

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی

تهیه نشانگرهای اختصاصی در سطح گونه جهت شناسایی زرشک ایرانی
با استفاده از ناحیه ITS

نگارنده: عزیز قهرمانلو

استاد راهنما

دکتر مهدی رضایی

اساتید مشاور

دکتر پرویز حیدری

دکتر احمد بالندری

آبان ۱۳۹۹

تقدیم به

محضر حضرت حجت ابن الحسن العسکری (عج) صاحب الزمان آرزوی سلامتی، تعجیل و تسریع در

فرج مولایمان.

و خانواده عزیزم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی‌شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی، به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است، به پاس قلب‌های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می‌گراید، و به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند.

تشکر و قدردانی

نخستین سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بنده کوچکش را در دریای بی‌کران اندیشه، قطره‌ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه‌های ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا نشیند. اکنون که در سایه سار بنده نوازی‌هایش، پایان نامه حاضر به انجام رسیده است، بر خود لازم می‌دانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که اگر دست یاری‌گرشان نبود، هرگز این پایان نامه به انجام نمی‌رسید، الهی، ای مهربان‌تر از ما به ما، از تو می‌خواهم همه کسانی را که حتی ذره‌ای در انجام این امر مرا یاری نموده‌اند، در سایه لطف و محبت بیکرانت، سلامت، شادکام و موفق بداری.

ابتدا از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر مهدی رضایی که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال سپاس را دارم بدون مساعدت و نظرات ارزنده ایشان، این پایان نامه به نتیجه مطلوب نمی‌رسید. همچنین از مشاوران محترم، جناب آقای دکتر پرویز حیدری و جناب آقای دکتر احمد بالندری برای کمک به هرچه بهتر شدن این پایان نامه، خاضعانه سپاسگزارم. همچنین از آقای مهندس جوهرچی از دانشگاه فردوسی مشهد در شناسایی مورفولوژیک گونه‌های مورد مطالعه زرشک در این تحقیق عهده دار بودند، و از تمامی اساتیدی که در دوران تحصیل در مقاطع کارشناسی و کارشناسی ارشد افتخار شاگردی در محضرشان را داشتم تشکر می‌نمایم. از مهربانترین همراهان زندگیم، خانواده عزیزم که حضورشان در فضای زندگیم مصداق بی‌ریای سخاوت بوده است و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یآوری بی‌چشمداشت و پشتیبانی محکم برایم بوده‌اند، صمیمانه سپاسگزارم.

تعهد نامه

اینجانب **عزیز قهرمانلو** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تهیه نشانگرهای اختصاصی در سطح گونه جهت شناسایی زرشک ایرانی با استفاده از ناحیه ITS تحت راهنمایی آقای دکتر مهدی رضایی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

زرشک در مناطق مختلف ایران مورد استفاده های غذایی، صنعتی و دارویی دارد. زرشک بی دانه به عنوان یک محصول اقتصادی سهم عمده ای در اقتصاد کشاورزی منطقه جنوب خراسان دارد. در سالهای اخیر استفاده از توالی نواحی rDNA ITS برای شناسایی گونه های گیاهی و تعیین بارکدینگ آنها افزایش یافته است. در تحقیق حاضر با هدف بررسی کارایی توالی نواحی rDNA ITS در بارکدگذاری ۱۹ نمونه جمع آوری شده زرشک از پژوهشکده علوم گیاهی و صنایع غذایی مشهد، شهرستان اسفراین و شاهرود انجام پذیرفت. نمونه ها در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی شاهرود با استفاده از پرایمر اختصاصی ITS2 زرشک تکثیر و برای توالی یابی ارسال گردید. پس از توالی یابی تجزیه و تحلیل فیلوژنی آنها با استفاده از نرم افزار MEGA X و آنالیز آن به روش UPGMA انجام شد. توالی ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید و میزان شباهت این توالی ها با عملیات بلاست با سایر گونه ها مشخص گردید و دندروگرام بر اساس میزان شباهت با سایر گونه ها در پایگاه داده NCBI رسم گردید. نتایج نشان داد فاصله ژنتیکی در میان نمونه های مورد بررسی از ۰/۱۲ تا ۰/۱۵۴ متغیر بود. در تجزیه خوشه ای زرشک ژاپنی (ژینتی JA) در شاخه جداگانه ای از ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه گونه های زرشک ایران قرار گرفت. در آنالیز بلاست ۹۳ توالی DNA مربوط به گونه های مختلف زرشک در پایگاه داده NCBI با توالی های ۱۹ ژنوتیپ زرشک بالای ۹۰ درصد تطابق نشان دادند. بیشترین شباهت توالی ITS2 زرشک ژینتی با گونه مشابه (*B. thumbergii*) در سایت NCBI تنها ۹۱ درصد بود. در تجزیه خوشه بر اساس توالی در سایت NCBI ژنوتیپ R9N3 جدا از ژنوتیپ های مورد مطالعه قرار گرفت و سایر ژنوتیپ ها در دو گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ های اسفراین (ES) (به جز ES1) و Sh1 و R14N2 بود. این ژنوتیپ ها اکثر از گونه *B. crataegina* بودند و گروه دوم شامل ژنوتیپ های ES1، Sh2-5، R12N1، R8N3، R5N1، R2N1 و R11N3 در کنار سایر ژنوتیپ های پایگاه داده NCBI در گونه *B. integerrima* قرار گرفتند. ژنوتیپ بی دانه زرشک باغی نیز در کنار گونه *B. integerrima* در این گروه قرار گرفت. با توجه به شباهت توالی ها تنها امکان تهیه سه جفت پرایمر اختصاصی به نام های R14N2، R9N3 و B.th فراهم گردید. سه جفت پرایمر طراحی، تکثیر و بر روی ۱۹ نمونه گونه گیاهی بکار گرفته شد. پرایمر R14N2 به طور اختصاصی توانست ژنوتیپ R14N2 را تکثیر نماید ولی پرایمر های R9N3 و B.th باند اختصاصی نداشتند.

کلمات کلیدی: زرشک، توالی یابی ناحیه ITS، بارکدگذاری DNA، پایگاه داده NCBI

فهرست مطالب

فصل اول	۱
مقدمه	۱
فصل دوم	۵
کلیات و بررسی منابع	۵
۱-۲- زرشک	۶
۲-۲- مصارف دارویی زرشک	۶
۳-۲- کاربرد زرشک در درمان سایر بیماری‌ها در ایران	۷
۴-۲- سایر مصارف و کاربردها	۸
۵-۲- گیاهشناسی	۸
۵-۲-۱- تیره زرشک Berberidaceae	۸
۶-۲- جنس زرشک	۱۰
۷-۲- ویژگی‌های برخی گونه‌های زرشک مطابق فلور ایران	۱۲
۷-۲-۱- زرشک زالزالکی <i>B. crataegina</i>	۱۲
۷-۲-۲- زرشک بی دانه <i>B. vulgaris</i>	۱۲
۷-۲-۳- زرشک زرافشانی <i>B. integerrima</i>	۱۳
۷-۲-۴- زرشک راست خوشه <i>B. orthobotrys</i>	۱۳
۷-۲-۵- زرشک خراسانی <i>B. khorasanica</i>	۱۳
۷-۲-۶- زرشک های زینتی	۱۴
۸-۲- نشانگر	۱۷
۸-۲-۱- انواع نشانگرها	۱۷
۸-۲-۱-۱- نشانگر SSR	۱۸
۸-۲-۱-۲- نشانگر RAPD	۱۸
۸-۲-۳- نشانگر ISSR	۱۹
۹-۲- توالی DNA در اندامک های گیاهی	۲۰
۱۰-۲- پیشینه بارکدگذاری در گیاهان و حیوانات	۲۱
۱۱-۲- بارکد گذاری DNA	۲۲
۱۱-۲-۱- کاربردهای DNA بارکدینگ	۲۴
۱۱-۲-۲- فواید DNA بارکدینگ برای کشور	۲۵

۲۵	۲-۱۱-۳- برنامه کاربردی دیگر در بارکدگذاری DNA در گیاهان
۲۵	۲-۱۲- ITS بخشی از توالی nr DNA مورد استفاده در بارکدینگ
۲۷	۲-۱۲-۱- مرور منابع
۳۳	فصل سوم
۳۳	مواد و روشها
۳۴	۳-۱- محل و روش نمونه برداری
۳۴	۳-۲- مواد گیاهی
۳۴	۳-۳- نمونه برداری و استخراج DNA
۳۵	۳-۴- مواد و وسایل مورد نیاز برای استخراج شامل
۳۵	۳-۵- مراحل استخراج DNA
۳۷	۳-۶- محلولهای مورد نیاز
۳۷	۳-۶-۱- بافر استخراج DNA
۳۷	۳-۷- محلول کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl, 5M)
۳۷	۳-۸- محلول استات سدیم ۳/۲ مولار (C2H3NaO2, 3.2M, pH=5.4)
۳۸	۳-۹- بافر TBE
۳۸	۳-۱۰- بررسی کمیت و کیفیت DNA
۳۸	۳-۱۰-۱- بررسی تعیین کمیت DNA با استفاده از نانو دراپ
۳۹	۳-۱۰-۲- تعیین کیفیت DNA روی ژل آگارز با استفاده از الکترو فورز افقی
۳۹	۳-۱۱- توالی نشانگرهای ITS مورد استفاده این آزمایش
۴۰	۳-۱۲- تکثیر نواحی ITS
۴۱	۳-۱۳- بررسی محصول PCR روی ژل آگارز بر روی دستگاه الکتروفورز
۴۱	۳-۱۴- استخراج ناحیه ITS از روی ژل و توالیبایی
۴۱	۳-۱۵-
۴۱	۳-۱۷- طراحی پرایمر اختصاصی برای گونه و ژنوتیپها
۴۲	۳-۱۸- راستی آزمایی پرایمر طراحی شده
۴۳	فصل چهارم
۴۳	نتایج و بحث
۴۴	۴-۱- نتایج استخراج DNA و تکثیر نواحی ITS
۴۵	۴-۲- نتایج توالیبایی ژنوتیپهای مورد استفاده و ثبت آن در سایت NCBI

- ۴-۳- رابطه خویشاوندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ناحیه ITS----- ۴۶
- ۴-۴- آنالیز خوشه‌ای ژنوتیپ‌های زرشک----- ۴۸
- ۴-۵- آنالیز خوشه‌ای با استفاده از بلاست در پایگاه داده NCBI----- ۵۰
- ۴-۶- تایید توالی اختصاصی ژنوتیپ زینتی مربوط به ناحیه ITS----- ۵۴
- ۴-۷- مناطق حفاظت شده ناحیه ITS ژنوتیپ‌های مورد پژوهش----- ۵۵
- ۴-۸- پرایمرهای اختصاصی----- ۵۶
- ۴-۹- توانایی پرایمرهای اختصاصی در تکثیر وتشکیل باند DNA نمونه‌ها----- ۵۷
- ۴-۱۰- نتیجه‌گیری----- ۵۹
- ۴-۱۱- پیشنهادات----- ۶۰
- منابع----- ۶۱

- شکل ۱-۲ ساختار شماتیک گل، میوه زرشک (*Berberis vulgaris*) ----- ۱۱
- شکل ۲-۲ درختچه‌های بارور زرشک ----- ۱۱
- شکل ۱-۳ بررسی کیفیت DNA از نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز ----- ۳۹
- شکل ۲-۴ کیفیت باند تشکیل شده با نشانگر ITS بر روی ژل آگارز ----- ۴۴
- شکل ۳-۴ - آنالیز خوشه‌ای ۱۹ ژنوتیپ زرشک بر اساس توالی ITS2، اعداد روی خوشه‌های نشان دهنده میزان Bootstrap است. ----- ۵۰
- شکل ۴-۴ - نتایج بلاست ۱۹ ژنوتیپ زرشک در پایگاه داده NCBI با تطابق بالای ۹۰ درصد ----- ۵۲
- شکل ۵-۴ - تجزیه خوشه ۱۹ ژنوتیپ زرشک مورد بررسی در کنار سایر گونه‌های زرشک با میزان شباهت بالای ۹۱٪ بر اساس بلاست ۳۵۰ جفت باز ناحیه ITS در پایگاه داده NCBI ----- ۵۳
- شکل ۶-۴ - تایید توالی ژنوتیپ JA (زرشک زینتی ژاپنی) با توالی با کد KX549401.1 مربوط به ناحیه ITS2 از گونه *Berberis thunbergii* در پایگاه داده NCBI ----- ۵۴
- شکل ۷-۴ نواحی حفاظت شده‌ی بدست آمده از توالیهای هم‌ردیف سازی شده ----- ۵۶
- شکل ۸-۴ نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر R14N2 بر روی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ----- ۵۸
- شکل ۹-۴ نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر R9N3 بر روی ژنوتیپ‌های زرشک ----- ۵۸
- شکل ۱۰-۴ نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر B.th. در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه زرشک. ----- ۵۹

فهرست جداول

- جدول ۱-۲ اسامی، ارتفاع، عادت رشدی و رنگ میوه برخی از زرشک های مهم دنیا براساس سیستم نام گذاری گیاهان USDA (USDA NRCS1999) ----- ۱۶
- جدول ۱-۳ ژنوتیپ های جمع آوری شده از کلسیون زرشک پژوهشکده علوم گیاهی و صنایع غذایی مشهد، اسفراین و شاهرود ----- ۳۴
- جدول ۲-۳: مواد و غلظت مورد استفاده جهت تهیه بافر استخراج ----- ۳۶
- جدول ۳-۳- برنامه حرارتی تکثیر نمونه های مورد مطالعه ----- ۴۰
- جدول ۱-۴ اطلاعات ثبت شده مربوط به توالی ناحیه ITS ژنوتیپ های زرشک مورد مطالعه ----- ۴۵
- جدول ۲-۴- فاصله ژنتیکی بین ۱۹ ژنوتیپ زرشک بر اساس توالی ناحیه ITS2 ----- ۴۸
- جدول ۳-۴- اطلاعات پرایمرهای اختصاصی طراحی شدن برای سه ژنوتیپ زرشک ----- ۵۷

فصل اول

مقدمه

مقدمه

خانواده زرشک (Berberidaceae) متعلق به راسته آلاله (Ranales) که از ابتدایی‌ترین گیاهان دولپه‌ای می‌باشد. تیره زرشک به علت داشتن میوه سته آبدار و آلکالوئید بربرین از ۶ تیره دیگر راسته آلاله جدا می‌شود. این تیره دارای ۱۵ جنس و ۶۵۰ گونه است که اغلب در نیمکره شمالی زمین رویش دارد. در نیمکره جنوبی جنس بربریس در نقاط معتدله آمریکای جنوبی دیده می‌شود (Ahrendt., 1961).

زرشک (*Berberis spp*) به عنوان یک گیاه داروئی مهم از گذشته‌های دور در ایران و بسیاری از تمدن‌های بزرگ دنیا شناخته شده و مورد استفاده بوده است (زرگری ۱۳۶۹). گیاهان موجود در جنس زرشک حاوی انواع آلکالوئیدها، ترکیبات فنلی، فعالیت آنتی اکسیدانی و متابولیت‌های ثانویه با ارزش نظیر بربرین، برلامبین، اکسی بربرین، کلومبامین، اکسی کانتین، ایزواوردین، لامبوتین و ماکنی فلورین است که در صنایع غذایی و داروئی کاربرد فراوان دارند (Arayene et al., 2007).

در ایران طبق نظر گیاه‌شناسان ۵ گونه 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*) می‌باشد.

گونه‌های زرشک به علت سازگاری گسترده محیطی، گسترش وسیعی در جهان دارند. تلاقی بین گونه‌ای در زرشک متداول است و احتمالاً زرشک بی‌دانه از تلاقی طبیعی زرشک‌های دانه دار بوجود آمده است که به عنوان یکی از محصولات باغی به صورت گسترده در خراسان جنوبی کشت می‌گردد. به علت مقاومت به سرما، در ارتفاعات بیش از ۱۵۰۰ متر دارای رشد بهتر است، اما کشت آن در دشت‌ها و وجود بادهای گرم از عوامل محدودکننده سازگاری اقلیمی آن است (بالندری و همکاران، ۱۳۸۱). زرشک بی‌دانه یک محصول منحصر به فرد است و در حدود ۹۶ درصد سطح زیر کشت این محصول به خراسان جنوبی اختصاص دارد و میزان تولید آن در این استان ۹۸ درصد کل کشور است، آمارهای رسمی نشان می‌دهد که ۱۸ هزار خانواده شهری و روستایی در زنجیره تولید، توزیع و فرآوری زرشک فعالیت دارند. نزدیک به ۶۴۰۵ هکتار از باغات منطقه زیر

کشت زرشک است و متوسط عملکرد در هکتار ۱۳۱۳ کیلوگرم در هکتار است، و سالانه ۸ هزار و ۴۵۰ تن زرشک تولید می‌شود. (آمارنامه جهاد کشاورزی ۱۳۹۶). طبق آمار جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۶ سطح زیرکشت زرشک در استان‌های خراسان رضوی، آذربایجان شرقی، تهران، کرمان، سمنان، کردستان، یزد، گیلان، فارس و مرکزی به ترتیب ۱۰۴، ۱۳، ۹، ۶، ۳، ۱/۹، ۱/۵ و ۷/۰ هکتار بوده است (آمارنامه جهاد کشاورزی ۱۳۹۶).

همواره تعیین میزان خویشاوندی بین گونه‌ها مورد توجه محققین بوده است. یکی از روش‌های تعیین خویشاوندی استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد. روبه کاهش بودن تنوع زیستی، وقوع دورگ‌ها و مضاعف شدن کروموزمی و از طرف دیگر دستیابی به روشی سریع و دقیق و ارزان از دغدغه‌های متخصصان سیستماتیک گیاهی در شناسایی گونه‌های گیاهی است (Blaxter, 2003; Hebert et al, 2003). به همین دلیل بسیاری از محققان بهترین وسیله برای تشخیص گونه‌های درختی را استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌دانند (Balasaravanan et al, 2006). در سال‌های اخیر یکی از نشانگرهای مولکولی که در پژوهش‌های فیلوژنتیکی و فن DNA بارکدینگ کاربرد بسیاری پیدا کرده است ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) بوده است که این ناحیه در کنار ژن‌های ریبوزومی قرار دارد (Gultepe et al, 2010; Schultz and Park et al, 2009). بیش از ۱۰ سال است که نشانگر مولکولی ITS در مطالعات فیلوژنتیک کاربرد دارند (Wolf, 2018). به علت وقوع هیبرید و دورگ شدن درون گونه‌ای در زرشک و کاهش تنوع ژنتیکی، شناسایی مورفولوژیکی گونه‌های آن با مشکلاتی همراه می‌باشد. بنابراین در این پژوهش با هدف شناخت و بهره برداری از پتانسیل‌های گونه‌ها و ژنوتیپ‌های بومی زرشک مناطقی از کشور در کارهای اصلاحی و تنوع ژنتیکی از نشانگرهایی که امروزه دقیق، کارا و موثر می‌باشند و به عنوان DNA بارکد ریبوزومی هسته‌ای شناخته می‌شوند، استفاده گردید. تاثیرپذیری ژنوم هسته‌ای نسبت به مشکلات ناشی از دورگ شدن کمتر است و پژوهشگران تبارشناسی چند سال است به دنبال ژنوم هسته‌ای بارکد برای گیاهان هستند. در این راستا ناحیه ITS¹ (نواحی

1- Internal transcribed spacer

داخلی فاصله انداز رونوشت‌ها) که طی تکامل محفوظ مانده‌اند، به عنوان بارکد برای برخی گیاهان پیشنهاد گردیده است (Kress et al., 2010). این نشانگر برای مقایسه گونه‌ها و جنس‌های بسیار نزدیک و همچنین بررسی‌های تبارزایی (فیلوژنی) مهم هستند (Silva et al., 2018; Garcia et al., 2017). هدف از انجام این پژوهش، تهیه نشانگرهای اختصاصی جهت شناسایی گونه‌های زرشک ایرانی و بررسی روابط فیلوژنی بین آن‌ها است.

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- زرشک

زرشک گیاهی با نام علمی *Berberis vulgaris* و دارای آلكالوئیدی به نام بربرین است که به عنوان ضدالتهاب و آنتی اکسیدان شناخته می‌شود (Imenshahidi and Hosseinzadeh, 2016). زرشک به دلیل موارد استفاده متعدد از قبیل مصارف خوراکی حایز اهمیت می‌باشد. انواع زرشک در اکثر کشورهای جهان بیشتر به عنوان یک گیاه دارویی و زینتی شناخته می‌شوند (Saied and Begum., 2004). اما نوع بی‌دانه آن در ایران به صورت یک میوه خشک و بیشتر به عنوان مکمل غذایی به مصرف می‌رسد. میوه گوشتی و سته آن در تولید ژله، شربت، مربا، سس، مارمالاد، نکتار و لواشک مورد استفاده قرار می‌گیرد (بالندری و کافی، ۱۳۸۱). نوع بی‌دانه زرشک به صورت خشک از گذشته‌های دور به عنوان یک چاشنی و افزودنی غذایی توسط ایرانیان استفاده می‌شود و هم اکنون نیز در رنگ بخشیدن و طعم دادن به غذاهای ایرانی از آن استفاده می‌شود.

