود در ژرم پلاسم جمع آوری شده از منطقه شرق و شمال شرق ایران بررسی و رابطه این گونه با زرشک بی دانه باغی ارزیابی گردید.

مواد و روش ها

٤٢ نمونه گیاهی زرشک در این مقاله مورد بررسی قرار گرفت . ٤٠ نمونه شامل ٣ نمونه از رقم باغی بی دانه زرشک، ١٢ نمونه *B. integerrima*، ٣ نمونه *B. khorasanica*، ٣ نمونه *B. cratagenia*، ١ نمونه *B. orthobotrys* و ١٨ نمونه شناسایی نشده (به دلیل داشتن صفات بینابینی قابل شناسایی نبودند)، از مناطق بیرجند و قائن واقع در استان خراسان جنوبی، منطقه شاهرود واقع در استان سمنان و منطقه رامیان و شهرستان گرگان و گنبد از استان گلستان در کشور ایران که در کلکسیون پارک علم و فن اوری مشهد جمع آوری شده بودند. سن درختچه های واقع در کلکسیون ٦ سال بود دو نمونه دیگر

از کشور آلمان منطقه پلینز پلاز شهر درسدن شامل یک نمونه *B. vulgaris* و یک نمونه *B. thunbergii* بود. DNA از نمونه برگ های کاملاً توسعه یافته در فصل بهار استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA ژنومی با استفاده از ژل آگاروز یک درصد تعیین و نمونه ها به غلظت۲۰ نانو گرم رقیق گردید. هفت جفت آغازگر ریزماهواره برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفت (Rub and Durka 2006). واکنش تکثیر با حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر با PCR انجام گرفت. برای طول یابی آلل ها از دستگاه کاپیلاری(Genetic Analyzer) Beckman Coulter® ، استفاده شد و طول هر یک از آلل های تکثیر شده با نرم افزار GenomeLab™ (Applied Biosystems, USA) محاسبه و ثبت گردید. داده بصورت آللی با نرم افزارهای Darwin وPowerMarker مورد آنالیز قرار گرفتند.

