بررسی تنوع ژنتیکی زالزالک‌های ایران (*Crataegus* spp.) بر اساس توالی‌های ITS هسته‌ای

ابوالفضل علیرضالو[۱]، نیما احمدی[۲]*، پیمان صالحی[۳] و علی سنبلی[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲- تاریخ پذیرش: ۳/۲۲ /۱۳۹۷)

چکیده

زالزالک (*Crataegus* L.) متعلق به تیره گل سرخ (Rosaceae) می‌باشد و کشور ایران یکی از اصلی‌ترین مراکز تنوع این میوه ارزشمند محسوب می‌شود. اندام‌های مختلف زالزالک (برگ، گل و میوه) به دلیل برخورداری از انواع فلاونوئیدها و پروآنتوسیانین‌ها اهمیت زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارند. با هدف شناخت و بهره‌برداری از پتانسیل ژنوتیپ‌های بومی در کارهای اصلاحی، تنوع ژنتیکی این گیاه در ایران (۵۶ منطقه از ۱۱ استان) بر اساس توالی‌های ITS هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی مولکولی توالی‌یابی ناحیه ITS به‌خوبی توانست، ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف سرده *Crataegus* spp. را از هم جدا نماید که از لحاظ اصلاحی بسیار ارزشمند می‌باشد. در ایران فقط گونه‌های مربوط به Sect. *Crataegus* موجود می‌باشد که از پنج سری (Ser. *Pentagynae*، Ser. *Erianthae*، Ser. *Orientalis*، Ser. *Microphyllae*، Ser. *Crataegus*) تشکیل شده‌اند. در پژوهش حاضر به‌جز Ser. *Microphyllae* بقیه مشاهده شدند. در شاخه اول از درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌ها، سری Ser. *Orientalis*، در شاخه دوم Ser. *Pentagynae* و Ser. *Erianthae* و در شاخه‌های سوم و چهارم سری Ser. *Crataegus* قرار گرفتند. پژوهش حاضر گسترده‌ترین تحقیق در زمینه تنوع ژنتیکی زالزالک در ایران بود و نتایج این پژوهش می‌تواند در اصلاح و بهنژادی زالزالک مورد استفاده علمی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: توالی‌های ITS، توالی‌یابی، تیره گلسرخ، زالزالک

۱ – دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۲ - استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

۳ - استاد گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

۴ - دانشیار گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

* پست الکترونیک: ahmadin@modares.ac.ir

مقدمه

تیره گلسرخ یکی از خانواده‌های متنوع و پر جمعیت از نظر گونه‌های گیاهی است. تعداد زیادی از گیاهان دارویی، درختان میوه، بخشی از گیاهان زینتی، تعداد زیادی از گل‌های شاخه بریده یا گیاهان آپارتمانی در این خانواده قرار دارند. بیشتر گونه‌های تیره گلسرخ بصورت درختان یا درختچه‌هایی با خصوصیات ارزشمند تغذیه‌ای می‌باشند. زالزالک یکی از ارزشمندترین سرده‌های موجود در خانواده رزاسه می باشد (علیرضالو[1] و همکاران، ۲۰۱۸). زالزالک درختچه یا درختان کوچک کم و بیش خارداری هستند و معمولاً دارای برگ‌های سبز و روشن، گل‌های سفید یا صورتی رنگ که روی گل‌آذین دیهیم ظاهر می شوند و میوه‌های کروی تا بیضوی، قرمز، زرد، ارغوانی و یا سیاه رنگ می‌باشند که هر میوه (بسته به گونه) حاوی ۱، ۳ یا ۵ عدد بذر است (چانگ[2]، ۲۰۰۲). زالزالک یکی از میوه‌های پاییزی بسیار خوش طعم هست که در درمان بیماری های قلبی عروقی و تنظیم فشار خون موثر است. این میوه جنگلی سرشار از ویتامین‌های گروه ب و ویتامین ث است و به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌های زیاد، گرفتگی عروق را کاهش می‌دهد (چانگ[3] و همکاران). گونه‌های مختلف ولیک و عصاره‌های آنها به عنوان داروهای گیاهی در طب سنتی و طب نوین معرفی شده‌اند و علت اصلی استفاده از آنها در فرآورده‌های دارویی عموماً به دلیل داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی، محافظ قلب و عروق، افزایش دهنده جریان خون کرونری و پایین آورنده فشارخون می‌باشد. این فرآورده‌ها با اصلاح عملکرد قلب در نارسائی‌های قلبی، نارسائی جریان خون کرونری و در آریتمی‌های متوسط مورد مصرف قرار می‌گیرند (ژوگیچ[4] و همکاران، ۲۰۱۴). استفاده از ولیک در طب سنتی به زمان دیسکورید بر می‌گردد، ولی حدود اواخر قرن نوزدهم در کتاب‌های دارویی آمریکا و اروپا، به طور گسترده به این گیاه اشاره شده است. گل، برگ و میوه این گیاه، برای درمان فشارخون بالا یا پایین، بی‌نظمی و تند شدن حرکات قلب به کار می‌رود و بنا بر گزارش‌های موجود، این گیاه ضداسپاسم و مسکن است. زالزالک در معالجه تصلب شرائین و آنژین صدری نیز کارآیی داشته است (کامی[5]، ۲۰۰۹). این گیاهان به طور معمول غنی از انواع پروسیانیدین‌ها، فلاونوئیدها و تری‌ترپن‌ها هستند که ترکیبات اصلی موثره در فعالیت‌های بیولوژیکی آنها محسوب می‌شوند (گارسیا ماتئوس و همکاران[6]، ۲۰۱۳).

