DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2016.109411

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۴، شماره ۲، صفحه ۲۲۰-۲۰۸ (۱۳۹۵)

زیرگونه جدیدی از سنجد تلخ (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A.Nelson) برای ایران بر اساس داده‌های مولکولی

حمید آهنی*[۱]، حمید جلیلوند[۲]، جمیل واعظی[۳] و سیّد احسان ساداتی[۴]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، اداره کل منابع طبیعی، استان خراسان رضوی، مشهد، پست الکترونیک: ahani1977@gmail.com

۲- استاد، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۹/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۱۴

چکیده

سنجد تلخ (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A.Nelson) گیاهی دارویی، مقاوم به خشکی، تثبیت‌کننده ازت و یک گونه پیش‌آهنگ جنگلی است. در این پژوهش برای اولین بار در ایران، شناسایی مولکولی سنجد تلخ در رویشگاه‌های مختلف کشور و مقایسه آنها با زیرگونه‌های شناخته شده در سایر نقاط جهان انجام شد. از پنج رویشگاه در استان‌های البرز، مازندران، آذربایجان‌شرقی و غربی و قزوین نمونه‌برداری انجام گردید. از نشانگر هسته‌ای ITS ریبوزومی در مطالعه مولکولی استفاده شد. پس از استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توالی‌های به‌دست آمده از این مطالعه به‌همراه توالی‌های بانک ژن مربوط به زیرگونه‌های سنجد تلخ در سایر نقاط دنیا، در یک ماتریس هم‌ردیف شده و مورد تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی Bayesian و شبکه TCS قرار گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های البرز، مازندران، آذربایجان‌شرقی و قزوین متعلق به زیرگونه قفقازی *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* هستند، اما نمونه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان‌غربی با دو تفاوت نوکلئوتیدی به‌عنوان یک زیرگونه جدید و با نام *E. rhamnoides* subsp. *azerbaijanica* معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی، سنجد تلخ، شناسایی مولکولی، گیاه دارویی.

مقدمه

سنجد تلخ با نام انگلیسی Sea buckthorn و نام علمی پذیرفته شده *Elaeagnus rhamnoides* (L.) A.Nelson که در منابع با نام علمی *Hippophae rhamnoides* L. نیز معرفی شده (Nelson, 1935)، گیاهی دو پایه است. این گونه به‌دلیل تشابه نام فارسی آن با زیتون تلخ (*Melia azedarach* L.) حتی در مجلات معتبر علوم پزشکی اشتباه گرفته می‌شود (Sadeghi Pourroudsari *et al*., 2006; Dehghani & Ahmadi, 2011). سنجد تلخ، درخت یا درختچه‌ای است به ارتفاع تا ۵ متر، برگها خطی سرنیزه‌ای به‌طول ۸-۲ و عرض ۰/۸-۰/۲ سانتی‌متر و میوه شفت بدون کرک و معطر (Mozaffarian, 2004)، گل نر چهار تا شش بخشی (جداگلبرگ) است ولی گل ماده تک گلبرگ با یک مادگی است (Geetha & Asheesh, 2011). این گونه

در شرق آسیا، مرکز آسیا، آسیای صغیر، اروپا و در کشورهای چین، روسیه، مغولستان، پاکستان، رومانی، آلمان، فنلاند و ترکیه وجود دارد (شکل ۱) (Jia *et al.*, 2012). سنجد تلخ از تیره سنجد (Elaeagnaceae) و از گونه‌های بومی ایران با رویشگاه‌های محدود و پراکنده در گچسر، هراز، ارسباران، خوی و الموت می‌باشد (Javanshir, 1976; Ghareman, 1993, Sabeti, 1994; Mozaffarian, 2004). این گونه ایران-تورانی، پیش‌آهنگ مناسب برای کاشت در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Marvi Mohajer, 2006).

