DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijrfpbgr.2013.3082

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۲-۱ (۱۳۹۲)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شمشاد در شمال ایران با نشانگرهای ISSR

وجیهه قندهاری[۱]، اسدالله احمدی‌خواه[۲*] و وحیده پیام نور[۳]

۱- کارشناس‌ارشد، جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، پست‌الکترونیک: ahmadikhaha@gmail.com
۳- استادیار، دانشکده جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰٤/۰٤

چکیده

ارزیابی دقیق مقدار و پراکنش تنوع ژنتیکی در گونه‌های نادر و در معرض خطر به منظور تدوین راهبرد حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیتی از سه جمعیت طبیعی شمشاد (*Buxus hyrcana* Pojark.) در شمال کشور (بندرگز، نوشهر و گرگان) و با استفاده از نشانگرهای ISSR استفاده شد. از هر جمعیت ۲۰ نمونه تصادفی انتخاب گردید، DNA آنها با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR در واکنش PCR تکثیر شده و الگوی الکتروفورزی آنها بدست آمد. سپس پارامترهای ژنتیک جمعیت براساس امتیازهای عددی مربوطه محاسبه گردید. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی مطلوبی (۳٤/۱ درصد) در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشت. اما سهم تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی در تنوع ژنتیکی کل بیشتر از سهم تنوع ژنتیکی بین جمعیتی برآورد گردید (۷۳ درصد در مقابل ۲۷ درصد). براساس ضریب تشابه Nei، شباهت ژنتیکی نسبتاً بالایی (٪۸۸-۷٤) بین جمعیت‌ها وجود داشت. کمترین فاصله ژنتیکی (۱۳/۲ درصد) بین جمعیت بندرگز و گرگان و بیشترین فاصله ژنتیکی (۳۰/۱ درصد) بین جمعیت گرگان و نوشهر مشاهده شد. براساس تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA دو جمعیت بندرگز و گرگان در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی بیشتر آنها می‌باشد و این گروه‌بندی با توزیع جغرافیایی این سه رویشگاه تطابق داشت. بررسی تعادل ژنتیکی هاردی- وینبرگ نشان داد که جمعیت بندرگز دارای بیشترین تعادل ژنتیکی در مقرهای ژنی مختلف بود (حدود ۷۸/۹ درصد مقرهای ژنی)، درحالی‌که دو جمعیت دیگر در وضعیت تعادل متوسطی قرار داشتند (به‌ترتیب ۵۸ و ٦۳ درصد مقرهای ژنی جمعیت نوشهر و گرگان). عدم تعادل ژنی در دو جمعیت اخیر می‌تواند ناشی از تخریب شدیدتر جنگل‌ها و از دست رفتن ذخایر توارثی گونه شمشاد در این مناطق باشد. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان بیان داشت که نشانگرهای ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی و بررسی ژنتیک جمعیت گونه شمشاد در جنگل‌های شمال کشور کارآمد و قابل اعتماد می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: شمشاد، تنوع ژنتیکی، ISSR، شمال ایران.

مقدمه

منابع ژنتیکی جنگل همواره توسط فاکتورهایی نظیر بهره‌برداری بی‌رویه، تغییر آب و هوا، آلودگی محیطی، جدا شدن زیستگاه، وقوع بلایای طبیعی و حمله آفات مورد تهدید هستند. جنگل به منظور پشت سر گذاشتن این تهدیدها، با هدف پایداری و ایستادگی در برابر بروز شرایط نامساعد موقتی و زودگذر به تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بشدت وابسته می‌باشد. زیرا این تنوع باعث افزایش توان سازگاری گونه‌ها می‌شود (Geburek, 1997). به عبارتی تنوع ژنتیکی برای سازگاری با تغییرات محیطی و بقای طولانی مدت گونه‌ها بسیار مهم و حیاتی است. بدین منظور، آگاهی و داشتن شناخت از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعت اهمیت ویژه‌ای در مدیریت حفاظت منابع طبیعی دارد (Hamrick & Godt, 1996). تنوع ژنتیکی به موجودات زنده کمک می‌کند تا با تغییرات محیطی موجود مقابله کنند. در واقع، در یک جامعه اکولوژیکی، تنوع ژنتیکی عاملی برای رقابت در میان افراد و پایه‌ای برای سازگاری به عدم پایداری محیطی آینده است (Kermani *et al.*, 2010).

نشانگرهای ژنتیکی اطلاعات مفیدی در مورد مقدار و توزیع اختلافات ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها فراهم می‌کنند (Belletti *et al.*, 2008) و می‌توانند به‌عنوان ابزار ضروری در توصیف و کمّی کردن تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده شوند (Avise, 1994). نشانگر مولکولی ISSR (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) شبیه نشانگر RAPD به دانش قبلی از ژنوم و روش‌های طراحی آغازگرهای خاص نیاز ندارد. در این روش به طور کلی از یک سری آغازگرهای منفرد جهت ایجاد قطعات استفاده می‌شود. این تکنیک سریع است و می‌تواند تفاوت میان افراد واجد قرابت زیاد را آشکار نماید. ازجمله مزایای آن می‌توان به داشتن چندین مقر ژنی چندشکل، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه و هزینه پایین اشاره کرد (Ahmadikhah, 2008). علاوه‌برآن، ISSR قابلیت تکرارپذیری بالاتری را به‌دلیل دمای اتصال بالاتر نسبت به RAPD داراست و هزینه‌های آنالیز ISSR نسبت به هزینه‌های برخی نشانگرها مثل AFLP پایین‌تر است (Zietkiewicz *et al.*, 1994؛ Reddy *et al.*, 2002). نشانگر ISSR به طور گسترده و موفقیت‌آمیز در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنتیک، نقشه‌های ژنتیکی و بیولوژی تکاملی در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی استفاده شده است (Cheghamirza *et al.*, 2004؛ Salimath *et al.*, 1995). در گذشته مطالعات اندکی بر روی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنگلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام شده است (Arcade *et al.*, 2000؛ Jiang *et al.*, 1998). اما در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی با هدف مطالعه بر روی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و تمایز آن، جریان ژن و تکامل نژادی توسعه یافته است (Wang & Szmidt, 2001). در ایران مطالعات مولکولی کمی در رابطه با بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنگلی با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شده است که می‌توان بررسی قرابت ژنتیکی برخی از ارقام زیتون ایرانی و خارجی (Koohi Dehkordi *et al.*, 2006) را ذکر نمود. نظر به اینکه تاکنون تنوع ژنتیکی شمشاد در ایران مطالعه نشده است و همچنین نشانگر ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی آنها به کار گرفته نشده است، در این پژوهش تنوع ژنتیکی شمشاد با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR بررسی شده است و از آنجایی که گونه شمشاد یکی از گونه‌های بومی شمال کشور و در معرض خطر می‌باشد، توجه به

