بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های شمشاد در جنگل‌های شمال ایران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

وجیهه قندهاری*[۱]، وحیده پیام نور[۲]، اسدالله احمدی‌خواه[۳] و محمدهادی پهلوانی[۴]

[۱] دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۲] استادیار دانشکدهٔ جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۳] استادیار دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه زنجان

[۴] دانشیار دانشکدهٔ تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۱/ ۴ /۲۸، تاریخ پذیرش: ۹۱ / ۱۰ / ۱۱)

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون‌جمعیتی، سه جمعیت طبیعی شمشاد (*Buxus hyrcana* Pojark.) در شمال کشور (چشمه‌بلبل بندرگز، سیسنگان نوشهر و قرن‌آباد گرگان) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD بررسی شدند. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی به‌نسبت مطلوبی (حدود ۲۹ درصد) در جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد، به‌گونه‌ای که از ۲۲٫۹ درصد در جمعیت قرن‌آباد گرگان تا ۲۸٫۳ درصد در جمعیت سیسنگان نوشهر متغیر است. سهم تنوع ژنی درون جمعیتی در تنوع ژنتیکی کل، بیشتر از تنوع ژنی بین‌جمعیتی برآورد شد (۹۰ درصد در مقابل ۱۰ درصد). بررسی ضریب تشابه ژنتیکی نئی نشان داد که سه جمعیت مورد بررسی شباهت ژنتیکی زیادی دارند (بین ۹۲٫۹ تا ۹۶٫۲ درصد). کمترین فاصلهٔ ژنتیکی (۳٫۹ درصد) بین دو جمعیت بندرگز و سیسنگان و بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی (۷٫۴ درصد) بین جمعیت قرن‌آباد و سیسنگان مشاهده شد. این نتیجه با تجزیهٔ خوشه‌ای به‌روش UPGMA نیز تأیید شد. بررسی تعادل ژنتیکی هاردی-واینبرگ نشان داد که به‌طور کلی جمعیت‌های مورد بررسی در اکثر لوکوس‌ها در وضعیت تعادل ژنتیکی قرار دارند. البته در مورد تعدادی از لوکوس‌ها در برخی جمعیت‌ها یا در هر سه جمعیت، تعادل آللی وجود نداشت. بیشترین عدم تعادل ژنتیکی مربوط به جمعیت قرن‌آباد گرگان بود، زیرا احتمالاً در حال از دست دادن ذخایر توارثی خود است که لزوم تبدیل این جمعیت را به ذخیره‌گاه گوشزد می‌کند. در مجموع با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان بیان داشت که نشانگرهای RAPD برای بررسی ژنتیک جمعیت گونهٔ شمشاد در جنگل‌های شمال کشور کارامد است.

واژه‌های کلیدی: شمشاد، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD، شمال ایران.

*نویسندهٔ مسئول: تلفن: ۰۹۳۵ ۳۴۴۱۴۶۷ Email: v.ghandehary@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه و هدف

حفاظت منابع ژنتیکی درختان جنگلی با هدف حفظ تنوع ژنتیکی باقی‌مانده در درون جمعیت‌ها، بیش از هر چیز به آگاهی از الگوی این تنوع ژنتیکی در بین و درون جمعیت‌ها نیاز دارد (Saenz-Romero *et al*., 2006). پایداری اکوسیستم‌ها به تنوع ژنتیکی موجود در گونه‌ها و نیز الگوی این تنوع ژنتیکی بستگی زیادی دارد (Ziehe & Muller-Starck, 1991). از طرفی انتخاب جمعیت‌ها یا توده‌هایی که تنوع ژنتیکی بیشتری دارند، برای حفاظت ژنتیکی مناسب خواهد بود، زیرا به‌واسطهٔ تغییرات اقلیمی در سطح جهان، درختان در اثر حوادث طبیعی حاد مثل سیل یا خشکی در معرض تهدید هستند و تنها جمعیت‌های گیاهی دارای تنوع ژنتیکی بیشتر می‌توانند در مقابل این عوامل مقاومت کنند (Ngulube *et al*., 1997; Greet *et al*., 1998) و از آنجا که ازدست‌رفتن تنوع ژنتیکی معمولا آثار زیان‌آوری بر قابلیت و توانایی گونه‌ها به‌جا می‌گذارد، ممکن است بقای جمعیت‌ها را تهدید کند (Malone *et al*., 2003; Reed & Frankham, 2003). نشانگرهای RAPD (DNA چندشکل حاصل از تکثیر تصادفی[1]) اولین نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR بودند که با هدف نقشه‌یابی ژنتیکی و انگشت‌نگاری DNA ابداع شدند. از این نشانگرها در نقشه‌یابی ژنتیکی، انگشت‌نگاری ژنومی و بررسی تنوع ژنتیکی، بسیار استفاده شده است، زیرا ایجاد آنها به‌نسبت ساده است و به دانستن توالی برای طراحی آغازگر نیازی نیست (Welsh & Mcclelland, 1990). همچنین به استفاده از مواد رادیواکتیو نیاز ندارد و برای انجام دادن آن مقدارکمی DNA ژنومی کافی است. این روش با وجود تکرارپذیری کم، یکی از روش‌های معمول تعیین تنوع ژنتیکی است (Simmons *et al*., 2006).

