

## بررسی تنوع توده‌های وحشی و زراعی زرشک استان‌های خراسان با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ارزیابی کارایی آن در مطالعات سیستماتیک

سمیه حیدری<sup>۱</sup>، سید حسن مرعشی<sup>۲</sup>، محمد فارسی<sup>۲</sup>، امین میرشمسی کاخکی<sup>۲</sup>

### 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. با این حال هیچگونه تحقیقاتی در زمینه شناسایی، بررسی تنوع و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های زرشک بی دانه و گونه‌های 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 خصوص با روابط خویشاوندی گونه‌های موجود در این خانواده وجود دارد که اغلب ناشی از اختلاف کارایی روش‌های مختلف می‌باشد. بدین منظور برای اولین بار در کشور از نشانگرهای مورفولوژیکی و ۳۹ صفت جهت بررسی تنوع و رابطه خویشاوندی ۳۳ نمونه زرشک متعلق به ۱۱ منطقه واقع در استان‌های خراسان استفاده شد و با داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی AFLP مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که همبستگی بسیار کمی بین داده‌های 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 می‌شوند و اکثراً صفات رویشی هستند، ارزیابی ضعیف تنوع و همبستگی پایین بین نتایج حاصل از داده‌های مورفولوژیکی و نتایج بدست آمده از نشانگر AFLP می‌تواند دلیل بر کارایی پایین کلید شناسایی فلور ایران در طبقه بندی و بررسی‌های فیلوژنتیکی خانواده زرشک باشد. بنابراین بررسی مولکولی بیشتر با هدف درک بهتر از روابط خویشاوندی بین جنسها و گونه‌های خانواده زرشک ضروری به نظر می‌رسد.

**واژه‌های کلیدی:** زرشک، نشانگر، AFLP، صفات مورفولوژیکی.

### مقدمه

اصلی مطرح شده، بطوریکه ۷۸۷۳ هکتار یعنی 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 زیاد 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 گیاه شناسی و سیستماتیک در این گیاه هم اکنون مورد توجه قرار گرفته است. با این حال ابهامات و

زرشک (*Berberis sp.*) به عنوان یک گیاه دارویی مهم از گذشته‌های دور در ایران و بسیاری از تمدن‌های بزرگ دنیا مطرح شده و مورد استفاده بوده است و هم اکنون با شناخت مواد مؤثره دارویی آن همانند بربرین کاربرد وسیعی در صنایع دارویی پیدا کرده است. زرشک بی دانه یکی از معدود محصولات ویژه و منحصر به فرد است که فقط در کشور ایران تولید می‌شود (۱۹). بسیاری از زمینهای کشاورزی شهرستان‌های قاین و بیرجند در استان خراسان جنوبی 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

آنها نشان داد که تنها جنس‌های زرشک و ماهونیا در این توالی مشترک هستند. این نتایج رابطه فیلوژنتیکی نزدیک آنها را که قبلاً داده‌های کروموزومی، ریخت‌شناسی و سرولوژیکی بیان کرده بود، تأیید می‌کند.

همچنین در مطالعه‌ای که حیدری (۶) بر روی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های زرشک استان‌های خراسان و دیگر گونه‌های 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* می‌باشد که بین جمعیت‌های مختلف آن در استان‌های خراسان تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود دارد. همچنین این تحقیقات نشان داد که در جمعیت زرشک‌های بی دانه تنوع نزدیک به صفر می‌باشد (۴).

از آنجایی که اصلاح گران وجود تنوع مورفولوژیکی را از بدیهی‌ترین و ارزشمندترین ضروریات شروع کار اصلاح می‌دانند، علی‌رغم وجود ابزارها و تکنیک‌های بسیار دقیق، توجه به تنوع صفات مورفولوژیکی و استفاده از آن برای بررسی تنوع ژنتیکی هنوز جایگاه مطلوب خود را حفظ نموده است.

مطالعه حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه خویشاوندی موجود در برخی گونه‌های جنس زرشک استان‌های خراسان به همراه دو نمونه زینتی و یک نمونه از جنس ماهونیا با استفاده از صفات مورفولوژیکی و در تکمیل مطالعات گذشته بر روی نمونه‌های مذکور با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP (۴)، انجام گرفت. علاوه بر آن و به منظور ارزیابی کارایی نشانگرهای مورفولوژیکی از آزمون Mantel جهت مقایسه دندروگرام حاصل از دو نشانگر استفاده گردید.

### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های زرشک بومی مورد استفاده در این تحقیق از ۷ منطقه واقع در استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی بودند. همچنین ۴ نمونه زرشک بی دانه از باغات زرشک اطراف شهرستان قاین و ۲ نمونه زینتی و یک نمونه جنس ماهونیا از پارک علم و فناوری خراسان رضوی واقع در ۱۵ کیلومتری شمال مشهد تهیه شد (جدول ۱). تنوع ژنتیکی موجود در این نمونه‌ها قبلاً با استفاده از نشانگر

اختلاف نظرهایی در موارد مختلف وجود دارد که نیاز به استفاده از روشها و ابزارهای مختلف را ضروری می‌سازد. از آن جمله می‌توان به رابطه خویشاوندی دو جنس زرشک و ماهونیا اشاره کرد. مطالعات سیتولوژیکی (۱۰)، ریخت‌شناسی چوب (۱۸)، شکل گل (۲۰) و مطالعات سرولوژیکی (۱۲) این دو را از یک جنس می‌دانند، اما مطالعات جنین‌شناسی (۱۷) 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 می‌کند (۷).

همچنین منشأ زرشک بی دانه‌ای که در جنوب خراسان پرورش می‌یابد و به نام *B. vulgaris* C. K. Schn. Var. *asperma* Don خوانده می‌شود، (۱۶) 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 می‌باشد، مقایسه روشها و شناسایی نقاط ضعف و قوت در الگوریتم‌های مختلف می‌تواند جهت تلفیق روش‌ها یا استفاده از روش‌های برتر مفید فایده باشد.

در مطالعه انجام شده توسط بوتینی و همکاران (۸) 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. آنها در ادامه تنوع ژنتیکی و رابطه میان جمعیت‌های زرشک در این گونه‌ها را با تکنیک AFLP مورد بررسی قرار دادند. دندروگرام تهیه شده از انگشت نگاری AFLP نشان داد که در مجموع، جمعیت گونه‌های مشابه، گروه‌های وابسته نزدیکی با ضریب تشابه بالا تشکیل داده‌اند. اما در مقایسه با نتایج حاصل از صفات مورفولوژیکی و داده‌های حاصل از نشانگر آیزوزایمی مشخص شد که رابطه معنی داری بین دندروگرام‌های حاصل از این داده‌ها وجود ندارد (۹). کیم و جانسون (۱۴) 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 را شناسایی و جداسازی کردند و توزیع فیلوژنتیک آن را در ۲۵ گونه از زرشک و ماهونیا و ۲۰ گونه دیگر از خانواده زرشک و ۴ گونه از خانواده‌های نزدیک دیگر مورد بررسی قرار دادند. مطالعات

به منظور محاسبه ماتریس فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای مورفولوژیک به روش UPGMA<sup>۱</sup> و ضریب نی (۱۵) و برای تعیین نقش و اهمیت هر صفت در تنوع کل، داده‌های خام به نرم افزار Statistica Ver. 5.5A منتقل گردید. ماتریس فاصله حاصل بر اساس ضریب اقلیدسی به نرم افزار GenALEx 6.1<sup>۱</sup> منتقل و در نهایت با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی<sup>۱</sup>، (۱۱) و با دو مؤلفه از سه مؤلفه اول که بیشترین درصد تنوع را توجیه می‌کردند نمودار دو بعدی جهت گروه بندی و بررسی روابط بین نمونه‌ها ترسیم شد. سپس ماتریس فاصله حاصل از صفات مورفولوژیک و ماتریس فاصله حاصل از نشانگرهای مولکولی AFLP که بر روی همین نمونه‌ها انجام گرفته است (۴) با استفاده از آزمون Mantel (۱۴) و نرم افزار GenALEx 6.1 مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتایج و بحث