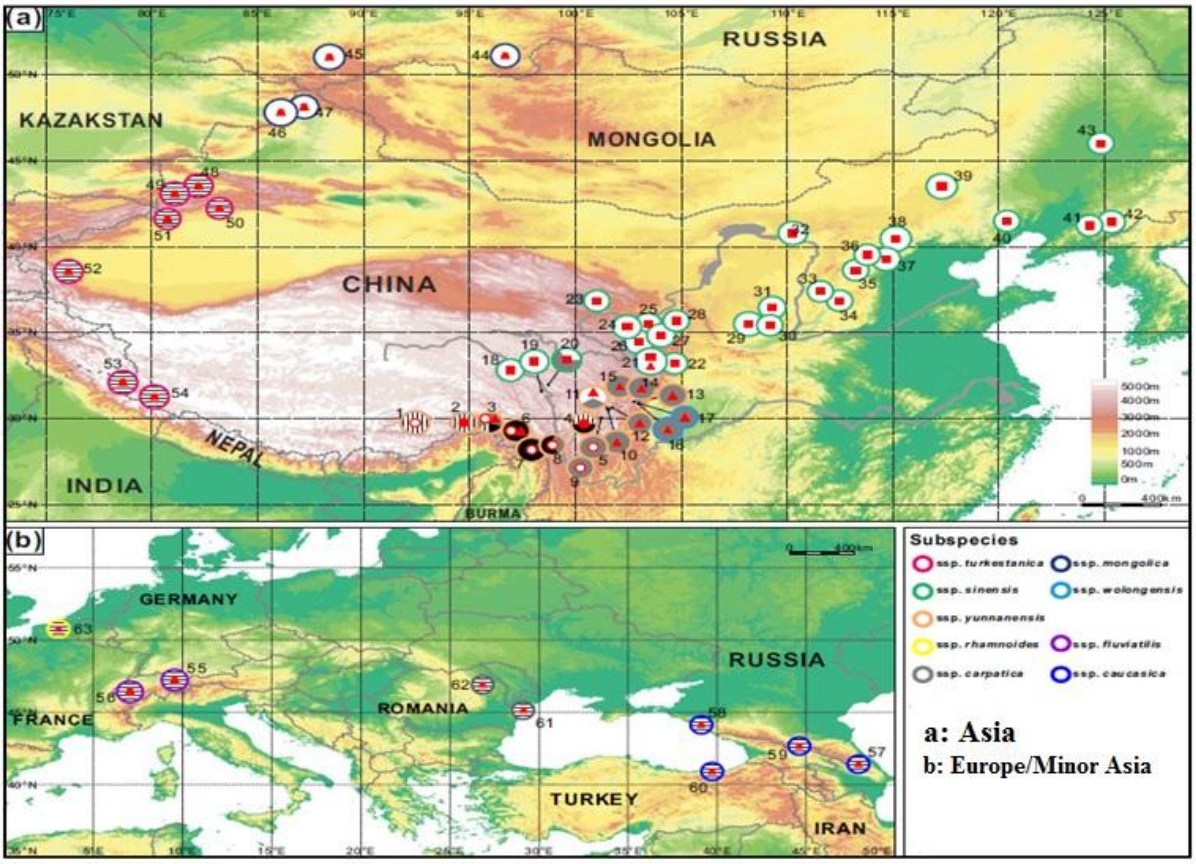
فلاونوئیدها از آنتی اکسیدان‌های طبیعی موجود در سنجد تلخ، از تجمع پلاکت‌های خون جلوگیری می‌کنند، گردش خون را بهبود می‌بخشد، التهاب را کاهش داده و از رشد و گسترش سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند (Bestwick *et al.*, 2007). سنجد تلخ برای بیماری‌های قلبی- عروقی، گوارشی و پوستی کاربرد دارد (Li *et al.*, 2012). مواد اتانولیک استخراج شده از ریشه و بذر سنجد تلخ نسبت به ساقه و برگ بیشتر است. این گونه با همزیستی اکتینومیست‌ها نیتروژن را تثبیت می‌کند. همچنین در صنایع آرایشی، شکلات‌سازی، نوشیدنی و مرباسازی به‌کار می‌رود (Michel *et al.*, 2012). به‌دلیل خصوصیات وراثتی، واریته-های مختلف این گونه نیز قابلیت اصلاح دارند (Shah *et al.*, 2009).

گونه *E. rhamnoides* گونه‌ای دیپلوئید (۲n = ۲۴) بوده (Ruan *et al.*, 2004) و دارای ۸ تا ۱۰ زیرگونه است (جدول ۱) (Tang, 2002; Li *et al.*, 2011).

زیرگونه‌های اسکاندیناوی (*E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides*) و روسی (*E. rhamnoides* subsp. *mongolica*) برای بررسی مقاومت به بیماریها، مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفتند که زیرگونه اسکاندیناوی مقاومت بیشتری به بیماریها نشان داد (Jeppsson *et al.*, 1999). در تحقیقی با استفاده از توالی جداکننده نسخه‌برداری شده درونی ITS (Internal Transcribed Spacer) از ژن ریبوزومی، روابط فیلوژنتیکی تمام زیرگونه‌های سنجد تلخ به‌جز زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که طول توالی‌های به‌دست آمده در زیرگونه‌های مختلف از ۶۵۱ تا ۶۶۶ جفت باز نوکلئوتیدی متغیر است (Sun *et al.*, 2002). در مطالعه دیگری، با استفاده از همین نشانگر، مطالعه فیلوژنی زیرگونه‌های سنجد تلخ در جلگه Qinghai تبت انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگر ITS به‌خوبی می‌تواند زیرگونه‌های سنجد تلخ را از یکدیگر متمایز کند (Jia *et al.*, 2012).

البته نه تنها دگرگشنی بالای درختان جنگلی شناسایی فنوتیپی آنها را با مشکل مواجه می‌کند (Mashaekhi *et al.*, 2010)، بلکه به‌طور کلی، تنوع ریخت‌شناسی در گیاهان، شناسایی گونه‌های نزدیک را با مشکل مواجه کرده است؛ از این‌رو برای تفکیک گونه‌ها، استفاده از نشانگرهای مولکولی توصیه می‌شود (Seyyed Tabatabaei *et al.*, 2007). علاوه بر این، صفات کمّی و فنوتیپی محدودند و به‌شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند (Fareghi *et al.*, 2007). از طرف دیگر، صفات ریخت‌شناسی با توجه به عوامل محیطی و هزینه و زمان زیاد، قابل اعتماد نیستند و در مطالعات مولکولی همبستگی کمی بین صفات ریخت‌شناسی گیاه و شاخص‌های مولکولی به‌چشم می‌خورد (Mohammadi Faresani *et al.*, 2008).

در این تحقیق برای اولین بار در کشور گونه پیشتاز، دارویی و تثبیت‌کننده ازت، سنجد تلخ، برای توسعه جنگل کاری‌های چند منظوره مورد مطالعه قرار گرفت. هدف این تحقیق، شناسایی رویشگاه‌های سنجد تلخ در کشور و معرفی زیرگونه و یا زیرگونه‌های ایرانی آن است. در این مطالعه برای تشخیص زیرگونه‌های احتمالی سنجد تلخ در کشور، از نشانگر هسته‌ای ITS ریبوزومی استفاده شد. همچنین، روابط فیلوژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه و نمونه‌های سایر کشورهای جهان مورد بررسی قرار گرفت. از طرف دیگر، تاکنون شناسایی مولکولی این گونه در ایران انجام نشده و از این نظر نیز این تحقیق برای اولین بار انجام می‌شود.