۲-۲- مصارف دارویی زرشک

در دهه اخیر مطالعاتی بر روی خواص فارماکولوژیکی آلكالوئیدهای این گیاه نشان از اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی، ضد انگلی آن می‌باشد (Saeed et al., 2007). بر اساس مطالعات، بیشترین خواص دارویی زرشک مربوط به آلكالوئیدهای مختلف در اندام‌های متفاوت این گیاه است. در تمام قسمت‌های این گیاه آلكالوئیدهای بربرین^۱، اکسیاکانتین^۲ و بربامین^۳ وجود دارد (liu et al., 1991). مقدار آلكالوئید در پوست ریشه زرشک بیشتر از قسمت‌های دیگر این گیاه است (Saeed et al., 2007). سایر آلكالوئیدهای مختلف زرشک شامل بربامین، بربروبین، ژاتوریزین، اکسیاکانتین، پالماتین، برولیسین، کلومبامین، والرسین و ترکیبات دیگر هستند (بالندری و کافی ۱۳۸۱). میوه زرشک دارای حدود چهار درصد مواد قندی، ۶۵ درصد اسید مالیک، اسید تارتاریک و مقداری صمغ می‌باشد. به علاوه این میوه دارای اسیدهای آلی و ترکیبات فنولی بوده و علاوه بر

¹. Berberene

². Oxyacanthine

³. Berbamine

رنگدانه‌های آنتوسیانینی و کاروتنوئیدی دارای آنزیم‌های فنولاز، پلی فنولاز و گلیکوپداز است (Saeed et al., 2007).

از گونه‌های مختلف زرشک در طب سنتی استفاده‌های فراوانی می‌شود. از جمله استفاده‌های دارویی زرشک در درمان سرطان، وبا و بیماری‌های فشار خون می‌باشد (Duke., 1969; Haliwell., 1985). زرشک خواص درمانی زیادی در مورد بیماری‌هایی چون سرطان دهان، تومورهای کبدی، ناراحتی‌های پوستی و برخی عفونت‌ها دارد (Saeed et al., 2007).

میوه ای گونه‌های مختلف زرشک خاصیت سمیت ندارند ولی گزارشاتی در مورد استفاده از این میوه وجود دارد که می‌بایست مورد توجه قرار بگیرد (میرحیدر، ۱۳۷۲). البته در هنگام رسیدن میوه میزان قند محلول و آنتوسیانین میوه افزایش و میزان کلروفیل و بربرین میوه کاهش می‌یابد (Chandra and Todaria., 1983) و بهتر است میوه‌ها در هنگام رسیدگی کامل مصرف شوند.

۲-۳- کاربرد زرشک در درمان سایر بیماری‌ها در ایران

نتایج پژوهش‌ها نشان داده بر بامین که یک بنزیل ایزو کینولین آلکالوئید است و در پوست ریشه زرشک وجود دارد و دارای خاصیت آنتی اکسیدان قوی است، در کاهش فیروز ناشی از تجویز داروی ضد سرطان بلئومایسین موثر بوده است. در بررسی پاتولوژیکی مشخص شده که بلئومایسین باعث تحریک شدید حباب‌های ششی و تجمع کلاترن بوده و بر بامین توانسته است به میزان قابل توجهی اثر آن را تخفیف دهد (Ikram., 1975). براساس پژوهشی در دانشکده دارو سازی مشهد عصاره ریشه و اندام هوایی زرشک در درمان سالک بر روی موش و همستر (حیوانی شبیه خوکچه هندی) آزمایش شد و نتایج مقدماتی، حاکی از خواص درمانی موثر عصاره این گیاه بود. پلاک دندان یکی از عارضه های شایع در جامعه ایران است که عامل اساسی ایجاد پوسیدگی دندان و آماس لثه می‌باشد. با توجه به طبیعت میکروبی این پلاک و همچنین با توجه به فعالیت ضد میکروبی عصاره پوست ساقه و ریشه گیاه که محتوی حدود ۱۵ بربرین می‌باشد یک نوع ژل دندانی بر این

اساس فرمولاسیون شده و اثرات آن کاهش درصدی شدیدی را روی پلاک دندان و عارضه آماس لثه نشان داد (آسوده، ۱۳۷۸).

۲-۴- سایر مصارف و کاربردها

از زرشک علاوه بر مصارف گفته شده، جهت رنگ کردن الیاف پشم ابریشم و پنبه استفاده می‌شود. دلایل متعددی برای استفاده از رنگ‌های گیاهی و معدنی برای رنگ کردن، به خصوص پشم وجود دارد که عمدتاً پایداری این رنگها و حفظ محیط زیست در نتیجه کاربرد آنهاست. همچنین از چوب زرشک که بسیار خوب خراطی می‌شود برای کارهای خاتم کاری و منبت کاری استفاده می‌شود و خار آن نیز برای خلال دندان مفید است. ضمناً چوب زرشک جلاپذیر می‌باشد (مودن فردوسی، ۱۳۷۲). در ایران مردم آب زرشک را می‌نوشند و از میوه آن در تهیه غذا، مربا، ترشی لواشک، شربت، پولکی و سوهان عسلی استفاده می‌کنند. در سال‌های اخیر به منظور استفاده صنعتی از زرشک تحقیقات زیادی درباره تهیه فرآورده‌های مختلفی مانند نوشابه، سس، ژله، آب نبات، پاستیل، پودر رنگی خوراکی و... از میوه زرشک انجام شده است

۲-۵- گیاه‌شناسی

۲-۵-۱- تیره زرشک Berberidaceae

این تیره شامل ۱۵ جنس و ۶۵۰ گونه بوده بیشتر در مناطق معتدله نیمکره شمالی پراکنده است. مهم‌ترین جنس‌های تیره زرشک ماهونیا (۱۰۰ گونه)، زرشک (۵۰۰ گونه) و پودوفیلوم می‌باشد. هر سه جنس دارای مبنای کروموزومی ۷ می‌باشند (نقل از Bottani et al., 2002). در حدود ۶۰ هیبرید بین گونه ای در زرشک، شش هیبرید در ماهونیا و چهار هیبرید ماهوبربریس^۱ شناسایی شده است (Kim et al., 2004). گیاهان این خانواده شامل درختچه‌های همیشه سبز و نیمه سبز (خزان کننده) هستند که در محدوده وسیعی از شرایط اکولوژیکی رشد می‌کنند (Bottani et al., 2002). روش تکثیر این گونه زرشک، بذری یا غیر جنسی است. ریزوم‌های آنها

¹. Mahoberberis

تا فاصله ۱۰ متری از گیاه رشد می‌کنند به همین دلیل جمعیت‌های آن‌ها با مقدار کم، سطح پوششی زیادی دارند. گونه‌های زرشک در دو سطح دیپلوئید ($2n=28$) و تتراپلوئید ($2n=56$) می‌باشند. گونه‌های دیپلوئید در ارتفاعات بالا و بارندگی کم و میزان آب در دسترس کم رشد می‌یابند و گونه‌های تتراپلوئید در عرض‌های میانی مناطق جنگلی با دوره رشدی طولانی و آب در دسترس فراوان و آب و هوای معتدل پراکنده هستند. پراکنش گونه‌های تتراپلوئیدی بطور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گونه‌ای دیپلوئید می‌باشد (Bottani et al., 2000). گونه‌های زرشک به صورت گیاهان علفی، چند ساله با برگ‌های همیشه سبز و زود افت، اغلب خار دار و گاهی به صورت درختچه یا حتی درخت‌های کوچک دیده می‌شوند. معمولاً انواع مختلفی از بنزیل ایزوکینولین در این تیره موجود بوده و بافت‌های آن به علت داشتن بربرین (یک نوع ایزوکینولین) زرد رنگ است. عناصر چوبی دارای صفحات ساده سوراخ‌داری هستند و گاهی اوقات این بخش‌های سوراخ‌دار به صورت آوندهای نردبانی در یک صفحه مشخص بوده و تعداد محدودی تیغه‌های افقی بین آنهاست. عناصر تراکئید بدون مجرا همراه با منافذ ساده می‌باشد. اشعه‌های مغزی پهن دارای سلول‌های مشابه یا به طور نسبی مشابه می‌باشند (بالندری و کافی، ۱۳۸۱).

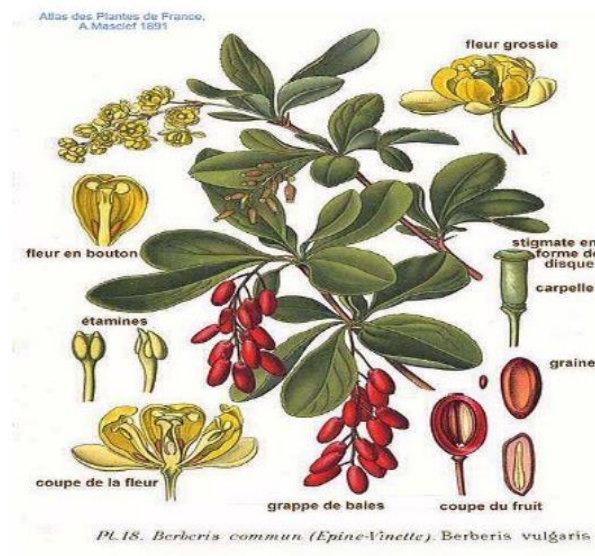
برگ‌ها متناوب، ساده یا مرکب، برگ‌های زرشک ساده و دارای مفصلی در قاعده پهنک است و به ندرت قاعده ای است. گاهی اوقات برگ‌ها به خار کاهش یافته است. دم‌برگ دارای دستجات آوندی سه تایی تا تعداد زیادی هستند که در یک حلقه و یا دو حلقه قرار می‌گیرند، استیپول وجود نداشته و تحلیل رفته است. گل‌ها منظم، کامل، منفرد یا مجتمع به صورت خوشه، سنبله و یا شکل‌هایی از پانیکول یا گرزن است. دم‌گل‌ها اغلب به طرف قاعده تا شده است. نوع گل‌ها پایینی بوده، قطعات گل معمولاً دوتایی یا سه تایی بوده و در دو ردیف قرار دارند. هر گل دارای چهار تا شش کاسبرگ براکته مانند در دو ردیف می‌باشد. گلبرگ‌های داخلی بیشتر پرچم‌های تحلیل رفته گلبرگ مانند هستند که تولید نوش می‌کنند. تعداد پرچم‌ها چهار عدد یا بیشتر است ولی اغلب شش عدد می‌باشد و معمولاً مقابل گلبرگ‌ها دارای نوش هستند. کیسه‌های گرده بساک معمولاً چهار عدد است. مادگی یک برچه‌ای است ولی گاهی دوتا سه برچه‌ای به نظر می‌رسد. تخمدان از نوع فوقانی است

و تخمک از نوع واژگون یا نیمه واژگون است و تعداد زیادی از آن‌ها ممکن است در حاشیه تخمدان روی جفت ضخیمی قرار گیرند. خامه برجسته بوده و دارای سه لوب می‌باشد. میوه بیشتر سه حبه‌ای است.

۲-۶- جنس زرشک

زرشک بزرگترین جنس در این تیره می‌باشد. فسیل این جنس از دوره پلیستوسن شناخته شده است. رنگ و شکل پوست شاخه‌ها با افزایش سن درخت تغییر می‌کند. رنگ پوست شاخه‌ها از زرد تا قهوه‌ای و خاکستری و ارغوانی متغییر است. شاخه‌های یک ساله معمولاً زرد رنگ می‌باشند و شاخه‌های بلند تیغ‌های فراوان دارند. برگ‌ها متناوب، ساده، خزان کننده و گاهی همیشه سبز است و دارای دمبرگ‌هایی است که بخشی از پهنک معمولاً در طرفین آن قرار داشته و باریک می‌شود. ساقه آن خاردار بوده و خارها ممکن است منفرد، سه شاخه و یا گاهی پنج شاخه باشد. این خارها از تغییر شکل برگ‌ها حاصل شده‌اند. گل‌ها منظم، دو جنسی، اغلب مجتمع از نوع خوشه کاذب یا گرز یا گاهی پانیکول و به ندرت منفرد است. گل‌های مجتمع کم و بیش حالت آویخته دارد. گل‌ها معمولاً در اردیبهشت یا خرداد شکفته می‌شوند. گل پوش‌ها سه تایی و در دو ردیف قرار دارند، یعنی دارای شش کاسبرگ و شش گلبرگ می‌باشند. گل‌ها از نوع تحتانی و زودریز می‌باشند، آرایش گلپوش‌ها از نوع هم پوش^۱ است. معمولاً یک تا دو ردیف غده‌های شهدزا روی گلبرگ‌ها بین جام گل و پرچم‌ها قرار دارد. پرچم‌ها معمولاً شش عدد و در دو ردیف هستند ولی بسته به گونه، ممکن است به تعداد ۴ تا ۱۸ عدد تغییر کنند. پرچم‌ها دارای میله‌ای کوتاه بوده و مفصلی در قاعده دارند. پرچم‌های بیرون‌اپی‌پتال بوده و مقابل گلبرگ‌ها قرار دارند. بساک‌ها دو حجره‌ای و بازی فیکس می‌باشند یعنی از قاعده به میله پرچم چسبیده‌اند. بساک‌ها توسط دو دریچه از طرفین شکفته می‌شوند (شکل ۲-۱).

^۱. Imbricate



شکل ۱-۲ ساختار شماتیک گل، میوه زرشک (*Berberis vulgaris*)



شکل ۲-۲ درختچه‌های بارور زرشک

مادگی یک عدد بوده و تخمدان بالایی و یک خانه است که دارای دو تا سه برچه و به عقیده بعضی یک برچه با تخمک‌های قاعده‌ای می باشد. کلالة آن یک عدد و میوه آن سته حبه‌ای مانند و قرمز رنگ می‌باشد که اغلب دارای دو تا سه دانه است. میوه معمولاً بیضوی بوده و طول آن گاهی ممکن است تا ۱۳ میلی‌متر هم برسد. روی میوه برجستگی کوچکی مربوط به بقایای کلالة و خامه دیده می‌شود. جنین، دو لپه‌ای و کوچک است و آندسپرم آن فراوان است (شکل ۲-۲) (بالندری و کافی، ۱۳۸۱).

۷-۲- ویژگی‌های برخی گونه‌های زرشک مطابق فلور ایران

۷-۲-۱ زرشک زالزالکی *B. crataegina*

زرشک زالزالکی درختچه‌ای با تنه‌های متعدد افراشته به ارتفاع ۱/۵ تا ۳ متر، شاخه‌های جوان ارغوانی تیره متمایل به قهوه‌ای تا قرمز، اغلب شفاف و شیاردار، شاخه‌های مسن خاکستری متمایل به قهوه‌ای، خارها کوتاه‌تر از برگ‌ها و به طول ۱ تا ۲/۵ سانتی‌متر، ساده یا ۳ قسمتی، رنگ پریده تر از شاخه، برگ‌ها غیر چرمی، به طول ۴ تا ۵ و عرض ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر و معمولا طول سه برابر عرض، کشیده، بیضوی و تا واژ سرنیزه‌ای یا خطی با دمبرگ به طول تا ۵ میلی‌متر یا در قاعده باریک شونده، در حاشیه اغلب صاف یا با دندانه‌های اره تنگ، نوک تیز یا گاهی نوک گرد، در سطح تحتانی با رگ‌بندی تقریبا برجسته، گل آذین خوشه‌ای یا ساده به ندرت خوشه‌ای مرکب، به طول ۲ تا ۵ سانتی‌متر، ۸ تا ۲۰ گل، گل‌ها زرد، نسبتا کوچک، کاسبرگ‌ها تقریبا گرد، زرد

متمایل به خاکستری، گلبرگ‌ها و از تخم‌مرغی پهن، میوه سته به طول تا ۸ میلی‌متر، بیضوی، فاقد خامه، سیاه رنگ (آزادی، ۱۳۸۸).

۷-۲-۲ زرشک بی‌دانه *B. vulgaris*

زرشک بی‌دانه یکی از معدود محصولات ویژه و منحصر به فردی است که تنها در کشور ایران تولید می‌شود. شهرستان‌های قائن و بیرجند مهم‌ترین مناطق تولید زرشک در ایران محسوب می‌شوند (Tehranifar., 2002; Alemardan et al., 2013). زرشک بی‌دانه درختچه‌ای با تنه‌های متعدد افراشته، به ارتفاع ۳ متر، شاخه‌های سال جاری شیاردار، زرد متمایل به سبز یا مایل به قهوه‌ای، شاخه‌های سال قبل و شاخه‌های مسن با عدسک‌های سیاه فراوان، خاکستری مات، با پوست متورق و ترک خورده، برگ‌های آن ۴ تا ۵ سانتی‌متر که به مراتب بلندتر از خارها بوده و شکل آن معکوس تخم‌مرغی و سرنیزه‌ای یا اره‌ای مژدار و دارای دمبرگ‌اند. به‌علاوه برگ‌های فوقانی در سطح رویی فاقد روزنه هستند و به صورت متناوب در روی شاخه‌ها قرار دارند، کناره برگ دندانه‌هایی

منتهی به خارهای ریز و نازک تیره رنگ دارند. خارها به طول ۱ تا ۱/۵ و یا به ندرت تا ۲/۵ سانتی متر، ساده یا ۳ قسمتی می‌باشد.

گل آذین آن خوشه‌ای مجتمع و آویزان به طول ۳ تا ۶ سانتی متر که در هر خوشه ۱۵ تا ۲۵ گل وجود دارد و به رنگ زرد در بهار بر روی شاخه‌های خاکستری ظاهر می‌گردند. گل‌ها دارای ۶ گلبرگ، ۶ کاسبرگ و ۶ پرچم می‌باشد. میوه آن سته تخم مرغی به طول ۷ تا ۸ سانتی‌متر و به عرض ۳ میلی‌متر به رنگ قرمز روشن که بعداً تیره می‌گردد. این گونه فقط در ایران و در عرض‌های ۳۲/۵ تا ۳۴/۵ درجه شمالی رشد دارد (مودن فردوسی، ۱۳۷۵).

۲-۷-۳ زرشک زرافشانی *B. integerrima*

گونه‌ای از زرشک وحشی و دانه‌دار است که به‌صورت خودرو در مناطق مختلف ایران از قبیل آذربایجان، لرستان، فارس، تهران و در خراسان در بجنورد، شیروان، اسفراین، قوچان و کلات رشد می‌کند. تغییرات موجود در این گونه حائز اهمیت خاصی است و واریته‌های مختلفی دارد. این گونه در فلور ایرانیکا (آسیای صغیر) نیز پراکنش زیادی دارد. میوه آن تخم مرغی شکل به رنگ قرمز تا ارغوانی می‌باشد (بالندری و همکاران، ۱۳۸۱).

۲-۷-۴ زرشک راست خوشه *B. orthobotrys*

ارتفاع این گیاه ۳ تا ۴ متر با شاخه‌های گل دهنده خاکستری برگ‌ها کشیده تا حدودی چرمی و بیضی با حاشیه صاف می‌باشند گل آذین خوشه متراکم، ۱/۵ تا ۳/۵ سانتی متر و تعداد گل‌ها ۵ تا ۲۰ عدد است میوه سته حبه‌ای گلابی شکل ۸ تا ۱۰ میلی‌متر طول، بیضی شکل و به رنگ قرمز مایل به سیاه دارای ۳ عدد بذر به رنگ سیاه می‌باشد.

۲-۷-۵ زرشک خراسانی *B. khorasanica*

زرشک خراسانی بومی ایران بوده و برای اولین بار در سال ۱۹۷۵ در ایران و فلور ایرانیکا ذکر شده است، درختچه‌ای با برگ‌های کشیده و چرمی کمی دارند و به شکل بیضی یا مستطیل با زاویه‌های کند که در پاییز

قرمز رنگ می‌شوند گل آذین ساده، کشیده راست تا حدودی خمیده دارای تعداد ۲۰ عدد گل در هر خوشه و رنگ گل‌ها زرد می‌باشند. میوه آن سته، تعداد میوه در هر خوشه ۱۲ تا ۳۰ عدد طول میوه ۸ تا ۱۰ میلی‌متر رنگ میوه قرمز آجری تا قرمز تیره می‌باشند.