تنوع ژنتیکی بیانگر گوناگونی قابل وراثت در بین و درون افراد موجودات زنده است و در واقع به صورت تظاهر متفاوت صفتی در جمعیت حاصل از چند ژنوتیپ تعریف می‌شود. تنوع ژنتیکی رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی است و انجام انتخاب منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب در صفت مورد بررسی می‌باشد. مطالعه تنوع ژنتیکی فرآیندی است که شباهت یا تفاوت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری خاص بر اساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند. بنابراین آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به عنوان اجزاء مهم پروژه‌های اصلاح گیاهان تلقی می‌شوند (گویندراج و همکاران[7]، ۲۰۱۵). داده‌های مولکولی مخصوصاً توالی DNA برای بازسازی روابط خویشاوندی تکاملی نسبت به سایر روش‌های دیگر از صحت بیشتری برخوردار است به همین دلیل امروزه به‌ویژه از زمان پیدایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز این روش با استقبال محققین مواجه شده است. در گیاهان سه نوع اصلی از توالی‌های DNA در دسترس هستند. این توالی‌ها شامل توالی‌های هسته‌ای (nDNA)، توالی‌های کلروپلاستی (cpDNA) و توالی‌های میتوکندریایی می‌باشد. توالی‌های میتوکندریایی به علت سرعت تکاملی پایین، کمتر در بررسی روابط خویشاوندی گیاهان مورد بررسی قرار می‌گیرند. اما توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی در ابعاد وسیعی بدین منظور مورد استفاده قرار گرفته‌اند (امیراحمدی، ۱۳۸۹؛ کاربونل[8] و همکاران، ۲۰۱۵؛ جیووانا[9] و همکاران، ۲۰۱۷). ناحیه فاصله گذار رونویسی شونده درونی یا ITS[10]، بخشی از DNA ریبوزومی هسته می‌باشد. در این ناحیه، نواحی کدگذار بسیار حفاظت شده (18S nrDNA, 5.8S nrDNA, 26S nr DNA) به همراه

1. Alirezalu
2. Chang
3. Chang
4. Zugic
5. Kami
6. García-Mateos
7. Govindaraj
8. Carbonell
9. Giovanna
10. Internal Transcribed Spacer

نواحی غیر کدگذار (ITS, ETS) قرار دارند. نواحی ITS1 و ITS2 در بالغ شدن و پردازش ریبوزوم نقش مهمی را ایفا می‌کنند (ناحیه ITS ترجمه نمی‌شود به همین دلیل کمتر تحت فشار عملکردی می‌باشد و سرعت بالای تکاملی آن، این ناحیه را برای بررسی روابط فیلوژنتیکی مناسب کرده است (آلوارز و وندل[1]، ۲۰۰۳). در دهه‌های اخیر از داده‌های توالی ITS به عنوان ابزاری برای تعیین روابط فیلوژنتیکی در سطوح پایین تاکسونومی و مخصوصاً سرده‌های نزدیک استفاده شده است (جیووانا و همکاران، ۲۰۱۷).

امروزه محققین اصلاح گیاهان بر اهمیت استفاده از ژرم پلاسم توده‌های وحشی به خاطر داشتن خصوصیاتی مانند مقاومت به شرایط نامناسب محیطی، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و داشتن مواد مؤثره بالا تأکید می‌کنند. بنابراین برای انجام هرگونه برنامه بهنژادی در مورد گیاهان، شناخت کافی از ژرم پلاسم، استفاده از روش‌های مناسب و نوین اصلاحی و همچنین وجود تنوع ژنتیکی بالا جهت تولید ارقام مناسب و با کیفیت ضروری است. گیاه زالزالک در سراسر ایران شامل شمال، شمال‌غرب، غرب، جنوب‌غرب، مرکز و شرق کشور پراکنش دارد و ایران یکی از مهم‌ترین مناطق پراکنش این گیاه به‌حساب می‌آید (خاتم ساز، ۱۳۷۱). با توجه به اینکه اولین قدم برای شروع برنامه‌های اصلاحی یک گیاه، شناخت کافی از تنوع ژنتیکی توده‌های مختلف آن می باشد، در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی زالزالک های ایران بر اساس توالی ITS هسته ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در پژوهش حاضر ۵۶ نمونه برگی زالزالک از ۱۱ استان کشور از مناطق مورد مطالعه جمع‌آوری شد (شکل ۱، جدول ۱). نمونه‌ها از برگ‌های کاملاً جوان انتخاب و در ازت مایع فریز شدند و نهایتاً به فریزر ۸۰°C- تا زمان استخراج DNA منتقل شدند. قبل از استخراج DNA نمونه‌ها با فریز درایر خشک شده و برای استخراج DNA به دانشگاه فدریکو دوم ناپولی ایتالیا منتقل شدند.

ارزیابی‌های ژنتیکی رساله در گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه فدریکو دوم ناپولی انجام شد.

استخراج DNA

DNA ژنومی به روش CTAB از نمونه‌های برگی استخراج گردید. ترکیب اصلی در این روش یک شوینده به نام CTAB (N,N,N, Cethyltrimethylammonium bromide) می‌باشد، که علاوه بر خاصیت شویندگی، با دارا بودن بارهای مثبت می‌تواند اطراف مولکول‌های DNA را که بار منفی دارد بپوشاند که این عمل DNA را تا حد زیادی از سایر ترکیبات جدا می‌کند.

اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

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

آغازگرهای مورد استفاده و شرایط بهینه انجام واکنش PCR

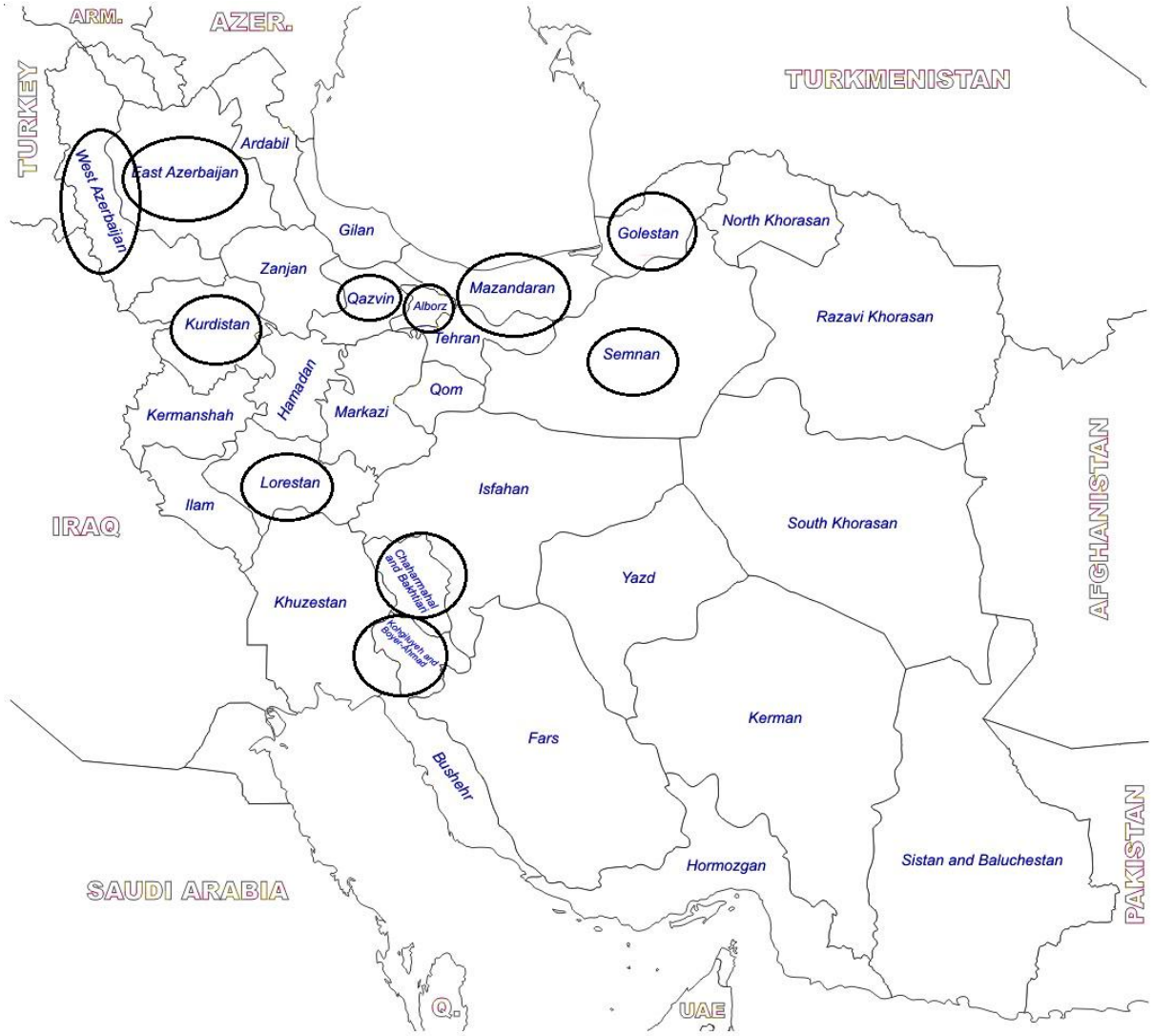
به منظور انجام واکنش PCR برای توالی های هسته ای nrDNA ITS از آغازگرهای JK14 و JK11 استفاده شد (آستو[2] و همکاران، ۱۹۹۹). توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول۲ آمده است.

حجم نهایی هر واکنش ۵۰µl بود. ترکیب مواد استفاده شده در PCR در جدول ۳ آورده شده است.

برنامه چرخه دمایی واکنش PCR استفاده شده بصورت زیر بود: ابتدا واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه انجام و سپس در ادامه ۳۵ چرخه PCR به ترتیب، واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه توسط ترموسایکلر انجام گرفت. مدت

1. Alvarez and wendel

2. Aceto



شکل ۱- مناطق جمع‌آوری گونه‌های مختلف زالزالک

زمان لازم برای بسط نهایی نیز ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

الکتروفورز فرآورده های PCR

برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده شد. بعد از اضافه نمودن ۲µl از بافر بارگذاری (Dye) به داخل هر یک از تیوب‌های حاوی محصولات PCR، مقدار ۴۰ µl از محصول PCR در داخل هر چاهک تزریق گردید. الکتروفورز به مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت انجام گرفت. سپس از ژل حاصله توسط نور UV با استفاده از دستگاه Gel documentation (Gel Logic 212 PRO, USA) عکس‌برداری صورت گرفت.