شکل ۱– نقشه پراکنش زیرگونه‌های مختلف سنجد تلخ در نقاط مختلف جهان (برگرفته از Jia *et al.*, 2012)

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

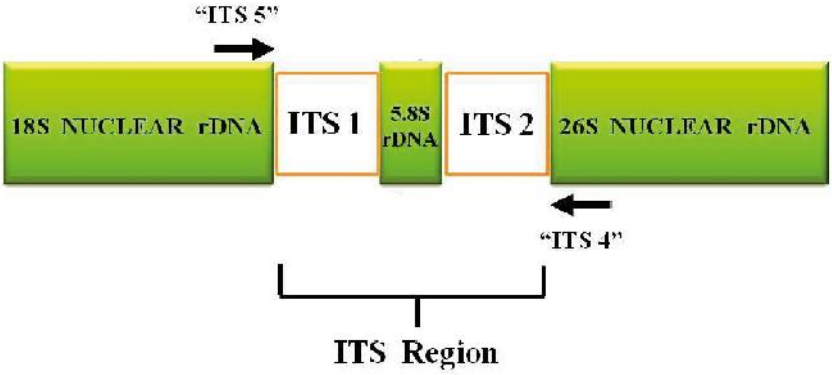
طی مسافرتهای متعدد و مراجعه به کتابهای مرجع گیاه‌شناسی (Javanshir, 1976; Murray, 1984; Ghahreman, 1993; Sabeti, 1994; Mozaffarian, 2004, 2012)، پنج رویشگاه مهم سنجد تلخ در ایران مورد شناسایی قرار گرفت (جدول ۱). این رویشگاه‌ها در مناطق جغرافیایی ایران– تورانی واقع شده‌اند. برای بررسی و مقایسه ریخت‌شناسی نمونه‌ها، از هر منطقه جغرافیایی، یک نمونه شامل یک شاخه برگدار و میوه‌دار جمع‌آوری گردید. برای مطالعه مولکولی، در هنگام جمع‌آوری، از هر نمونه، تعدادی برگ سالم، شاداب و جوان انتخاب شده و برای آبگیری سریع، بلافاصله در کیسه‌های حاوی سیلیکاژل قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شد.

جدول ۱– موقعیت جغرافیایی رویشگاه‌های مورد مطالعه

ردیف	نام استان	طول جغرافیایی (شرق)	عرض جغرافیایی (شمال)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	البرز	۵۱° ۱۰/۸۳۰'	۳۵° ۹۸/۷۱۳'	۱۸۵۹
۲	مازندران	۵۲° ۲۳/۵۵۶'	۳۶° ۲۰/۲۵۳'	۲۱۶۱
۳	آذربایجان‌شرقی	۴۶° ۴۸/۳۳۲'	۳۸° ۵۸/۹۷۴'	۱۷۷۶
۴	آذربایجان‌غربی	۴۴° ۵۶/۵۷۰'	۳۸° ۴۳/۶۶۹'	۱۸۹۰
۵	قزوین	۵۰° ۵۲/۶۸۱'	۳۶° ۴۶/۰۲۷'	۱۷۰۱

استخراج DNA، PCR و توالی‌یابی

DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) استخراج گردید. برای تعیین هویت تاکسونومیکی نمونه‌های جمع‌آوری شده و نیز بررسی روابط فیلوژنتیکی این نمونه‌ها با یکدیگر و مقایسه آنها با نمونه‌های سایر رویشگاه‌های دنیا، نشانگر هسته‌ای ITS ریبوزومی (شامل ITS1-5.8s-ITS2) مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲– نشانگر ITS و آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

در این مطالعه برای تکثیر ناحیه ITS، از آغازگرهای ITS4 و ITS5 (White *et al.*, 1990) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، در محلولی به‌حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۱/۸۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۵ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر از هریک از dNTPها، ۲ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، ۱۰۰ میکرومول بر لیتر از هریک از آغازگرها (رفت و برگشت) و تقریباً ۲۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی استخراج شده، انجام شد. این واکنش با یک واسرشتی DNA به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز شد. سپس ۳۵ چرخه تکثیر به‌ترتیب با یک واسرشتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به‌مدت ۵۵ ثانیه و دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد، مرحله طویل شدن به‌مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پس از پایان یافتن این ۳۵ چرخه، توالی‌ها دوباره به‌مدت پنج دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بسط داده شدند.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، پس از مشاهده بر روی ژل الکتروفورز و اطمینان از تکثیر، برای خالص‌سازی و تعیین توالی، به سفارش شرکت نوآوران زیستی پارسه در مشهد به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده از این مطالعه، با کمک نرم‌افزار Sequencher (Gene Code version 4.1, Inc., Arbor, Michigan Ann) ویرایش شدند. برای اطمینان از تکثیر صحیح نشانگر مورد مطالعه، تعیین هویت مولکولی نمونه‌های سنجد تلخ جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران و نیز دریافت توالی مربوط به سایر گونه‌ها و زیرگونه‌ها، توالی‌های دریافتی از شرکت ماکروژن با کمک گزینه BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) با توالی‌های موجود در بانک ژن (جدول ۲) مورد مقایسه قرار گرفتند. از توالی ITS ریبوزومی سه گونه *Elaeagnus angustifolia*، *E. umbellata* و *E. gyantsensis* به‌عنوان برون گروه در این مطالعه استفاده شد.