۲-۷-۶- زرشک‌های زینتی

گونه‌های زرشک زینتی را در سه گروه می‌توان دسته‌بندی کرد: خزان دار، همیشه سبز و نیمه همیشه سبز، درختچه‌های خزان دار و همیشه سبز به خاطر دارا بودن ویژگی‌های مناسبی مثل گل‌های خوشه ای زرد تا نارنجی، میوه های قرمز تا آبی بنفش، تغییر رنگ زیبایی شاخ و برگ در پاییز و ارتفاع مختلف از ۳۰ سانتی متر تا حدود ۲/۵ متر در طراحی فضای سبز در باغ‌های صخره‌ای تا حاشیه پارک‌ها به صورت منفرد یا در دسته های کوچک گلبزرگ دارند. ارقام زینتی زرشک از نظر شکل و رنگ برگ‌ها و میوه‌هایشان دارای تنوع بسیار زیادی هستند (جدول ۱-۲). بیشتر زرشک‌های خزان دار منشاء آسیایی دارند کاملاً مقاوم بوده و در آفتاب یا کمی سایه و تقریباً در هر خاک‌ی که زهکشی خوبی داشته باشد به آسانی رشد می‌کنند. این گونه‌ها معمولاً برگ‌های تخم مرغی و حبه های قرمز رنگ دارند زرشک‌های همیشه سبز دارای برگ‌های چرمی، اغلب کاردی شکل و دندانه دار با میوه‌های آبی، سیاه و ارغوانی می‌باشند. آنها عمدتاً منشاء آسیایی داشته و تعداد کمی نیز از آمریکای جنوبی هستند (بالندری و کافی ۱۳۸۱). گونه‌های *Berberis darwinii* و *B. stenophylla* از زیباترین درختچه‌های همیشه سبزی هستند که پرورش داده می‌شوند. زرشک آمریکایی بومی شمال شرق آمریکا است. *B. thunbergii*، زرشک ژاپنی که اغلب به عنوان پرچین یا یک درختچه زینتی کاشته می‌شود و چندین رقم با شاخ و برگ ارغوانی یا زرد پاکوتاه آن در طراحی فضای سبز کاربرد دارد. این درختچه بخاطر داشتن شاخ و برگ پاییزه مخملی رنگ و حبه‌های قرمز روشن پردوامش در فصل پاییز و زمستان، مورد پرورش قرار می‌گیرد. زرشک ژاپنی که متداول‌ترین گونه زرشک مورد استفاده در طراحی فضای سبز در نقاط مختلف دنیاست، از قابلیت سازگاری خوبی نیز برخوردار است. تا سال ۱۹۸۱ دارای ۱۶ رقم مختلف زیبا از آن معرفی شده بود که از نظر رنگ برگ در دو گروه برگ قرمز تا ارغوانی با نام *B. atropurpurea* و گروه برگ سبز قرار

می‌گیرند (بالندری و کافی ۱۳۸۱). رنگ میوه‌های زرشک به طور کلی می‌توان سیاه، قرمز و یا ارغوانی باشد. رنگ تیپیک میوه در اکثر گونه‌های همیشه سبز سیاه رنگ است (۵/۵۴ درصد از گونه‌ها و واریته‌های که به وسیله آهرنت تشریح گردید. رنگ قرمز و ارغوانی بیشتر در گونه‌های خزان کننده موجود می‌باشند (۸/۳۱/)). در انواع ترکیبی حدود ۷/۱ درصد از همیشه سبزها دارای میوه‌های قرمز یا ارغوانی بودند و حدود ۶/۶ درصد گونه‌ها خزان کننده دارای میوه‌های سیاه رنگ بودند (Cadici., 1992). دلیل اصلی اختلافات رنگی در میوه‌های سیاه با قرمز یا ارغوانی مربوط به فقدان رنگیزه پلارگونیدن^۱ در میوه‌ها می‌باشد. در جدول ۱-۲ اسامی، ارتفاع، عادت رشدی و رنگ میوه برخی از زرشک‌های مهم دنیا آورده شده است.

^۱. pelargoniden

جدول ۱-۲ اسامی، ارتفاع، عادت رشدی و رنگ میوه برخی از زرشک‌های مهم دنیا براساس سیستم نام گذاری گیاهان (USDA)

NRCS1999)USDA

نام علمی	نام عمومی	ارتفاع	عادت رشدی	رنگ میوه رسیده
		درختچه زمان بلوغ (M)		
<i>B. buxifoli</i> Lam.	Boxleaf barberry	۰/۶ - ۲/۱	خزان دار	آبی آلبی
<i>B. candidula</i> (C.K.Schneid)	paleleaf barberry	۰/۶ - ۱/۲	همیشه سبز	زرشکی
<i>B. circumserrata</i> (C.K.Schneid)	cutleaf barberry	۰/۶ - ۰/۹	خزان دار	قرمز مات
<i>B. darwinii</i> Hook.	Darwin barberry	۱/۵ - ۲/۴	همیشه سبز	آبی آلبی
<i>B. gagnepainii</i> C.K.Schneid	black barberry	۰/۹ - ۱/۸	همیشه سبز	آبی آلبی
<i>B. gilgiana</i> Fedde	wildfire barberry	۱/۸ - ۲/۴	خزان دار	قرمز
<i>B. julianiae</i> Schneid	Julian barberry	۱/۸ - ۳	همیشه سبز	سیاه مایل به آبی
<i>B. koreana</i> palibin	Korean barberry	۱/۲ - ۱/۸	خزان دار	قرمز روشن
<i>B.sargentiana</i> C.K.Schneid	Sargent barberry	۱/۸ - ۲/۷	همیشه سبز	سیاه
<i>B. thunbergii</i> DC	Japaneese barberry	۰/۹ - ۱/۸	خزان دار	قرمز روشن
<i>B. trifoliata</i> moric				
<i>B. tricanthophora</i> Fedde	threespine barberry	۰/۹ - ۱/۵	همیشه سبز	سیاه مایل به آبی
<i>B. verna</i> C.K.Schneid	Verna barberry	۰/۹ - ۱/۲	خزان دار	قرمز مات
<i>B. verruculosa</i> Hensl.&E.H.Wilson	warty barberry	۰/۹ - ۱/۸	همیشه سبز	سیاه مخملی
<i>B.vulgaris</i> L.	common barberry (European barberry)	۱/۸ - ۳/۰	خزان دار	زرشکی

۲-۸- نشانگر

تفاوت‌های بین ردیف‌های DNA یک موجود، که آن را از سایر موجودات جدا می‌کند را نشانگر ژنتیکی می‌گویند، به عبارتی هر آنچه میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف تفاوت ایجاد کند و سبب تمایز آن‌ها از یکدیگر شود به عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می‌شود (Chauhan & Kumar., 2015).

نشانگرهای مولکولی DNA جهت تخمین تنوع ژنتیکی و نیز تشخیص ژرم‌پلاسماهای جدید به منظور بهره‌مندی در برنامه‌های اصلاحی گونه‌های گیاهی مختلف استفاده می‌شوند (Panwar et al., 2010). این نشانگرها از نظر هزینه، مقدار DNA مورد نیاز، سرعت آشکارسازی، درجه چندشکلی و دقت تخمین فاصله ژنتیکی از تفاوت‌های منحصر به فردی برخوردارند (Garcia et al., 2004). به عبارتی مزایای یک نشانگر خوب عبارتند از توارث هم بارز (که امکان تمایز حالت‌های خاص (هموزیگوت) و ناخالص (هتروزیگوت) در موجودات دیپلوئید را فراهم می‌سازد)، میزان چندشکلی متوسط تا زیاد، تبادل آسان داده‌ها بین آزمایشگاه‌ها، ارزیابی آسان و سریع، رفتار خنثی از نظر گزینشی (نبود اثرگذاری‌های چندگانه)، تعیین آلل‌ها به صورت کاملاً مشخص و روشن، صرف هزینه کم به منظور ایجاد، بررسی و ارزیابی نشانگر را داراست (Weising et al., 2012).

۲-۸-۱- انواع نشانگرها

- نشانگرهای مورفولوژیکی، گروهی که براساس تنوعات قابل مشاهده می‌باشند مانند صفات مورفولوژیکی و صفات زراعی و ...
- نشانگرهای بیوشیمی، گروهی که براساس تنوعات محصول ژن (پروتئین) می‌باشند. که بازتابی از تنوع موجود در سطح ژنوم می‌باشند.
- نشانگرهای مولکولی، گروهی که براساس تنوعات تفاوت‌های موجود در ردیف بازی DNA می‌باشند که در واقع توارث سطح ژنوم را آشکار می‌کنند (Chauhan & Kumar., 2015).

بر همین اساس نشانگرهای متنوعی نظیر RFLP، AFLP، RAPD و SSR (ریزماهواره) توسعه یافته و در آنالیزهای ژنومی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Palombi and Damiano., 2002).

۲-۸-۱-۱ نشانگر SSR

یکی از تکنیک‌های قدرتمند در کاوش DNA نشانگرهای SSR می‌باشند میکروساتلایت‌ها از تکرارهای نوکلئوتیدی ۲ الی ۶ جفت بازی تشکیل شده و آلل‌های آن‌ها معمولاً در تعداد واحدهای تکراری متفاوت می‌باشند (Upadhyay et al., 2011). تعداد این نشانگرها در ژنوم بسیار فراوان و جهش‌پذیر بوده و به دلایل چند آلی بودن، هم‌بارزی، تکرارپذیری، تفسیر نسبتاً آسان، توزیع مناسب در ژنوم و قدرت آشکارسازی چند شکلی بالا (Jatoi et al., 2006). استفاده از این نشانگرها در مطالعات تکاملی، تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی گیاهان و حتی شناسایی ارقام امکان‌پذیر می‌باشد هزینه مورد نیاز و تلاش لازم برای توسعه میکروساتلایت‌ها محدودیت‌هایی را برای استفاده از این نشانگر ایجاد نموده به طوری که کاربرد آن‌ها را به تعدادی از گیاهان مهم زراعی که برنامه توالی‌یابی آن‌ها تکمیل شده محدود می‌نماید (کرمی و همکاران، ۲۰۱۰). در خصوص کارایی نشانگر SSR وی و تنشکی (۱۹۹۳) اظهار داشتند که هتروزیگوسیتی میکروساتلایت‌ها بسیار بالاتر از نشانگرهای معروف دیگر بوده و به عنوان مثال میزان آن ۷ الی ۱۰ بار بیشتر از نشانگرهای RELP می‌باشد (Garcia et al., 2010). در حالی که فواید زیادی برای این نشانگر ذکر شده است ولی توسعه آن نیاز به توالی‌یابی ژنوم دارد. بنابراین جهت کاوش ژنوم‌های ناشناخته نیاز به استفاده از نشانگرهای تصادفی مانند RAPD احساس می‌شود (میرعرب و همکاران، ۱۳۹۳).

۲-۸-۱-۲ نشانگر RAPD

RAPD نشانگری غیراختصاصی بوده و مبتنی بر استفاده از آغازگر منفرد تصادفی می‌باشد و به منظور تکثیر چندین قطعه از DNA که هر قطعه از یک محل ژنوم مشتق و به صورت دو قطعه کوتاه آغازگری با جهت معکوس طراحی می‌شود (جونز و همکاران، ۱۹۹۷). مطالعات متعددی نشان می‌دهند که تغییر پارامترهای

مختلف از جمله نسبت نمونه DNA به آغازگر، غلظت Taq پلیمرز و حتی دستگاه‌های متفاوت ترموسایکلر می‌توانند بر باندهای به دست آمده از نشانگر RAPD اثر بگذارند. بنابراین جهت افزایش تکرارپذیری این نوع نشانگر، لازم است که شرایط استاندارد برای واکنش آن در نظر گرفته شود. اما با این حال نشانگرهای RAPD عموماً در تحقیقات ژنتیکی به دلیل سرعت فرآیند و سهولت کاربرد مورد استفاده قرار می‌گیرند (پنوار و همکاران، ۲۰۱۰، اگرما و توئینسترا، ۲۰۰۳). از دیگر ویژگی‌های نشانگر RAPD آن است که غالب بوده و توانایی ردیابی اختلاف تک نوکلئوتیدی در میان ژنوم‌ها را دارد و بنابراین می‌توان از این نشانگر در تفکیک گونه‌های یک جنس بر پایه میزان شباهت ژنومی و قرابت جغرافیایی با موفقیت استفاده نمود (Shery et al., 2011). دلیل علاقمندی محققین به استفاده از این نشانگر در مزایای منحصر به فردی مانند نامحدود بودن تعداد نشانگر، عدم استفاده از مواد رادیواکتیو، نیاز کم به DNA ژنومی، آسان و سریع بودن تجزیه و تحلیل و اقتصادی‌تر بودن نسبت به سایر نشانگرها می‌باشد. به خصوص این که کاربرد آن‌ها در گونه‌های کمتر شناخته شده به دلیل عدم نیاز به سابقه توالی ژنومی برای طراحی آغازگرها بسیار مناسب می‌باشد (Foolad et al., 2003; Selaraj et al., 2011; Ilbi., 1993). نشانگر RAPD دارای معایبی نظیر توان شناسایی چندشکلی در حد بسیار پایینی در مقایسه با نشانگرهای دیگری نظیر AFLP می‌باشد. بنابراین افزایش توان این نشانگر در تعیین نقاط پلی‌مورف در سطح DNA افراد مورد مطالعه می‌تواند کارایی این نشانگر را در بررسی تنوعات ژنتیکی بسیار افزایش دهد (Yousefi Harikandehei et al., 2009).

۲-۸-۱-۳ نشانگر ISSR

در بین نشانگرهای مبتنی بر PCR نشانگرهای ISSR (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) به طور وسیعی توسط محققان برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، کارآمد گزارش شده‌اند. نشانگر ISSR مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و جزء انواع تغییر یافته نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد. نشانگرهای ISSR توسط PCR و با استفاده از توالی‌های مرکزی ریزماهواره به عنوان آغازگر، همراه با چند نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳ یا ۵ به عنوان لنگرهای داخلی مناطق غیرتکراری مجاور تکثیر می‌شوند (Li et al., 2008).

نشانگر ISSR یک تکنیک ساده، سریع و موثر و بسیار تکرارپذیر است و دارای ویژگی‌های بسیار مطلوبی مانند تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین، سرعت و سهولت اجرا به طور گسترده‌ای در گیاهان به کار گرفته شده است. نشانگر ISSR نیمه تصادفی بوده و از تکرارپذیری و چند شکلی بالایی برخوردار است و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد. هم‌چنین به علت غالبیت، سادگی، سرعت عمل و قدرت تفکیک بالا، قدرت بیشتری در آشکارسازی تنوع ژنتیکی دارد (Reddy et al, 2002; Hasani et al., 2013). مزایای استفاده از نشانگر ISSR این است که اختصاصی بودن نشانگرهای ریزماهواره را به نمایش می‌گذارد، اما با بهره‌گیری از مزیت‌های نشانگر تصادفی، نیاز به هیچ گونه اطلاعات توالی برای سنتز آغازگر ندارد. هم‌چنین داشتن چندین مقر ژنی چندشکلی، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه و هزینه پایین از مزایای این نشانگر می‌باشد (Reddy et al., 2002).

۲-۹- توالی DNA در اندامک های گیاهی

در گیاهان سه نوع اصلی از توالی های DNA در درون اندامک‌های میتوکندریایی، کلروپلاستی و ریبوزومی هسته وجود دارد.

پیشنهاد آغازین در سال ۲۰۰۳، هبرت و همکاران در مقاله‌ای که در شاخه علوم زیستی ژورنال جامعه سلطنتی لندن به چاپ رسید، استفاده از نشانگر CO1 را به عنوان خط شناسه عمومی برای شناسایی گونه‌های جانوری پیشنهاد دادند (هبرت و همکاران، ۲۰۰۳). این مقاله را می‌توان سرآغاز جنبش خط شناسه‌گذاری دانست. این مقاله برای جنبش خط شناسه‌گذاری اهمیت تاریخی شایانی دارد. DNA بارکدینگ براساس توالی کوتاه استاندارد شده‌ای بنا شده است که سبب تمایز در بین تک گونه‌ها به علت تنوع ژنتیکی درون جمعیت می‌شود. برای این کار می‌توان از قطعات مختلفی برای بیوسیس‌تماتیک گونه‌های مختلف استفاده کرد (هبرت، ۲۰۰۳). بالغ بر سه دهه است DNA میتوکندریایی به عنوان مارکری است که برای تنوع مولکولی زیاد استفاده می‌شود در پژوهشی که توسط گالتیر و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد استفاده از DNA میتوکندریایی برای توصیف و شناسایی گونه‌ها ارزیابی شد و از M DNA به عنوان یک پتانسیل عظیم برای آنالیز تکامل و عملکرد ژنوم

سمیتوکندریایی ذکر گردید. توالی‌های در میتوکندری به علت سرعت پایین تفکیک پذیری کمتر در بررسی روابط خویشاوندی گیاهان بکار گرفته می‌شوند.

ژنوم کلروپلاستی و توالی‌های ریبوزومی هسته nr DNA به طور وسیعی در مطالعات فیلوژنی بکار می‌روند. یکی از عواملی سیتوپلاسمی در گیاهان کلروپلاست است. ژن‌های کلروپلاستی به صورت گسترده‌ای برای درک فیلوژنی گیاهان در رده‌های مختلف تاکسونومیک به کار رفته است. در رده‌بندی و تکامل گیاهان کوچک بودن ژنوم، مقدار فراوان DNA و سرعت کمتر جهش در مقایسه با ژنوم هسته‌ای از جمله دلایلی است که کارایی استفاده از ژنوم کلروپلاستی در مطالعات رده‌بندی را در مقایسه با ژن‌های هسته افزایش داده است (Clegg et al., 1994). به طور کلی در گیاهان، ژنوم میتوکندریایی در سرعت پایین، ژنوم کلروپلاستی در سرعت بالاتر و ژنوم هسته‌ای با بیشترین سرعت تکامل می‌یابد (Pag & Home., 2000).

ژنوم هسته‌ای ریبوزومی که در هستک سازمان یافته‌اند، توالی‌های تکراری به تعداد ۵۰ تا بیش از ۴۰۰۰ جفت باز می‌باشند که در تکرارهای پشت سر هم آرایش یافته‌اند و در گیاهان ۱۰٪ کل DNA را تشکیل می‌دهند (Peg et al., 1980).

۲-۱۰- پیشینه بارکدگذاری در گیاهان و حیوانات

بارکدگذاری در حیوانات که از بخشی از میتوکندری (Co1) استفاده می‌گردند به طور موفقیت آمیز پیشگام بوده است و به عنوان قطعه مورد توافق عمومی قرار گرفته است. بارکد استاندارد DNA C01 دارای سطح بالایی از قدرت تفکیک می‌باشد. اما به علت جایگزینی کند نوکلئوتیدی در ژنوم‌های میتوکندری گیاهی مانع از استفاده از Co1 به عنوان بارکد گیاهی شده است و هنوز قطعه ژنوم گیاهی که بتواند برای تمام جنس‌های گیاهی به عنوان بارکد کاربرد داشته باشد معرفی نشده است.

محققان ابتدا پذیرفتند که نشانگرهای متعددی برای تفکیک گونه‌های گیاهی مختلف لازم است. پس ۷ نشانگر مختلف پلاستییدی به نام‌های RpoC1, rpoB, matK, AtPH, PsbK, timH, psbA را معرفی نمودند. هر کدام

از این نشانگرها نقاط ضعف و قوت زیادی داشتند. سپس نشانگرهای trnf, TMH, PsbA, atpF, atpH, trnL در مطالعات فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند (Hollingsworth., 2011).

در وضعیت چالش برانگیز بارکد مناسب گیاهی، بسیاری از راهبردهای پیشنهاد شده یا بر اساس یک منطقه منفرد کلروپلاستی (Lahay et al., 2008) و یا ترکیبی از مناطق مختلف کلروپلاستی (Ktess & Erickson., 2007) می‌باشد. علاوه بر مکان‌های ژنی و بین ژنی کلروپلاستی در مطالعات تبارشناسی که شامل مناطقی از قبیل Ndhf, Ycf, accD, rpoB, rpoC, matK و منطقه ریبوزومی هسته ای ITS و همچنین توالی بین ژنی trnH-psb, psbK-psbI, tranL, trnfat-F-atpH مورد استفاده قرار می‌گیرند. محققان به دنبال استفاده از بارکدهای مختلف مذکور جهت دسترسی به موفقیت بیشتر هستند (Ming et al., 2011).

۲-۱۱- بارکد گذاری DNA

امروزه از روش‌های مختلفی برای شناسایی دقیق گونه‌های گیاهی و بارکدینگ استفاده می‌شود. روند رو به کاهش تنوع زیستی از یک سو و وقوع دورگ‌ها و مضاعف‌شدگی کروموزومی که از عوامل تشخیص نادرست گونه‌های گیاهی است از سوی دیگر، از دغدغه‌های اصلی متخصصان سیستماتیک گیاهی برای دسترسی سریع، دقیق و ارزان قیمت در شناسایی گونه‌های گیاهی می‌باشد (بیتا و همکاران، ۱۳۹۲).

یکی از این روش‌های شناسایی قابل اعتماد، شناسایی گیاهان به کمک تکنیک جدید بارکدگذاری DNA می‌باشد که نسبت به روش‌های سنتی تبارشناسی ارزان، سریع و دقت بالا در تشخیص گونه‌ها می‌باشد (Gharamanzadeh et al., 2012). بیش از یک دهه است که تقاضا برای تشخیص مولکولی تنوع زیستی افزایش یافته است. بارکدگذاری DNA با استفاده از اطلاعات موجود در یک منطقه مشترک از یک ژن یا ناحیه بین ژنی در تمام گونه‌ها و تعیین توالی آن‌ها برای فراهم آوردن یک شبکه جهانی برای تبادل داده‌ها بین پژوهشگران روشی موفق در شناسایی و مستندسازی تنوع زیستی موجودات محسوب می‌گردد. این روش که اولین بار توسط هبرت و همکاران (۲۰۰۳) مطرح گردید، یک ارتباط ساده بین تمام مراحل زندگی در سطوح بالاتر از گونه ایجاد می‌کند. کنسرسیوم بارکدگذاری موجودات زنده (CBOL) تلاش‌های فراوانی برای توسعه

این روش انجام می‌دهد (Casiraghi et al., 2010) در جانوران منطقه ژنی که به عنوان بارکد استاندارد پیشنهاد شده، ژن سیتوکروم اکسیداز (CO1) میتوکندری می‌باشد (Hebert et al., 2003). ولی در گیاهان استفاده از این مکان ژنی به عنوان بارکد به دلیل ماهیت میتوکندریایی گیاهان میسر نیست، زیرا میزان تغییرات در ژن‌های میتوکندریایی گیاهان پایین بوده و همچنین ساختار ژنوم میتوکندریایی در گونه‌های گیاهی متغیر است. بنابراین بسیاری از بارکدهای پیشنهاد شده در گیاهان براساس یک منطقه منفرد از کلروپلاست و یا ترکیبی از مناطق مختلف کلروپلاستی یا هسته‌ای می‌باشند (Chen et al., 2010). برخی ژن‌های هسته‌ای یا پلاستییدی گیاهی به علت سرعت پایین تکامل قادر به تفکیک گونه‌های گیاهی هستند و بارکدگذاری DNA¹ به دلیل تمایز بین گونه‌ای وعدم تمایز درون گروهی ابزار قوی در شناسایی گونه‌ها می‌باشد (Chen et al., 2010). در روش DNA بارکدینگ، بخشی از ژنوم که ضمن کوتاه بودن، دارای ویژگی چند شکلی نیز می‌باشد، برای تفکیک گونه‌های یک جنس استفاده می‌شود (Marshall et al., 2005). علاوه بر این سیستم‌های مبتنی بر DNA بارکدینگ علاوه بر شناسایی گونه‌ها، امکان یافتن گونه‌های جدید فراهم می‌آورد (Heber et al., 2003). این تکنیک از سال ۲۰۰۳ به طور چشمگیری در شناسایی گونه‌های گیاهی بکار رفته است. و از سال ۲۰۰۴ کنسرسیوم بارکد موجودات زنده (CBOL²) به منظور ایجاد کتابخانه بارکدگذاری موجودات زنده راه اندازی شد. بارکدگذاری DNA با استفاده از یک توالی DNA بسیار کوتاه استاندارد شده از یک ژن یا منطقه ژنی انجام می‌گیرد و به کمک آن توالی می‌توان پی برد هر جانور، گیاه یا قارچ به چه گونه‌ای تعلق دارد (Valentini et al., 2008). در نتیجه با تکثیر توالی هدف می‌توان گونه‌های خیلی نزدیک بهم را از یکدیگر تشخیص داد (Hebert et al., 2003).