در گذشته تحقیقات اندکی بر روی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنگلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام گرفته است (Jiang *et al*., 1998; Arcade *et al*., 2000). اما در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی با هدف پژوهش بر روی تنوع ژنتیکی، ساختار جمعیت و تمایز آن، جریان ژن و تکامل نژادی توسعه یافته است (Wang & Szmidt, 2001) و در این میان شماری از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR نظیر RAPD و ISSR (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده[2]) به‌طور گسترده در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، بدون اینکه محدودیت نشانگرهای آلوزایمی را داشته باشند، به‌کار گرفته شده‌اند (Esselman *et al*., 1999; Rossetto *et al*., 1999; Tani *et al*., 1998). از آن جمله می‌توان به استفاده از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی در سطح دنیا بر روی گونه‌هایی نظیر توس *Betula alnoides* (Zeng *et al*., 2003)، *Araucaria bidwillii* (Pye & Gadek, 2004)، جنس تمشک *mulberry* (Kawasthi *et al*., 2004)، *Pinus mugo* (Monteleone *et al*., 2006)، پیسهآ *Picea likiangensis* (Peng *et al*., 2007)، شمشاد *Buxus Sinica* Var *parvifoli* (Huang *et al*., 2008)، بارانک *Sorbus torminalis* (Belletti *et al*., 2008)، کاج‌های سفید مکزیکی (Castro-Felix *et al*., 2008)، کهور *Prosopis chilensis* (Ferreyra *et al*., 2010) و بید معمولی *Salix viminalis* L. (Przyborowski & Sulima, 2010) اشاره کرد. در ایران پژوهش‌های تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD در بخش جنگل بسیار محدود است که در این میان می‌توان به بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های سرو کوهی پارک ملی تندوره (کرمانی و همکاران، ۱۳۸۹) و پژوهش تنوع ژنتیکی نارون از نواحی مختلف شهر اصفهان (سید طباطبایی و همکاران، ۱۳۸۶) اشاره کرد. تحقیق حاضر که به گمان نویسندگان نخستین پژوهش در ایران است، با هدف بررسی مقدار تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گونهٔ شمشاد با استفاده از نشانگر RAPD انجام گرفت و از آنجا که گونهٔ شمشاد، از گونه‌های بومی شمال کشور و در معرض خطر است، اهمیت ضرورت اجرای این تحقیق دوچندان است.

1- Random Amplification Polymorphic DNA

2- Inter Simple Sequence Repeat

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

برای اجرای این تحقیق، سه جمعیت شمشاد شمال کشور شامل دو ذخیره‌گاه حفاظت‌شده (چشمه‌بلبل بندرگز در استان گلستان و پارک سیسنگان نوشهر در استان مازندران) و جمعیت شمشاد قرن‌آباد گرگان در استان گلستان در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری از برگ سرشاخه‌های جوان درختان با ظاهر سالم و ارتفاع تاج یکسان، در اوایل اردیبهشت ۱۳۸۹ از مناطق مورد بررسی و با انتخاب ۲۰ پایه به‌طور تصادفی در هر منطقه صورت گرفت. هر چند فاصلهٔ درختان از الگوی خاصی پیروی نمی‌کرد، متوسط فاصله حدود ۱۵ متر بود. به‌منظور استخراج DNA و تعیین تنوع ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی RAPD، برگ‌های جمع‌آوری‌شده از هر پایه درون کاغذ آلومینیوم در داخل تانک ازت مایع قرار داده شد و به آزمایشگاه انتقال یافت و تا مرحلهٔ استخراج در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

در مرحلهٔ استخراج DNA، ابتدا نمونه‌های برگی مناطق مورد بررسی با استفاده از ازت در ظروف چینی ضدعفونی‌شده کوبیده شد و برگ‌های پودرشدهٔ مربوط به هر پایه در تیوب‌هایی کدگذاری‌شده ریخته شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. در این تحقیق استخراج DNA با استفاده از کیت دنانوکلئیک (DenaNucleic Kit؛ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) بر پایهٔ روش پیشنهادی Ahmadikhah (2009) به شرح زیر انجام گرفت.