جدول ۲- فهرست آرایه‌های مورد استفاده در این مطالعه و کد توالی‌های بانک ژن مربوط به آنها

ردیف	نام تاکسون	کد بانک ژن
۱	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *rhamnoides*	AF440242
۲	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *turkestanica*	AF440243
۳	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *mongolica*	AF440244
۴	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *carpatica*	AF440245
۵	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *fluviatilis*	AF440248
۶	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *yunnanensis*	AF440250
۷	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *wolongensis*	AF440252
۸	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *sinensis*	JQ289285
۹	*Elaeagnus rhamnoides* subsp. *caucasica*	JQ663580
۱۰	*Elaeagnus gyantsensis*	JF976624
۱۱	*Elaeagnus angustifolia*	AF440256
۱۲	*Elaeagnus umbellata*	AF980300

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی

توالی‌های ویرایش شده با کمک نرم‌افزار BioEdit (Hall, 1999) هم‌ردیف شدند. هم‌ردیف‌سازی با روش ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) و بعد با ویرایش دستی انجام شد. تجزیه‌وتحلیل‌های فیلوژنتیکی با روش Bayesian انجام گردید. قبل از انجام این تجزیه‌وتحلیل-ها، مناسبترین مدل جانشینی نوکلئوتیدی برای توالی‌های هم‌ردیف شده به‌کمک نرم‌افزار MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004) انتخاب شد. برای استفاده از این نرم‌افزار، ابتدا فایل MrModelBlock (موجود در بسته MrModeltest) در نرم‌افزار PAUP* (Swofford, 2002) فعال شده و بعد خروجی نرم‌افزار اخیر در نرم‌افزار MrModeltest 2.2 مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی Bayesian با کمک نرم‌افزار MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) انجام شد. این تجزیه‌وتحلیل پس از یک میلیون نسل به ثبات رسید. این ثبات وقتی حاصل می‌شود که انحراف معیار به‌دست آمده از جستجوها به کمتر از ۰/۰۱ برسد.

با کمک نرم‌افزار Tracer (Rambaut & Drummond, 2007) درختان فیلوژنتیکی غیرقابل استفاده، تعیین شده و از مجموع درختان نهایی حذف شدند. در نهایت، یک درخت توافقی برای سایر درختان ترسیم شده و با نرم‌افزار TreeView 1.6.6 (Page, 2001) مشاهده گردید.

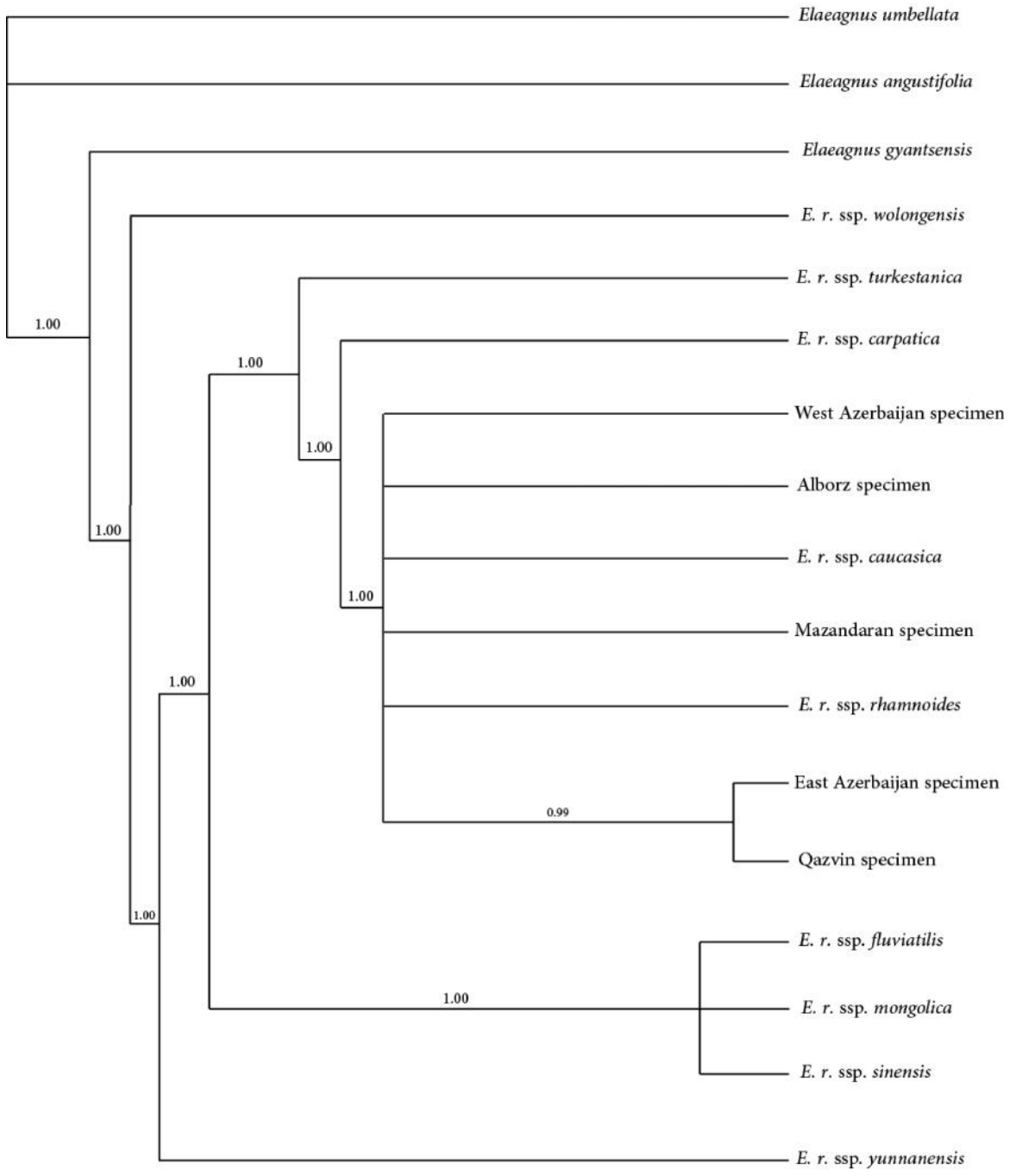
با توجه به تفاوت‌های نوکلئوتیدی کم در میان زیرگونه‌ها و نمونه‌های مورد مطالعه و نیز عدم تفکیک کامل برخی از آنها در درخت فیلوژنتیکی حاصل از تجزیه‌وتحلیل Bayesian، ماتریس توالی‌ها، مورد تجزیه‌وتحلیل شبکه فیلوژنتیکی قرار گرفت. در این تجزیه‌وتحلیل، در صورتی‌که بین دو توالی، حداقل یک تفاوت نوکلئوتیدی نیز وجود داشته باشد، قابل مشاهده خواهد بود. این تجزیه‌وتحلیل با نرم‌افزار TCS version 1.21 (Clement *et al.*, 2000) انجام شد.