هدف اولیه و اصلی این تکنیک شناسایی بارکد خاص برای هر گونه و تشکیل بانک اطلاعات بارکد موجود زنده می‌باشد، تا تمام پژوهشگران دنیا امکان دسترسی و استفاده از این داده‌ها را داشته باشند. بانک اطلاعات

1 -DNA barcoding

2- consortium for the barcode of life

موجود زنده (¹BOLD) تمام اطلاعات لازم از قبیل گیاهشناسی، شرایط رشد، محل رویش و مقالات مرتبط با گیاه مورد بررسی را در خود جای داده است (بانک اطلاعاتی BOLD).

۲-۱۱-۱- کاربردهای DNA بارکدینگ

DNA بارکدینگ به عنوان حلقه گمشده در علم تاکسونومی محسوب می شود و می تواند بسیاری از عیب های روش های سنتی را تا حدود زیادی برطرف می کند. DNA بارکدینگ در ترسیم بهتر درخت حیات و روابط فیلوژنتیکی بین موجودات تأثیر بسزایی دارد. DNA بارکدینگ در جنبه کاربردی خود به کمک بشر می شتابد و به عنوان اسلحه ای در دست انسان برای شناسایی عوامل مضر در پزشکی و کشاورزی و مبارزه به موقع با آن ها می باشد و همچنین می تواند در زمینه حفاظت منابع و محیط زیست بسیار تأثیرگذار باشد. DNA بارکدینگ نه تنها در امر طبقه بندی موجودات زنده به کمک تاکسونومیست ها و روش سنتی طبقه بندی شتافت بلکه در زمینه های دیگر نیز انسان را یاری نمود مانند:

کنترل آفات کشاورزی و در نتیجه کاهش فقر و گرسنگی: DNA بارکدینگ امکان شناسایی آفات و بیماری های محصولات کشاورزی را در هر مرحله از مراحل نمو میسر می سازد.

شناسایی ناقلان بیماری برای مبارزه با بیماری ها: DNA بارکدینگ به غیر تاکسونومیست ها در امر شناسایی ناقل ها کمک می کند و گسترش عوامل بیماری زا و ناقل ها را محدود می کند.

حفاظت منابع طبیعی و حمایت از گونه های در حال انقراض: ماموران و مدیران منابع طبیعی می توانند با تکنیک DNA بارکدینگ به کشف خرید و فروش غیرقانونی محصولات آنالیز شده بپردازند. همچنین مجریان قانون به کمک این تکنیک می توانند به شناسایی گوشت حیوانات در حال انقراض در بازارهای محلی بپردازند. **آگاهی از کیفیت آب:** آب یک منبع ارزشمند است که سلامتی رودخانه ها، رودها و دریاچه ها که اغلب با اندازه گیری ارگانیس م ها در آن محک زده می شود. DNA بارکدینگ برای بررسی این گونه شاخص ها استفاده

می‌شود که بدون استفاده از این روش شناسایی آن‌ها بسیار مشکل است. فعالان بخش محیط با استفاده از این روش کیفیت آب را بهبود بخشیده و منابع آب نوشیدن را با اطمینان بیشتر تأمین می‌کنند (عشوریون و همکاران، ۱۳۸۸).

۲-۱۱-۲- فواید DNA بارکدینگ برای کشور

- شناسایی سریع و ارزان نمونه‌ها
- توانایی بهتر برای کنترل و جابجایی گونه‌ها در مرزهای ملی
- فرصت برای آموزش دانشجویان و پژوهشگران منطقه
- به کارگیری پژوهشگران منطقه‌ای در شبکه‌های جهانی و ابتکار عمل‌های تنوع زیستی
- ایجاد فرصت‌هایی جهت بهبود زیرساخت‌های تحقیقات ملی در زمینه‌های کلکسیون نمونه، آزمایشگاه-های زیست‌شناسی مولکولی و پایگاه داده‌های تنوع زیستی (اولین همایش جایگاه DNA بارکدینگ در آرایه شناسی، ۱۳۹۰).

۲-۱۱-۳- برنامه کاربردی دیگر در بارکدگذاری DNA در گیاهان

علاوه بر طبقه‌بندی سطح گونه‌ها، در شناسایی گونه‌های جدید و زیر گونه‌ها و رفع ابهام از گونه‌های چالشی و مشکوک بسیار موثر می‌باشد. همچنین در سایر رشته‌ها نظیر تاکسونومیست‌ها، اکولوژیست‌ها، طرفداران محیط زیست و منابع طبیعی، پزشکی قانونی و گمرک و قرنطینه نباتی مفید است. DNA بارکدینگ ابزار مناسبی در شناسایی گونه‌های در حال انقراض که تحت تدابیر قوانین منع بهره برداری و تجارت جهانی آنها قرار دارند، خواهد بود (Hollingswarth et al., 2011).

۲-۱۲- ITS بخشی از توالی nr DNA مورد استفاده در بارکدینگ

قدرت تفکیک پذیری ریبوزوم هسته‌ای nr DNA بیش از نواحی پلاستید شناخته شده است، nr ITS یک جایگزین به جای استفاده از کل مجموع DNA هسته می‌باشد. سپس نواحی با طول کمتری از مجموعه ITS

بنام ITS 2 S ITS 1-5/8 که قدرت تفکیک پذیری را آسان تر و قابل پیش بینی و با موفقیت بیشتری همراه است، معرفی گردید (Hollingsworth et al., 2011).

به طور کلی از نشانگرهای مولکولی برای بررسی ژرمپلاسم، شناسایی ژنتیکی گیاه، مطالعه ژنوم، تجزیه فیلوژنتیکی و بارکدینگ استفاده می شود. نشانگرهای ITS جزء مناطق مهم کروموزومی هستند که روی مناطق ژن های ریبوزومی قرار دارند. می توان از آنها به عنوان آغازگرهای عمومی جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی بین و درون گونه ها استفاده نمود و جزء توالی هایی هستند که به صورت حفاظت شده ای در طی تکامل باقی مانده است. تغییر در داخل مناطق ITS باعث تفاوت در جایگاه برش آنزیم و ایجاد چند شکلی می گردد. این تغییرات می تواند در اثر شرایط آب و هوایی یک منطقه نسبت به منطقه دیگر متفاوت باشد و باعث گردد نمونه ها از مناطق مختلف از یکدیگر تفکیک گردند (حیدری و همکاران ۱۳۹۳).

در حقیقت توالی ITS در DNA ریبوزومی توالی تغییر پذیری است که برای مطالعه فیلوژنتیکی در بسیاری از خانواده گیاهان و یوکاریوتها مناسب است. شایستگی مارکر ITS برای مطالعات فیلوژنتیکی به خاطر وراثت دو والدی، فراگیری، آسانی، یکسانی داخل گونه ای، تغییر پذیری بین گونه ای و تعداد کمی زیاد می باشد (feng et al., 2002).

ژن های ریبوزومی هسته ای در ۲ گروه 18S (زیر واحد کوچک ریبوزوم) و 5/8S و 28S (زیر واحد بزرگ ریبوزوم) قرار می گیرند. فاصله بین این نواحی را در دو ناحیه فاصله انداز داخلی (ITS₁, ITS₂) و یک قطعه 5/8S پر کرده است نواحی کد کننده 18S و 28S که به شدت محافظت شده اند، برای بررسی در سطح خانواده و بالاتر مفید هستند. بنابراین برای مقایسه گونه ها و جنس های بسیار نزدیک و مطالعات فیلوژنی کاربرد دارند.

نتایج نشان داده ITS₁ طولانی تر، متغیرتر و برای مطالعات فیلوژنی از ITS₂ مناسب تر است. به عبارت دیگر ITS یا ناحیه فاصله انداز رونویسی شده، بخشی از DNA ریبوزومی هسته می باشد، درون این بخش، نواحی کدشونده بسیار حفاظت شده (18S nrDNA, 5/8 nrDNA, 26nr DNA) به همراه نواحی غیر کد شونده (NS, ET) قرار دارند. نواحی ITS₁ و ITS₂ در بالغ شدن و پردازش ریبوزوم نقش دارند. ناحیه ITS پس از

پردازش ریبوزوم 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 (Baldwin, 2011, Alvarez & Wendel, 2003).

لذا تکثیر ناحیه بارکد ITS و توالی یابی مستقیم آن روشی استاندارد در مطالعه بارکدینگ است (Chen et al., 2010).

۲-۱۲-۱ مرور منابع

در تحقیقی به منظور تبار شناسی قارچ‌های همزیست اکتومیکوریزا با ریشه درختان بلوط در جنگل‌های شمال با هدف تایید کارایی آنالیزهای مولکولی DNA با استفاده از توالی‌یابی ناحیه هسته‌ای ITS rDNA انجام پذیرفت، نتیجه آن شناسایی ۴۹ تاکسون مختلف از قارچ‌های اکتومیکوریزا متعلق به ۱۳ جنس بود. استفاده از توالی ناحیه ITS ابزار مناسب و ارزشمندی برای شناسایی اکتومیکوریزهای جمع آوری شده از جنگل‌های شمال ایران معرفی شد. در واقع مقایسه توالی های ITS بدست آمده از این پژوهش با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌ها، روابط تاکسونومیکی مورد نظر را به خوبی بیان نمود (زمانی و همکاران، ۱۳۹۶).

در پژوهشی که به منظور بارکدگذاری DNA برخی از گیاهان داروئی بومی اردبیل انجام شد، ده گیاه داروئی بر اساس بارکدهای رایج rbcL, psbA, trnH, matk و بارکد هسته ای ITS انجام شد، نتایج حاصله نشان داد نشانگر rbcL قدرت تفکیک و جامعیت بالا داشته و بارکدهای ITS و trnH به عنوان بارکدهای مکمل شناسایی شدند. از طرف دیگر نشانگر matk دارای توالی یابی پایین و مناسب نبود. (اسدی و همکاران، ۱۳۹۴)

توالی نوکلئوتیدی nr DNA ITS داغداغان در یک بررسی (شاهی و همکاران، ۱۳۹۳) فاصله ژنتیکی بین توالی های نوکلئوتیدی مطالعه و مقایسه گردید. حداکثر فاصله بین گونه‌ها ۱۰۰٪ و حداقل ۱۹٪ بدست آمد و نتایج حاصل نشان داد روش ITS روش مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌های داغداغان می‌باشد (شاهی و همکاران، ۱۳۹۳).

در پژوهشی دیگر که به منظور تشخیص چند شکلی ژنتیکی بین برخی ارقام انار براساس آنالیز توالی ITS ژن های ریبوزومی هسته ای و نشانگر SRAP انجام پذیرفت، نتایج نشان داد داده های حاصل از توالی یابی در ناحیه ITS بر روی ۲۰ ژنوتیپ انار حاکی از وجود تفاوت بین ژنوتیپ های انار در محتوی و طول این ناحیه بود. طول ناحیه ITS₂ از 246 bp تا 250 bp متغیر بود در حالی که ناحیه ITS₁ در همه ژنوتیپ ها ۲۶۰ جفت باز داشت. ناحیه ITS₂ داده های کارآمدتری را نسبت به ناحیه ITS₁ ایجاد نمود.

تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها را در سه خوشه گروه بندی کرد. آنالیز مقایسه ای ساختار ثانوی توالی رونویسی شده ناحیه ITS₂ و پایه ارثی ترمودینامیکی آن، پنج ساختار متفاوت ایجاد کرد که در تفکیک برخی از ژنوتیپ های انار مؤثر بود (سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۰).

در مطالعه ای به منظور تنوع درون و بین توده های گیاه داروئی بادرنجبویه با انتخاب ۱۴ توده گیاه بادرنجبویه به همراه ۲ توده از گیاهان بادرشبو و ریحان از نواحی ITS جهت طراحی نشانگر استفاده گردید نتایج خوشه ای، توده ها را در هشت گروه مجزا تفکیک نمود و گیاه ریحان در مقایسه با بادرشبو فاصله ژنتیکی کمتری در توالی با گیاه بادرنجبویه داشت (حیدری و همکاران، ۱۳۹۳).

در پژوهشی که با روش مولکولی و با استفاده از بررسی توالی ژن 18 Sr RNA و نواحی ITS شامل ۳ قسمت (ITS₁, ITS₂, 5/8S rRNA) جهت تشخیص بیماری تیلریوز گرمسیری بیماری انگلی ناشی از تک یاخته *Theilata annulata* می باشد را مورد بررسی قرار دادند. توالی های مورد نظر با PCR تکثیر و تبیین توالی گردید و پس از رسم درخت فیلوژنی براساس توالی های ناحیه ITS و ژن 18Sr RNA نتایج نشان داد که ژن 18 Sr RNA دارای ارزشی با شناسایی در حد جنس و توالی ITS در حد گونه می باشد (حبیبی و همکاران، ۱۳۹۳).

تاکنون نشانگرهای زیادی برای تعیین خلوص گیاهان داروئی از جمله زعفران به کار رفته اند اما در روشی نوین برای تعیین تقلبات زعفران براساس روش های مولکولی از نشانگر مولکولی ITS₂ استفاده گردید، در این بررسی از یک پرایمر عمومی بر مبنای ناحیه حد واسط ژن 5/8 S rRNA و پرایمرهای اختصاصی برگشتی بر

مبنای ناحیه ITS₂ در گونه‌های مختلف تقلبات گیاهی نظیر کلالة انار، ذرت، گلرنگ، زردچوبه، فلفل قرمز خرد شده و هم‌چنین گوشت گاو و شتر برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. بعد از انجام واکنش، نوار مربوط به توالی ITS₂ در چندین نمونه ذکر شده فوق به عنوان تقلبات زعفران تکثیر شدند. نتایج آزمایش نشان داد که استفاده از تمامی پرایمرها در قالب واکنش PCR چند گانه سبب تکثیر تمامی نوارهای مربوط به انواع تقلبات می‌شود. این روش کارایی لازم در تشخیص تقلبات زعفران در سطح یک درصد وزنی از مخلوط تقلبات را دارا می‌باشد. فلور روش‌های مبتنی بر DNA سهم مهمی را در حفاظت نام‌های تجاری با کیفیت بالا و محافظت از حقوق مصرف کننده دارد. با این حال نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که روش‌های مولکولی در تشخیص نمونه‌های زعفران از مزایایی نظیر تشخیص در مقادیر بسیار اندک، کاهش در مدت زمان تشخیص، دقت در شناسایی نمونه برخوردار می‌باشد (مشتاقی و همکاران، ۱۳۹۳).

در مطالعه‌ای که به منظور شناسایی مولکولی سنجد تلخ ایران و مقایسه آن‌ها با زیرگونه های شناخته شده سایر نقاط جهان انجام شد، از نشانگر مولکولی ITS ریبوزومی در مطالعه مولکولی انجام شد. نتایج نشان داد که نمونه‌ها در سطح زیرگونه قابل تفکیک بوده و با این نشانگر زیر گونه‌ای جدید به نام *rhamnoides sup* *Elaeagnus azerbaijanica* معرفی گردید (آهنی و همکاران، ۱۳۹۵).

در پژوهشی دیگر جهت ارزیابی مولکولی رابطه فیلوژنتیک جمعیت هایی از لاله واژگون با استفاده از تمامی ناحیه ITS، تعداد ۱۹ جمعیت از لاله واژگون از مناطق مختلف کشور جمع آوری و براساس توالی ITS ارزیابی گردید. این تحقیق که نخستین مطالعه انجام شد، با استفاده از توالی ITS برای ارزیابی مولکولی رابطه فیلوژنی جمعیت لاله‌های واژگون می‌باشد، نشان داد توالی های DNA در ناحیه ITS قابلیت بالائی در یافتن روابط فیلوژنتیک جمعیت‌های مختلف این گونه دارد. نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی در میان لاله‌های واژگون مورد بررسی به طور مستقیم متأثر از فواصل جغرافیایی و همچنین شرایط توپوگرافی زیستگاه‌های طبیعی آن‌ها بود (کیانی و همکاران، ۱۳۹۴).

در تحقیقی که در زمینه بازنگری گونه های جنس ممرز براساس نشانگر مولکولی ITS, trnh-psbA صورت پذیرفت نشان داد در استفاده از نشانگر مولکولی، باید نشانگری را انتخاب کرد که قابلیت شناسایی در ارتباط با جنس و گونه مورد مطالعه را داشته باشد، هر چند کارائی نشانگر ITS در رده بندی گونه های گیاهی پیش از این اثبات شده است (Feliner rossello., 2007). هم چنین مشخص گردید نقاط اطلاع رسان^۱ در ITS₂ بالاتر از ITS₁ می باشند و ITS₂ قابلیت استفاده به عنوان بارکد را در شناسایی گونه های گیاهی و درک رابطه بین آنها را دارد. با بررسی ساختار ثانویه قطعه ITS₂ در رده بندی گونه هایی که قرابت نزدیکی با هم دارند، با اختلاف کم و جایگزینی خوب نوکلئوتیدی، مشخص گردید که نشانگر مناسبی است (Muller et al., 2007).

در پژوهشی در هندوستان جهت تفکیک سه گونه زرشک از نشانگرهای بر مبنای ITS استفاده گردید و نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از توالی ITS یک ابزار قوی جهت تفکیک گونه های زرشک از یکدیگر می باشد (Paranthaman et al., 2011).

در پژوهشی با بکارگیری روشی PCR-RFLP ضمن مطالعه الگوی چند شکلی ناحیه ITS نمدارهای هیرکانی قصد مقایسه ۲ روش (توالی یابی مستقیم و PCR-RFLP) بر نه گونه نمدار را با هم داشتند. هر دو روش گونه های مورد بررسی را در ۹ گروه مجزا قرار داد. لذا با توجه به نیاز به صرف زمان و هزینه کمتر برای روش PCR-RFLP و بدست آوردن ناحیه ITS و همسویی نسبتاً بالای نتایج آن با روش توالی یابی مستقیم، این روش به عنوان روشی مناسب و کم هزینه برای فیلوژنی گونه های گیاهی مشخص گردید (یوسف زاده و همکاران، ۱۳۹۲).

جهت تفکیک گونه های گیاه Cardamine از خانواده Brassicaceae نمونه گیاهی آن از ۷ نقطه ایران جمع-آوری، پس از استخراج DNA با استفاده از پرایمر های ITS₄ و ITS₅ تکثیر و توالی یابی گردیدند. نتایج با تأیید حداقل ۴ گونه کاردامینه ایران نشان داد ITS می تواند به عنوان یک نشانگر مولکولی مناسب در شناسایی جنس و گونه در گیاهان کاردامینه، کارایی بالایی داشته باشد (باقری و همکاران، ۱۳۹۳).

در پژوهشی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم و جمعیت کاهو با استفاده از نواحی فاصله انداز رونویسی داخلی (ITS_1 , ITS_4) صورت پذیرفت. نتایج نشان داد نشانگر ITS ابزار مناسبی جهت ارزیابی ژنتیکی بین گونه‌ای و بین جنسی است ولی به علت تغییرات کم بین لاین‌های مختلف توانایی تفکیک درون گونه‌ای جمعیت‌ها را ندارد، به عبارتی نشانگر ITS نتوانست جمعیت‌های مختلف کاهو را از نظر جغرافیایی از هم تفکیک کند (قاسم آبادی و همکاران، ۱۳۹۷).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

۳-۱- محل و روش نمونه برداری

این پژوهش در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی در دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود در استان سمنان انجام شد.

۳-۲- مواد گیاهی

۳-۳- نمونه برداری و استخراج DNA

در بهار سال ۱۳۹۶ از ۱۹ ژنوتیپ نمونه برگ تازه درختچه زرشک نمونه برداری شد و در فریزر ۸۰- نگه داری شد. گونه ها و اکوتیپ های احتمالی به شرح جدول ذیل می باشد.