اهمیت این تحقیق و لـزوم انجـام آن را دو چنـدان کـرده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برای انجام ایـن تحقیـق سـه جمعیـت طبیعی شمشاد شمال کشور شامل دو ذخیره‌گاه حفاظت شده (چشمه بلبـل بنـدرگز در اسـتان گلسـتان و پـارک سیسنگان نوشهر در استان مازندران) و رویشگاه شمشاد قرن‌آباد گرگان در استان گلستان در نظـر گرفتـه شـدند. منطقه و عرصه ذخیرگاه شمشاد چشمه بلبل بنـدرگز بـا مسـاحت ٤٥٠/٤٨ هکتـار و محـیط ١٣/٨ کیلـومتر در موقعیت طول جغرافیایی ٤٧َ- ٣٦ْ و عـرض جغرافیـایی ٥٣َ- ٥٣ْ و در غرب استان گلسـتان و در دامنـه شـمالی البرز در نزدیکی دریا، به فاصله ٨ کیلـومتری شهرسـتان بندرگز استقرار یافته است. پارک جنگلـی سیسـنگان در شهرستان نوشـهر و در فاصـله ٢٧ کیلـومتری شـرقی از مرکز شهر واقع شده است که دارای دو بخـش سـاحلی به مساحت ١٨/٤ هکتار و جنگلی به مساحت ٦٠٢/٨٥٠ هکتار می‌باشد و موقعیت رویشگاه قرن‌آباد گرگـان بـین عرض جغرافیـایی شـمالی ١٥َ- ٣٧ْ و طـول جغرافیـایی شرقی ٣٠َ- ٥٥ْ واقع شده است. نمونـه‌بـرداری از بـرگ سرشاخه‌های جـوان درختـان بـا ظـاهر سـالم و ارتفـاع یکسانی از تاج درختان در اوایل اردیبهشـت مـاه ١٣٨٩ از مناطق تحـت بررسـی و بـا انتخـاب ٢٠ پایـه در هـر منطقه انجام شـد. هـر چنـد فاصـله درختـان از الگـوی خاصی پیروی نمی‌کرد، اما متوسط فاصله بین پایـه‌هـای درختـی در حـدود ١٠ متـر بـوده اسـت. سـپس جهـت استخراج DNA و تعیین تنـوع ژنتیکـی بـا نشـانگرهای مولکولی ISSR، برگ‌های جمع‌آوری شده از هر پایه در داخل کاغذ آلومینیوم و در داخل تانک ازت مـایع قـرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل و تـا مرحلـه اسـتخراج DNA در دمای C °٨٠- نگهداری شدند.

استخراج DNA: ابتدا نمونه‌های برگـی منـاطق مـورد مطالعـه بـا اسـتفاده از ازت مـایع در ظـروف چینـی ضدعفونی‌شده کوبیده شد و برگ‌های پودر شـده مربـوط به هر پایه در تیوب‌هایی کدگذاری‌شده ریختـه شـد و تـا زمان استخراج DNA در دمای C °٨٠- نگهـداری شـدند. اسـتخراج DNA بـا اسـتفاده از کیـت دنانوکلئیـک (DenaNucleic Kit) طبق روش پیشنهادی Ahmadikhah (٢٠٠٩) انجام گردید. کمّیـت و کیفیـت DNA بـه وسـیله الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیـین شد و در زیر نـور مـاوراء بـنفش در دسـتگاه UV trans-illuminator (شـرکت UniDoc) مشـاهده شـد. سـپس غلظت هر نمونه با آب مقطر سـترون‌سـازی‌شـده در حـد ١٠٠ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم گردید و نمونه‌ها تا زمـان استفاده در واکنش PCR در فریزر ٢٠- ذخیره شدند.

واکنش ISSR-PCR: در ایـن تحقیـق از ١٠ آغـازگر ISSR استفاده شد که توالی آنها در جـدول ١ آورده شـده است. لازم به ذکر است که انتخاب آغازگرهـای ISSR بـا توجه به فراوانی توالی‌های SSR گیاهی انجام شد. پروفیل حرارتی PCR برای آغازگرهای ISSR به صورت زیر بود.

٩٤°C به مدت ٥ دقیقه؛ ٣٥ چرخه در ٩٤°C بـه مـدت ٣٠ ثانیه، ٤٨°C به مدت ٣٥ ثانیه، ٧٢°C به مدت ٩٠ ثانیه؛ و سرانجام ٧٢°C به مدت ٥ دقیقه.