نتایج

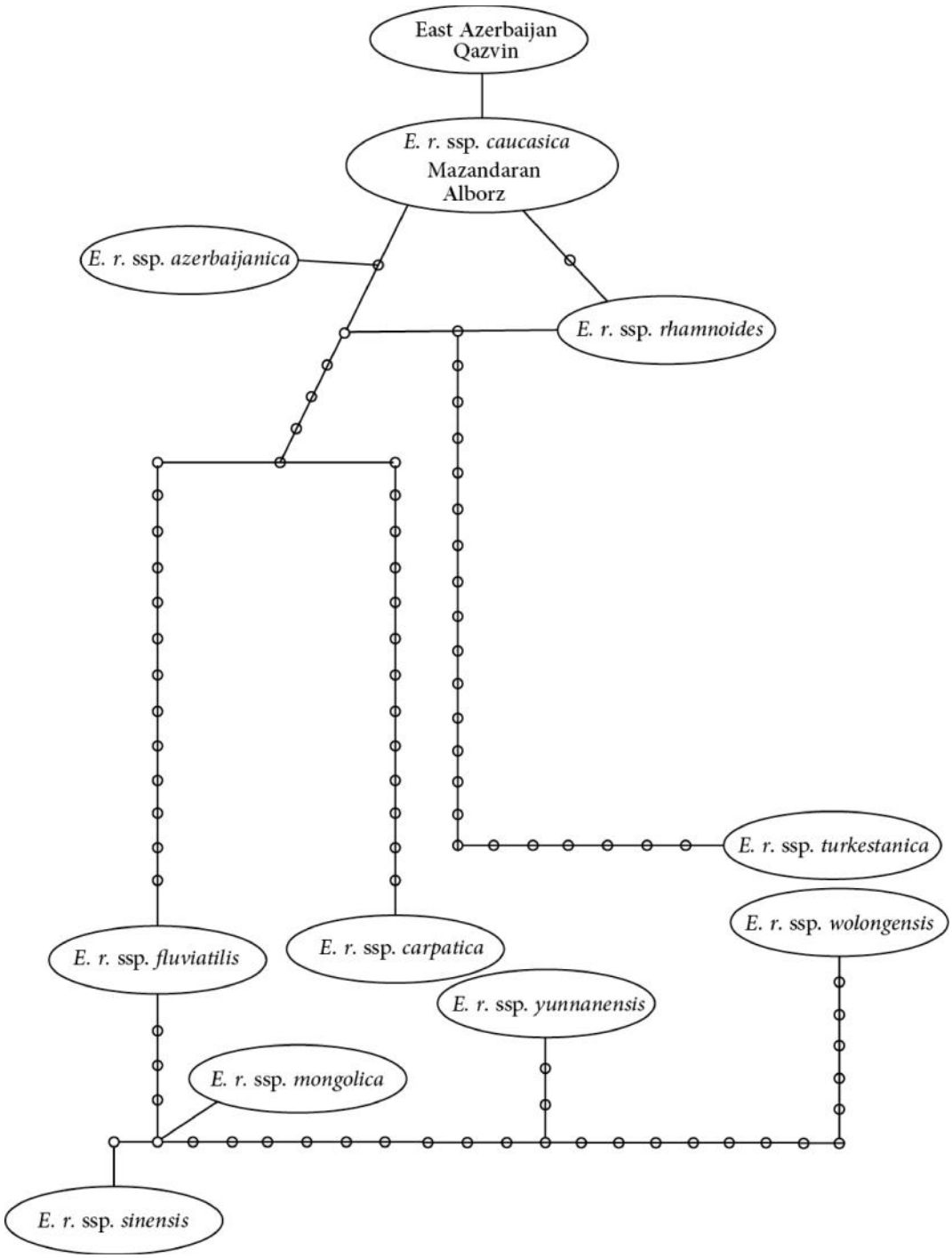
از هم‌ردیف کردن مجموع توالی‌ها، ماتریسی به‌طول ۶۶۵ نوکلئوتید به‌دست آمده و مورد تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی قرار گرفت. نتایج Bayesian حاصل از تجزیه‌وتحلیل توالی‌های ITS ریبوزومی حاصل از این مطالعه و توالی‌های دریافت شده از بانک ژن مربوط به زیرگونه‌های مختلف گونه *Elaeagnus rhamnoides* در شکل ۳ نشان داده شده است. در درخت توافقی حاصل از این تجزیه‌وتحلیل، از ۱۰ زیرگونه سنجد تلخ، زیرگونه‌های *E. rhamnoides* subsp. *wolongensis*، *E. rhamnoides* subsp. *turkestanica*، *E. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* و *E. rhamnoides* subsp. *carpatica* از سایر زیرگونه‌ها و نمونه‌های مورد مطالعه به‌خوبی تفکیک شده‌اند. زیرگونه‌های *E. rhamnoides* subsp. *fluviatilis*، *E. rhamnoides* subsp. *mongolica*، *E. rhamnoides* subsp. *caucasica*، *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides*، *E. rhamnoides* subsp. *sinensis* و پنج نمونه مورد مطالعه، شاخه‌های تفکیک نشده (polytomy) را ایجاد کردند.