بعد از مشاهده ژل محصول PCR، برش باندهای حاوی DNA، خالص‌سازی از ژل و اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA انجام گرفت (آستو و همکاران، ۱۹۹۹).

انجام PCR توالی‌یابی

در این مرحله از پژوهش PCR مخصوص توالی‌یابی انجام گرفت. بدین صورت که ۲/۵ میکرولیتر DNA با ۰/۵ میکرولیتر پرایمر و ۲ میکرولیتر میکس مخلوط و PCR انجام گرفت. برنامه چرخه دمایی واکنش PCR استفاده شده بصورت زیر بود: ابتدا واسرشته سازی اولیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس در ادامه ۲۵ چرخه PCR به ترتیب، واسرشته‌سازی در ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۰

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مختلف ولیک

کد	منطقه	ارتفاع (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	کد	منطقه	ارتفاع (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی
G1	سمنان/پرور	۱۵۴۰	۳۶° ۰۲ ۹۷	۵۳° ۲۸ ۰۳	G29	آذر شرقی/شانجان	۱۶۹۴	۳۸° ۱۴ ۰۸	۴۵° ۴۲ ۸۶
G2	گلستان/محمدآباد	۴۰۹	۳۶° ۵۰ ۲۱	۵۴° ۴۷ ۱۴	G30	آذر شرقی/شانجان	۱۶۹۰	۳۸° ۱۴ ۰۱	۴۵° ۴۲ ۹۲
G3	گلستان/محمدآباد	۴۱۳	۳۶° ۵۰ ۲۵	۵۴° ۴۷ ۱۴	G31	آذر شرقی/شبستر	۱۴۲۷	۳۸° ۱۰ ۲۱	۴۵° ۴۲ ۴۸
G4	مازندران/کدیر	۱۰۸۱	۳۶° ۲۵ ۹۹	۵۱° ۵۲ ۷۰	G32	آذر شرقی/شبستر	۱۴۲۶	۳۸° ۱۰ ۳۰	۴۵° ۴۲ ۴۸
G5	مازندران/کجور	۱۱۹۲	۳۶° ۲۶ ۰۲	۵۱° ۵۱ ۷۲	G33	آذر شرقی/کلیبر	۱۲۶۵	۳۸° ۴۹ ۶۲	۴۷° ۰۳ ۳۲
G6	مازندران/کجور	۱۵۴۱	۳۶° ۲۶ ۴۹	۵۱° ۵۱ ۳۲	G34	آذر شرقی/کلیبر	۱۲۸۱	۳۸° ۴۹ ۵۹	۴۷° ۰۳ ۲۸
G7	مازندران/پول	۹۸۱	۳۶° ۲۵ ۶۴	۵۱° ۲۸ ۷۰	G35	آذر شرقی/کلیبر	۱۲۷۷	۳۸° ۴۹ ۶۱	۴۷° ۰۳ ۲۷
G8	مازندران/ لرگان	۱۳۲۰	۳۶° ۲۴ ۲۶	۵۱° ۳۳ ۴۳	G36	آذر شرقی/کلیبر	۱۱۹۶	۳۸° ۵۰ ۷۵	۴۷° ۰۲ ۸۷
G9	مازندران/ لرگان	۱۳۷۱	۳۶° ۲۳ ۹۲	۵۱° ۳۲ ۷۵	G37	آذر شرقی/اهر	۱۵۲۵	۳۸° ۲۳ ۶۹	۴۷° ۱۴ ۲۱
G10	مازندران/ لرگان	۱۳۸۹	۳۶° ۲۳ ۴۵	۵۱° ۳۲ ۵۳	G38	آذر شرقی/اهر	۱۴۹۰	۳۸° ۲۳ ۶۱	۴۷° ۱۴ ۲۸
G11	مازندران/ لرگان	۱۳۸۸	۳۶° ۲۳ ۴۷	۵۱° ۳۲ ۵۴	G39	آذر شرقی/اهر	۱۴۹۰	۳۸° ۲۳ ۶۲	۴۷° ۱۴ ۲۸
G12	مازندران/ لرگان	۱۳۸۹	۳۶° ۲۳ ۴۸	۵۱° ۳۲ ۵۵	G40	آذر شرقی/اهر	۱۵۲۴	۳۶° ۵۰ ۲۱	۵۴° ۴۷ ۱۴
G13	مازندران/ لرگان	۱۳۹۴	۳۶° ۲۳ ۵۰	۵۱° ۳۲ ۶۰	G41	کردستان/سنندج	۱۶۰۳	۳۵° ۲۳ ۸۸	۴۶° ۵۵ ۷۵
G14	مازندران/لرگان	۱۳۹۵	۳۶° ۲۳ ۵۱	۵۱° ۳۲ ۶۲	G42	کردستان/سنندج	۱۶۳۲	۳۵° ۲۳ ۸۰	۴۶° ۵۵ ۷۷
G15	مازندران/کندلوس	۱۱۲۳	۳۶° ۲۵ ۶۶	۵۱° ۳۱ ۸۶	G43	کردستان/سنندج	۱۶۳۴	۳۵° ۲۳ ۸۰	۴۶° ۵۵ ۷۷
G16	مازندران/دشت نظیر	۱۳۷۱	۳۶° ۲۳ ۹۴	۵۱° ۳۱ ۵۹	G44	کردستان/سنندج	۱۶۳۳	۳۵° ۲۳ ۸۹	۴۶° ۵۵ ۷۱
G17	کهگلویه/میمند	۱۶۰۷	۳۱° ۲۰ ۱۰	۵۱° ۱۳ ۸۶	G45	کردستان/سنندج	۱۶۳۷	۳۵° ۲۳ ۸۸	۴۶° ۵۵ ۷۰
G18	بختیاری/گردبیشه	۱۹۱۳	۳۱° ۳۳ ۰۷	۵۱° ۱۲ ۰۹	G46	کردستان/سنندج	۱۶۴۴	۳۵° ۲۳ ۹۵	۴۶° ۵۵ ۶۷
G19	بختیاری/لردگان	۱۸۹۰	۳۱° ۲۶ ۲۸	۵۰° ۵۸ ۰۹	G47	کردستان/سنندج	۱۶۴۹	۳۵° ۲۴ ۰۰	۴۶° ۵۵ ۵۷
G20	بختیاری/فلارد	۱۹۳۵	۳۱° ۲۲ ۳۳	۵۱° ۱۳ ۲۷	G48	کردستان/سقز	۱۵۰۶	۳۶° ۰۶ ۷۷	۴۶° ۲۰ ۹۲
G21	بختیاری/شهریار	۱۸۵۳	۳۱° ۲۰ ۱۰	۵۱° ۱۳ ۸۶	G49	کردستان/سقز	۱۵۰۶	۳۶° ۰۶ ۷۷	۴۶° ۲۰ ۹۲
G22	قزوین/الموت	۱۳۳۰	۳۶° ۲۴ ۰۳	۵۰° ۳۳ ۳۷	G50	آذر غربی/مهاباد	۱۷۲۸	۳۶° ۴۲ ۵۱	۴۵° ۵۶ ۳۵
G23	البرز/زی دشت	۱۸۱۴	۳۶° ۱۰ ۱۲	۵۰° ۴۱ ۶۷	G51	آذر غربی/بند اورمیه	۱۴۸۸	۳۷° ۲۷ ۸۶	۴۴° ۵۶ ۵۰
G24	البرز/طالقان	۱۸۵۰	۳۶° ۰۹ ۹۰	۵۰° ۴۲ ۰۹	G52	آذر غربی/بند اورمیه	۱۴۸۸	۳۷° ۲۷ ۸۷	۴۴° ۵۶ ۵۸
G25	البرز/طالقان	۱۸۴۶	۳۶° ۰۹ ۸۸	۵۰° ۴۲ ۰۷	G53	آذر غربی/دره شهدا	۱۴۳۲	۳۷° ۱۸ ۳۶	۴۵° ۰۷ ۰۰
G26	البرز/طالقان	۱۹۶۴	۳۶° ۱۰ ۹۸	۵۰° ۴۷ ۷۰	G54	آذر غربی/بند اورمیه	۱۴۴۰	۳۷° ۲۹ ۱۸	۴۴° ۵۸ ۶۵
G27	البرز/طالقان	۱۹۸۰	۳۶° ۱۱ ۰۶	۵۰° ۵۴ ۰۶	G55	لرستان/بروجرد	۱۶۴۰	۳۳° ۵۶ ۲۲	۴۸° ۴۰ ۵۹
G28	آذر شرقی/شبستر	۱۴۳۹	۳۸° ۱۰ ۶۴	۴۵° ۴۲ ۳۸	G56	لرستان بروجرد	۱۶۴۳	۳۳° ۵۵ ۲۱	۴۸° ۴۱ ۵۶