تجزیه خوشه‌ای: نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان دهنده

جدول ۲: صفات مورد بررسی در نمونه‌های زرشک مورد آزمون

ردیف	صفت	ردیف	صفت
۱	ارتفاع x شعاع درخچه	۲۱	تاخوردگی برگ
۲	رنگ شاخه های جوان	۲۲	نوک برگ
۳	رنگ شاخه های گلدار (یکساله)	۲۳	حاشیه برگ
۴	شکل شاخه های گلدار (یکساله)	۲۴	اندازه خار
۵	رنگ شاخه های چندساله	۲۵	پهنا و ضخامت خار
۶	شکل شاخه های چندساله	۲۶	زاویه خار با ساقه
۷	شکل انشعابات شاخه ها	۲۷	خمیدگی
۸	شکل کلی رویشی درخچه	۲۸	تعداد شعبه ها
۹	میانگین طول برگهای شاخه های عقیم	۲۹	رنگ خارها
۱۰	میانگین عرض برگهای شاخه های عقیم	۳۰	رنگ نوک خار
۱۱	طول چند برابر عرض	۳۱	نوع گل آذین
۱۲	طول دمبرگ بزرگترین برگها	۳۲	طول گل آذین
۱۳	زاویه برگ با ساقه	۳۳	تعداد گل در گل آذین
۱۴	تراکم برگها روی ساقه	۳۴	زاویه گل آذین با ساقه
۱۵	رنگ پشت برگ	۳۵	تراکم گل آذین
۱۶	رنگ روی برگ	۳۶	زمان گلدهی
۱۷	وجود موم روی برگ	۳۷	رنگ گل
۱۸	وضیعت رنگ برگ اصلی	۳۸	رنگ میوه
۱۹	جنس برگ	۳۹	وجود بذر
۲۰	شکل برگ		

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

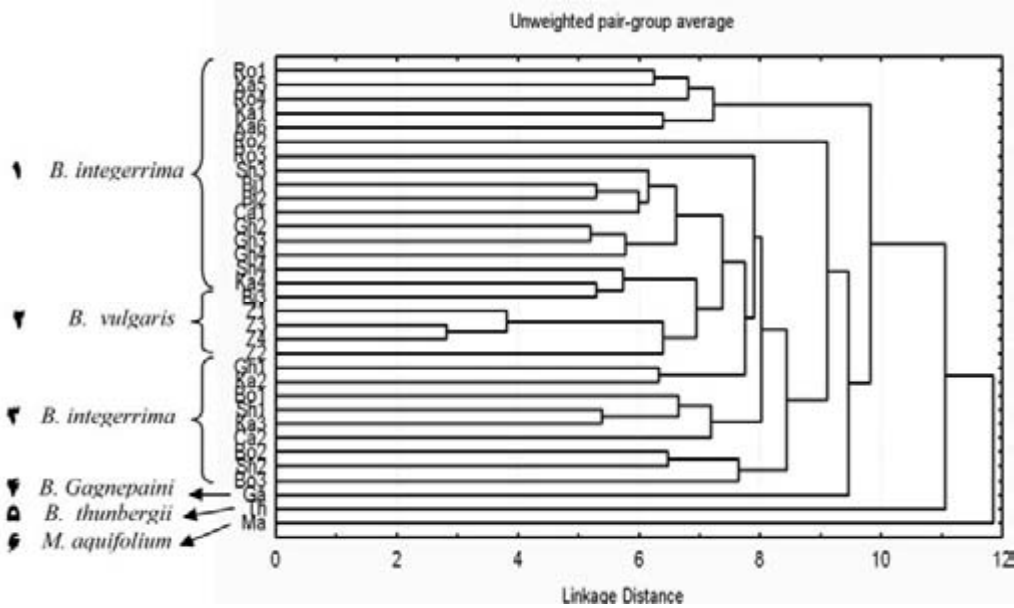
جمعیت	نام نمونه های داخل هر جمعیت	نام گونه	محل جمع آوری نمونه
Pop1	Ro1, Ro2, Ro3, Ro4	<i>Berberis integerrima</i>	رشتخوار زبارنگاه پیر باهو
Pop2	Bo1, Bo2, Bo3	<i>B. integerrima</i>	بجنورد روستای درکش
Pop3	Sh1, Sh2, Sh3, Sh4	<i>B. integerrima</i>	شمال شیروان
Pop4	Gh1, Gh2, Gh3, Gh4	<i>B. integerrima</i>	قائن زبارنگاه پیر مردان شاه
Pop5	Ka1, Ka2, Ka3, Ka4, Ka5, Ka6	<i>B. integerrima</i>	جاده نیشابور - گاشمر روستای چلبو
Pop6	Bj1, Bj2, Bj3	<i>B. integerrima</i>	باجگیران بعد از اندام فلی
Pop7	Ca1, Ca2	<i>B. integerrima</i>	کلات نادر آبشار فوه سو
	V 1	<i>B. vulgaris</i>	قائن بین خضری و زبارنگاه پیر مردان شاه
Pop8	V 2	<i>B. vulgaris</i>	پارک علم و فن آوری خراسان
	V 3	<i>B. vulgaris</i>	قائن روستای بارز
	V 4	<i>B. vulgaris</i>	قائن روستای شیر مرغ
Pop9	Ga	<i>B. gaznepaini</i>	پارک علم و فن آوری خراسان
Pop10	Th	<i>B. Thunbergii</i>	پارک علم و فن آوری خراسان
Pop11	Ma	<i>Mahonia aquifolium</i>	پارک علم و فن آوری خراسان