دو نمونه جمع‌آوری شده از قزوین و آذربایجان‌شرقی با حمایت ۹۹٪ در یک گروه قرار گرفتند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از آذربایجان‌غربی، البرز و مازندران با دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* و *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides* شاخه‌های تفکیک نشده‌ای را ایجاد کردند. به‌دلیل عدم تفکیک مناسب نمونه‌های مورد مطالعه و نیز دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* و *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides* در درخت فیلوژنتیکی حاصل (شکل ۳)، توالی‌های مربوط به‌تمام زیرگونه‌های سنجد تلخ به‌همراه تمام نمونه‌های جمع‌آوری شده در این مطالعه، مورد تجزیه‌وتحلیل شبکه فیلوژنتیکی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل شبکه فیلوژنتیکی نشان داد (شکل ۴) که تمام زیرگونه‌های سنجد تلخ به‌جز دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* و *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides* و نمونه‌های مورد مطالعه، به‌خوبی و با تفاوت‌های نوکلئوتیدی فراوانی از یکدیگر تفکیک شده‌اند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از البرز و مازندران بدون هیچگونه جهشی با زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* همگروه شدند و به‌نظر می‌رسد که این دو نمونه، از نظر تاکسونومیکی زیرگونه مذکور باشند. زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides* با دو تفاوت نوکلئوتیدی از زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* جدا شده است. دو نمونه جمع‌آوری شده از قزوین و آذربایجان‌شرقی با یک تفاوت نوکلئوتیدی از *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* جدا شده‌اند و نمونه آذربایجان‌غربی با دو تفاوت نوکلئوتیدی از زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* تفکیک می‌گردد.



شکل ۳- کلادوگرام زیرگونه‌های مورد مطالعه حاصل از تجزیه‌وتحلیل **Bayesian** توالی‌های **ITS** ریبوزومی
اعداد روی هر شاخه، نشان‌دهنده حمایت آماری هر شاخه است.



شکل ۴- شبکه فیلوژنتیکی زیرگونه‌های مورد مطالعه حاصل از تجزیه‌وتحلیل TCS توالی‌های ITS ریبوزومی فاصله بین دو نقطه نشان‌دهنده یک تفاوت نوکلئوتیدی است.

بحث

درختچه سنجد تلخ (*Elaeagnus rhamnoides*) به‌عنوان یک گونه بومی مناطق ایران-تورانی (Mozaffarian, 2004)، خزان‌کننده، مقاوم به سرما و خشکی (Zhang *et al.*, 2010)، دارویی و تثبیت‌کننده ازت (Marvi Mohajer, 2006) شناخته شده است. اغلب زیرگونه‌های آن در شرق آسیا و برخی از آنها

مانند زیرگونه‌های *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides* و *E. rhamnoides* subsp. *fluviatilis* تا اروپای مرکزی نیز گسترش یافته‌اند (Jia *et al.*, 2012).

مطالعات Sun و همکاران (2002) و Jia و همکاران (2012) نشان داده است که نشانگر ITS ریبوزومی دارای واریانس مولکولی مناسبی برای تفکیک تاکسونومیکی زیرگونه‌های سنجد تلخ است. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که بین زیرگونه‌های مختلف سنجد تلخ تفاوت نوکلئوتیدی مناسبی برای تفکیک آنها وجود دارد (شکل‌های ۳ و ۴). با وجود اینکه زیرگونه‌های *E. rhamnoides* subsp. *mongolica*، *E. rhamnoides* subsp. *sinensis* و *E. rhamnoides* subsp. *fluviatilis* در درخت فیلوژنتیکی حاصل از تجزیه‌وتحلیل Bayesian (شکل ۳) به‌خوبی از یکدیگر تفکیک نشده‌اند اما در شبکه فیلوژنتیکی حاصل از تجزیه‌وتحلیل شبکه TCS (شکل ۴)، این زیرگونه‌ها به‌خوبی از یکدیگر جدا شده و بین آنها حداقل ۳ (بین زیرگونه‌های اول و دوم) و حداکثر ۶ (بین زیرگونه‌های دوم و سوم) تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده شد.

بین دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *rhamnoides* و *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* فقط دو تفاوت نوکلئوتیدی دیده شد (شکل ۴). این در حالی است که پراکنش فعلی زیرگونه اول در شمال‌غربی اروپا و زیرگونه دوم در منطقه قفقاز و شمال ترکیه است (شکل ۱). با وجود فاصله جغرافیایی زیادی که بین این دو زیرگونه وجود دارد اما تفاوت نوکلئوتیدی آنها قابل توجه نیست. به‌طور مشابهی، بین دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *mongolica* و *E. rhamnoides* subsp. *fluviatilis* فقط پنج تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده شد (شکل ۴)، اما به لحاظ جغرافیایی این دو زیرگونه از یکدیگر دور هستند، به‌طوری‌که زیرگونه اول در منطقه مغولستان (شمال چین) و زیرگونه دوم در مرکز اروپا پراکنش دارند. از طرف دیگر زیرگونه‌هایی که بین آنها تفاوت نوکلئوتیدی زیادی مشاهده می‌شود، از نظر جغرافیایی به یکدیگر نزدیک هستند. به‌عنوان مثال، بین دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *fluviatilis* و *E. rhamnoides* subsp. *carpatica* که هر دو در اروپا پراکنش دارند، ۲۸ تفاوت نوکلئوتیدی دیده می‌شود (شکل ۴). به‌طور مشابهی، بین دو زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *wolongensis* و *E. rhamnoides* subsp. *yunnanensis* که هر دو در جنوب‌شرقی چین پراکنده هستند، ۱۷ تفاوت نوکلئوتیدی مشاهده شد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که در گونه سنجد تلخ، میزان تفاوت نوکلئوتیدی با فاصله جغرافیایی پراکنش زیرگونه‌ها، نسبت عکس دارد. لازم به‌ذکر است که این نتیجه می‌تواند در قالب یک مطالعه بیوجغرافیایی گیاهی بررسی شود.