جدول ۳-۱- ژنوتیپ های جمع آوری شده از کلسیون زرشک پژوهشکده علوم گیاهی و صنایع غذایی مشهد، اسفراین و شاهرود

ردیف	نمونه زرشک	گیاهی	کد نمونه	گونه قابل تشخیص (مورفولوژیکی)	رویشگاه
۱	R2N1		B-1-M1	<i>integerrima</i>	قائن
۲	R5N1		B-1-M2	<i>Integerrima*Ortobotrys</i>	کاخک
۳	R8N3		B-1-M3	<i>Integerrima</i>	قائن
۴	R9N3		B-1-M4	<i>unknown</i>	شاهرود
۵	R11N3		B-1-M5	<i>Integerrima*Ortobotrys</i>	شاهرود
۶	R12N1		B-1-M6	<i>Integerrima*Otrobotrys</i>	شاهرود
۷	R14N2		B-1-M7	<i>Integerrima*Ortobotrys</i>	شاهرود
۸	BD		B-1-M8	<i>Integerrima</i>	بیرجند
۹	ES1		B-2-E1	<i>crataegina</i>	اسفراین
۱۰	ES2		B-2-E2	<i>crataegina</i>	"
۱۱	ES3		B-2-E3	<i>crataegina</i>	"
۱۲	ES4		B-2-E4	<i>crataegina</i>	"
۱۳	ES5		B-2-E5	<i>crataegina</i>	"
۱۴	Sh1		B-3-S1	<i>crataegina</i>	شاهرود
۱۵	Sh2		B-3-S2	<i>crataegina</i>	"
۱۶	Sh3		B-3-S3	<i>crataegina</i>	"
۱۷	Sh4		B-3-S4	<i>crataegina</i>	"
۱۸	SH5			<i>crataegina</i>	
۱۹	زرشک زینتی B.t		B-4-T1	<i>B.thunbergii</i>	شاهرود

۳-۴- مواد و وسایل مورد نیاز برای استخراج شامل

بافر استخراج CTAB، تیوب‌های ۱/۵ و ۲ میلی لیتری، سمپلر، سانتریفیوژ، نیتروژن مایع، بن ماری، اتانول ۹۶ درصد و ۷۰ درصد سرد، کلروفرم-ایزوامیل الکل (به نسبت ۱:۲۴)، آب مقطر استریل، ایزوپروپانول سرد بافر TE بود.

۳-۵- مراحل استخراج DNA

استخراج DNA از بافت برگ گیوان و فریز شده گیاه زرشک به روش دوپیل و دوپیل (۱۹۹۸) با کمی تغییرات صورت گرفت. حدود ۰/۳ گرم از نمونه‌های برگ گیوان چینی استریل و در حضور ازت مایع پودر شده و سریع به درون میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته شدند و مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (جدول ۳-۵) از قبل در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد گرم شد و ۳ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به آن اضافه گردید، سپس به مدت ۶۰ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و هر ۱۰ دقیقه یکبار تیوب‌ها به آرامی برای همگنی بیشتر سروته شده و مجدداً درون حمام آب گرم قرار گرفتند، نمونه‌ها پس از خروج از بن ماری به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس مایع شناور رویی را برداشته و به تیوب جدید منتقل کردیم. محلول کلروفرم^۲:ایزوامیل الکل^۳ (۱:۲۴) به صورت هم حجم با مایع رویی برداشته و به نمونه اضافه شد، سپس تا بوجود آمدن امولسیون همگن به آرامی سر و ته شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه درون سانتریفیوژ با دور rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد فاز بالایی را با احتیاط و بدون مخلوط شدن با فاز وسط که حاوی پروتئین است، برداشته و به یک تیوب جدید منتقل شد. اگر محلول شفاف نباشد می‌توان با تکرار دو یا سه مرتبه‌ی دیگر، به شفاف شدن آن کمک کرد. سپس ۲/۳ حجم ایزوپروپانول سرد (۲۰- درجه سانتی گراد)، ۰/۱ حجمی استات سدیم (pH=5.4، ۳/۲M) و ۱/۲ حجم کلرید سدیم (۵M NaCl)، به

¹ Doyel and Doyel

² Chloroform

³ Isoamyl alcohol

مایع رویی برداشته شده، اضافه شد و تیوب‌ها به آرامی با دست سر و ته گردید تا مواد اضافه شده، خوب مخلوط گردد. سپس در فریزر با دمای -20°C درجه سانتی‌گراد برای حداقل ۲ ساعت یا یک شب تا صبح جهت ته‌نشینی DNA نگهداری کردیم. سپس میکروتیوب‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه و با دور 14000 rpm سانتریفیوژ شدند و بعد از آن فاز رویی را دور ریخته و نوکلئیک اسید ته‌نشین شده با ایزوپروپانول سرد 96°C درصد یا اتانول مطلق و دوبار با اتانول 70% درصد شست‌وشو داده شدند که این مرحله بستگی به میزان شفاف بودن یا آلودگی رسوب DNA دارد. در مرحله پایانی رسوب DNA در شرایط استریل به طور کامل گردید، و در نهایت به DNA استخراج شده مقدار 20 تا 50 میکرولیتر بافر TE یا آب دوبار تقطیر استریل اضافه شد و درون فریزر با دمای -20°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۳-۲: مواد و غلظت مورد استفاده جهت تهیه بافر استخراج

مواد	غلظت (مولار)	در 100 میلی‌لیتر	نیاز به اتوکلاو
Tris-HCl, pH=8	1 M	10 ml	بله
EDTA, pH=8	0.5 M	28 ml	بله
NaCl	5 M	4 ml	بله
PVP-40	-	2%	خیر
CTAB	-	2%	خیر
β -Mercaptoethanol	-	0.3%	خیر

در نهایت حجم بافر با آب مقطر دوبار تقطیر استریل، به حجم 100 میلی‌لیتر و pH آن توسط HCl به 8 رسید.

۳-۶- محلول‌های مورد نیاز

۳-۶-۱- بافر استخراج DNA

برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر استخراج که شامل: ۱۰ میلی‌لیتر Tris-HCl ۱ مولار pH=8، ۴ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار pH=8، ۲۸ میلی‌لیتر NaCl ۵ مولار را با هم مخلوط کرده و سپس pH کل توسط HCl در میزان pH=8 تنظیم شده و پس از اتوکلاو شدن، ۲ گرم CTAB و ۱ گرم PVP-40 به محلول فوق افزوده شد و با آب مقطر استریل به حجم کل ۱۰۰ میلی‌لیتر رساند شد.

محلول اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید ۰/۵ مولار (EDTA, 0.5M, pH=8)

ابتدا ۱۸/۶۱۲ گرم EDTA در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر مخلوط شد و pH محلول، توسط یک همزن مغناطیسی و با استفاده از NaOH به ۸ رسید و در نهایت حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، محلول پس از اتوکلاو شدن در یخچال نگهداری گردید.

۳-۷- محلول کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl, 5M)

۲۹/۲۲ گرم NaCl در حدود ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و اتوکلاو گردید.

۳-۸- محلول استات سدیم ۳/۲ مولار (C₂H₃NaO₂, 3.2M, pH=5.4)

۲۶/۲۵ گرم استات سدیم در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر، pH محلول تنظیم شد و اتوکلاو گردید.

۳-۹-بافر TBE

بافر TBE یا بافر الکتروفورز با غلظت استوک ۱X، ۱۰/۸ گرم Tris Base، ۵/۵ گرم اسیدبوریک، ۴ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار با هم مخلوط و به حجم ۷۵۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از تنظیم pH به میزان ۸، حجم محلول با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

بافر TBE (بافر الکتروفورز) با غلظت استوک ۵X تهیه و نگهداری و با غلظت ۰/۵X مصرف گردید. برای تهیه استوک ۵X، ۵۴ گرم Tris Base، ۲۷/۵ گرم اسید بوریک ۲۰ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار با هم مخلوط و به حجم ۷۵۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از تنظیم pH بر روی ۸، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

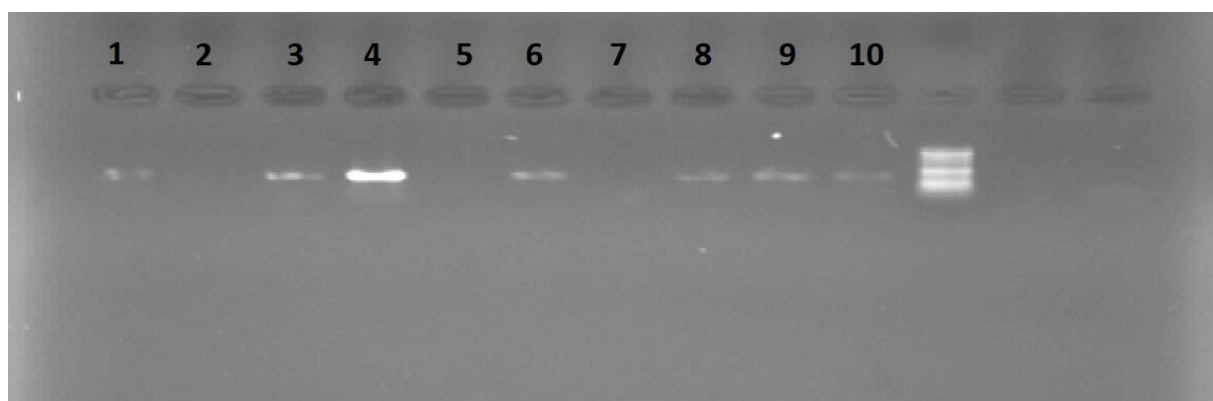
۳-۱۰-بررسی کمیت و کیفیت DNA

۳-۱۰-۱-بررسی تعیین کمیت DNA با استفاده از نانو دراپ

برای بررسی کمیت DNA از دستگاه نانو دراپ مدل (N60 UV/V is Spectrophotometer) استفاده شد. ابتدا دستگاه با استفاده از آب دیونیزه کالیبره گردید، سپس یک میکرولیتر از نمونه DNA در محل مورد نظر دستگاه قرار گرفت و میزان جذب نور در طول موج A260/280 نانومتر قرائت گردید. مطلوب ترین کیفیت DNA استخراج شده در این طول موج برابر ۱/۸ تا ۲ بود. نسبت های پایین تر از ۱/۸ نشان دهنده آلودگی پروتئینی و غلظت های بالاتر از ۲ نشان دهنده آلودگی DNA در طی مراحل استخراج است.

۳-۱۰-۲- تعیین کیفیت DNA روی ژل آگارز با استفاده از الکترو فورز افقی

برای تعیین کیفیت DNA از نظر شکستگی و یا وجود آلودگی RNA و پروتئین، مقداری از نمونه‌های DNA با بافر بار گذاری ۱ مخلوط گردیدند و در چاهک‌های حاصل از ژل آگارز ۰/۸ درصد حاوی اتیدیوم بروماید بارگذاری شدند. سپس در کنار یک DNA مقیاس ۲ با اندازه مشخص تحت جریان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان الکتروفورز، ژل بر روی دستگاه عکس برداری ۳ و تحت اشعه ماوراء بنفش قرار گرفته و از آن عکس برداری گردید. وجود باند های کاملاً واضح ۴ و فاقد کشیدگی ۵ نشان دهنده کیفیت مطلوب DNA می‌باشد.



شکل ۳-۱- بررسی کیفیت DNA از نمونه های استخراج شده بر روی ژل آگارز

۳-۱۱- توالی نشانگرهای ITS مورد استفاده این آزمایش

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش از مطالعات قبلی انجام شده از توالی ناحیه ITS باقلا توالی،

AAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG (بعنوان پرایمر پیشبر) و

AAAGACTCGATGGTTCACG (بعنوان پرایمر برگشت) انتخاب شدند (حیدری و همکاران ۱۳۹۳).

-
1. Loading Buffer
 2. DNA Ladder
 3. Gel Documentatio
 4. Sharp
 5. Smear

پس از حل کردن و رقیق سازی در غلظت ۱۰۰ نانو گرم با آب دو بار تقطیر طبق دستورالعمل مربوطه، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۳-۱۲- تکثیر نواحی ITS

برای انجام PCR از مستر میکس آماده شرکت سینا کلون با ترکیبات:

(Tris- pH=8.5) So₄, 4mM Mgcl₂, (.04 mM dNTPs), Ampliqon Taq DNA polymerase (20 Tween 20 , 20 , 2 HCL NH₄ استفاده شد.

نشانگرهای مورد استفاده توسط شرکت سینا کلون که هر کدام از نشانگرها به نسبت ۱۰ به ۹۰ رقیق سازی و مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه ۱۰ میکرو لیتر مخلوط واکنش PCR ابتدا مخلوط اولیه شامل ۵ میکرو لیتر مستر میکس، ۲ میکرو لیتر نشانگر، ۱ میکرو لیتر DNA و ۲ میکرو لیتر آب دیونیزه را در یک ویال ۰/۲ میلی لیتر ریخته و در آخر نیز چند ثانیه اسپین شده تا تمام مواد باهم مخلوط شوند. سپس ویالها در چاهکهای دستگاه ترمو سایکلر^۱ قرار گرفته و براساس دمای خاص هر نشانگر، تنظیمات لازم جهت شروع واکنش PCR انجام شد (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳- برنامه حرارتی تکثیر نمونه های مورد مطالعه

ردیف	مرحله	دما	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
۱	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۲۴۰	۱
۲	واسرشته سازی	۹۴	۳۰	-
۳	اتصال آغازگرها	۴۸-۵۴	۳۰	۳۶
۴	تکثیر	۷۲	۶۰	-
۵	تکثیر نهایی	۷۲	۴۲۰	۱
۶	پایان برنامه	۴	۳۰۰	-

^۱. Thermocycler

۳-۱۳- بررسی محصول PCR روی ژل آگارز بر روی دستگاه الکتروفورز

محصول PCR برای هر نشانگر روی ژل آگارز ۱.۵ درصد (W/V) در دستگاه الکتروفورز حاوی بافر TBE 0.5 X جدا شد. نواحی ITS برای ۱۹ ژنوتیپ زرشک تکثیر گردید و بروی ژل آگاروز ران گردید.

۳-۱۴- استخراج ناحیه ITS از روی ژل و توالی‌یابی

محصول PCR از ناحیه ITS ۱۹ ژنوتیپ زرشک با استفاده از کیت استخراج ژل، از روی ژل آگاروز جداسازی شد. محصول با اندازه باند صحیح و غلظت مناسب برای تعیین توالی‌یابی نمونه‌ها به شرکت سینا کلون ارسال گردید.

۳-۱۵- بررسی فاصله ژنتیکی و آنالیز کلاستر

فاصله ژنتیکی براساس توالی‌های ناحیه ITS با نرم افزار MEGA X (Kumar et al., 2018) انجام گرفت. آنالیز کلاستر با روش UPGMA انجام شد.

۳-۱۶- ثبت توالی در پایگاه داده و آنالیز خوشه با سایر گونه‌ها

توالی‌ها در پایگاه داده NCBI ثبت گردید و میزان شباهت این توالی‌های با عملیات بلاست با سایر گونه مشخص گردید و دندروگرام بر اساس میزان مشابهت با سایر گونه‌ها در سایت NCBI رسم گردید.

۳-۱۷- طراحی پرایمر اختصاصی برای گونه و ژنوتیپ‌ها

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی، ابتدا توالی‌های مربوطه با نرم افزار MEGA همردیف شدند و پس از مشخص شدن حداکثر اختلاف بین توالی‌های دی‌ان‌آ، از نرم افزار طراحی پرایمر^۱ Primer-blast برای طراحی پرایمرهای اختصاصی استفاده شد.

^۱<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

۳-۱۸- راستی آزمایی پرایمر طراحی شده

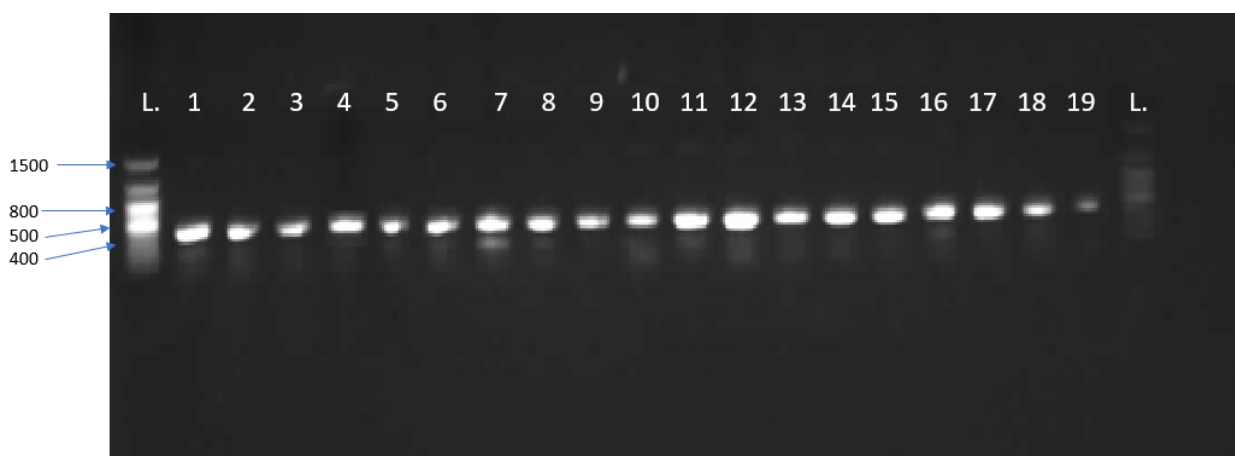
پرایمرهای اختصاصی بر اساس توالی‌های بدست آمده از شرکت سینا کلون تهیه گردید. با استفاده از دی ان آ ژنومی ۱۹ ژنوتیپ زرشک با استفاده از پرایمرهای طراحی شده با واکنش PCR تکثیر شدند و پس از الکتروفورز روی ژل اگاروز یک درصد، کارایی آن‌ها در تشخیص صحیح هریک از گونه‌های زرشک بررسی گردید.

فصل چهارم

نتایج و بحث

۱-۴- نتایج استخراج DNA و تکثیر نواحی ITS

نتایج استخراج DNA بر روی ژل آگاروز نشان داد که نمونه‌ها از DNA مناسبی جهت تکثیر برخوردار هستند (شکل ۱-۴). جهت تکثیر ناحیه ITS، DNA های استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) مورد تکثیر قرار گرفتند. نتایج تکثیر بر روی ژل آگاروز نشان داد که ناحیه مورد نظر تکثیر یافته و یک قطعه مونومورف در همه نمونه‌ها رویت شد (شکل ۲-۴). تکثیر یک قطعه مونومورف در سایر پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه بررسی نواحی ITS نیز گزارش شده است (Kim et al. 2004). تکثیر نواحی تک شکلی را در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های زرشک گزارش داده‌اند و همچنین باتوجه به اینکه این نواحی مورد استفاده جهت طراحی پرایمر بشدت در گونه‌های گیاهی مختلف حفاظت شده است، لذا مشاهده قطعات مونومورف در واقع نتایج صحت کار را تایید می‌کند (Balasubramani et al. 2014).



شکل ۲-۴- کیفیت باند تشکیل شده با نشانگر ITS بر روی ژل آگارز

(نمونه‌ها در لاین ۱- R2N1، لاین ۲- R5N1، لاین ۳- R8N3، لاین ۴- R9N3، لاین ۵- R11N3، لاین ۶- R12N1، لاین ۷- R14N2، لاین ۸- Sh1، لاین ۹- Sh2، لاین ۱۰- Sh3، لاین ۱۱- Sh4، لاین ۱۲- Sh5، لاین ۱۳- Es1، لاین ۱۴- Es2، لاین ۱۵- Es3، لاین ۱۶- Es4، لاین ۱۷- Es5، لاین ۱۸- بی دانه، لاین ۱۹- زینتی ژاپنی)

۴-۲- نتایج توالی‌یابی ژنوتیپ‌های مورد استفاده و ثبت آن در سایت NCBI

نواحی تکثیر یافته ITS مورد توالی‌یابی قرار گرفتند. توالی ITS ژنوتیپ‌ها در سایت NCBI ثبت گردید. کدهای دسترسی و برخی اطلاعات اولیه مرتبط به قطعات تکثیر شده در جدول ۴-۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج توالی‌یابی، طول قطعات تکثیر شده بین ۳۴۲ تا ۳۵۶ جفت باز متغیر بود. تفاوت در طول قطعات تکثیر یافته می‌تواند به علت جهش، حذف شدگی و یا جابجایی قطعات بین کروموزوم‌ها باشد (حیدری و همکاران، ۱۳۹۳).

جدول ۴-۱ اطلاعات ثبت شده مربوط به توالی ناحیه ITS ژنوتیپ‌های زرشک مورد مطالعه

شماره	اسم علمی*	کد	Accession:	کد GI	طول توالی (bp)
۱	<i>Berberis thunbergii</i>	JA	MN758667	1779939157	۳۵۲
۲	<i>Berberis integerrima</i>	R2N1	MN758649	1779939135	۳۵۰
۳	<i>Berberis integerrima</i>	R8N3	MN758651	1779939140	۳۴۹
۴	<i>Berberis sp</i>	BD	MN758666	1779939156	۳۵۰
۵	<i>Berberis orthobotrys</i>	R11N3	MN758653	1779939143	۳۵۱
۶	<i>Berberis sp</i>	R14N2	MN758655	1779939145	۳۴۵
۷	<i>Berberis crataegina</i>	R5N1	MN758650	1779939138	۳۴۶
۸	<i>Berberis crataegina</i>	R12N1	MN758654	1779939144	۳۴۸
۹	<i>Berberis crataegina</i>	ES1	MN758656	1779939146	۳۴۵
۱۰	<i>Berberis crataegina</i>	ES2	MN758657	1779939147	۳۴۲
۱۱	<i>Berberis crataegina</i>	ES3	MN758658	1779939148	۳۵۱
۱۲	<i>Berberis crataegina</i>	Es4	MN758659	1779939149	۳۵۰
۱۳	<i>Berberis crataegina</i>	ES5	MN758660	1779939150	۳۴۷
۱۴	<i>Berberis crataegina</i>	Sh1	MN758661	1779939151	۳۵۰
۱۵	<i>Berberis crataegina</i>	Sh2	MN758662	1779939152	۳۴۹
۱۶	<i>Berberis crataegina</i>	Sh3	MN758663	1779939153	۳۵۶
۱۷	<i>Berberis crataegina</i>	Sh4	MN758664	1779939154	۳۴۷
۱۸	<i>Berberis crataegina</i>	Sh5	MN758665	1779939155	۳۴۸
۱۹	<i>Berberis sp.</i>	R9N3	MN758652	1779939142	۳۵۰

*: اسامی علمی بر اساس خصوصیات ظاهری و گونه‌های پیشنهادی موجود در ایران ارائه شده است.