برای تهیه مخلوط واکنش‌های PCR از کیـت شـرکت سـیناکلون (PCR master mix kit) اسـتفاده شـد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

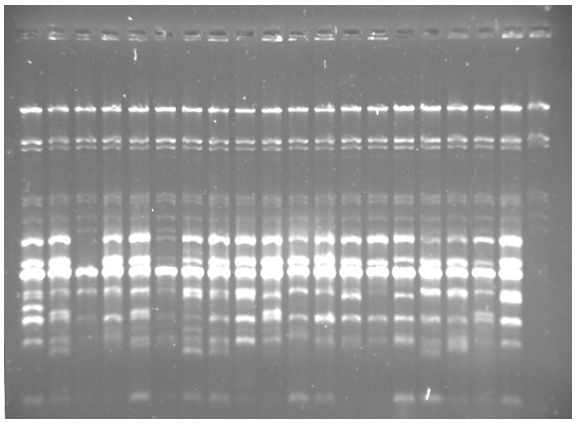
ردیف	نام آغازگر	توالی (`۳.....`۵)	ردیف	نام آغازگر	توالی (`۳.....`۵)
۱	ISSR1	(GA)7-RG	٦	ISSR6	(AC)8-YG
۲	ISSR2	(CA)7-YC	۷	ISSR7	(TG)8-RC
۳	ISSR3	(AG)8-T	۸	ISSR8	(AT)7-RC
٤	ISSR4	(AG)8-YC	۹	ISSR9	(CA)7-YG
۵	ISSR5	(GT)8-YC	۱۰	ISSR10	(CA)8-RC

در یک واکنش PCR از ٦ میکرولیتر PCR Master Mix، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر، یک میکرولیتر DNA، ٤/۸ میکرولیتر H_2O استفاده گردید. پس از تکثیر، فرآورده‌های PCR بر روی ژل آگارز یک درصد در ولتاژ ۱۱٤ ولت الکتروفورز گردید. پس از پایان الکتروفورز عکسبرداری از ژل‌ها با دستگاه UV trans-illuminator انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی: امتیازدهی نوارها به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار PopGene Version 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) تعداد و درصد نشانگرهای چندشکل، میزان اطلاعات چندشکلی هر آغازگر (PIC)، تنوع ژنتیکی نئی (h)، شاخص شانون (I)، فاصله ژنتیکی نئی (D)، تنوع ژنتیکی کل (Ht)، تنوع بین جمعیت‌ها (Gst) و تنوع داخل جمعیت‌ها (Hst) محاسبه گردید. از نرم‌افزار Ntsys Version PC-2.02e برای تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های داخل رویشگاه‌های مورد مطالعه استفاده گردید. اعتبارسنجی روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب کوفنتیک (Sokal & Rohlf, 1994) انجام شد.

نتایج

از ده آغازگر ISSR مورد استفاده تنها ٤ آغازگر (۲۰ درصد) توانستند الگوی نواردهی مناسبی جهت امتیازدهی تولید کنند که نمونه‌ای از الگوی نواردهی آنها در شکل ۱ نشان داده شده است. این چهار آغازگر عبارت بودند از ISSR1، ISSR2، ISSR3 و ISSR4. در بین این چهار آغازگر، آغازگرهای ISSR1 و ISSR2 کمترین تعداد باند (۸ عدد) و ISSR4 بیشترین تعداد باند (۱۵ عدد) را تولید نمودند (جدول ۲). متوسط تعداد باند تولید شده به‌ازای هر آغازگر ۱۰/۵ عدد بدست آمد. برای این چهار آغازگر جمعاً ٤۲ باند امتیازدهی گردید که ۳۸ عدد (۹۰/۵ درصد) چندشکلی نشان دادند.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی آغازگر ISSR4 در ۲۰ نمونه از جمعیت شمشاد سیسنگان نوشهر

کمترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگر ISSR2 (۳۰/٦ درصد) و بالاترین میزان آن برای آغازگر ISSR3 (٤٤ درصد) محاسبه گردید. متوسط میزان PIC برای این چهار آغازگر ۳٦/٤ درصد بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- تعداد باند تولید شده به‌ازای هر آغازگر ISSR و مقدار عددی PIC آنها

نام آغازگر	تعداد باند تولید	تعداد باندهای چندشکل	مقدار PIC (٪)
ISSR1	8	۷	۳۵/٤
ISSR2	۸	۸	۳۰/٦
ISSR3	۱۱	۸	٤٤
ISSR4	۱۵	۱۵	۳۵/۷
جمع	٤۲	۳۸	-
متوسط	۱۰/۵	٪۹۰/۵	۳٦/٤

درصد مقرهای ژنی چندشکل در سه جمعیت متفاوت بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که بیشترین آن مربوط به جمعیت بندرگز و کمترین آن مربوط به جمعیت قرن‌آباد گرگان در استان گلستان بود (به‌ترتیب ۸۸/۱ و ۵۲/٤ درصد). متوسط تنوع ژنتیکی نئی معادل ۳٤/۱٤ درصد و متوسط شاخص تنوع شانون ۵۰/٤۷ درصد محاسبه شد. بیشترین تنوع ژنتیکی نئی و شانون مربوط به جمعیت بندرگز بود (جدول ۳).