در میان نمونه‌های مورد مطالعه، نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و البرز، بدون هیچگونه تفاوت نوکلئوتیدی با زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* همگروه شده‌اند. بنابراین، نمونه‌های جمع‌آوری شده از این دو استان را می‌توان زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* نامید. احتمالاً، نمونه‌های این مناطق از منطقه قفقاز به‌داخل کشور گسترش یافته‌اند. نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های قزوین و آذربایجان‌شرقی با یک تفاوت نوکلئوتیدی به زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* متصل شده‌اند (شکل ۴). از آنجایی که این جهش به‌طور مستقل و مشابه در دو نمونه دیده شد، فرضیه اشتباه آنزیم پلی‌مراز مردود است. به‌هرحال، با توجه به نبود تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین این نمونه‌ها و نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های مازندران و البرز، به‌نظر می‌رسد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های قزوین و آذربایجان‌شرقی متعلق به زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* باشند.

البته نمونه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان‌غربی با دو تفاوت نوکلئوتیدی از زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* جدا می‌شود (شکل ۴). از نظر ریخت‌شناسی نیز میوه‌های این نمونه کمی بزرگ‌تر و پررنگ‌تر از میوه‌های زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *caucasica* است. همچنین، دانه‌های نمونه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان‌غربی، کوچک‌تر از دانه‌های زیرگونه اخیر است. بنابراین، در این مطالعه، نمونه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان‌غربی به‌عنوان یک زیرگونه جدید شناسایی شده و با نام علمی *E. rhamnoides* subsp. *azerbaijanica* Vaezi نام‌گذاری می‌شود.

شرح زیرگونه *E. rhamnoides* subsp. *azerbaijanica* Vaezi subsp. nov. (شکل ۵)

درختچه‌ای تا ارتفاع ۵ متر، شاخه‌ها متعدد، خاردار، با فلس‌های نقره‌ای- ستاره‌ای، متراکم مخصوصاً در زیر برگها؛ برگها خطی- سرنیزه‌ای، به‌طول ۶۰-۳۰ میلی‌متر و عرض ۷-۳ میلی‌متر؛ گل‌های نر در شاتون‌های کوچک، هر گل نر دارای ۲ پرچم، گلپوش ۲ قسمتی، به‌طول ۴-۳ میلی‌متر؛ گل‌های ماده در خوشه‌های محوری؛ میوه‌ها شفت، نارنجی پررنگ، بدون کرک، گوشتی و معطر، بیضوی، به‌طول ۱۰-۷ میلی‌متر و عرض ۸-۴ میلی‌متر؛ دانه‌ها بیضوی، سیاه رنگ و درخشان.

نمونه‌ی جمع‌آوری شده: استان آذربایجان‌غربی، کیلومتر ۳۵ جاده خوی- قطور.

شکل ۵- نمونه هرباریومی زیرگونه جدید *Elaeagnus rhamnoides* subsp. *azerbaijanica*، جمع‌آوری شده از استان آذربایجان‌غربی، قطور

منابع مورد استفاده

–Altschul, S.F., Gish, W., Miller, E.W. and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410.

–Bestwick, C.S., Milne, L. and Duthie, S.J., 2007. Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations. Chemico-Biological Interactions, 170: 76-85.

–Clement, M., Posada, D. and Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology, 9: 1657-1660.

–Dehghani, M. and Ahmadi, K., 2011. The effect of Sea Buckthorns and Wild Rue extracts on the length of nymphal and puparium of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). Journal of Herbal Drugs, 2(4): 239-244.

–Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19: 11-15.

–Fareghi, SH., Farshadfar, E. and Farshadfar, M., 2007. Assessment of some perennial medics (*Medicago sativa* L.) based on chemical minerals and food substances and their genetic diversity investigation using SDS-PAGE marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15(3): 120-196.

–Geetha, S. and Asheesh, G., 2011. Review Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). Journal of Ethnopharmacology, 138: 268–278.

–Ghahreman, A., 1993. Cormophytes of Iran. Vol. 2. Markaze Nashre Daneshgahi Press, 843 pp.

–Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41:95-98.

–Huelsenbeck, J.P. and Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17: 754-755.

–Javanshir, K., 1976. Atlas of Iranian wood plants. National Community of Natural Resources and Human Environment Conservation, 163 pp.

–Jeppsson, N., Bartish, I.V. and Persson, H.A., 1999. DNA analysis as a Tool in Sea Buckthorn Breeding, Reprinted from. In: Perspectives on New Crops and New Uses. Janick, J., (eds), ASHS Press, Alexandria, VA, 528 pp.

–Jia, D.R., Abbott, R.J., Liu, T.L., Mao, K.S., Bartish, I.V. and Liu, J.Q., 2012. Out of the Qinghai–Tibet Plateau: evidence for the origin and dispersal of Eurasian temperate plants from a phylogeographic study of *Hippophae rhamnoides* (Elaeagnaceae). New Phytologist, 194: 1123-1133.

–Li, D.Z., Gao, L.M., Li,H.T., Wang, H., Ge, X.J., Liu, J.Q., Chen, Z.D., Zhou, S.L., Chen, S.L., Yang, J.B., Fu, C.X., Zeng, C.X., Yan, H.F., Zhu, Y.J., Sun, Y.S., Chen, S.Y., Zhao, L., Wang, K., Yang, T. and Duan, G.W., 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants, *Hippophae rhamnoides* subsp. *gyantsensis* voucher JF976624. Proceedings of the National Academy of Sciencs U.S.A., 108 (49): 19641-19646.