مولکولی AFLP توسط حیدری (۴) مورد بررسی قرار گرفته است. در فاصله اردیبهشت تا خردادماه که زمان شکوفه دهی زرشک می‌باشد و همچنین در اواخر تابستان که میوه‌ها می‌رسند، ۳۹ صفت مختلف، 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.

بدین منظور برای هر صفت اندازه گیری‌ها در حدود ۱۵ اندام (برگ، شاخه، گل، میوه و خار) انجام و میانگین آنها در هر نمونه قرار داده شد. برای حالات (رتبه‌های) 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. نمونه‌های جمع آوری شده در هر بار یوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد توسط مهندس محمد رضا جوهرچی 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 نمونه‌ها باشند و نمونه‌های هر منطقه به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شدند.

1- Unweighted pair-group method using arithmetic averages  
3- Principal Co-ordinate Analysis (PCoA)

2- Genetic Analysis in Excel Dec 2007



شکل ۱: دندروگرام بدست آمده از ماتریس فاصله ژنتیکی و روش UPGMA برای ۳۳ نمونه زرشک با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک. نمونه‌ها با علامت اختصاری موجود در جدول ۱ مشخص شده‌اند. همچنین شماره هر گروه از ۱-۶ مشخص گردیده است.

جدول ۳: ارزش ویژه، میزان واریانس و واریانس تجمعی در شش مؤلفه اول حاصل از تجزیه PCA

مؤلفه	مقدار ویژه	درصد واریانس کل	درصد واریانس تجمعی
۱	۵/۶۸	۱۴/۱۹	۱۴/۱۹
۲	۳/۱۰	۶/۹۶	۲۴/۱۶
۳	۲/۷۳	۹/۳۴	۳۳/۵۰
۴	۲/۳۶	۸/۴۰	۴۱/۸۹
۵	۲/۷۰	۶/۷۱	۴۸/۶۰
۶	۲/۶۰	۶/۴۸	۵۵/۰۸

گروه بندی و بررسی روابط بین نمونه‌ها ترسیم شد (شکل ۲)، بیانگر فاصله قابل ملاحظه میان نمونه‌های *M. aquifolium* و *B. thunbergii* از دیگر نمونه‌هاست. در بررسی این نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP، داده‌های این تجزیه به همراه نتایج گروه بندی بر پایه تجزیه خوشه‌ای نشان داد که گونه *M. aquifolium* در فاصله‌ای دور از دیگر نمونه‌ها و گروهی کاملاً مجزا قرار گرفته است. علاوه بر این در شکل ۲ با وجود قرار گرفتن نمونه‌های زرشک زراعی (*B. vulgaris*) در کنار هم، فاصله قابل توجهی با سایر نمونه‌ها نشان نمی‌دهد (۴). قرار گرفتن