جدول ۳- درصد مقرهای ژنی چندشکل، میانگین تنوع ژنی نئی و شاخص اطلاعات شانون در جمعیت‌های مختلف

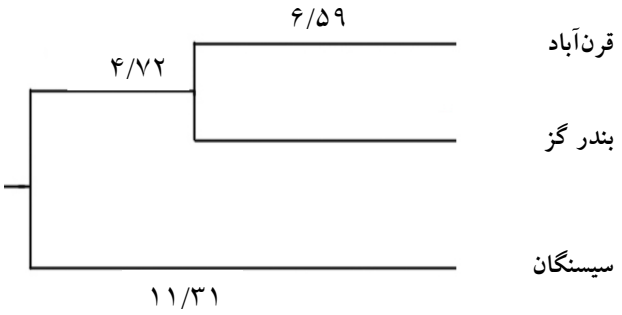
جمعیت	مقرهای ژنی چندشکل (٪)	تنوع ژنی نئی (h) (٪)			شاخص شانون (I) (٪)		
		کمینه	بیشینه	متوسط	کمینه	بیشینه	متوسط
بندرگز	۸۸/۱	۵/٤۸	٤۹/۹٦	۳۵/۸	۱۲/۸۳	٦۹/۲۷	۵۲/۱
سیسنگان نوشهر	۵٤/۸	۱۱/٤	٤۸/۷۲	۱۹/۷۵	۲۲/۸۸	٦۸/۰۳	۲۹/۵
قرن‌آباد گرگان	۵۲/٤	۱۲/۸٦	٤۹/۹۵	۱۸/۸	۲۵/۱۲	٦۹/۲٦	۲۸/۲
کل	۹۰/۵		۳٤/۱٤			۵۰/٤۷	

براساس ضریب تشابه ژنتیکی نئی، سه جمعیت مورد مطالعه دارای شباهت ژنتیکی نسبتاً بالایی بودند (بین ۷٤/۹ تا ۸۸/٦ درصد) (جدول ٤). کمترین فاصله ژنتیکی بین ذخیره‌گاه بندرگز و جمعیت قرن‌آباد گرگان (۱۲/۱ درصد) و بیشترین فاصله بین جمعیت قرن‌آباد گرگان و سیسنگان نوشهر مشاهده شد (۲۸/۹ درصد).

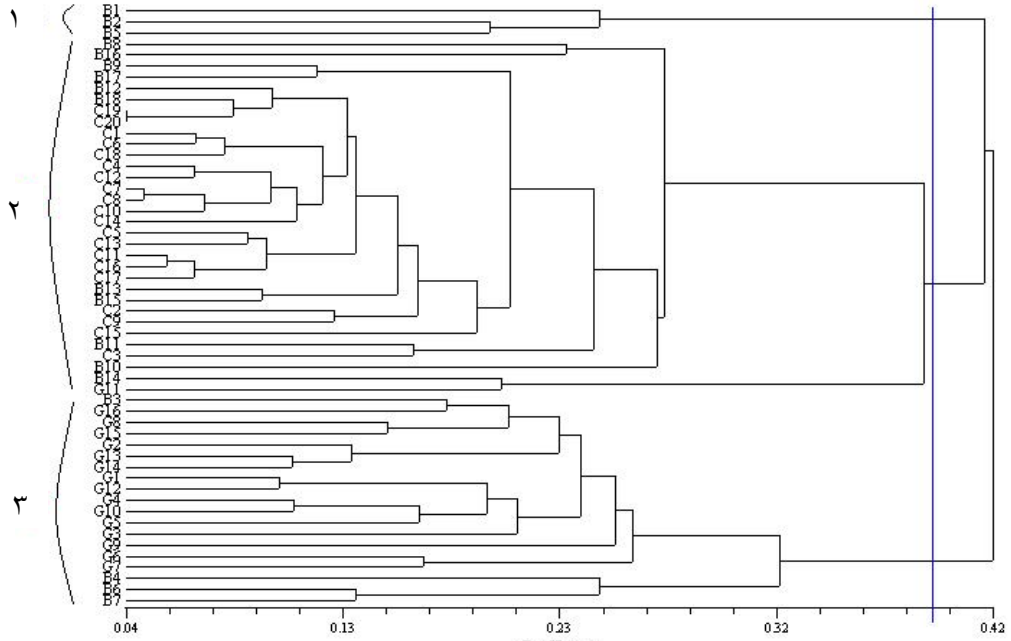
براساس تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA دو جمعیت بندرگز و قرن‌آباد گرگان در فاصله ژنتیکی ٤/۷۲ در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهنده قرابت ژنتیکی بیشتر آنها می‌باشد و جمعیت سیسنگان نوشهر در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت (شکل ۲).

جدول ٤- ضرایب تشابه نئی (مقادیر بالای قطر اصلی) و فاصله ژنتیکی نئی (مقادیر زیر قطر اصلی) بین سه رویشگاه مورد مطالعه بدست آمده از الگوی باندهی آغازگرهای ISSR

رویشگاه	بندرگز	سیسنگان نوشهر	قرن‌آباد گرگان
بندرگز	-	٨٦/٠	٨٨/٦
سیسنگان نوشهر	١٥/١	-	٧٤/٩
قرن‌آباد گرگان	١٢/١	٢٨/٩	-



شکل ۲- گروه‌بندی سه رویشگاه مورد مطالعه براساس الگوی باندی نشانگر ISSR با روش UPGMA مبتنی بر فاصله ژنتیکی نئی



شکل ۳- گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه در سه رویشگاه (بندرگز B، قرن‌آباد G و سیسنگان C) با روش ترکیبی Nei-UPGMA براساس الگوی باندی نشانگر ISSR

رده‌بندی براساس تنوع داخل جمعیت‌ها نیز با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شد که در بین ۱۲ روش ترکیبی بکار رفته برای گروه‌بندی، روش UPGMA در ترکیب با ضریب تشابه نئی، دارای بالاترین ضریب کوفنتیک (۰/۸٤۱) برای گروه‌بندی نمونه‌های سه رویشگاه مورد مطالعه بود (شکل ۳). همانگونه که در شکل دیده می‌شود، نمونه‌های سه جمعیت به سه گروه اصلی ۱، ۲ و ۳ تقسیم شده‌اند. گروه یک منحصراً از نمونه‌های رویشگاه بندرگز تشکیل شده است. گروه ۲ عمدتاً از نمونه‌های رویشگاه سیسنگان نوشهر و گروه سه نیز عمدتاً از نمونه‌های رویشگاه قرن‌آباد گرگان تشکیل شده است، هر چند برخی نمونه‌های رویشگاه بندرگز نیز در این دو گروه پراکنده شده‌اند.