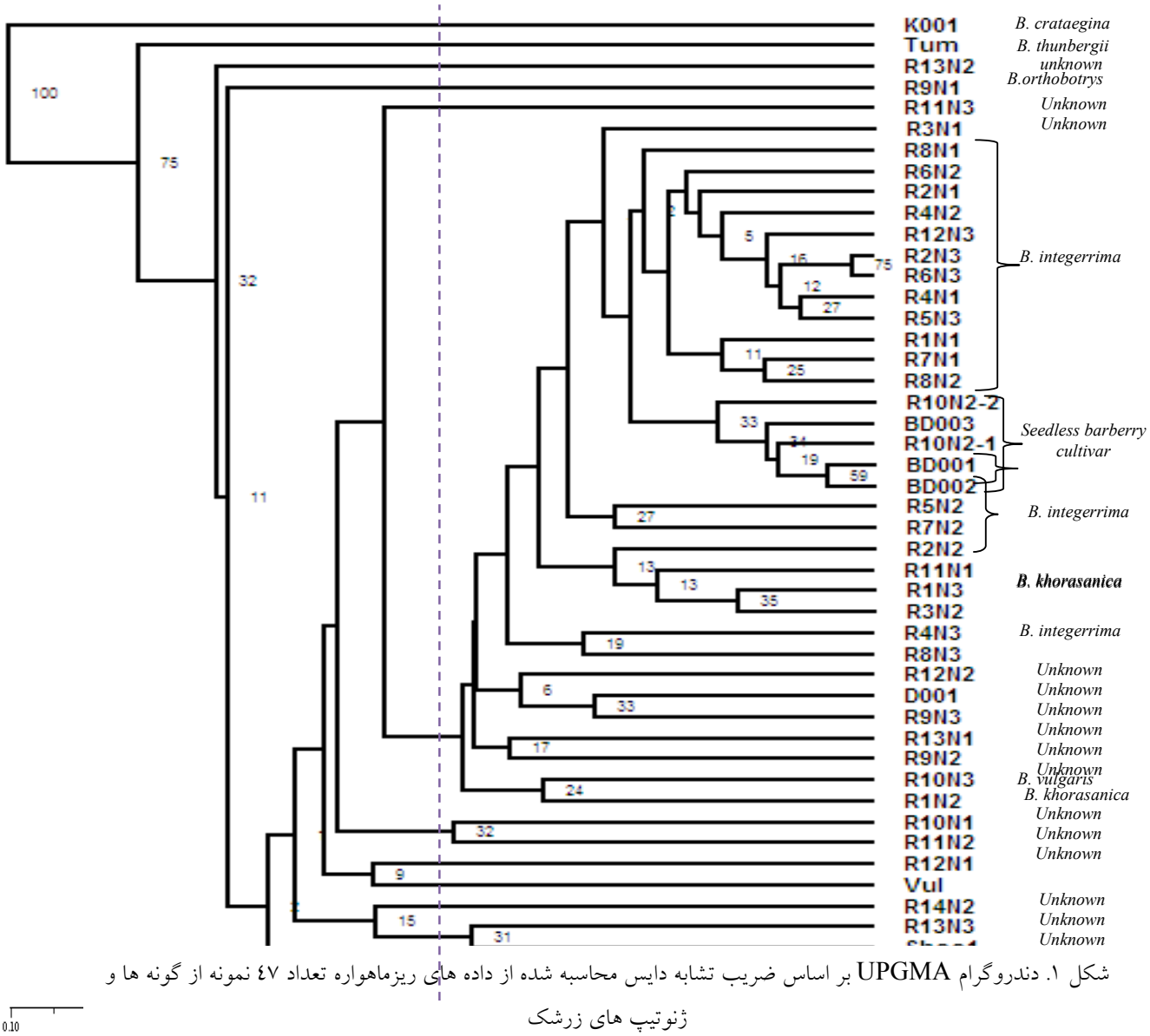
نتایج وبحث

روش کاپیلاری طول یابی آلل های SSR توانست به خوبی الگوی باندی محصولات PCR حاصل از آغازگر های SSR را تفکیک کند. تعداد آلل های تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر در اکثر موارد بین سه عدد تا پنج عدد در هر مکان ژنی متغییر بود. بیشترین تعداد آلل مربوط به جفت آغازگر GA33 با ۳۵ آلل و کمترین تعداد آلل به میزان ٦ عدد از جفت آغازگر GA05بدست آمد. دامنه الگوی باندی در آغازگرها بین ۵ تا ٣٤ الگو بود که بیشترین تعداد الگوی باندی در جفت آغازگرهای CA04 و GA33 مشاهده شد. شاخص هتروزیگوتی با متوسط ۰/۷۸ و در محدوده ۰/٦۵ تا ۰/۹۰ قرار گرفت. قدرت تفکیک کنندگی آغازگرها نیز در محدوده ۰/٦٦ تا ۰/۹۲ قرار گرفت. آغازگرهای CA04 و GA33 دارای بیشترین قدرت تفکیک کنندگی (۰/۹۲) و جفت آغازگر GA05 دارای کمترین قدرت تفکیک کنندگی(۰/٦٦) بودند. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ R2N3 با ژنوتیپ R6N3 (۹۸ ٪) مشاهده شد. این دو ژنوتیپ با ژنوتیپ های R4N1 و R5N3 بالای ۹۰ درصد شباهت داشتند. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ های بی دانهBD001، BD002 حدود ۹٦ ٪ بدست آمد. تجزیه خوشه ای حاصله از روش UPGMA همخوانی نسبتاً بالایی را با ماتریس تشابه نشان داد(r=۰/۹۲). ژنوتیپ های K001، Tum، R13N2، R9N1، R11N3، R12N1، R14N2 و Vul در درصد تشابه ۰/۵۵ هرکدام در یک شاخه جداگانه و جدا از سایر ژنوتیپ ها قرار گرفتند. بر اساس نتایج ژنوتیپ های بی دانه و کم دانه زرشک در میان ژنوتیپ های گونه *B. integerrima* قرار گرفتند(شکل ۱).