جدایی دو جنس ماهونیا و زرشک در سطح شباهت ۸٪ و در دو گروه جداگانه است. این در حالی است که در دندروگرام حاصل از نشانگرهای AFLP این جدایی در سطح شباهت ۵۰٪ اتفاق افتاده است و دو جنس *Berberis* و *Mahonia* در دو گروه کاملاً مجزا قرار دارند. در سطح شباهت ۱۷٪ گونه *B. thunbergii* نیز در یک گروه جداگانه قرار می‌گیرد. دیگر گونه‌های مربوط به جنس زرشک یعنی گونه‌های *B. integerrima*، *B. vulgaris* و *B. gagnepaini* شباهت و همپوشانی زیادی را با هم نشان می‌دهند. همچنین نمونه‌های زرشک بی دانه (*B. vulgaris*) نیز در فاصله نزدیک به هم قرار دارند و به نظر می‌رسد که با وجود فاصله زیاد مناطق رویش آنها، شباهت بسیار زیادی با هم دارند و در یک گروه قرار گرفته‌اند (شکل ۱). نمونه‌های منطقه کلات نیز در بین دیگر نمونه‌های گونه *B. integerrima* پراکنده‌اند و هیچگونه تمایز قابل ملاحظه‌ای را نسبت به دیگر نمونه‌ها نشان نمی‌دهند و بر خلاف دندروگرام حاصل از نشانگرهای AFLP در گروهی جداگانه و با فاصله از دیگر نمونه‌ها قرار ندارند (دندروگرام آورده نشده).

تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCoA) در سطح جنس و گونه‌های خانواده زرشک: نمودار دو بعدی که جهت



جدول ۴: مقدار همبستگی بین ۳۹ صفت مورد بررسی با سه مؤلفه اول که در بر گیرنده بیشترین میزان تنوع می‌باشند.

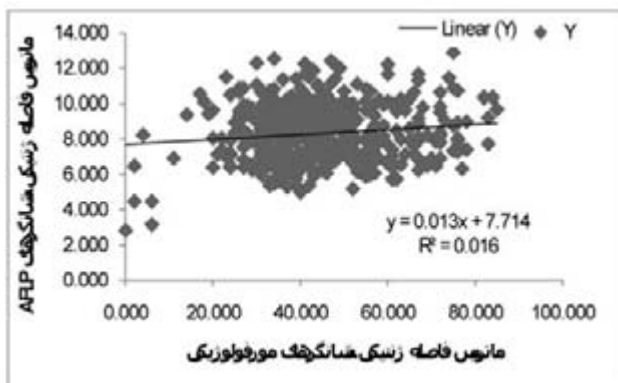
شماره صفت	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم	شماره صفت	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم
۱	۰/۰۲۴	۰/۱۹۰	۰/۶۳۷	۲۱	۰/۰۹۹	۰/۲۶۸	۰/۰۶۴
۲	۰/۳۳۷	-۰/۰۵۵	-۰/۵۶۱	۲۲	-۰/۴۳۱	-۰/۲۳۳	-۰/۰۱۶
۳	-۰/۰۰۵	-۰/۰۹۲	۰/۴۱۱	۲۳	۰/۱۴۹	۰/۷۰۸	-۰/۲۹۰
۴	۰/۷۴۴	۰/۲۲۵	۰/۱۴۷	۲۴	۰/۱۴۳	۰/۷۸۰	-۰/۲۵۱
۵	-۰/۳۶۱	-۰/۱۰۷	۰/۶۵۱	۲۵	۰/۱۹۴	۰/۵۶۸	۰/۱۲۸
۶	-۰/۱۰۵	۰/۰۰۲	۰/۱۳۲	۲۶	-۰/۳۰۳	۰/۵۸۲	۰/۱۳۹
۷	۰/۲۸۶	۰/۴۸۱	-۰/۲۲۲	۲۷	۰/۲۰۸	-۰/۱۴۲	-۰/۰۲۶
۸	۰/۱۹۸	-۰/۳۳۱	۰/۴۱۵	۲۸	-۰/۳۸۵	۰/۵۱۱	-۰/۱۱۵
۹	-۰/۳۵۳	-۰/۰۸۰	-۰/۱۴۵	۲۹	۰/۱۹۳	۰/۶۶۰	-۰/۱۱۱
۱۰	-۰/۲۳۲	۰/۰۶۲	۰/۰۰۱	۳۰	-۰/۵۴۲	-۰/۰۲۵	۰/۴۰۱
۱۱	-۰/۱۰۳	۰/۱۵۴	-۰/۱۶۵	۳۱	۰/۰۸۳	۰/۰۳۰	۰/۱۳۰
۱۲	-۰/۰۱۱	۰/۱۵۷	۰/۰۳۶	۳۲	۰/۰۷۴	۰/۲۰۰	-۰/۰۱۱
۱۳	-۰/۰۲۰	۰/۴۸۰	۰/۰۹۲	۳۳	۰/۱۷۰	۰/۱۱۱	-۰/۳۱۱
۱۴	۰/۴۰۰	۰/۳۱۵	-۰/۲۰۳	۳۴	۰/۵۳۱	-۰/۰۳۵	۰
۱۵	۰/۱۷۹	-۰/۱۳۹	-۰/۸۱۳	۳۵	-۰/۳۴۶	۰/۱۹۰	۰/۰۱۵
۱۶	۰/۲۲۴	۰/۱۹۰	-۰/۲۴۳	۳۶	-۰/۵۶۰	۰/۰۰۶	-۰/۱۲۴
۱۷	-۰/۲۴۴	۰/۱۸۰	۰/۵۸۶	۳۷	-۰/۰۸۷	-۰/۰۹۵	-۰/۶۱۸
۱۸	۰/۰۷۳	-۰/۳۳۸	۰/۰۰۶	۳۸	-۰/۲۲۳	۰/۰۱۱	-۰/۲۰۶
۱۹	-۰/۱۷۵	-۰/۰۹۱	۰/۲۱۲	۳۹	-۰/۸۱۷	۰/۱۹۰	۰/۲۴۰
۲۰	۰/۰۹۷	۰/۰۱۷	۰/۱۶۹				