بررسی تعادل ژنتیکی هاردی- واینبرگ نشان داد که جمعیت بندرگز دارای بیشترین تعادل ژنتیکی در لوکوس‌های مختلف بود؛ در عوض دو جمعیت دیگر در وضعیت تعادل نسبی قرار داشتند (جدول ۵).

جدول ۵- وضعیت تعادلی ژنتیکی هاردی- واینبرگ براساس تعداد لوکوس‌های متعادل و نامتعادل به‌ازای هر آغازگر ISSR (مقادیر داخل پرانتزها بر حسب درصد می‌باشند)

جمعیت	ISSR1		ISSR2		ISSR3		ISSR4		کل	
	متعادل	نامتعادل	متعادل	نامتعادل	متعادل	نامتعادل	متعادل	نامتعادل	متعادل	نامتعادل
بندرگز	٤	۳	۷	۱	۷	۱	۱۲	۳	۳۰(۷۸/۹۵)	۸(۲۱/۰۵)
سیسنگان	۵	۲	٤	٤	۷	۱	٦	۹	۲۲(۵۷/۸۹)	۱٦(٤۲/۱۱)
قرن‌آباد	۵	۲	٤	٤	۸	۰	۷	۸	۲٤(٦۳/۱٦)	۱٤(۳٦/۸٤)

میانگین ضریب تنوع ژنی کل (Ht) معادل ۳٤/۰۱ درصد و میانگین سهم ضریب تنوع ژنی داخل جمعیتی (Hs) و بین جمعیتی (Gst) در تنوع ژنی کل به‌ترتیب معادل ۷۲/۹ درصد و ۲۷/۱ درصد برآورد گردید (جدول ٦).

جدول ٦- برآورد تنوع ژنی کل (Ht)، تنوع ژنی داخل جمعیت‌ها (Hs) و تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst)

	Ht	Hs	Gst
مقدار پارامتر	۰/۳٤۰۱	۰/۷۲۹۲	۰/۲۷۰۸
انحراف معیار	۰/۰۲۵۲	۰/۰۱۸۰	۰/۰۰۸۹

بحث

در این مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR میزان تنوع بین و درون جمعیت‌های طبیعی شمشاد شمال کشور مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی دقیق مقدار و پراکنش تنوع ژنتیکی در گونه‌های نادر و در معرض خطر به منظور حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Rieseberg 1996& Fritsch ؛ Gonzalez-Astorga & Castillo-Campos, 2004). در این راستا Wang و همکاران (۱۹۹٦) اظهار داشته‌اند آشکارسازی تنوع با افزایش منابع ژنتیکی مورد مطالعه و تعداد آغازگرهای مورد استفاده کارآمدتر می‌باشد. از طرفی با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در جامعه حدود انتخاب هم در طبیعت و هم به طور مصنوعی وسیع‌تر می‌شود. با توجه به رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی، رابطه مشابهی بین کارایی بهبود ژنتیکی اصلاح یک جامعه و تنوع ژنتیکی برای صفت مورد نظر وجود دارد.

بنابراین، حفظ و نگهداری دخایر ژنتیکی ضروریست (Abdi & Maddah-Arefi 2002؛ Rout & Chrungoo., 2007؛ Bernath., 2002). در این مطالعه، چندشکلی قابل ملاحظه‌ای (۹۰/۵ درصد) در الگوهای نواری نشانگرهای ISSR بدست آمد که با مطالعات دیگر قابل مقایسه می‌باشد. برای مثال، درصد چندشکلی بدست آمده در مطالعه مشابهی که توسط Huang و همکاران (۲۰۰۸) بر روی شش جمعیت شمشاد *Buxus sinica Var parvifoli* با استفاده از ۲۱ نشانگر ISSR انجام شده، میزان چندشکلی ۹۰/۱۵ درصد گزارش شده است.

میانگین شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) آغازگرها در تحقیق حاضر به طور متوسط ۳٦/٤ درصد بود که در دامنه ۳۰/٦ درصد تا ٤٤ درصد متغیر بود. همچنین Koohi Dehkordi و همکاران (۲۰۰٦) در بررسی توده‌های زیتون با استفاده از نشانگرهای ISSR، تعداد ۲۰۳ باند چند شکل را گزارش نمودند که می‌توان گفت میزان PIC در خانواده زیتون در مقایسه با گونه شمشاد مورد مطالعه کمتر بوده است. با در نظر گرفتن تعداد آلل‌های هر جایگاه ژنی و فراوانی نسبی آنها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، شاخص PIC محتوای اطلاعاتی چندشکلی آغازگرها را نشان می‌دهد که در انتخاب نوع نشانگر، برای بدست آوردن چندشکلی کافی، نوع رابطه خویشاوندی و نوع مواد گیاهی مورد مطالعه اهمیت زیادی دارد. طبق نظر Naghavi و همکاران (۲۰۰۷) در کل هرچه نمونه‌های مورد مطالعه به هم نزدیک‌تر باشند، نشانگرهای با قدرت بیشتر در تشخیص چندشکلی مورد نیاز خواهند بود. از آنجایی‌که آغازگر ISSR3، PIC بیشتری را در این مطالعه نشان داد، بنابراین برای بررسی چندشکلی جمعیت‌های شمشاد مورد مطالعه از توانایی بالاتری نسبت به سایر آغازگرها برخوردار بود. با توجه به اینکه مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت تحت بررسی است (Fabriki Ourang *et al.*, 2009). ازاین‌رو در این مطالعه محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بیشتر آغازگرهای مورد استفاده عدد بزرگی بود که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها می‌باشد. به‌طورکلی، درصد باندهای چندشکل ملاک تعیین مقدار تنوع ژنتیکی و فرسایش ژنتیکی می‌باشد که معمولا سازگاری پایینی نسبت به هر تغییر محیطی نشان می‌دهد (Hao *et al.*, 2006).