۴-۳- رابطه خویشاوندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ناحیه ITS

نتایج ماتریس تشابه بین ۱۹ ژنوتیپ زرشک نشان از وجود تنوع بالا در بین اکوتیپ‌های زرشک مورد بررسی داشت (جدول ۲-۴). با توجه به اینکه اکوتیپ‌های زرشک از مناطق مختلف جغرافیایی هستند، وجود تنوع ژنتیکی تایید کننده این مطلب می‌باشد که تنوع توسط عوامل ژنتیکی هم کنترل می‌شوند (باقری و همکاران، ۱۳۸۱). فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی از ۰/۰۱۲ تا ۰/۱۵۴ متغیر بود به طوری که بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۵۴) بین نمونه‌های زرشک زینتی (JA) و اکوتیپ اسفراین (ES1) و کمترین فاصله ژنتیکی (بیشترین قرابت) بین اکوتیپ شاهرود (SH2) و R8N3 با ۰/۰۱۲ مشاهده شد. توده‌های اکوتیپ شاهرود و R8N3 میزان تشابه بیشتری نسبت به سایر توده‌ها را نشان دادند. داشتن فاصله ژنتیکی زیاد در گیاهان یک گونه یک مزیت جهت تولید هیبریدهای پرمولکورد و مشاهده هتروزیس بیشتر است (Adamz et al., 1998). هم‌چنین طبق جدول ۲-۴ زرشک زینتی (JA) دارای فاصله ژنتیکی بیشتری با سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی را داشت.

در مطالعه حاضر توالی یابی قطعات تکثیر شده توسط نشانگر ITS توانست میزان بالایی از تنوع را نشان دهد که حاکی از مناسب بودن این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد. تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی ممکن است از طریق ساز و کارهای متفاوتی نظیر جهش، نو ترکیبی جنسی، مهاجرت و جریان ژن، رانده شدن ژنتیکی و گزینش ایجاد شود (باقری و همکاران، ۱۳۸۱). از بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان با استفاده از روش‌های مولکولی می‌توان به مقدار تنوع موجود در جمعیت گیاهی پی برد (باقری و همکاران، ۱۳۸۱). با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه حدود انتخاب نیز وسیع‌تر خواهد شد. انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه اصلاحی بوده و اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند (رضانی و رحیمی، ۱۳۹۶).

ساختار و موقعیت نواحی ITS طوری است که از آن به عنوان یک ابزار معتبر جهت تفکیک، تعیین تشابه و ارتباطات فیلوژنتیکی گونه‌ها استفاده می‌شود. در سایر پژوهش‌های صورت گرفته شده نیز استفاده از نواحی ITS توانست ژنوتیپ‌ها را بخوبی از یکدیگر تفکیک کند. به عنوان مثال سلیمانی نجف آبادی و همکاران (۱۳۹۰) چند شکلی ژنتیکی بالایی در ناحیه ITS را در برخی از ارقام انار مشاهده کردند. همچنین با استفاده از خواص ریخت‌شناسی میوه برخی از ژنوتیپ‌های وحشی زرشک در ارومیه، پس از تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های زرشک به چهار گروه تقسیم گردیدند، میوه‌ها از لحاظ صفاتی مثل وزن، طول، عرض، شاخص رنگ، وجود یا عدم وجود بذر متفاوت‌اند. در روش شناسایی به روش مورفولوژی، با وجود برخی تفاوت‌های مورفولوژی در بین ژنوتیپ‌ها، به علت همبستگی و ایجاد رابطه بین چند صفت در این روش اندازه‌گیری برخی صفات مشکل گردید و جداسازی آنها از یکدیگر میسر نشد. برای بررسی بیشتر و جداسازی دقیق‌تر آنها استفاده از نشانگرهای مولکولی همچون نشانگرهای ITS می‌تواند موثر باشد (علیزاده و حسن پور، ۱۳۹۴).

پژوهش‌های دیگری نیز به منظور مقایسه بین دو نشانگر مورفولوژیکی و مولکولی ALFP بر روی ۳۳ نمونه زرشک خراسان صورت گرفت که نشان از برتری نشانگر مولکولی دارد و همچنین نشان از کارایی پایین کلید شناسایی فلور ایران در طبقه‌بندی و بررسی فیلوژنتیکی بدست آمده از خانواده زرشک می‌باشد (حبیبی، ۱۳۹۲). در مطالعه‌ای از طریق توالی‌یابی نواحی ITS، تنوع درون‌گروهی *Erysiphe aquilegia* و همچنین تنوع گونه‌های جنس *Fasciolidae* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن بود که ITS توانایی جدا کردن زیرگونه‌ها را از یکدیگر دارند (Cunnington et al., 2004 ; Adlard et al., 1993). لذا در پژوهش حاضر پس از بررسی نقاط ضعف نشانگرهای مورفولوژی و مولکولی ذکر شده از نشانگری برتر در بررسی فیلوژنتیکی و تنوع گونه‌ها با تعیین بارکد با استفاده از نشانگر ITS در خانواده زرشک استفاده نمودیم. هرچند که این روش یک ناحیه محدود از ژنوم را مورد بررسی قرار می‌دهد اما دارای کارایی بالا در تعیین زیر گونه‌های گیاهی می‌باشد.

جدول ۴-۲- فاصله ژنتیکی بین ۱۹ ژنوتیپ زرشک بر اساس توالی ناحیه ITS2

	R2N1	R5N1	R8N3	R9N3	R11N3	R12N1	R14N2	ES1	ES2	ES3	Es4	ES5	Sh1	Sh2	Sh3	Sh4	Sh5	BD	JA
R2N1																			
R5N1	۰/۰۳۶																		
R8N3	۰/۰۲۹	۰/۰۲۶																	
R9N3	۰/۰۵۷	۰/۰۴۸	۰/۰۴۲																
R11N3	۰/۰۳۵	۰/۰۲۴	۰/۰۳۵	۰/۰۴۴															
R12N1	۰/۰۴۲	۰/۰۴۵	۰/۰۳۵	۰/۰۶۳	۰/۰۵۱														
R14N2	۰/۰۳۹	۰/۰۴۳	۰/۰۳۹	۰/۰۴۵	۰/۰۲۴	۰/۰۵۸													
ES1	۰/۰۵۴	۰/۰۳۶	۰/۰۳۹	۰/۰۵۱	۰/۰۳۶	۰/۰۴۲	۰/۰۴۵												
ES2	۰/۰۳۶	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۰/۰۴۹	۰/۰۴۲	۰/۰۲۴	۰/۰۳۳	۰/۰۵۲											
ES3	۰/۰۵۱	۰/۰۱۸	۰/۰۳۵	۰/۰۵۷	۰/۰۱۷	۰/۰۴۴	۰/۰۳۰	۰/۰۴۲	۰/۰۴۵										
Es4	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۰۵۴	۰/۰۳۵	۰/۰۵۴	۰/۰۳۹	۰/۰۵۴	۰/۰۳۹	۰/۰۳۸									
ES5	۰/۰۴۸	۰/۰۲۴	۰/۰۳۹	۰/۰۴۲	۰/۰۳۶	۰/۰۴۳	۰/۰۳۰	۰/۰۴۵	۰/۰۳۶	۰/۰۲۰	۰/۰۳۶								
Sh1	۰/۰۴۲	۰/۰۳۶	۰/۰۴۱	۰/۰۴۲	۰/۰۱۴	۰/۰۴۸	۰/۰۲۴	۰/۰۴۲	۰/۰۳۶	۰/۰۲۹	۰/۰۲۶	۰/۰۲۴							
Sh2	۰/۰۳۲	۰/۰۲۷	۰/۰۱۲	۰/۰۵۷	۰/۰۳۳	۰/۰۳۵	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۰/۰۴۶	۰/۰۲۹	۰/۰۴۲	۰/۰۳۶	۰/۰۳۹						
Sh3	۰/۰۵۷	۰/۰۴۵	۰/۰۵۱	۰/۰۵۰	۰/۰۴۴	۰/۰۴۱	۰/۰۵۱	۰/۰۲۴	۰/۰۴۸	۰/۰۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۳۸	۰/۰۵۳	۰/۰۶۰					
Sh4	۰/۰۳۸	۰/۰۳۹	۰/۰۳۰	۰/۰۴۵	۰/۰۴۴	۰/۰۲۷	۰/۰۳۹	۰/۰۴۵	۰/۰۲۷	۰/۰۳۸	۰/۰۴۸	۰/۰۳۹	۰/۰۳۹	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵				
Sh5	۰/۰۲۹	۰/۰۲۷	۰/۰۱۸	۰/۰۵۱	۰/۰۴۵	۰/۰۳۶	۰/۰۵۲	۰/۰۴۸	۰/۰۳۹	۰/۰۳۹	۰/۰۴۸	۰/۰۴۵	۰/۰۴۸	۰/۰۳۰	۰/۰۶۰	۰/۰۳۶			
BD	۰/۰۴۲	۰/۰۲۴	۰/۰۲۶	۰/۰۴۸	۰/۰۲۰	۰/۰۴۵	۰/۰۳۰	۰/۰۳۹	۰/۰۴۵	۰/۰۲۰	۰/۰۴۸	۰/۰۲۹	۰/۰۲۰	۰/۰۲۹	۰/۰۵۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۶		
JA	۰/۱۳۹	۰/۱۲۳	۰/۱۳۲	۰/۱۳۱	۰/۱۴۲	۰/۱۵۳	۰/۱۴۵	۰/۱۵۴	۰/۱۳۸	۰/۱۴۳	۰/۱۵۰	۰/۱۲۶	۰/۱۴۷	۰/۱۴۳	۰/۱۴۸	۰/۱۵۰	۰/۱۲۹	۰/۱۴۳	

۴-۴- آنالیز خوشه‌ای ژنوتیپ‌های زرشک

بررسی آنالیز خوشه‌ای حاصل از توالی ناحیه ITS موجود با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی بین گونه‌های زرشک و از طریق تفاوت نوکلئوتیدی بین هر جفت توالی نشان داد که گونه‌های مورد بررسی در دو گروه مجزا قرار دارند (شکل ۴-۳). آزمون فیلوژنی مورد استفاده به منظور راستی آزمایی موقعیت هر گونه بر روی نمودار درختی به روش (اتصال-همسایگی) Nj رسم گردید (ضرایب بوت استرپ در کنار هر شاخه قید شده است). مطابق انتظار گونه زرشک ژاپنی (ژینتی JA) به علت تفاوت نوکلئوتیدی در شاخه جداگانه‌ای از سایر ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه گونه‌های زرشک ایران قرار گرفت. کمترین فاصله ژنتیکی در میان گونه‌های مورد بررسی بین گونه‌های R5N1 و ES3 (با بوت استرپ ۲۷) که از دو ناحیه کاخک گناباد و ارتفاعات روستای دهنه اجاق

شهرستان اسفراین تهیه گردیده بود، مشاهده گردید. پس از آن کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به گونه‌های ES6 و BD مشاهده شد.

می‌توان بیان داشت که نزدیکی گونه‌های مورد نظر می‌تواند به علت ادغام ژنوم ریبوزومی هسته‌ای این گونه‌ها در اثر هیبریداسیون بین گونه‌ها باشد، که نشان از طبیعی بودن فرایند تکامل می‌باشد (باقری و همکاران، ۱۳۸۱). در جایگزینی نوکلئوتیدی کم، اثر متفاوت جهش در رمزدهی پروتئینی کمتر نشان داده می‌شود و در طی تکامل جایگزینی نوکلئوتیدی تحمل شده و صفات متفاوت بروز نکرده است (باقری و همکاران، ۱۳۸۱). البته با گسترش سطح نواحی توالی شده می‌توان میزان تنوع را با اعتبار بیشتری تعیین کرد.

همچنین نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های R5N1 و JA (زرشک زینتی) در فاصله ژنتیکی زیادی نسبت به سایر واریته‌ها قرار می‌گیرند بیشترین تنوع بین گونه‌ای مربوط به گونه R5N1 (گونه تهیه شده کاخک گناباد) و R9N3 (گونه تهیه شده آزاد شهر) می‌باشد. فاصله ژنتیکی زیاد یک مزیت ارزشمند در اصلاح گونه‌های گیاهی بحساب می‌آید که می‌توان از این ژنوتیپ‌ها (R5N1 و JA) بعنوان والدین در تلاقی‌ها و معرفی لاین جدید بر اساس اهداف مدنظر استفاده کرد. چراکه در نسل‌های در حال تفکیک دامنه‌ی وسیع از ژنوتیپ‌ها با تفاوت ژنتیکی خاص ایجاد می‌شود که قدرت انتخاب اصلاح‌گر را بالا می‌برد و از میان تنوع ایجاد شده امکان انتخاب ژنوتیپ‌های برتر فراهم می‌شود.



شکل ۴-۳ - آنالیز خوشه‌ای ۱۹ ژنوتیپ زرشک بر اساس توالی ITS2، اعداد روی خوشه‌های نشان دهنده میزان Bootstrap است.

۴-۵ - آنالیز خوشه‌ای با استفاده از بلاست در پایگاه داده NCBI

توالی ITS با طول تقریبی ۳۵۰ جفت باز ژنوتیپ‌های زرشک در پایگاه داده NCBI مورد آنالیز آنلاین بلاست قرار گرفت. توالی‌های مورد بررسی با ۹۳ توالی دیگر موجود در NCBI بالای ۹۰ درصد مطابقت^۱ داشتند. تمام این ۹۳ توالی مربوط به گونه‌های مختلف زرشک بودند (شکل ۴-۴). آنالیز به صورت تجزیه خوشه‌ای بر اساس بیشترین شباهت بر اساس ۳۵۰ جفت باز توالی‌یابی شده در ناحیه ITS2 در شکل ۴-۵ آمده است. در شکل ۴-۵ ژنوتیپ JA از گونه زرشک‌های زینتی (*Berberis thunbergi*) از دانشکده کشاورزی شاهرود به صورت جداگانه از سایر ژنوتیپ‌ها قرار گرفت. بیشترین شباهت توالی این گونه با گونه همانم در سایت NCBI

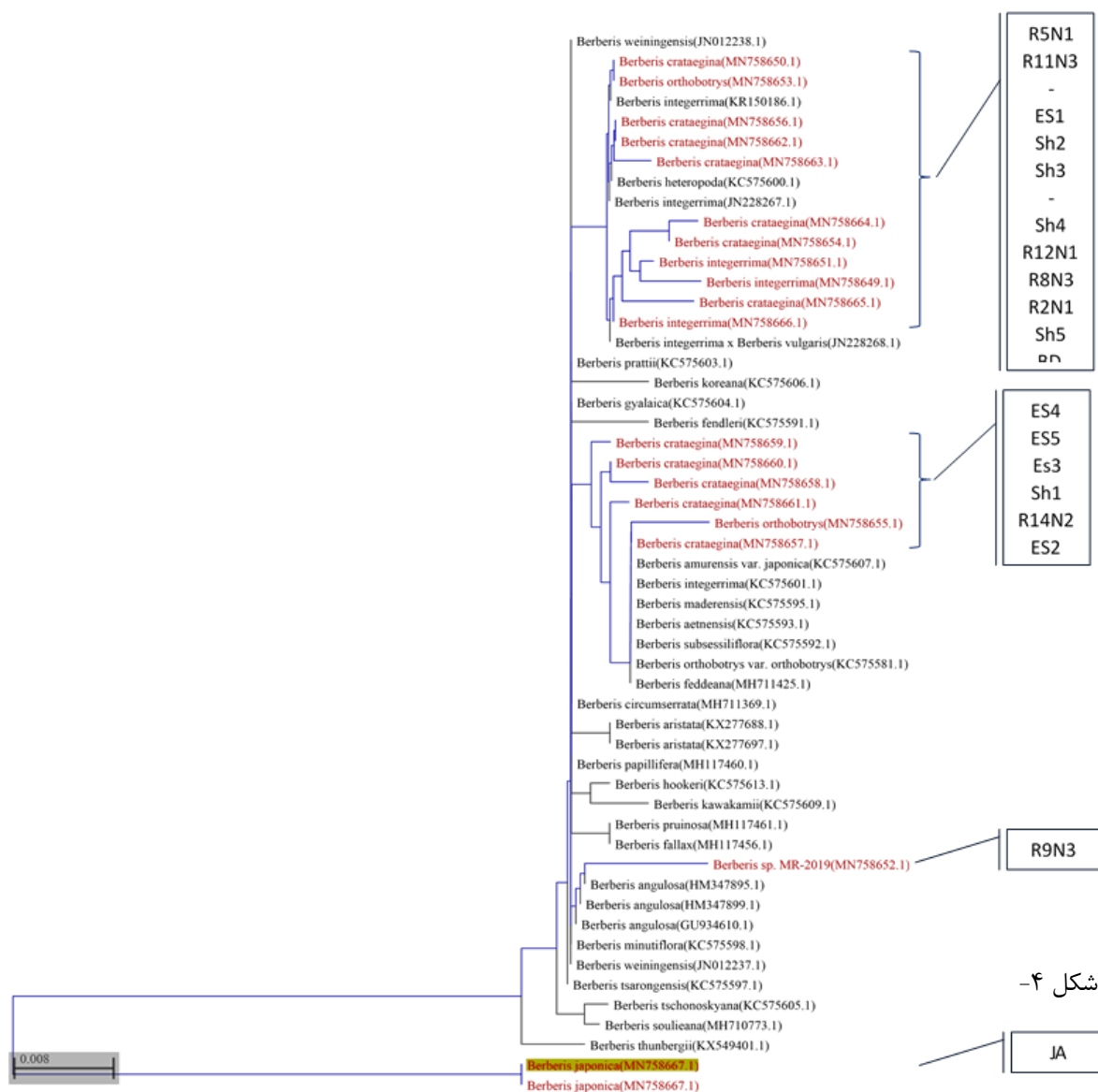
^۱ Identity

تنها ۹۱ درصد بود (شکل ۴-۵). این نتایج نشان می دهد که گونه های مورد بررسی دارای تنوع بین گونه ای نیز هستند. ژنوتیپ R9N3 بصورت جدا از ژنوتیپ های مورد مطالعه در کنار گونه های *B. augulosa* از هندوستان (سه تا)، *B. minutiflor* از باغ بوتانیک رویال گاردن انگلستان، *B. weiningensis* از کشور چین و گونه *B. turongensis* قرار گرفت. ژنوتیپ R9N3 با تیپ رشدی متراکم، شاخه های پرزدار و برگ های ضخیم با لبه های به شدت خاردار به لحاظ ظاهری نیز تفاوت های قابل ملاحظه ای با سایر ژنوتیپ ها دارد. به نظر می رسد این ژنوتیپ یک گونه مجزا از سایر ژنوتیپ ها باشد که می تواند مورد توجه بیشتر گیاهشناسان باشد و جزو گونه ای جدید در ایران قرار گیرند.

در تجزیه خوشه ای شکل ۴-۵ دو گروه از ژنوتیپ ها هر کدام در یک ناحیه مجزا در کنار سایر گونه های زرشک از پایگاه داده NCBI قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ های اسفراین (ES) به جز ES1 و Sh1 و R14N2 بود. این ژنوتیپ ها اکثراً از گونه *Berberis crataegina* بودند. در پایگاه داده NCBI بیش از ۱۶۰۰ توالی مربوط به جنس *Berberis* ثبت شده است ولی هیچ توالی مربوط به گونه *B. crataegina* به جز داده های این پژوهش وجود نداشت. ژنوتیپ های R14N2 و ES2 با فاصله نزدیک در کنار گونه های *B. amurensis*، *B. orthobotrys*، *B. maderensis*، *B. aentensis*، *integerrima* از باغ بوتانیک رویال گاردن انگلستان در گروه یک قرار گرفتند. این نتایج لزوم توجه بیشتر در نامگذاری این گونه ها و تحقیقات بیشتر گیاهشناسی در این زمینه را می رساند. ژنوتیپ Es4 در فاصله دورتری از سایر ژنوتیپ ها در این گروه قرار گرفت (شکل ۴-۵). در گروه دوم شامل ژنوتیپ های ES1، Sh2-5، R12N1، R8N3، R2N1، R5N1 و R11N3 در کنار گونه های *B. integerrima* با کد (KR150186) (Ghorbani et al., 2017) و کد (JN228267) (Sodagar et al., 2012) از ژنوتیپ های زرشک ایرانی قرار گرفتند. گونه *B. heteropoda* نیز از باغ بوتانیک انگلستان نیز در این گروه قرار گرفت. ژنوتیپ بی دانه در کنار گونه *B. integerrima* در این گروه قرار گرفت (شکل ۴-۵).