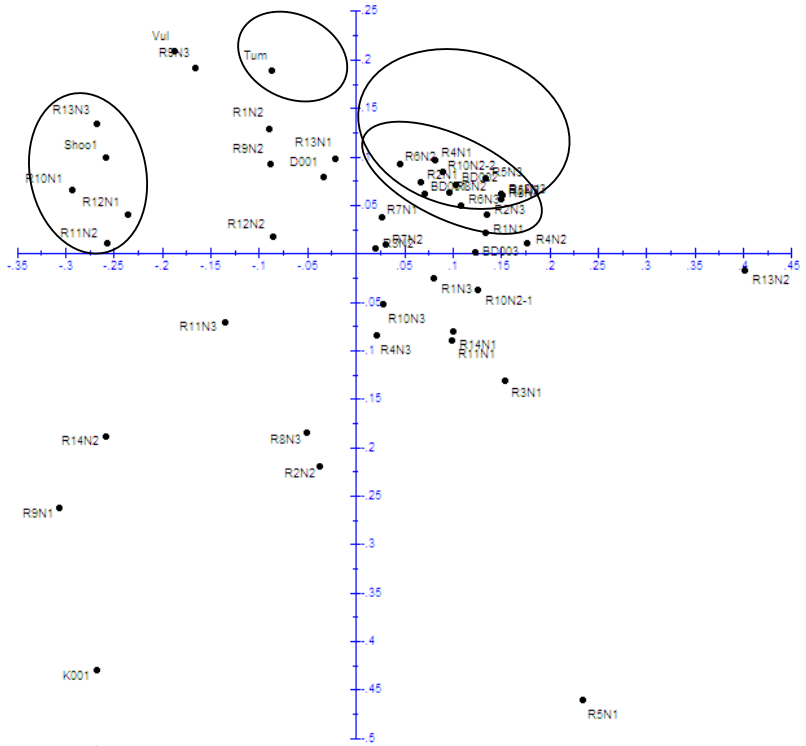
نمودار تجزیه دوبعدی با استفاده از دو عامل اصلی که به ترتیب ۱۷/۷۳ و ۱۳/۰٦ درصد واریانس ژنتیکی را توجیه نمودند؛ ترسیم گردید. گروه بندی حاصله و پراکنش گونه ها در پلات ترسیم شده از الگوی کلی بدست آمده تجزیه خوشه ای آنها پیروی کرد(شکل ۲). تعدادی از ژنوتیپ ها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند و بقیه ژنوتیپ ها به صورت پراکنده در پلات ها قرار گرفتند(شکل ۲). ژنوتیپ های Vul(*B.vulgaris*)، Tum(*B. thunbergii*)، K001 (*B. crataegina*)، R5N1، R14N2، R9N1(*B. orthobotrys*)، R9N3، R11N3، R13N2، R8N3 و R2N2 به صورت کاملاً جدا از ژنوتیپ های مورد بررسی قرار گرفتند. ژنوتیپ های R13N3، Sh001، R10N1، R12N1، R11N2 در یک گروه، ژنوتیپ های R13N1، D001، R1N2 و R9N2 در گروه دیگر و ژنوتیپ های R10N3، R4N3، R14N1، R11N1 و R3N1 در گروه بعدی قرار گرفتند. بقیه ژنوتیپ ها که اکثراً از منطقه خراسان جنوبی بودند و شامل گونه های *B. integerrima*، *B. khorasanica* و ژنوتیپ های زرشک های باغی بودند در یک گروه قرار گرفتند(شکل ۲)