مورفولوژیکی و AFLP برای ۳۳ نمونه مورد آزمون دارای ضریب همبستگی  $r^2 = ۰/۴۷$  بودند که حاکی از همبستگی نسبتاً کم بین دو دندروگرام می‌باشد (شکل ۴).  
 به منظور بررسی همبستگی دو دندروگرام حاصل از نشانگرهای مورفولوژیکی و AFLP در نمونه‌های زرشک دانه دار و بی دانه استانهای خراسان، با حذف دو نمونه زینتی و جنس ماهونیا از ماتریس فاصله، آزمون Mantel بار دیگر برای این دو دندروگرام انجام شد (شکل ۵). نتایج این آزمون حاکی از معنی‌دار نبودن ضریب همبستگی (۱۳)  $r^2 = ۰/۱۳$  آنها می‌باشد.

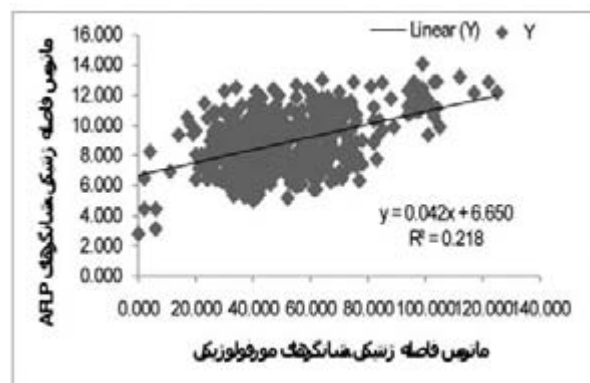
در واقع گرچه همبستگی میان دندروگرام‌های صفات مورفولوژیکی و AFLP در ۳۳ نمونه زرشک کم می‌باشد اما میزان آن بسیار بیشتر از همبستگی میان دو دندروگرام

جدایی قابل توجه بین نمونه‌ها شود، چندان قابل قبول نمی‌باشد. مؤلفه سوم نیز با صفات ارتفاع و شعاع درختچه، رنگ شاخه‌های جوان، رنگ شاخه‌های چند ساله، رنگ پشت برگ، وجود موم روی برگ و رنگ گل بیش از ۵۰٪ همبستگی نشان داد. صفات همبسته با این مؤلفه نیز شامل صفات رویشی می‌شود که به نظر می‌رسد بیشتر آنها مانند ارتفاع و رنگ شاخه‌ها و همچنین رنگ گل، بسیار تحت تأثیر محیط قرار دارند و برای بررسی تنوع و رابطه خویشاوندی و یا شناسایی گونه‌های موجود در خانواده زرشک چندان مناسب به نظر نمی‌رسند.