نتایج این بررسی حکایت از تنوع ژنتیکی نسبتا مطلوب در بین توده‌های مورد مطالعه داشت (۳٤/۱٤ درصد براساس شاخص نئی و ۵۰/٤۷٪ براساس شاخص شانون). از آنجا که براساس فرمول Nei (۱۹۷۸) حداکثر تنوع ژنتیکی قابل محاسبه برای نشانگرهای غالب معادل ۵۰ درصد می‌باشد، مقدار بدست آمده در این تحقیق، حدود ٦۸/۳ درصد (با لحاظ ۳٤/۱٤ درصد از ۵۰ درصد) از حداکثر تنوع ژنتیکی قابل محاسبه بوده است که نشان می‌دهد در مجموع تنوع ژنتیکی مطلوبی در جمعیت‌های مورد مطالعه وجود داشته است. لازم بذکر است که در تحقیقات علمی مطالعات بسیار محدودی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جنس شمشاد و گونه‌های آن انجام شده است. در بررسی Huang و همکاران (۲۰۰۸) بر روی جمعیت‌های شمشاد *Buxus sinica Var parvifoli* تنوع ژنتیکی به وسیله شاخص شانون ٤۳/٤ درصد (با نشانگر RAPD) بدست آمده که از میزان محاسبه شده در این تحقیق نسبتاً پایین‌تر می‌باشد. البته میزان تنوع ژنتیکی

جمعیت‌های *Populus cathayana Rehd* با استفاده از نشانگرهای ISSR توسط Lu و همکاران (۲۰۰٦) معادل ۳۳/۱ درصد تخمین زده شد که باز هم در مقایسه با تنوع محاسبه شده در این تحقیق پایین‌تر می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر، Hao و همکاران (۲۰۰٦) تنوع ژنتیکی هشت جمعیت *Cupressus chengiana* گونه در معرض خطر در چین را با نشانگرهای ISSR به وسیله شاخص شانون ٤۷/٤۰ درصد گزارش کرده‌اند و دخالت انسان و فشارهای مخرب انسانی را مهمترین فاکتور مؤثر در کمیابی این گونه دانسته‌اند. بررسی نشانگرهای ISSR نشان داد که بیشترین تنوع ژنی مربوط به ذخیره‌گاه بندرگز بوده است و بیشترین تشابه ژنتیکی بین ذخیره‌گاه بندرگز و جمعیت قرن‌آباد گرگان مشاهده شد و به دلیل همین تشابه ژنتیکی بیشتر، این دو جمعیت در یک گروه قرار گرفتند. تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های ذکر شده و قرار گرفتن آنها در یک گروه می‌تواند ناشی از نزدیک بودن زمان پیدایش، مبدأ جغرافیایی یکسان، قرابت‌های ژنتیکی و خویشاوندی‌های احتمالی، اشتقاق جمعیت‌ها از یکدیگر و داشتن اجداد مشترک باشد (Hartl & Clarck, 1994). البته بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت قرن‌آباد گرگان و سیسنگان نوشهر دیده شد که این دو رویشگاه از نظر جغرافیایی فاصله نسبتاً زیادی (۲۸۰ کیلومتر) از هم دارند و موانع اکولوژیکی جریان ژن بین این رویشگاه‌ها را کاهش می‌دهد؛ به عبارتی هر چه تبادل ژنی بین دو جمعیت کمتر باشد، آن دو جمعیت به مرور زمان راه تکاملی جداگانه‌ای را طی خواهند کرد و بیشتر و بیشتر از هم دور می‌شوند و با تجمع این تفاوت‌های بین جمعیتی در طی تکامل، گونه جدیدی خلق می‌گردد. اما بعکس، اگر مبادله ژن بین دو جمعیت بیشتر باشد (مثلاً از طریق انتشار دانه گرده یا بذر از یکی به دیگری و بعکس)، به مرور زمان این دو جمعیت شباهت بیشتری به هم پیدا می‌کنند (Hartl & Clarck, 1994). میزان تنوع ژنی کل حدود ۳٤ درصد برآورد شد (جدول ٦) که حدود ۲۷ درصد آن (یعنی ۹/۲ درصد) مربوط به تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst) و حدود ۷۳ درصد دیگر آن (یعنی ۲٤/۸ درصد) مربوط به تنوع ژنی داخل جمعیت‌ها (Hs) بوده است. این معیار نشان می‌دهد که تفاوت ژنتیکی بین سه جمعیت مورد مطالعه کمتر از تفاوت ژنتیکی داخل جمعیت‌ها می‌باشد. علت این موضوع می‌تواند ناشی از اشتقاق از یک نیای مشترک و بعد ادامه حیات در شرایط اقلیمی مشابه و جریان بالای ژن بین جمعیت‌ها و یا هر سه عامل فوق باشد. توزیع تنوع ژنتیکی در داخل و بین گونه‌ها با خصوصیات تاریخی حیاتی، خصوصاً انتشار ژن و نحوه تولید مثل مرتبط است (Hamrick *et al*., 1979) و گونه‌هایی که ژن‌های خود را پراکنده می‌کنند (مانند گیاهان که با تولید دانه گرده و بذر این عمل را انجام می‌دهند) تنوع بین جمعیتی (Gst) پایین‌تری نسبت به تنوع داخل جمعیتی دارند (Hamrick *et al*., 1979). شمشاد یک گیاه آزاد گرده‌افشان است (Mozafarian, 2004) و چگونگی انتشار دانه گرده به فواصل دوردست را باید در آینده بررسی کرد. حتی مقدار متوسطی از جریان ژن میان جمعیت‌ها می‌تواند باعث ارتباط مخازن ژنی دو جمعیت شود و به مرور زمان تفاوت ژنتیکی میان جمعیت‌ها را به حداقل برساند (Hamrick, 1989). در مطالعه Belaid و همکاران (۲۰۰٦) بر روی گونه‌های جنس Lathyrus با استفاده از نشانگرهای ISSR، سهم تنوع داخل جمعیتی در تنوع کل بیشتر از تنوع بین جمعیتی برآورد گردید که نشان می‌دهد بیشتر تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع داخل جمعیتی بوده است و نتایج تحقیق