Sequences producing significant alignments						Download	Manage Columns	Show	500	
select all 93 sequences selected						GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession			
☒	Berberis japonica clone JA internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	651	651	100%	0.0	100.00%	MN758667.1			
☒	Berberis sp. MR-2019 clone R9N3 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	440	440	96%	2e-119	90.27%	MN758652.1			
☒	Berberis crataegina clone R5N1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	436	436	95%	3e-118	90.24%	MN758650.1			
☒	Berberis crataegina clone ES1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	431	431	95%	1e-116	89.94%	MN758656.1			
☒	Berberis orthobotrys clone R11N3 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	429	429	94%	4e-116	90.12%	MN758653.1			
☒	Berberis crataegina clone Sh5 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	427	427	96%	2e-115	89.47%	MN758665.1			
☒	Berberis tsaronensis voucher RBQE-19381165 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	427	427	93%	2e-115	90.12%	KC575597.1			
☒	Berberis crataegina clone Sh1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	425	425	95%	6e-115	89.47%	MN758661.1			
☒	Berberis crataegina clone ES5 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	425	425	94%	6e-115	89.85%	MN758660.1			
☒	Berberis integerrima clone R8N3 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	425	425	96%	6e-115	89.44%	MN758651.1			
☒	Berberis integerrima clone R2N1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	425	425	97%	6e-115	89.08%	MN758649.1			
☒	Berberis tchonoskiana voucher RBQE-199401936 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	425	425	91%	6e-115	90.46%	KC575605.1			
☒	Berberis crataegina clone Es4 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	424	424	93%	2e-114	90.00%	MN758659.1			
☒	Berberis crataegina clone Sh4 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	422	422	92%	7e-114	89.97%	MN758664.1			
☒	Berberis crataegina clone ES3 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	422	422	94%	7e-114	89.58%	MN758658.1			
☒	Berberis thunbergii internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	422	422	89%	7e-114	90.62%	KC549401.1			
☒	Berberis circumserrata voucher Q434 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	MH711369.1			
☒	Berberis pauciflora voucher YLDP068C small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	MH117460.1			
☒	Berberis gyalica voucher Harber AS6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	KC575604.1			
☒	Berberis pratii voucher RBQE-19687172 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	KC575603.1			
☒	Berberis minutiflora voucher Harber AS62 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	KC575598.1			
☒	Berberis weinigenensis voucher WN2-12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	JN0012238.1			
☒	Berberis weinigenensis voucher WN1-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	420	420	91%	3e-113	90.18%	JN0012237.1			
☒	Berberis integerrima clone BD internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	418	418	92%	1e-112	89.94%	MN758666.1			
☒	Berberis orthobotrys clone R14N2 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	418	418	94%	1e-112	89.52%	MN758655.1			
☒	Berberis aristata isolate SBB-1443 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	418	418	91%	1e-112	90.15%	KX277686.1			
☒	Berberis crataegina clone R12N1 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	416	416	92%	3e-112	89.91%	MN758654.1			
☒	Berberis crataegina clone Sh3 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	92%	1e-111	89.67%	MN758663.1			
☒	Berberis crataegina clone Sh2 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	93%	1e-111	89.89%	MN758662.1			
☒	Berberis soulieana voucher Ge130952 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	91%	1e-111	89.48%	MH710773.1			
☒	Berberis prinosa voucher YLDP096C small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	91%	1e-111	89.88%	MH117461.1			
☒	Berberis fallax voucher YLDP016A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	414	414	91%	1e-111	89.88%	MH117456.1			
☒	Berberis aristata isolate SBB-1292 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	414	414	91%	1e-111	89.88%	KX277697.1			
☒	Berberis integerrima isolate Kh116 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	414	414	91%	1e-111	89.88%	KR150186.1			
☒	Berberis integerrima 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	414	414	91%	1e-111	89.88%	JN228267.1			
☒	Berberis angulosa clone 4 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	414	414	89%	1e-111	90.31%	HM347895.1			
☒	Berberis angulosa clone 5 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	414	414	89%	1e-111	90.31%	HM347899.1			
☒	Berberis angulosa isolate B121 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	414	414	89%	1e-111	90.31%	GU934610.1			
☒	Berberis kavalakamli voucher RBQE-199339796 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.57%	KC575607.1			
☒	Berberis amurensis var. japonica voucher RBQE-19920784A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575607.1			
☒	Berberis koreana voucher RBQE-19731131A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575606.1			
☒	Berberis integerrima voucher RBQE-19912970 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575601.1			
☒	Berberis madrensis voucher Harber EU5 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575595.1			
☒	Berberis aetnensis voucher Harber EU2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575593.1			
☒	Berberis subsessiliflora voucher Harber AS66 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575592.1			
☒	Berberis orthobotrys var. orthobotrys voucher RBQE-19810556 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	412	412	91%	5e-111	89.85%	KC575581.1			
☒	Berberis crataegina clone ES2 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	411	411	91%	2e-110	89.60%	MN758657.1			
☒	Berberis fendleri voucher Ross McCauley 640 (E) 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	411	411	91%	2e-110	89.57%	KC575591.1			
☒	Berberis feddeana voucher Q519 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	MH711425.1			
☒	Berberis dielsiana voucher Q515 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	MH711421.1			
☒	Berberis dielsiana voucher Q255 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	MH711231.1			
☒	Berberis dielsiana voucher Q140 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	MH711134.1			
☒	Berberis amurensis voucher Q023 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	MH711026.1			
☒	Berberis sibirica internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	KX549400.1			
☒	Berberis fendleri internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	KX549392.1			
☒	Berberis aristata isolate SBB-1326 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	88%	6e-110	90.42%	KX277659.1			
☒	Berberis sargentiana voucher RBQE-19784169 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	KC575612.1			
☒	Berberis beromanniae voucher RBQE-19754095A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	KC575610.1			
☒	Berberis tsaronensis voucher RBQE-19310185 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	KC575596.1			
☒	Berberis garciae voucher Harber EU4 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	89%	6e-110	89.97%	KC575594.1			
☒	Berberis canadensis voucher Chase 13196 (K) internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	KC575590.1			
☒	Berberis sibirica voucher Harber AS81 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	KC575580.1			
☒	Berberis sp. 3 ARB-2011 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	JN228269.1			
☒	Berberis tsienii voucher YS1-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	91%	6e-110	89.57%	JN0012234.1			
☒	Berberis asiatica isolate B26 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	GU934625.1			
☒	Berberis hainensis clone 3 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347903.1			
☒	Berberis hainensis clone 2 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347902.1			
☒	Berberis hainensis clone 1 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347901.1			
☒	Berberis angulosa clone 7 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347898.1			
☒	Berberis angulosa clone 6 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347897.1			
☒	Berberis angulosa clone 5 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347892.1			
☒	Berberis aristata clone 6 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	HM347889.1			
☒	Berberis glaucocarpa isolate B108 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	88%	6e-110	90.42%	GU934665.1			
☒	Berberis chitria isolate B73 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, partial sequence	409	409	89%	6e-110	90.00%	GU934658.1			

شکل بالا ۴-۴- نتایج بلاست ۱۹ ژنوتیپ زرشک در پایگاه داده NCBI با تطابق بالای ۹۰ درصد



شکل ۴-

۵- تجزیه خوشه ۱۹ ژنوتیپ زرشک مورد بررسی در کنار سایر گونه‌های زرشک با میزان شباهت بالای ۹۱٪ بر اساس بلاست

۳۵۰ جفت باز ناحیه ITS در پایگاه داده NCBI

۴-۶- تایید توالی اختصاصی ژنوتیپ زینتی مربوط به ناحیه ITS

جهت تعیین نشانگرهای ویژه برای یک گونه خاص زرشک، توالی‌ها مورد آنالیز مقایسه‌ای قرار گرفتند و نواحی اختصاصی تفکیک و از آنها جهت طراحی پرایمر استفاده شد. سپس DNA های استخراج شده مورد تکثیر با استفاده از PCR و پرایمرهای ویژه قرار گرفتند. از نظر توالی‌یابی، رقم زرشک زینتی (JA) از بقیه ارقام متفاوت است و بیان‌کننده تفاوت این رقم با سایر ارقام است، چرا که در توالی‌ها تطابق کامل مشاهده نشد (شکل ۴-۶).

Range 1: 1 to 320 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Prev](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
422 bits(228)	7e-114	290/320(91%)	4/320(1%)	Plus/Plus
Query 18	TTG-AA-CTGCATAGCAG-AAGACCCGCGAACTTGTGAACAACTAT-TTGGGAGAGGGAT	73		
Sbjct 1	TTGAAACCTGCATAGCAGAAAGACCCGCGAACTTGTGAACAACTATATTGGGAGAAGGAT	60		
Query 74	ACGGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGTCTGGGCATTC	133		
Sbjct 61	ACGGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGTCTGGGCATTC	120		
Query 134	TTTGGCTCTAATAAAATAACAAACTCGGCCTGATCACCGCCAAGGAAAATTAATGGGAAA	193		
Sbjct 121	TTTGGCTCTGATAAAATAACAAACTCGGCCTGATCAGCGCCAAGGAAAATTAATGGGAAA	180		
Query 194	TACCTGCCCTTGTCTTGC AAAAGGGTATTGCTTATCTAATATTCAAACAACTCTCGGC	253		
Sbjct 181	TAGCTAGCCCTTGTCTTGC AAGATGGTATTGCTTATCTGATATTGCAACGACTCTCGGC	240		
Query 254	AATGAATATCTCGGCTCTCCACCAATAAAAAACGTACCGAATTGCAATACTTGGTGTGA	313		
Sbjct 241	AATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGA	300		
Query 314	ATTGCAAAACCCCGGAACC	333		
Sbjct 301	ATTGCAGAATCCCGTGAACC	320		

شکل ۴-۶- تایید توالی ژنوتیپ JA (زرشک زینتی ژاپنی) با توالی با کد KX549401.1 مربوط به ناحیه ITS2 از گونه

Berberis thunbergii در پایگاه داده NCBI

۴-۷- مناطق حفاظت شده ناحیه ITS ژنوتیپ‌های مورد پژوهش

در شکل ۴-۷ نتایج همردیفی چندگانه ارائه شده است. نواحی حفاظت شده‌ی بدست آمده از توالی‌های همردیف شده نشان داد برخی نواحی اختصاصی مختص یک گونه وجود دارد که می‌توان در شناسایی گونه مورد نظر مورد بررسی قرار گیرد (شکل ۴-۷). همان‌گونه که مشاهده می‌شود ناحیه حفاظت شده ژنوتیپ زینتی از سایر ژنوتیپ‌ها متفاوت می‌باشد که می‌تواند تایید دیگری بر تفاوت این ژنوتیپ با سایر ژنوتیپ‌ها باشد.

3	R2N1_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerimapolulation.Mashad	-	... CAGCGGCAGACATTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
4	R6N1_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerima" orataeginapolulation.Mashad	-	... CAAGCGGAGAC- TTGTTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
5	R6N3_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerimapolulation.Mashad	-	... CAGGGGGGAGAC- TTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
6	R6N3_ "Berberis_Its2spcies.B.Unknownwpopulation.Mashad	-	... GAGGGGAGAGACTTTGTTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTAT- TTGGGAGAGGGATA	
7	R1N3_ "Berberis_Its2spcies.B_ orthobotryspolulation.Mashad	-	... GCAATCGGGAGACATTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
8	R12N1_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Mashad	-	... CAGGGGGTAGATCATTGTTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
9	R1W2_ "Berberis_Its2spcies.B_ orthobotryspolulation.Mashad	-	... CGCAGTCGG- AGAC- TTGTTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	TGCGAACTTGTGAGCAACTAT- TTGGGAGAGGGATA	
10	ES1_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	-	... GCAGCGGAGTCTTGTGAACTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
11	ES2_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	-	... AAGAACATTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACT	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
12	ES3_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	-	... CGCAATGCGGAGTCAATTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
13	ES4_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	-	... CGCTATTCGGTAGTCAATTGTTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
14	ES5_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	-	... CAGGCGAGTCAATTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
15	Sh1_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	-	... GGCATGCGGTAGAC- TTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
16	Sh2_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	-	... CAAGCGGAGTC- TTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
17	Sh3_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	G	CCAGGGCGGCGAGTCAATTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
18	Sh4_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	-	... GGGGAAGBACATTGTTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
19	Sh5_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	-	... CAGGCGGAGAC- TTGTTGA- C	CTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA
20	BD_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerimapolulation.Birjand	-	... CGCATGGGTAGAC- TTGTTGAACCTGCATAGCAGAAAGACC	CGCGAACTTGTGAGCAACTATATTGGGAGAGGGATA	
21	JA_ "Berberis_Its2spcies.B.japonicapolulation.shahrood	-	... GGCAGCGGAGACAATTGATTGAACCTGCATAGCAGAA- GAC	CGCGAACTTGTGAGCAACTAT- TTGGGAGAGGGATA	
22		81			
23	R2N1_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerimapolulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CAATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
24	R6N1_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerima" orataeginapolulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
25	R6N3_ "Berberis_Its2spcies.B.Integerimapolulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
26	R6N3_ "Berberis_Its2spcies.B.Unknownwpopulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
27	R1N3_ "Berberis_Its2spcies.B_ orthobotryspolulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
28	R12N1_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
29	R1W2_ "Berberis_Its2spcies.B_ orthobotryspolulation.Mashad	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
30	ES1_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
31	ES2_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
32	ES3_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
33	ES4_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
34	ES5_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Esfaraen	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
35	Sh1_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
36	Sh2_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
37	Sh3_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	
38	Sh4_ "Berberis_Its2spcies.B.orataeginapolulation.Shahrood	C	GGGTCTCTTGGACTCCTTCCCTCGATTTCGGACCGAGGAGTGCCCTTGT	CGG- CATCTTTGGCTCTGATAAAATAACA	

شکل ۴-۷ نواحی حفاظت شده‌ی پدست آمده از توالی‌های هم‌ردیف سازی شده

[illegible]

۴-۱- پرایمرهای اختصاصی

بر اساس نتایج هم‌ردیفی، سه جفت پرایمر اختصاصی طراحی گردید و DNA ژنوتیپ‌های *B. integerrima*

، R9N3 و R14N4 با استفاده از PCR و جفت پرایمرهای اختصاصی طراحی شده تکثیر شد. توالی و برخی

خصوصیات این پیرایمرها در جدول ۳-۴ ارائه شده است.

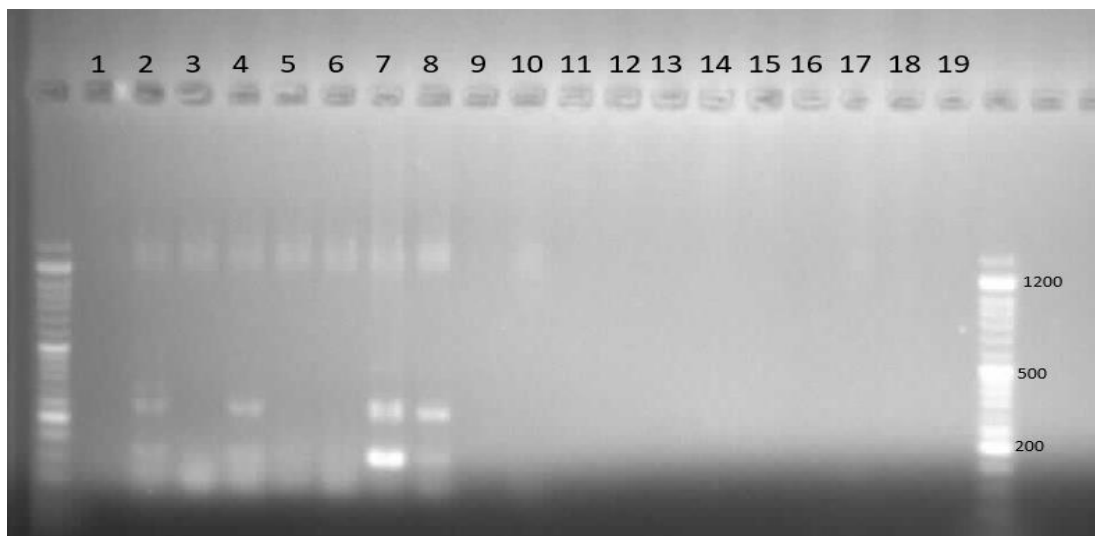
جدول ۳-۴- اطلاعات پرایمرهای اختصاصی طراحی شدن برای سه ژنوتیپ زرشک

طول قطعه	GC%	Tm	توالی (5'→3')	رقم
209	42 57	57 59	F: AGCGGAGACATTGATTGAACT R: CAAGAGCAAGGGGCAGGTA	JA
268	55 42	57 57	F: GACCCGCGAACTTGTGTA R: GTATCGCATTTTCGCTACGTTT	R9N3
113	50 30	59 49	F: GACTCGCGAACTTGTGAA R: TTTTATCAGAGCCAAAGATA	R14N2

۴-۹- توانایی پرایمرهای اختصاصی در تکثیر و تشکیل باند DNA نمونه ها

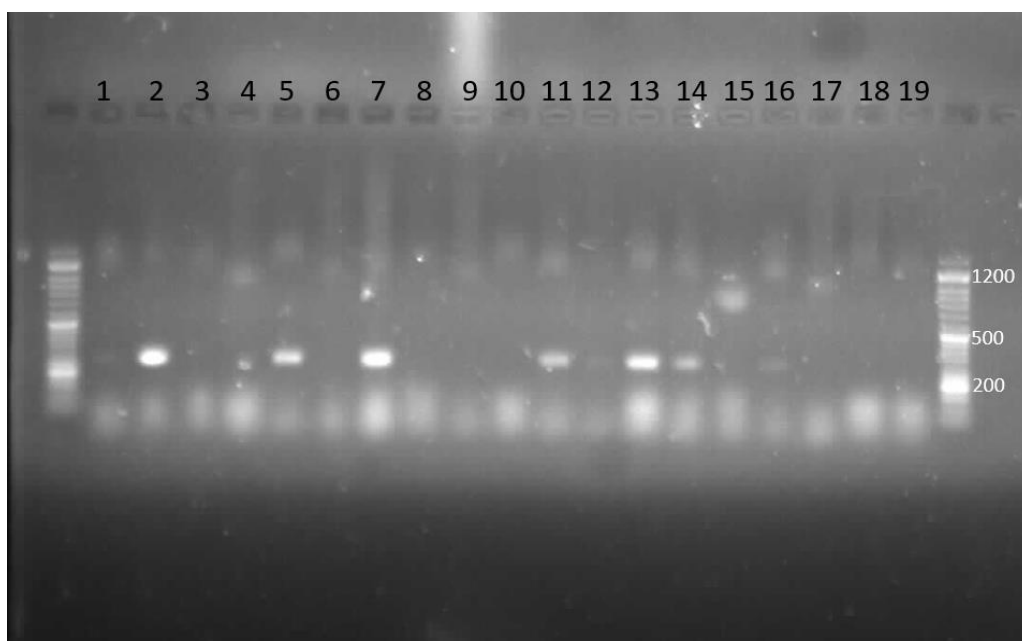
سه جفت پرایمر اختصاصی B.th, R14N2 و R9N3 بصورت جداگانه در DNA ۱۹ نمونه گیاهی زرشک با استفاده از دستگاه PCR مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی توانایی تکثیر پرایمرهای اختصاصی محصول نهایی در ژل آگارز قرار گرفتند. پرایمر طراحی شده برای ژنوتیپ R14n2 توانست باند اختصاصی این ژنوتیپ را از سایر ژنوتیپ های مجزا کند (شکل ۴-۸). پرایمر طرحی شده برای ژنوتیپ R9N3 در ناحیه مد نظر (۲۶۸bp) باند اختصاصی تشکیل نداد و در ناحیه حدود ۳۵۰ bp پرایمر R9N3 بر روی ژنوتیپ های R5N1, R11N3, R14N2, Sh4, Es1, Es2 زرشک نواحی را تکثیر کرد (شکل ۴-۹). پرایمر B.th. نیز باند اختصاصی در ژنوتیپ های مد نظر تولید نکرد (شکل ۴-۱۰).

نتایج نشان داد که در زرشک به علت اختلاف کم جایگزینی نوکلئوتیدی در طی تکامل، روابط بین آنها به خوبی تفکیک نشده و اکثرا هیبرید هستند. تغییر در جایگاه برش کروموزومی در اثر تغییراتی همچون جابجایی، معکوس شدن و جهش خواهد بود، انتظار تغییرات زیاد نوکلئوتیدی مناطق مختلف، مستلزم داشتن شرایط آب و هوایی متفاوت و حداکثر عوامل تنش زای محیطی خواهد بود (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸). در این مطالعه ژنوم گونه های مناطق مشابه آب و هوایی سردسیری اسفراین و شاهرود در تمایز با ژنوم منطقه گرم و خشک قاین و گناباد بوده و تفاوت نوکلئوتیدی در آنها مشاهده شد.