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای PCR

نام قطعه	توالی
JK14-F	GGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG
JK11-R	GCTATGAACCACACTTAACGTCTTA

جدول ۳- اجزاء واکنش PCR

اجزاء واکنش PCR	غلظت	برای یک نمونه
بافر واکنش PCR	۱۰ X	۵ µl
آغازگر پیش رو	۱۰ µM	۲ µl
آغازگر معکوس	۱۰ µM	۲ µl
دزوکسی نوکلئوتیدها	۲/۵ mM	۴ µl
DNA پلیمراز Taq	۵ U	۰/۵ µl
آب دوبار تقطیر	-	X µl
DNA	۲۵ ng	X µl

درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و طویل سازی در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه توسط ترموسایکلر انجام گرفت.

پس از اینکه PCR به اتمام رسید، ۵ میکرولیتر از محصول PCR در داخل تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری با ۵۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد، ۲ میکرولیتر سدیم استات ۳ مولار و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm در اتاق سرما (Cold room)، فاز مایع دور ریخته شد. ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به نمونه اضافه شده و سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm در اتاق سرما انجام گرفت (این مرحله دوبار تکرار شد). در این مرحله اتانول را دور ریخته و نمونه‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در داخل دستگاه Concentrator (دمای دستگاه روی ۴۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد) قرار داده شد تا هیچ اتانولی در نمونه باقی نماند. ۱۵ میکرولیتر فرمالدئید به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. نمونه‌ها در داخل تیوب‌های مخصوصی ریخته شده و در دستگاه توالی یاب (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) قرار داده شدند. در این مرحله عمل توالی‌یابی رشته‌های DNA انجام گرفت (آستو و همکاران، ۱۹۹۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از توالی‌یابی نمونه‌های DNA، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار کروماس در قالب فستا ذخیره شده و توسط نرم افزار BioEdit هم ردیف سازی گردیدند. ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده برای هر قطعه DNA مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند (تامورا[1] و همکاران، ۲۰۱۳). توالی گونه *C. rhipidophylla* که اطلاعات آنها از پایگاه اینترنتی NCBI (با کد EU500460) گرفته شد به عنوان نمونه خارج گروهی در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. بررسی رابطه فیلوژنتیک ژنوتیپ‌ها بر اساس روش «حداکثر احتمال، مدل تامورا- نی[2]» صورت پذیرفت (۱۹۹۳). آزمون «بوت استرپ[3]» بر اساس ۱۰۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد (فلسنستین[4]، ۱۹۸۵).