اجزای کیت شامل بافر ۱ (DNA NUC 1) و بافر ۲ (DNA NUC 2) بود. ابتدا در یک تیوب ۲ میلی‌لیتری، ۱۵۰-۷۰ میلی‌گرم نمونهٔ بافت پودرشده و ۵۰۰ میکرولیتر بافر DNA NUC 1 اضافه شد. سپس نمونه‌ها به‌وسیلهٔ استیرر، به‌مدت یک دقیقه به‌خوبی هموژنیزه شد و به‌مدت ۴۰-۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (بن ماری) با دمای ۶۵-۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده و هر پنج دقیقه یک‌بار تیوب‌ها به آرامی سر و ته شد. نمونه‌ها از بن‌ماری خارج و ۲۰۰ میکرولیتر بافر DNA NUC 2 به آنها اضافه شد و مجدداً در بن‌ماری (۶۵-۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد) به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. پس از خارج کردن نمونه‌ها از بن‌ماری، در زیر هود از محلول ۲۴:۱ کلروفورم:ایزوآمیل الکل به مقدار ۰/۷ حجم نمونه به تیوب اضافه و سپس چند بار تیوب به آرامی سر و ته شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام گرفت. در مرحلهٔ بعد، مایع رویی با سمپلر مناسب به تیوب جدید انتقال یافت و ۰/۷ حجم مایع برداشته شد و به آن ایزوپروپانل سرد (۴ درجهٔ سانتی‌گراد) اضافه و مخلوط شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ صورت گرفت و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب باقی‌مانده دو بار با ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۹۶ درصد شست‌وشو شد و در نهایت نمونه‌ها در آون فن‌دار در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه خشک شد. سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در یخچال به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد.

کیفیت DNA به‌وسیلهٔ الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین و در زیر نور فرابنفش در دستگاه UV trans-illuminator مشاهده شد. کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت هر نمونه در حد ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر تنظیم شد. سپس نمونه‌ها تا زمان استفاده در واکنش PCR در فریزر ۲۰- (درجهٔ سانتی‌گراد) ذخیره شد. برای بررسی واکنش RAPD-PCR از ۱۷ آغازگر RAPD استفاده شد که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است. واکنش‌های PCR در دستگاه ترمال سایکلر شرکت PeqLab انجام گرفت. پروفیل حرارتی PCR برای آغازگرهای RAPD به‌صورت زیر بود:

۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و سرانجام ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توالی آغازگرهای RAPD استفاده‌شده در این تحقیق

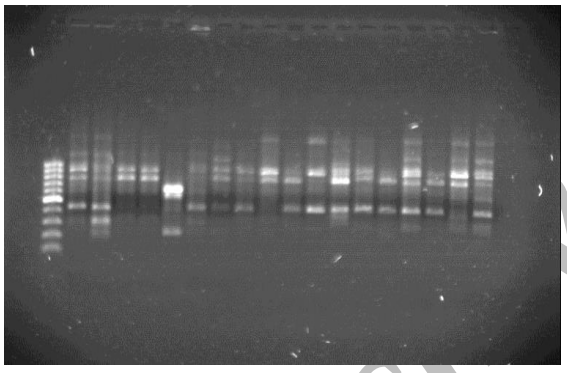
ردیف	نام آغازگر	توالی (۵.....۳)
۱	OPA02	TGCCGAGCTG
۲	OPA04	AATCGGGCTG
۳	OPA09	GGGTAACGCC
۴	OPB03	CATCCCCCTG
۵	OPB05	TGCGCCCTTC
۶	OPB07	GGTGACGCAG
۷	OPB09	TGGGGGACTC
۸	OPB10	CTGCTGGGAC
۹	OPC01	TTCGAGCCAG
۱۰	OPC03	GGGGGTCTTT
۱۱	OPC05	GATGACCGCC
۱۲	OPD01	ACCGCGAAGG
۱۳	OPD02	GGACCCAACC
۱۴	OPD03	GTCGCCGTCA
۱۵	OPD05	TGAGCGGACA
۱۶	OPD06	ACCTGAACGG
۱۷	OPD07	TTGGCACGGG

برای تهیهٔ مخلوط واکنش‌های PCR از کیت شرکت سیناکلون (PCR master mix kit) استفاده شد. مواد مورد استفاده در یک واکنش PCR (۶ میکرولیتر PCR Master Mix، ۰/۲ میکرولیتر آغازگر، یک میکرولیتر DNA، ۴/۸ میکرولیتر H_2O) با هم ترکیب شد. پس از تکثیر، فرآورده‌های PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با ولتاژ ۱۱۴ ولت الکتروفورز شد. پس از پایان الکتروفورز عکس‌برداری از ژل‌ها با دستگاه UV trans-illuminator انجام گرفت.