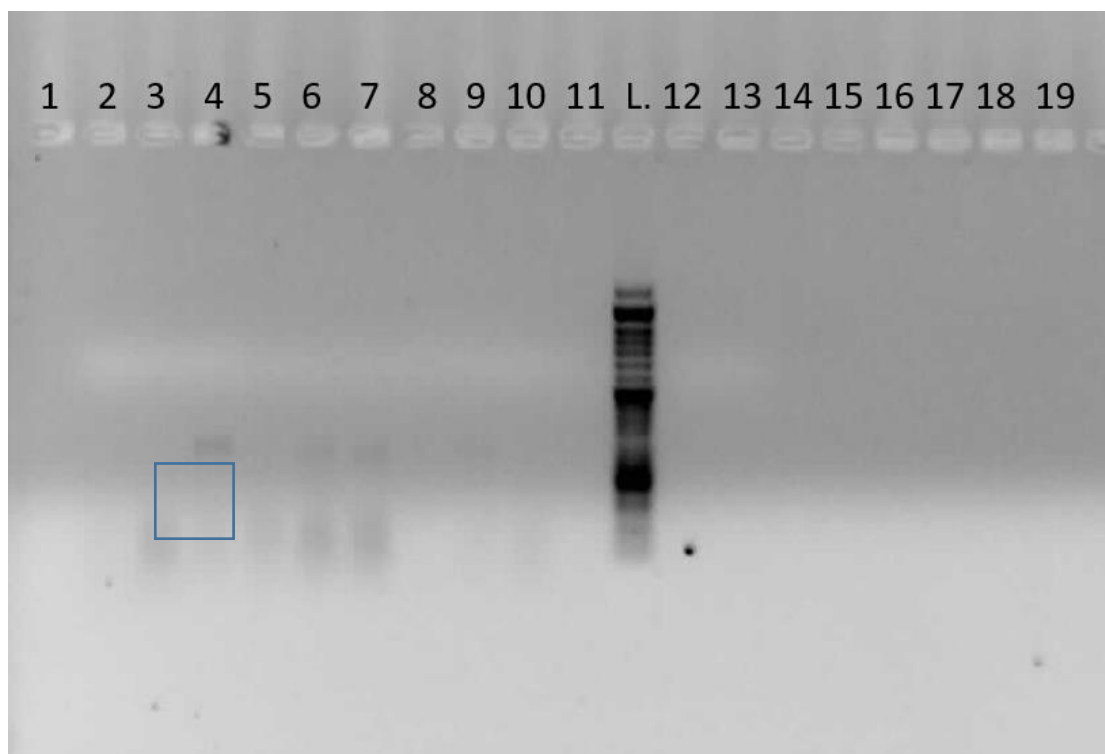
شکل ۴-۸ نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر R14N2 بر روی ژنوتیپ های مورد مطالعه

(نمونه ها به ترتیب لاین ۱- R2N1، لاین ۲- R5N1، لاین ۳- R8N3، لاین ۴- R9N3، لاین ۵- R11N3، لاین ۶- R12N1، لاین ۷- R14N2، لاین ۸- Sh1، لاین ۹- Sh2، لاین ۱۰- Sh3، لاین ۱۱- Sh4، لاین ۱۲- Sh5، لاین ۱۳- Es1، لاین ۱۴- Es2، لاین ۱۵- Es3، لاین ۱۶- Es4، لاین ۱۷- Es5، لاین ۱۸- بی دانه، لاین ۱۹- زینتی ژاپنی)



شکل ۴-۹ نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر R9N3 بر روی ژنوتیپ های زرشک

(نمونه ها به ترتیب لاین ۱- R2N1، لاین ۲- R5N1، لاین ۳- R8N3، لاین ۴- R9N3، لاین ۵- R11N3، لاین ۶- R12N1، لاین ۷- R14N2، لاین ۸- Sh1، لاین ۹- Sh2، لاین ۱۰- Sh3، لاین ۱۱- Sh4، لاین ۱۲- Sh5، لاین ۱۳- Es1، لاین ۱۴- Es2، لاین ۱۵- Es3، لاین ۱۶- Es4، لاین ۱۷- Es5، لاین ۱۸- بی دانه، لاین ۱۹- زینتی ژاپنی)



شکل ۴-۱۰ نتایج الگوی تکثیر برای پرایمر B.th. در ژنوتیپ های مورد مطالعه زرشک.

(نمونه ها به ترتیب لاین ۱- R2N1، لاین ۲- R5N1، لاین ۳- R8N3، لاین ۴- R9N3، لاین ۵- R11N3، لاین ۶- R12N1، لاین ۷- R14N2، لاین ۸- Sh1، لاین ۹- Sh2، لاین ۱۰- Sh3، لاین ۱۱- Sh4، لاین ۱۲- Sh5، لاین ۱۳- Es1، لاین ۱۴- Es2، لاین ۱۵- Es3، لاین ۱۶- Es4، لاین ۱۷- Es5، لاین ۱۸- بی دانه، لاین ۱۹- زینتی ژاپنی)

۴-۱۰ نتیجه گیری

استفاده از نشانگرها یک روش ارزان، آسان و رضایت بخش برای ارزیابی روابط ژنتیکی و تنوع ژنتیکی می باشد. ITS می تواند به عنوان یک نشانگر مولکولی مناسب در شناسایی جنس و گونه گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش ۱۹ ژنوتیپ مختلف زرشک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد کمترین فاصله ژنتیکی در میان گونه های مورد بررسی بین گونه های R5N1 و ES3 (بوت استرپ ۲۷) که از دو ناحیه کاخک گناباد و ارتفاعات روستای دهنه اجاق شهرستان اسفراین تهیه گردیده بود، مشاهده گردید. هم چنین نتایج حاکی از آن بود که ژنوتیپ های R5N1 و JA (زرشک زینتی) در فاصله ژنتیکی زیادی نسبت به سایر وارپته ها قرار می گیرند بیشترین تنوع بین گونه ای مربوط به گونه R5N1 (گونه تهیه شده کاخک) و R9N3 (گونه تهیه شده آزاد

شهر) می باشد که این ژنوتیپ ها برای کارهای اصلاحی زرشک معرفی می گردد. پرایمر R9N3 بر روی چند نمونه گیاهی زرشک باند تشکیل داد و پرایمر B.th. هیچ باند بر روی نمونه ها تشکیل نداد. نتایج این بررسی نشان می دهد توالی یابی ناحیه ITS2 از هسته ریبوزومی DNA علی الرغم وجود تنوع توانایی تفکیک گونه های زرشک را ندارد و به نظر می رسد که می بایست ناحیه بزرگتری از ITS2 و سایر نواحی بررسی گردد.

۴-۱۱ پیشنهادات

- توالی یابی کامل ناحیه ITS در زرشک جهت تعیین دقیق عملکرد این ناحیه در تفکیک زیر گونه ها پیشنهاد می شود.
- تعیین پرایمرهای اختصاصی مرتبط با زیرگونه های زرشک
- در تحقیقات بعدی تعداد بیشتری نشانگر برای شناسایی دقیق و قابل اطمینان استفاده شود.
- پیشنهاد می شود در مطالعات بعدی صفات مورفولوژیکی در زرشک نیز مورد بررسی قرار گیرد.
- پیشنهاد می شود در پژوهش های بعدی از ژنوتیپ های بیشتر زرشک استفاده گردد.

منابع

- اسدی، ف.، دژستان، س.، قهرمانزاده، ر.، رزمجو، ج.، آل ابراهیم، م. (۱۳۹۴). بارکد گذاری DNA برخی از گیاهان دارویی، فصلنامه علمی - پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی ۵ (۱۰) ۴-۳۱.
- آهنی، ح.، جلیوند، ح.، واعظی، ج.، ساداتی، ا. (۱۳۹۵). زیرگونه جدیدی از سنجد تلخ (*Elaeagnus rhamnoides* A.Nelson) برای ایران براساس داده‌های مولکولی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۲۴، شماره ۲ صفحه ۲۲۰-۲۰۸.
- بالندری، الف. و کافی، م. (۱۳۸۱). زرشک فناوری تولید و فرآوری، چاپ اول، نشر زبان و ادب، مشهد.
- باقری، ع.، ایزدی دربندی، ع. و ملبوبی، م.ع. ۱۳۸۱. کاربردهای عملی بیولوژی مولکولی گیاهی (ترجمه) انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۲۳۲ صفحه.
- علیزاده، ش.، حسن پور، ح. (۱۳۹۴). بررسی خواص ریخت شناسی میوه برخی از ژنوتیپ های وحشی زرشک در استان آذربایجان غربی، نشریه علوم باغبانی، دوره ۴۸، شماره ۱. (ص ۳۷-۲۷).
- بیتا، ح.، یوسفزاده، ح.، حسین زاده کلاگر، ا. (۱۳۹۲). مقایسه الگوی PCR-RFLP با توالی یابی مستقیم ناحیه ITS
- نمدارهای هیرکانی. نشریه تاکسونومی و بیوسوماتیک. ص ۷۳-۸۲ سال ۵ شماره ۱۷.
- حیدری، پ.، اشرف مهرابی، ع. و نصراله نژاد قمی، ع. (۱۳۹۳). بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون گروهی گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) با استفاده از هر نشانگر های ITS. نشریه پژوهشگاه اصلاح گیاهان زراعی
- حیدری، ح.ر.، گلبابایی، ف.، شمسی پو، ع.ا و رحیمی فروشانی، ع. (۱۳۹۸). بررسی روند تغییرات دمایی دردهه-های آتی با تاکید بر استرس های گرمایی در محیط های روباز کشور و سلامت کار ایران، ۱۶ (۲): ۳۲-۴۷.
- زرگری، ع. (۱۳۶۹). گیاهان دارویی. ویرایش ۳، انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

زمانی، م.، زمانی، ن.، محمدی گل تپه، ا.، عارفی پور، م. (۱۳۹۷). کاربرد بارکدگذاری DNA توسط مارکر ریبوزومی ITS در شناسایی و طبقه بندی مولکولی قارچ های اکتومیکوریز. نشریه طبیعت ایران، پایان نامه کارشناسی ارشد.

سلیمانی، م.، سید طباطبایی، ب. و طالبی، م. (۱۳۹۰). تشخیص چند شکلی ژنتیکی بین برخی ارقام انار براساس آنالیز توالی ITS ژن های ریبوزومی هسته ای و نشانگر SRAP. نشریه پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات، پایان نامه کارشناسی ارشد.

شاهی، ر.، نصرتی، ه.، حسین پور، ف. و زبان حقیقی، م. (۱۳۹۳). مطالعه سیتوماتیکی گونه‌هایی از جنس (Celtis) با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ITS. نشریه پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات. پایان نامه کارشناسی ارشد.

کیانی، م.، بابائی، ع.، سفید کن، ف.، نقوی، م. (۱۳۹۴). ارزیابی مولکولی رابطه فیلوژنتیک جمعیت هایی از لاله واژگون ایران با استفاده از توالی ناحیه ITS. دو فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، دانشنامه دکتري.

مشتاقی، ن.، حمیدی، ا.، باقری، ع.، شریفی، ا. و همتی کافی، ع. (۱۳۹۲). شناسایی برخی تقلبات زعفران (*Crocus sativus*) با استفاده از نشانگر مولکولی ITS. نشریه زراعت و فناوری زعفران. ۲: ۲۹-۳۸.

مودن فردوسی، ب. (۱۳۷۲). زرشک و زراعت کشاورزی. انتشارات سازمان آموزش و پرورش.

میرحیدر، ح.، (۱۳۷۲). معارف گیاهی، جلد ۷-۱، دفتر نشر فرهنگ اسلامی تهران، ۳۸۶۹ صفحه.

میرعرب، م.، احمدی خواه، ا. ا. و پهلوانی، م. ه. (۱۳۹۴). مقایسه کارآیی مولکولی SSR و RAPD در برنامه گزینش به کمک نشانگر (MAS) در برنج. مجله فناوری زیستی در کشاورزی. ۴ (۲): ۱۳-۲۱.

Adams, M.D., J.M. Kelley, J.D. Gocayne, M. Dubnick, M.H. Polymeropoulos, H. Xiao, C.R. Merrill, A. Wu, B. Olde and R.F. Moreno. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science, 252: 1651-1656.

- Ahrendt, L. (1961). *Berberis* and *Mahonia*, a taxonomical revision. *Bot J Linn Soc*, 57:401–410.
- Alvares, L. & Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3): 417-434.
- Alemardan, A., Asadi, W., Rezaei, M., Tabrizi, L., & Mohammadi, S. (2013). Cultivation of Iranian seedless barberry (*Berberis integerrima* ‘Bidaneh’): A medicinal shrub. *Industrial Crops and Products*, 50, 276-287.
- Arayne, M.S. (2007). Sultana N, and Bahadur SS. The berberis story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. *Pak J Pharm Sci* .20: 83-92.
- Ashraf, H., Zare, S. & Farnad, N. (2014). The effect of aqueous extract of barberry fruit on live damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Shahrekord Univ Med Sci*: 15(6): 1-9.
- Balasaravanan, T., P. Chezian, R. Kamalakannan, R. Yasodha, M. Varghese, K. Gurumurthi & M. Ghosh. (2006). Identification of species-diagnostic ISSR markers for six *Eucalyptus* species. *Silvae Genetica*, 55(3): 119-122.
- Baldwin, C.C., Castillo, C.I., Weigt, L.A. & Victor, B.C. (2011). Seven new species within western Atlantic *Starksia atlantica*, *S. lepicoelia*, and *S. sluiteri* (*Teleostei, Labrisomidae*), with comments on congruence of DNA barcodes and species. *Zookeys*. (79):21–72
- Balasubramani, S. P., Goraya, G. S., & Venkatasubramanian, P. (2011). Development of ITS sequence-based markers to distinguish *Berberis aristata* DC. from *B. lycium* Royle and *B. asiatica* Roxb. *3 Biotech*, 1(1), 11-19.
- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: counting angels with DNA. *Nature*, 421: 122-124.
- 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.
- Cadic, A. (1992). Breeding for ever-red barberries (*Berberis* spp.). *Acta Horticulturae*, 320, 85-90.
- Chawla, H.S. (2000). Introduction to plant biotechnology. Science Publishers Inc. USA.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C. & Song, J. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*. 5: e8613.

- Chillali, M., Idder Ighili, H., Guillaumin, J.J., Mohammed, C, Long Escarmant, B. & Botton, B. (1998). Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycological Research* 102: 533-540
- Clegg, M.T., Gaut, B.S., Learn, G.H. & Morton, B.R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 91: 6797-6801.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H. & Wanapat, M. (2008). The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports* 35: 265-274.
- Flinder, G., Nieto, and Josen, A. & Rossello. (2007). Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nr DNA ITS in species-level evolutionary studies in plants." *Molecular phylogenetics and evolution* 44.2:911-919.
- Garcia, S., A. Kova, K., Leitch, A.R. & Garnatje, T. (2017). Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the plant rDNA database. *The plant Journal*, 89(5):1020- 1030.
- Ghahramanzadeh, R., Marashi, H., van de Weil, K, Malekzadeh, S., Shahriari, F. & Asmaldrz, R. (2012). The use of DNA barcoding to separation invasive species of aquatic weeds *Myriophyllum* spp. Non-invasive from relatives. *Journal of Crop Protection*. 101.
- Giordano, J., & Hutchison, P. J. (2007). Regrounding medicine in humanity amidst technocracy and cultural pluralism. Paper presented at the Oxford Roundtable in Arts and Sciences, Harris Manchester College, University of Oxford, United Kingdom.
- Gultepe, M., U. Uzuner, K. Coşkuncelebi, A.O. Belduz & S. Terzioğlu. (2010). Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild *Primula* (Primulaceae) taxa of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 34(3): 147-157.
- Ghorbani, A., Saeedi, Y. & de Boer, H.J. (2017). Unidentifiable by morphology: DNA barcoding of plant material in local markets in Iran. *PLoS ONE* 12(4): e0175722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175722>.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984; 219(1): 1-14.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*; 270(1512):313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Biol Sci SerB* 270: S96–S99.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. & Little, D.P. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. PLoS ONE 6(5): e19254

Hosseinzadeh, H., Ramezani, M., Shafaei, H. & Taghiabadi, E. (2013). Anticonvulsant effect of *Berberis integerrima* L. root extract in mice. J Acupunct Meridian Stud; 6(1): 12-7. (Persian).

Imenshahidi, M. & Hosseinzadeh, H. (2016). *Berberis vulgaris* and Berberine: an update review. Phytother Res; 30(11):1745-64.

Kim, Y.D., Kim, S. H. & Landrum, L. R. (2004). Taxonomic and phylogeographic implications from ITS phylogeny in *Berberis* (Berberidaceae). Journal of Plant Research, 117 (3): 175-182

Kress, W.J. & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLoS ONE 2: e508.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.

Lahaye, Renaud et al. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 105,8 (2008): 2923-8.

Li, Q., Liu, Q.C., Zhai, H., Ma, D.F., Wang, X., Li, X.Q. & Wang, Y.P. (2008). Genetic diversity in main parents of sweet Potato in China as revealed by ISSR markers. Acta Agronomica Sinica, 34: 972-977.

Liu, C.X., Xiao, P.G. & Liu, G.S. (1991). Studies on plant resources, pharmacology and clinical treatment with berbamine. Phytotherapy Research, 5(1991): 228-230.

Marshall, E. (2005). Will DNA bar codes breathe life into classification. Science 307: 1037.

Müller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J. & Wolf, M. (2007). Distinguishing species. RNA 13: 1469–1472.40.

Parkin, E.J. & Butlin, R.K. (2004). Within-and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. Molecular biology and evolution, 21(8): 1595-1601. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh163>.

Reddy, P.M., Sarla, N. & Siddig, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 9-17.

- Saeed, A., Najma, S. & Saima S. (2007). The beriberi's story: *Berberis vulgaris* in therapeutics. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 20:83-92.
- Saied, S. & Begum, S. (2004). Phytochemical studies of *Berberis vulgaris*. Chemistry of Natural Compounds, 40, 137-140.
- Schultz, J. & Wolf, M. (2009). ITS2 sequence structure analysis in phylogenetics: a ho to manual for molecular systematics. Mol Phylogent Evol, 52(2): 520-523.
- Silva, S.R., Gibson, R. Adamec, L. Dominguez, Y. & Miranda, V.F. (2018). Molecular phylogeny of bladderworts: A wide approach of *Utricularia* (Lentibulariaceae) species relatinshpes based on six plastidial and nuclear DNA sequences. Mol phylogenet Evol, 118: 244-264.
- Slageren, M. & Van, W. (1994). Wild wheats: a monograph *Aegilops* L. and *Amblypyrum* (Jaub and spach) of eig (poaceae). Wagenin Gen. Agr., Univ. ICARDA.
- Sodagar, N., Bahrami, A.R., Memariani, F. et al. (2012). Biosystematic study of the genus *Berberis* L. (Berberidaceae) in Khorassan, NE Iran. Plant Syst Evol **298**, 193–203. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0537-9>.
- Valentini, A., Miquel, C., Nawaz, M.A., Bellemain, E., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Cruaud, C., Nascetti, G., Wincker, P., Swenson, J.E. & Taberlet, P. (2009). New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. Molecular Ecology Resources, 9: 51-60.
- Yousefi Harikandehei, M.J., Hasani, M.E., Madah Arefi, H. & Mohammadipour, M. (2009). Evaluation of genetic diversity of several accessions of Iranin *Hyoscyamus niger* L. Based on RAPD markers. Iranin Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Res. 1 (33): 1-14.

Abstract

In different parts of Iran, Barberry is used for food and medicine. Seedless Barberry, as an economic crop has a major role in the agricultural economy of the southern region of Khorasan. In recent years, the use of ITS sequences of rDNA has been increased to identify plant species as DNA barcoding. In the present study, the main objective is evaluation efficiency of ITS sequence for DNA barcoding of 19 collected barberry genotypes where they were collected from a barberry collection in Mashhad Food Science and Technology Research Institute and genotypes collected from Esfarayen and Shahroud, Iran. DNA samples were amplified by ITS2 primers and then DNA fragment separated from agarose gel and send to SinaClon Co for sequencing. The phylogenetic analysis of barberry genotypes was performed using MEGA X software by the UPGMA method on the base of ITS DNA sequencing. ITS sequences were registered in the NCBI database and the identity of sequences was determined with other related species by blasting analysis. Dendrogram of cluster analysis was done based on sequence similarity with other species in the NCBI database. The results showed that the genetic pair_wise distance, between the studied samples, varied from 0.122 to 0.154. In the cluster analysis, Japanese barberry (JA) was placed in a separate branch from 18 Iranian barberry genotypes. In Blast analysis, 93 DNA sequences of different species of *Berberis* had more than 90% identity with the ITS sequences of 19 Iranian barberry genotypes in the NCBI database. The most similarity between the ITS2 sequences of ornamental barberry with similar species (*B. thumbergii*) on the NCBI site was only 91%. In cluster analysis based on sequence on the NCBI site, the R9N3 genotype was separated from the studied barberry genotypes and the other genotypes were divided into two groups. The first group included Esfarayen (ES) genotypes, except ES1, and Sh1, and R14N2 that most of these genotypes were belong to *Berberis crataegina*. The second group, including ES1, Sh2-5, R12N1, R8N3, R2N1, R5N1, and R11N3 genotypes, along with other NCBI database genotypes, were classified as *B. integerrima*. The seedless barberry genotype was also placed in the *B. integerrima* species class. Due to the high similarity of the DNA sequences, only three pairs of primers were designated for R14N2, R9N3, and B.th genotypes. The DNA of 19 barberry genotypes was amplified by three specific primers. The R14N2 primer was specifically able to reproduce the R14N2 genotype, but the R9N3 and B.th primers did not have a specific band.

Keywords: barberry, ITS sequencing, DNA barcode, NCBI database



Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products

**Development of Species-Specific Markers for the Identification
Iranian Barberry species by using ITS region**

By: Aziz Ghahremanlo

Supervisor:

Dr. Mehdi Rezaei

Advisors

Dr. Parviz Hedari

Dr. Ahmad Balandari

October 2020