نتایج و بحث

توالی‌یابی برای هر دو جهت پیش‌رو[5] و پس‌رو[6] صورت پذیرفت و نتایج آن‌ها به‌خوبی یکدیگر را تایید نمود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مورد نواحی ITS1 برای همه نمونه‌ها به‌دست آمد. در مورد هر دو دسته آغازگر، محصولات PCR با اندازه‌های یکسان بدست آمد (به‌جز محصولات ژنوتیپ‌های G29 و G30؛ که اندازه بزرگتری نسبت به سایر ژنوتیپ ها از خود نشان دادند). میانگین تعداد G+C برای ناحیه ITS برابر ۵۱/۳ درصد بود. درصد توالی‌های کاملاً مشابه برای ناحیه ITS در حدود ۹۴٪ محاسبه شد.

بر اساس طبقه‌بندی کریستنسن[7] (۱۹۹۲) پنج بخش برای سرده *Crataegus* در سراسر دنیا در نظر گرفته شده است که شامل Sect. *Mexicanae* Loudon، Sect. *Crataegus* (= Sect. *Oxyacanthae* Loudon)، Sect. *Sanguineae* Schneider، Sect. *Cuneatae* Schneider و *C. hupehensis* Sarg و *C. shensiensis* Pojarkova می‌باشند. در ایران فقط گونه‌های مربوط به Sect. *Crataegus* موجود می‌باشد که از پنج سری (Ser. *Pentagynae*، Ser. *Erianthae*، Ser. *Orientalis*، Ser. *Microphyllae*، Ser. *Crataegus*) تشکیل شده‌اند. در پژوهش حاضر به جز Ser. *Microphyllae* بقیه مشاهده شدند. در شکل ۲ طبقه‌بندی گونه‌های مختلف سرده *Crataegus* spp. نشان داده شده است. در شاخه اول از دندروگرام حاصل از آنالیز داده‌ها، سری Ser. *Orientalis* قرار داشت. از خصوصیات مهم ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مربوط به Ser. *Orientalis* رنگ میوه است، که زرد یا نارنجی (قرمز کم‌رنگ) بوده و بخش خوراکی متمایل به زرد می‌باشد. ارزش خوراکی ژنوتیپ‌های این سری بیشتر از ارزش دارویی آنها می باشد. در شاخه دوم دندروگرام Ser. *Pentagynae* و Ser. *Erianthae* قرار گرفته‌اند. رنگ میوه‌های مربوط به Ser. *Pentagynae* سیاه بوده و از

1. Tamura
2. Tamura-Nei
3. Bootstrap
4. Felsenstein
5. Forward
6. Reverse
7. Christensen

لحاظ اندازه میوه بسیار کوچک می‌باشند. در این سری بذر، بخش اعظم میوه را فراگرفته است. میوه‌های سری Ser. *Erianthae* سیاه متمایل به ارغوانی بوده و از نظر اندازه بزرگتر از Ser. *Pentagynae* می‌باشند. شاخه‌های سوم و چهارم مربوط به Ser. *Crataegus* بود که از نظر جمعیت پراکندگی بیشتری نسبت به سری‌های دیگر در ایران دارند. رنگ میوه‌های این سری سرخ و سرخ تیره و اندازه میوه در این سری متوسط می‌باشد. همان‌طور که در نتایج نشان داده شد توالی یابی ناحیه ITS به‌خوبی توانست، ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف سرده *Crataegus* spp. را از هم جدا نماید که از لحاظ اصلاحی بسیار ارزشمند می‌باشد.

به دلیل تکرارپذیری بالای نتایج، مطالعات مبتنی بر توالی یابی نواحی مختلف DNA، از مهم‌ترین روش‌های موجود جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی در موجودات زنده به‌شمار می‌آیند (تورس ماکارو[1] و همکاران، ۲۰۱۰). ناحیه فاصله انداز رونویسی‌شونده داخلی[2] از DNA ریبوزومی هسته‌ای[3] (رامایا و همکاران[4]، ۲۰۱۴) تاکنون به طور موفقیّت‌آمیزی برای بررسی روابط فیلوژنتیک موجود در بسیاری از گیاهان گل‌دار مورد استفاده قرار گرفته‌اند (فان[5] و همکاران، ۲۰۱۴). در این تحقیق ۵۶ ژنوتیپ مختلف از گونه‌های مختلف سرده ولیک با استفاده از این ناحیه ژنومی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه توانایی مناسب این ناحیه را به‌منظور ارزیابی فیلوژنتیک گونه‌های مختلف سرده ولیک نشان داد.