حاضر با نتایج این تحقیق تطابق دارد. هر چند مقدار تنوع داخل جمعیتی در این مطالعه بیشتر از تنوع بین جمعتی برآورد شد، اما با توجه به تشدید تخریب منابع جنگلی در سال‌های اخیر باید توجه بیشتری از لحاظ حفاظت ژنتیکی به این جمعیت‌ها مبذول داشت تا به مرور زمان از تنوع ژنتیکی داخل آنها و به تبع آن از تنوع کل ژنتیکی جمعیت-های طبیعی شمشاد در ناحیه خزری کاسته نشود. زیرا از دست دادن تنوع ژنتیکی می‌تواند منجر به کاهش توانایی گونه نسبت به سپری کردن تغییرات محیطی و تغییر جمعیت‌ها در کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت شود (Ellstrand & Elam, 1993؛ Reed & Frankham, 2003).

همانگونه که در بخش نتایج دیده شد، نمونه‌های داخل سه جمعیت به سه گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۳) و هر گروه عمدتاً از نمونه‌های یک رویشگاه به خصوص تشکیل شده بود که این نتیجه به نوعی منعکس‌کننده توزیع جغرافیایی سه رویشگاه فوق می‌باشد و نشان می‌دهد که بین گروه‌بندی مولکولی و توزیع جغرافیایی جمعیت‌های مورد مطالعه تطابق بالایی وجود دارد. با نگاهی به جدول تعادل هاردی- واینبرگ می‌توان اذعان نمود که احتمالاً عدم تعادل ژنی در دو جمعیت سیسنگان نوشهر و قرن‌آباد گرگان ناشی از تخریب شدیدتر جنگل‌ها و از دست رفتن ذخایر توارثی گونه شمشاد در این مناطق می‌باشد. ذخیره‌گاه سیسنگان به علت داشتن مدیریت پارک‌داری تا حد زیادی از تخریب مصون مانده، اما از جانب گردشگری خارج از ظرفیت اکولوژیکی آسیب دیده است. رویشگاه شمشاد قرن‌آباد گرگان نیز تحت تأثیر دخالت‌های انسانی است و از آنجایی که هنوز به صورت ذخیره‌گاه مطرح نشده است، توجه جدی به حفاظت و غنای گونه شمشاد در این رویشگاه از اهمیت بیشتری برخوردار است. در مجموع با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان بیان داشت که نشانگرهای ISSR برای مطالعه تنوع ژنتیکی و بررسی ژنتیک جمعیت گونه شمشاد در جنگل‌های شمال کشور مطلوب هستند و توانستند به خوبی تأثیر توزیع جغرافیایی را بر گروه‌بندی سه جمعیت شمشاد منعکس نمایند.

منابع مورد استفاده

- Abdi, N., and Maddah-Arefi, H., 2002. Study of variation and seed deterioration of *Bromus tomentollus* germplasm, in natural resources genebank. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 7: 1-25.
- Ahmadikhah, A., 2008. Advanced Genetics. Publication of Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources. Gorgan, 348 p.
- Ahmadikhah, A., 2009. A rapid mini-prep DNA extraction method in rice. Afr. J. Biotechnology, 8: 234-238.
- Arcade, A., Anselin, F., Rampant, P.F., Lesage, M.C., Paques, L.E. and Prat, D., 2000. Applicatin of AFLP, RAPD and ISSR Markers to genetic mapping of European and Japanese Larch [J].Theoretical and Applied Genetics, 100: 299-307.
- Avise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. New York. 528p.
- Belaid, Y., Chtourou-Ghorbel, N., Marrakchi, M. and Trifi-Farah, N., 2006. Genetic diversity within and between populations of *Lathyrus* genus (Fabaceae) revealed by ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 1413–1418
- Belletti, P., Monteleone, I. and Ferrazzini, D., 2008. A population genetic study in a scattered forest species, Wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) crantz], using RAPD markers, European Journal of Forest Research, 127: 103-114.
- Bernath, J., 2002. Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. Proc. Int. Conf. MAP. Acta Horticulturae, 576, 65– 68.
- Cheghamirza, K., Koveza, O.V., Konovalov, F.A. and Gostimskii, S.A., 2004 Identification and mapping of chi115 gene and DNA markers linked to it in pea (*Pisum sativum* L.), Genetika, 40: 909–915.
- Ellstrand, N.C. and Elam, D.R., 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Reviews of Ecological Systems, 24: 217–242.