–Marvi Mohajer, M.R., 2006. Silvics and Forest Training. Tehran University Press, 387 pp.

–Mashaekhi, Sh., Shiran, B., Jahanbazi Gozani, H., Hooshmand, S., Soltani, E. and Sorkheh, K., 2010. Genetic biodiversity assessment of Iranian oak in Charmahal-o-Bakhtiari province using AFLP molecular marker. Journal of Forest and Wood Product, 63(1): 77-90.

–Michel, T., Destandau, E., Floch, G., Elisabeth Lucchesi, M. and Elfakir, C., 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. Food Chemistry, 131: 754-760.

–Mohammadi Faresani, T., Etemadi, N. and Seyyed Tabatabaei, BA., 2008. Genetic diversity assessment of scutch grass specimens (*Cynodon dactylon*) using morphological characters and ISSR molecular markers. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 9(2): 83-96.

–Mozaffarian, VA., 2004. Trees and Shrubs of Iran. Farhange Moa'ser Press. 1003 pp.

–Mozaffarian, VA., 2012. Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Farhange Moa'ser press. 1444 pp.

–Murray, E., 1984. Eleaegnaceae. In: Rechinger, K.H., (Ed.). Flora Iranica. Vol. 55. Akademische druck- und verlagsanstalt, Graz.

–Nelson, A. 1935. '*Elaeagnus rhamnoides* L. (A.Nelson)'. *American Journal of Botany*, 22(7): 682.

–Nylander, J.A.A., 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Available from http://www.abc.se/~nylander.

–Page, D.M., 2001. TreeView (Win32) Version 1.6.6. Available from http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod

–Rambaut, A. and Drummond, A.J., 2007. Tracer, version 1.4. Available from: http:// beast.bio.ed.ac.uk/tracer.

spacer (ITS) sequences of nrDNA. Plant Systematics and Evolution, 235: 121-134.

–Swofford, D.L., 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b10. Sinauer Press, Sunderland, Mass.

–Tang, X., 2002. Intrinsic change of physical and chemical properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and implications for berry maturity and quality. Journal of Horticultural science and Technology, 77: 177-185.

–Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680.

–White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., (eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, 315-322.

–Zhang, H.Q., Tang, M., Chen, H., Tian, Z.Q., Xue, Y.Q. and Feng, Y., 2010. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the rhizosphere of *Caragana korshinkii* and *Hippophae rhamnoides* in Zhifanggou watershed. Plant and Soil, 326: 415-424.

–Ruan, C., Qin, P., Zheng, J. and He, Z., 2004. Genetic relationships among some cultivars of sea buckthorn from China, Russia and Mongolia based on RAPD analysis. Scientia Horticulturae, 101: 417-426.

–Sabeti, H., 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Yazd University Press, 1009 pp.

–Sadeghi Pourroudsari, H.R., Haeri Rouhani, S.A., Parandin, R., Vosoughi, M., Sepehri, H., Hagi Akhoundi, A. and Khanavi, M., 2006. Study of antifertility effects of Sea Buckthorns (*Melia azedarach* L.) fruit oil distributed in Iran on desert male rats. Herbal Drugs, 5(18): 23-29.

–Seyyed Tabatabaei, B.A., Rahim Malek, M., Talebi Bodaf, M., Yamchi, A., Etemadi, N. and Mobli, M., 2007. Genetic diversity assessment of elm populations (*Ulmus* spp. L.) of Isfahan using RAPD and ISSR markers. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 8(4): 213-224.

–Shah, A. H., Ahmad, S.D., Khaliq, I., Batool, F., Hassan, L. and Pearce, S.R., 2009. Evaluation of phylogenetic relationship among Seabuckthorn (ssp. *turkestanica*) wild ecotypes from Pakistan using AFLP Pakistan Journal of Botany, 41(5): 2419-2426.

–Sun, K., Chen, X., Ma, R., Li, C., Wang, Q. and Ge, S., 2002. Molecular phylogenetics of *Hippophae* L. (Elaeagnaceae) based on the internal transcribed

A new subspecies of sea buckthorns (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) from Iran based on molecular data

H. Ahani[*1], H. Jalilvand[2], J. Vaezi[3] and S.E. Sadati[4]

1-Corresponding author, Natural Resources Office of Khorasan Razavi, Mashhad, I.R. Iran Email: ahani1977@gmail.com
2- Professor, Department of Forestry, Natural Resources Faculty, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran
3- Assoc. Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, I.R. Iran
4- Assoc. Prof., Agriculture and Natural Resources Research Center of Mazandaran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, I.R. Iran

Received: 15.12.2015 Accepted: 02.04.2016

Abstract

Sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides* (L.) A. Nelson) is a medicinal, drought tolerant, nitrogen fixing and forest pioneer plant species. In this research, for the first time in Iran, molecular identification of the species distributed in different habitats of the country was carried out comparing to the known subspecies distributed worldwide. Specimens were collected from five habitats located in Alborz, Mazandaran, East and West Azerbaijan, and Qazvin provinces. Nuclear ribosomal ITS marker was used in the molecular study. After DNA extraction and PCR application, sequences obtained in this study were aligned with those obtained from Gene-Bank belonging to all sea buckthorn subspecies. The aligned sequences were analyzed using Bayesian and TCS phylogenetic methods. Results showed that the specimens collected from Alborz, Mazandaran, East Azerbaijan and Qazvin belong to the Caucasian subspecies, *E. rhamnoides* subsp. *caucasica*, but the specimen sampled from West Azerbaijan with two mutations is a new subspecies. Therefore, it is introduced as *E. rhamnoides* subsp. *azerbaijanica*.

Keywords: *Elaeagnus rhamnoides*, medicinal plant, molecular identification, phylogenetic analysis,