به منظور مقایسه دقیق‌تر دو دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگرهای مورفولوژیکی و AFLP، از آزمون Mantel (۱۳) استفاده شد. دو دندروگرام نشانگرهای



شکل ۵: آزمون Mantel جهت مقایسه دو ماتریس فاصله ژنتیکی نشانگرهای مورفولوژیکی و AFLP در ۳۰ نمونه زرشک استانهای خراسان



شکل ۴: آزمون Mantel جهت مقایسه دو ماتریس فاصله ژنتیکی نشانگرهای مورفولوژیکی و AFLP در ۳۳ نمونه زرشک مورد آزمون

شناسایی و نتایج حاضر، به نظر می‌رسد که صفات موجود در کلید شناسایی زرشک در فلور ایرانیکا، از کارایی مناسبی برای شناسایی زرشک در سطح گونه و زیر گونه برخوردار نیستند. احتمالاً وجود همبستگی‌های عملکردی<sup>۱</sup> و صفات زاید<sup>۱</sup> از دلایل عدم کارایی این صفات باشد. همچنین این صفات بیشتر بر خصوصیات رویشی این خانواده تأکید دارد. در حالی که صفات رویشی صفاتی هستند که بیشتر تحت تأثیر عوامل محیطی و سازگاری با محیط جدید قرار می‌گیرند و برای طبقه بندی و شناسایی گونه مناسب نیستند. در واقع صفات مستقل از تغییرات اکولوژیکی از وزن بیشتری نسبت به سایر صفات برخوردارند. همانطور که در همبستگی بین مؤلفه‌های اول که بیشترین تنوع ژنتیکی را توجیه می‌کنند با صفات مورد بررسی ملاحظه شد، تنها صفاتی که مربوط به اندامهای زایشی مورد بررسی می‌باشند، با مؤلفه اول بیش از ۵۰٪ همبستگی دارند. در حالی که صفات رویشی در درجه دوم اهمیت قرار گرفته‌اند. وجود بیش از ۶ مؤلفه توجیه کننده کمتر از ۶۰٪ تنوع، نشان می‌دهد که صفات مورد بررسی حتی در مجموع قادر به توجیه تنوع موجود بین نمونه‌های مورد بررسی نبوده و این امر می‌تواند دلیلی دیگر برای نامناسب بودن صفات در بررسی تنوع ژنتیکی خانواده زرشک باشد. بطوریکه این امر می‌تواند دلیلی بر وجود تعداد زیاد مترادف برای بسیاری از گونه‌های خانواده زرشک باشد. بخصوص گونه *B. integerrima* که در فلور ایرانیکا دارای ۱۱ گونه مترادف می‌باشد و این نشان

حاصل از صفات مورفولوژیکی و AFLP در ۳۰ نمونه زرشک استان‌های خراسان می‌باشد. بطور کلی می‌توان چنین استنباط کرد که اگرچه نشانگرهای مورفولوژیکی در سطح جنس می‌توانند نمونه‌ها را از یکدیگر تفکیک کنند، اما در سطح گونه از کارایی لازم جهت گروه بندی نمونه‌های زرشک برخوردار نیستند (۳). شاید این مسئله بیشتر ناشی از وجود صفات بارزی چون نداشتن خار در جنس ماهونیا و یا برگهای شانه‌ای باشد که سبب ایجاد یک حالت (رتبه) جدید در صفات مورفولوژی خار و برگ شده و توانسته این دو جنس را از یکدیگر جدا کند. عموماً یک ویژگی جدید در مقابل تحلیل یا فقدان یک ویژگی دیگر دارای وزن بیشتری است چرا که احتمال تحلیل یا فقدان یک صفت بطور مستقل بیشتر از تکامل مستقل یک صفت جدید می‌باشد. نمونه زینتی *B. thunbergii* نیز در میان دیگر گونه‌ها، دارای حالتی خاص برای هر صفت می‌باشد که باعث تمایز هرچه بیشتر این گونه از دیگر گونه‌های مورد آزمون می‌شود. در حالی که اگر صفات بکار رفته به راستی قادر به تمایز بین گونه‌ها بودند می‌بایست گونه‌های *Berberis vulgaris* و *gagnepaini* نیز از دیگر نمونه‌های مربوط به گونه *Berberis integerrima* به خوبی تفکیک می‌شدند. اما همانطور که در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، به جز نمونه‌های ماهونیا و *B. thunbergii* سایر نمونه‌ها بر روی یکدیگر همپوشانی دارند با توجه به بررسی اجمالی صفات موجود در کلید