Assessment of genetic relationship of some Iranian and exotic olive cultivars using molecular markers. Journal of Horticultural Science and Technology, 7: 93-102.
– Lu, Z., Wang, Y., Peng, Y., Korpelainen, H. and Li, C., 2006. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers. Plant Science, 170: 407-412.
– Mozafarian, V.A., 2004. Trees and Shrubs of Iran. Farhang Moaser Publication. Tehran, 1003 p.
– Naghavi, M.R. Gharayazi, B. and Hossieni Salekdeh, Gh., 2007. Molecular Markers. Tehran University Publication Institute. Tehran. 380 p.
– Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
– Reddy, P.M., Sarla, N. and Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 9–17.
– Reed, D.H. and Frankham, R., 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conservational Biology, 17: 230-237.
– Rout, A. and Chrungoo, N.K., 2007. Genetic variation and species relationships in Himalayan buck wheats as revealed by SDS PAGE of endosperm proteins extracted from single seeds and RAPD based DNA fingerprints. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 767–777.
– Salimath, S.S., de Oliveira, A.C., Godwin, I.D. and Bennetzen, J.L., 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus Eleusine with DNA markers. Genome, 38: 757-763.
– Sokal, R. and Rohlf, J., 1994. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3rd edn.). Freeman & Co, NY.
– Wang, X.Q., Zou, Y.P., Zhang, D.M. and Hong D.Y., 1996. RAPD analysis on genetic polymorphism of silvery fir. Science in China Series C., 26: 436–444.
– Wang, X.R. and Szmidt, A.E., 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees. Scandinavian Journal of Forest Research, 16: 199-220.
– Yeh, F.C., Yang, R. and Boyle, T., 1999. POPGENE Version 1.31. Microsoft windows based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Edmonton. AB. Canada. pp. 26.
Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.
Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.
– Fabriki Ourang, S., Shamsbakhsh, M., Jalali Javaran, M., and Ahmadi, J., 2009. Assessment of genetic diversity of native populations of Iranian melon (*Cucumis melo L.*) using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. Journal of Iranian Biology, 22: 271-278.
– Fritsch, P. and Rieseberg, L.H., 1996. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: T.B. Smith and R.K. Wayne, Editors, Molecular Genetic Approaches in Conservation, Oxford University Press. New York. USA. pp. 54-73.
– Geburek, T., 1997. Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees. Biodiversity Conservation, 6: 1639–1654.
– Gonzalez-Astorga, J. and Castillo-Campos, G., 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castilo-Campos and Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. Annals of Botany, 93: 521–528.
– Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J.C., Hamrick, J. L. (Eds.), Conservation Genetics: Case Histories from Nature. Chapman and Hall, New York.
– Hamrick, J.L., 1989. Isozymes and analyses of genetic structure of plant populations. In: D. Soltis and P. Soltis, Editors, Isozymes in Plant Biology, Discorides Press, Portland Oregon, pp. 87–105.
– Hamrick, J.L., Linhart, Y.B. and Mitton, J.B., 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variance in plants. Annual Reviews of Ecological Systems, 10:173–200.
– Hao, B., Li, W., Linchun, M., Li, Y., Rui, Z., Mingxia, T. and Weikai, B., 2006 . A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana* an endangered endemic of China, using ISSR markers. Biochemical Genetics, 44: 29-43.
– Hartl, D.L. and Clark, G.C., 1994. Principles of Population Genetics. Sinauer, Sunderland.
– Huang, Y., Ji, K., Jiang, Z. and Tang, G., 2008. Genetic structure of *Buxus sinica var. parvifolia*, a rare and endangered plant. Scientia Horticulturae, 116: 324-329.
– Jiang, S., Chen, Q. and Fang, X., 1998. RAPD and ISSR analysis between photoperiod sensitive genetic male sterile rice Non gken 58s and its original variety Nongken 58 (in Chinese). Journal of Agricultural Biotechnology, 8: 63-66.
– Kermani, M., Marashi, H. and Mellati, F., 2010. Assessment of genetic diversity of Cyprus samples of Tondoureh national park using RAPD molecular markers. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Research. 18: 115-124.
– Koohi Dehkordi, M.A., Rahim Malek, M., Seyyed Tabtabei, B.A., Bani Nasab, B. and Mobli, M., 2006.

Genetic diversity of *Buxus hyrcana* populations in north of Iran using ISSR markers

V. Ghandehari[1], A. Ahmadikhah[2*] and V. Payamnoor[3]

1- M.Sc., Faculty of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, I.R.Iran
2*- Corresponding author, Assist. Prof., Faculty of Agriculture, Zanjan University, Faculty of Agriculture, Zanjan, I.R.Iran, Email: ahmadikhaha@gmail.com
3- Assist. Prof., Faculty of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, I.R.Iran

Received: 01.20.2013 Accepted: 06.25.2013

Abstract

Precise evaluation of extent and distribution of genetic diversity in rare and endangered species is of particular importance for conserving and utilizing genetic resources. To study inter- and intra-population genetic diversity of three natural populations of boxus (*Buxus hyrcana* Pojark.) in north of Iran (Bandar Gaz, Nowshahr and Gorgan) ISSR markers were used. Twenty samples per population were randomly selected, their DNA was amplified in PCR reaction using 10 ISSR primers and electrophoretic patterns were obtained. Then, population genetic parameters were calculated based on respective numerical scores. Results showed that there was a desirable genetic variation (34.1%) in the studied populations. However, contribution of intra-population genetic variation in total genetic variation was estimated over than that of inter-population genetic variation (73% vs. 27%). On the basis of Nei`s similarity, a relatively high genetic similarity (74 to 88%) was observed among the populations. The lowest genetic distance (13.2%) was observed between Bandar Gaz`s and Gorgan`s populations and the highest amount (30.1%) was observed between Gorgan`s and Nowshar`s populations. Based on cluster analysis using UPGMA method, populations of Bandr Gaz and Gorgan were grouped together, indicating their higher genetic relatedness and this grouping coincided to geographic distribution. Investigation of Hardy-Winberg genetic equilibrium showed that Bandar Gaz`s population had the highest genetic equilibrium at different loci (~78.9% of loci), while two other populations had a mild equilibrium (58% and 63% of loci in Nowshahr and Gorgan populations, respectively). Gene disequilibrium in the latter populations is probably due to harder endangering forests and losing the hereditary resources of boxus species in the regions. Altogether, on the basis of the results of this research it can be concluded that ISSR markers are efficient and reliable markers for studying genetic diversity and population genetics of *Buxus hyrcana* species in forests of north of Iran.

Key words: *Buxus hyrcana*, Genetic diversity, ISSR Marker, North of Iran.