ارزیابی گوناگونی ژنتیکی در بین گونه‌های گیاه ولیک که از مناطق گسترده اقلیمی ایران جمع‌آوری شدند اطلاعات ارزشمندی را در زمینه سیر تکاملی آن‌ها به‌دست می‌دهد و از نظر اتخاذ استراتژی‌های مناسب در راستای شناسایی و حفاظت از این سرمایه ملّی و نیز استفاده از مزیّت‌های گوناگونی گیاهی در قالب فرآیندهای بِه‌نژادی (اصلاحی) از اهمیّت به‌سزایی برخوردار است. امروزه همه محققان اعتقاد دارند که اختصاصات عمومی مرتبط با رشد و نمو، تولید متابولیت‌های اوّلیه و ثانویه در گیاهان و بسیاری دیگر از ویژگی‌های مرتبط، همگی تابعی از عامل ژنتیکی و برهم‌کنش آن با شرایط محیطی می‌باشند (امیدبیگی، ۱۳۸۴). از نقطه‌نظر گوناگونی ژنتیکی، دگرگشنی یکی از عوامل مهم و شناخته شده ایجاد گوناگونی در گیاهان به شمار می‌آید (لوید[6]، ۱۹۹۲). بنابراین با لحاظ طیف گسترده ژنتیکی مورد استفاده در این تحقیق، وجود گوناگونی ژنتیکی گسترده در بین این گیاهان امری بدیهی به نظر می‌رسد. از سوی دیگر با توجّه به جمع‌آوری نمونه-های گیاهی از اقلیم‌های گوناگون موجود در کشور از گرم و خشک تا سرد و مرطوب و برهم‌کنش‌های طبیعی و محیطی موجود با ساختار ژنتیکی گیاهی، بیش از پیش وجود این سطح از گوناگونی را توجیه‌پذیر می‌سازد. به دلیل وجود تفاوت های ژنتیکی فراوان، ایجاد دو رگ گیری به مقدار زیاد در بین گونه های مجاور، دو رگ گیری درهم، سیستم تولید مثلی آپومیکسی و پلی پلوییدی متوالی در این سرده رسیدن به یک طبقه بندی ثابت بین محقیقن مشکل به نظر می رسد. نتایج بدست آمده توسط سایر پژوهش‌ها نیز این موضوع را تایید می‌کند (جیوانا و همکاران، ۲۰۱۷).