مورد بررسی قرار گیرد. چراکه خصوصیات مورفولوژیکی که برای آن ذکر شده و مهمترین آنها وجود خارهای زیاد در حاشیه برگ می‌باشد، تفاوت اندکی با دیگر گونه‌های جنس زرشک دارد و به نظر واقعی نمی‌رسند (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 جمع‌آوری نشده و هیچگونه بررسی در این زمینه انجام نگرفته است.

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

دهنده تنوع زیاد در زیرگونه‌ها و همچنین عدم شناسایی درست این گونه می‌باشد. چنانکه گونه‌های موجود در منطقه کلات با توجه به کلید شناسایی فلور ایرانیکا گونه *B. integrima* می‌باشد و بررسی آن با نشانگرهای مورفولوژیک این امر را تأیید می‌کند. 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 می‌بخشد که این نمونه‌ها 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 گونه‌های 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 می‌بایست موجودیت گونه (*B. khorassanica*) که در فلور ایرانیکا به عنوان گونه بومی استان خراسان یاد شده است،

## منابع

- ۱-آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۱۳۸۵. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات. انتشارات جهاد کشاورزی.
- ۲- بالندری، الف. و کافی، م. ۱۳۸۱. زرشک فناوری تولید و فرآوری. چاپ اول، ناشر زبان و ادب، مشهد.
- ۳- جونز، اس. بی. و لوچ سینگر، آ. ای. ۱۳۸۴. سیستماتیک گیاهی. ترجمه رحیمی نژاد، م. ر. چاپ دوم، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.
- ۴- 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.
- ۵- زرگری، ع. ۱۳۶۰-۱۳۶۹. گیاهان دارویی. ویرایش ۳، انتشارات دانشگاه تهران، تهران
- ۶- سینگ، گ. ۱۳۸۵. سیستماتیک گیاهی. ترجمه جعفری، آ.، احمدیان، ر. و زارع حسن آبادی، م. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- 7-Ahrendt, L. W. A. 1961. *Berberis and Mahonia: a taxonomic revision. Journal of Linnian Society Botany*, 57: 1-410.
- 8-Bottini, M. C. J., Greizerstein E. J., Aulicino 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.
- 9-Bottini, M. C. J., De Bustos, A., Jouve, N. and Poggio, L. 2002. AFLP characterization of natural populations of *Berberis* (*Berberidaceae*) in Patagonia, Argentina. *Plant systematic and evolution journal*, 133-142.
- 10-Dermen, H. 1931: A study of chromosome number in two genera of *Berberidaceae*: *Mahonia* and *Berberis*. *Journal of Arnold Arbor*, 12: 281-287.
- 11-Huff, D.R., Peakall, R. and Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelman). *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 827-834.
- 12-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.
- 13-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.
- 14-Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Researches*. 27: 209-220.
- 15-Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Nature* 106: 283-292.
- 16-Rechinger, K. 1975. *Flora Des Iranischen Hochlandes unter umrahmenden gebirge*., Berberidaceae. Vol 11. Academische Druck-U-verganstalt. Graz, Austria. No. 111.
- 17-Sastri, R. L. N. 1969. Floral morphology, embryology, and relationships of the *Berberidaceae*. *Australian Journal of Botany*, 17: 69-79.
- 18-Shen, Y. 1954. Phylogeny and wood anatomy of *Nandina*. *Taiwania*, 5: 85-92.
- 19-Tehranifar, A. 2003. Barberry growing in Iran, *Acta Horticulture.(ISHS)*, 620: 193-195.
- 20-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.

## Assessment of variation in wild and cultivated *Berberis* populations of Khorasan provinces using morphological markers and comparison to data resulted from AFLP markers

S. Heidary, S. H. Marashi, M. Farsi, A. Mirshamsi Kakhki<sup>1</sup>

### Abstract

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 spieces and genera of Berberis family looks necessary.

**Keywords:** Berber's, AFLP marker, morphological traits