در تجزیه خوشه ای آنالیز به فاکتور های اصلی، ژنوتیپ های جمع آوری شده از منطقه جنوب خراسان را از دیگر ژنوتیپ ها جدا کرد. ژنوتیپ های جمع آوری شده از منطقه شاهرود و گرگان در چندین گروه قرار گرفتند که نشان از تنوع بالای بین گونه ای در این منطقه دارد. ژنوتیپ های جمع آوری شده از منطقه جنوب خراسان (بیرجند و قائن) متعلق به گونه *B. integerrima* بودند. نزدیکترین گونه به ارقام زرشک بی دانه گونه *B. integerrima* بود.

گونه باغی زرشک طبق نظر اکثر محققین متعلق به گونه *vulgaris* و با نام علمی *B. vulgaris var asperma* می باشد(Ghahreman, 1997; Kafi & Balandari, 2002). تجزیه خوشه ای و ماتریس تشابه نشان دهنده قرابت زیاد زرشک باغی به گونـــــه *B. integerrima* می باشد و اکثر گونه های اینتگریما در این بررسی مربوط به منطقه بیرجند و قائن بودند و همان گونه که قبلاً ذکر گردید این مناطق بیشترین میزان کشت زرشک بی دانه را دارا می باشند. بنابراین به نظر می رسد احتمالاً زرشک باغی بی دانه حاصل جهش در *B.integerrima* بوده باشد که در اثر انتخاب و اهلی سازی توسط کشاورزان منطقه گسترش یافته است.



شکل ۱. دندروگرام UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس محاسبه شده از داده های ریزماهواره تعداد ٤٧ نمونه از گونه ها و ژنوتیپ های زرشک



شکل ۲. تجزیه دوبعدی ٤۷ نمونه زرشک براساس ماتریس تشابه دایس بدست آمده از هفت جفت آغازگر SSR

Reference

Browicz, K.Zielinski, J. (1975). Flora Iranica: no. 111. Berberidaceae. *Graz: Akademische Druck 16p.-illus., key.. La, En Geog* **2**

Doyle, J.Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12,** 13-15

Ghahreman, A. (1997). Flora of Iran. *Published by Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran* **16,** 1944

Kafi, M.Balandari, A. (2002). Berberis Production and Processin. Ferdowsi University press, Mashhad.

Roß, C. Durka, W. (2006). Isolation and characterization of microsatellite markers in the invasive shrub Mahonia aquifolium (Berberidaceae) and their applicability in related species. *Molecular Ecology Notes* **6,** 948-950

Sabeti, H. (1966). *Native and exotic trees and shrubs of Iran*. University of Tehran

Genetic diversity of some Iranian barberry genotypes with SSR marker

Seedless barberry cultivar and wild types barberry are especial corps that used for food, industrial and medicinal purpose in Iran. There is a little information about genetic diversity of wild type barberry and origin of seedless barberry cultivars. In the present study, genetic diversity of forty five Iranian barberry accessions including seedless cultivar and wild type barberries and two genotypes *Berberis vulgaris* and *B. thunbergi* were studied with seven Mahonia SSR primers. Seven primers produced 101 putative alleles that were used for genetic diversity analysis. The number of putative allele per locus ranged from 6 to 35, with an average 14.28. Power of discriminating with average 0.80 ranged from 0.66 to 0.92. Shanon index ranged from 1.8 to 4.12. Results indicated that GA33 and CA04 primers have high efficiency in discriminating genotypes. Similarity coefficient ranged from 0.09 to 0.98. Result of cluster and principle component analysis indicated high relationship among seedless barberry cultivar and *B.khorasanica* with *B.integerrima*. There was high genetic diversity in genotypes that collected from Shahrood region. The SSR marker were highly polymorphic and can be used in cultivar identification and interaspecies genetic diversity in barberry genotype.

Key Word: Barberry, cluster analysis, genetic diversity, SSR markers.