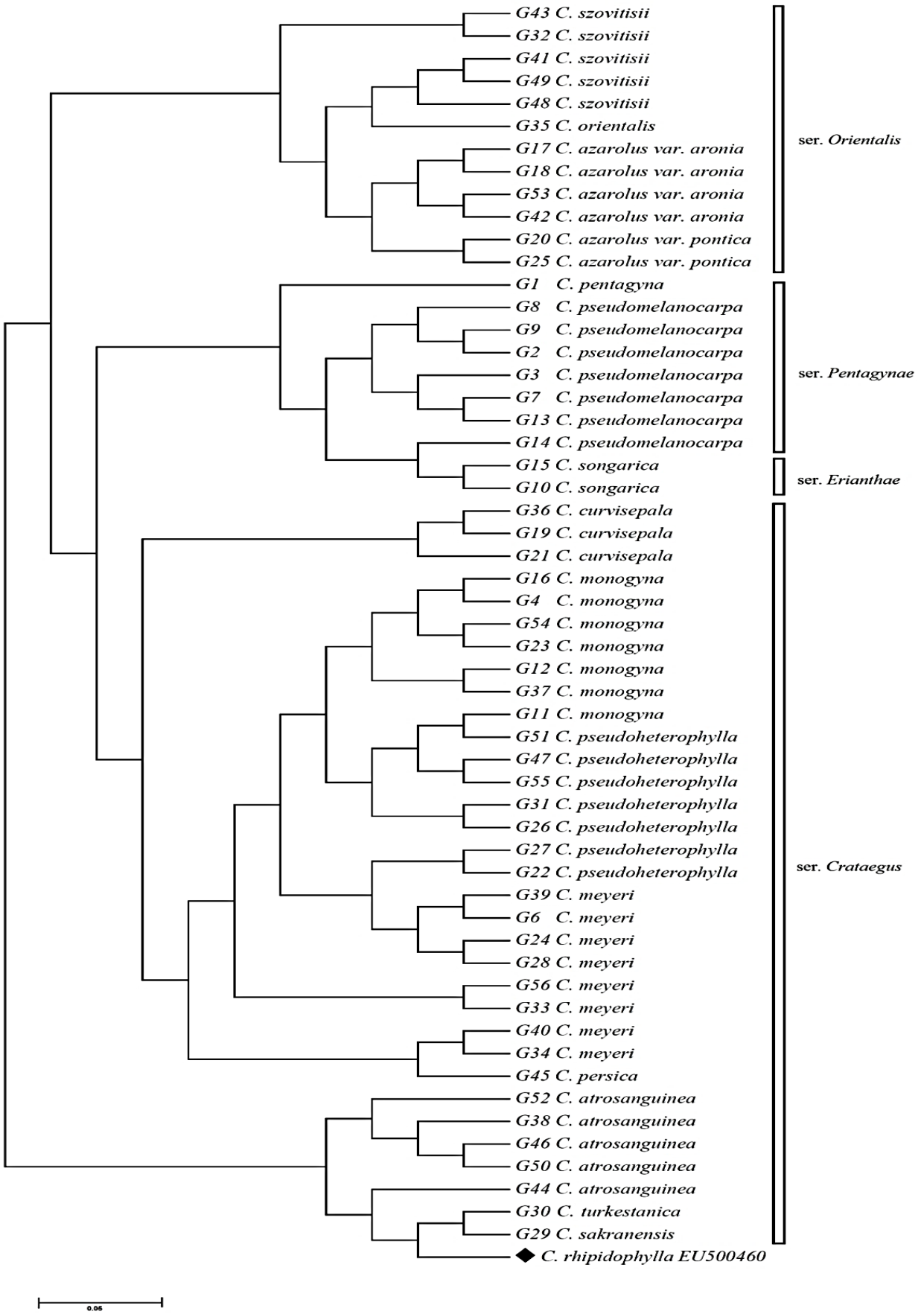
نتیجه گیری کلی

دورگه‌گیری به‌عنوان یکی از روش‌های مرسوم و متداول به منظور تولید و عرضه ارقام جدید به شمار می‌آید. بنابراین وجود اطلاعات فیلوژنتیکی موجود در میان گونه‌های مختلف زالزالک می‌تواند به عنوان ابزار ارزشمندی در راستای مطالعات و برنامه‌های اصلاحی آینده به‌کار آید. گیاه ولیک در سراسر ایران شامل شمال، شمال‌غرب، غرب، جنوب‌غرب، مرکز و شرق کشور پراکنش دارد و ایران یکی از مهم‌ترین مناطق پراکنش این گیاه به‌حساب می‌آید، نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که زالزالک‌های ایران از تنوع وسیعی برخوردار هستند و این بررسی می تواند آغازی بر اهلی سازی این گیاه ارزشمند در کشور باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله تشکر و قدردانی خود را از مسئولین گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه فدریکو دوم ناپولی ایتالیا ابراز می‌دارند.

1. Torres-Machorro
2. Internal Transcribed Spacer: ITS
3. nrDNA
4. Ramaiya
5. Fan
6. Lloyd



شکل ۲- طبقه‌بندی گونه‌های مختلف سرده *Crataegus* spp. جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران.

منابع

امیدبیگی، ر. ۱۳۸۴. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. چاپ اول. جلد اول. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد، ۳۴۷ ص.

امیراحمدی، ع. ۱۳۸۹. فیلوژنی مولکولی قبیله *Hedysareae* با تأکید بر سرده *Onobrychis* بر اساس توالی‌های ITS هسته‌ای و *trn*L-F کلروپلاستی، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس.

خاتم‌ساز، م. ۱۳۷۱. فلور ایران. شماره ۶: تیره گل سرخ. موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ۳۵۲ ص.

Aceto, S., Caputo, S., Cozzolino, S., Gaudio, L. and Moretti, A. 1999. Phylogeny andevolution of orchis and allied genera based on ITS DNA variation:morphological gaps and molecu-lar continuity. Molecular Phylogenetics and Evolution, 13: 67–76.

Alirezalu, A., Salehi, P., Ahmadi, N., Sonboli, A., Aceto, S., Hatami Maleki, H. and Ayyari, M. 2018. Flavonoids profile and antioxidant activity in flowers and leaves of hawthorn species (*Crataegus* spp.) from different regions of Iran. Int. International Journal of Food Properties, 21: 452–470.

Alvarez, I. and Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29: 417–434.

Chang, C.L., Chen, H.S., Shen, Y.C., Lai, G.H., Lin, P.K. and Wang, C.M. 2013. Phytochemical composition, antioxidant activity and neuroprotective effect of *Crataegus pinnatifida* fruit. South African Journal of Botany, 88: 432–437.

Christensen, K. 1992. Systematic botany monographs (Revision of Crataegus and Nothosect). Crataeguineae (Rosaceae-Maloideae) in the old world, vol: 35 THE. American society of plant taxonomists.

Fan, X., Liu, J., Sha, L.N., Sun, G.L., Hu, Z.Q., Zeng, J., Kang, H.Y., Zhang, H.Q., Wang, Y. and Wang, X.L. 2014. Evolutionary pattern of rDNA following polyploidy in *Leymus* (Triticeae: Poaceae) Molecular Phylogenetics and Evolution, 77: 296–306.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.

García-Mateos, R., Ibarra-Estrada, E. and Nieto-Angel, R. 2013. Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad, 84: 1298–1304.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M. and Srinivasan, M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of Its analytical perspectives. Genetics Research International, from https://www.hindawi.com/journals/gri/2015/431487/.

Kami, D., Shi, L., Sato, T., Suzuki, T. and Oosawa, K. 2009. Cryopreservation of shoot apices of hawthorn in vitro cultures originating from East Asia. Scientia Horticulturae, 120: 84-88.

Lloyd, D.A. 1992. Pass/fail grading fails to meet the grade. Academic Medicine, 67:583–4.

Ramaiya, S.D., Bujang, J.S. and Zakaria, M.H. 2014. Genetic diversity in *Passiflora* species assessed by morphological and ITS sequences analysis. The Scientific World Journal, from https://www.hidawi.com/journals/tswj/2014/598313/abs/.

Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation ofthe number of nucleotide substi-tutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans andchimpanzees. Molecular Phylogenetics and Evolution, 10: 512–526.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725–2729.

Torres-Machorro, A.L., Hernandez, R., Cevallos, A.M. and Lopez-Villasenor, I. 2010. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny. FEMS Microbiology Reviews, 34: 59– 86.

Yao, M., Ritchie, H.E. and Brown-Woodman, P. D. 2008. A reproductive screening test of hawthorn. Journal of Ethnopharmacology, 118: 127–132.

Zugic, A., Dordevic, S., Arsic, I., Markovic, G., Zivkovic, J., Jovanovic, S. and Tadic ,V. 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. Industrial Crops and Products, 52: 519–527.