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های مولکولی، امتیازدهی باندها به‌صورت صفر (نبود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت. با استفاده از نرم‌افزار PopGene Version 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) تعداد و درصد نشانگرهای چندشکل، مقدار اطلاعات چندشکلی هر آغازگر (PIC)، تنوع ژنتیکی نئی[1] (h)، شاخص شاخص شانون[2] (I)، فاصلهٔ ژنتیکی نئی (D)، تنوع ژنتیکی کل (Ht)، تنوع بین جمعیت‌ها (Gst)، تنوع درون جمعیت‌ها (Hst) و مقدار جریان ژن بین جمعیت‌ها (Nm) محاسبه شد. از نرم‌افزار Ntsys Version PC-2.02e برای تجزیهٔ خوشه‌ای نمونه‌های داخل رویشگاه‌های مورد بررسی استفاده شد. اعتبارسنجی روش‌های مختلف تجزیهٔ خوشه‌ای بر اساس ضریب کوفنتیک (Sokal & Rohlf; 1994) با نرم‌افزار یادشده انجام گرفت.

نتایج

از ۱۷ آغازگر RAPD مورد استفاده، ۱۳ آغازگر هیچ تکثیری نشان ندادند یا تکثیر ضعیفی نشان دادند و تنها ۴ آغازگر (۲۰ درصد) OPA04، OPA09، OPB10 و OPC05 توانستند الگوی باندهی قابل امتیازدهی تولید کنند. نمونه‌ای از الگوی الکتروفورزی یکی از این آغازگرها در شکل ۱ نشان داده شده است. آغازگر OPB10 کمترین تعداد باند (۵ عدد) و OPA09 بیشترین تعداد باند (۱۳ عدد) را تولید کردند (جدول ۲). برای این چهار آغازگر، در مجموع ۳۹ باند امتیازدهی شد که ۳۷ عدد (۹۴/۸۷ درصد) آنها چندشکلی نشان دادند.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی آغازگر OPC05 در نمونه‌های جمعیت شمشاد در ذخیره‌گاه بندرگز

جدول ۲- تعداد باند تولیدشده به ازای هر آغازگر RAPD و مقدار عددی PIC آنها

نام آغازگر	تعداد باند تولیدشده	تعداد باندهای چندشکل	مقدار PIC (درصد)
OPA04	۱۰	۸	۳۶/۷
OPA09	۱۳	۱۳	۲۸/۶
OPB10	۵	۵	۳۱/۳
OPC05	۱۱	۱۱	۳۰/۱
جمع	۳۹	۳۷	-
متوسط	۸/۵	٪۹۴/۸۷	۳۱/۷

کمترین و بیشترین اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌ترتیب برای آغازگر OPA09 (۲۸/۶ درصد) و OPA04 (۳۶/۷

1- Nei Genetic Diversity
2- Shannon

Archive of SID

www.SID.ir

درصد) محاسبه شد. متوسط PIC برای این چهار آغازگر ۳۱/۷ درصد به‌دست آمد (جدول ۲). درصد لوکوس‌های چندشکل در سه جمعیت متفاوت بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که بیشترین آن مربوط به جمعیت بندرگز (۷۹/۴۹ درصد) و کمترین آن مربوط به جمعیت قرن‌آباد گرگان (۶۶/۶۷ درصد) بود. متوسط تنوع ژنتیکی نئی، ۲۹/۱۴ درصد و متوسط شاخص تنوع شانون، ۴۴/۸۷ درصد محاسبه شد. بیشترین تنوع ژنتیکی نئی و شانون مربوط به جمعیت سیسنگان نوشهر بود (جدول ۳).

جدول ۳- درصد لوکوس‌های چندشکل، کمینه، بیشینه و متوسط تنوع ژنی نئی و شاخص اطلاعات شانون در جمعیت‌های مختلف برای نشانگرهای RAPD

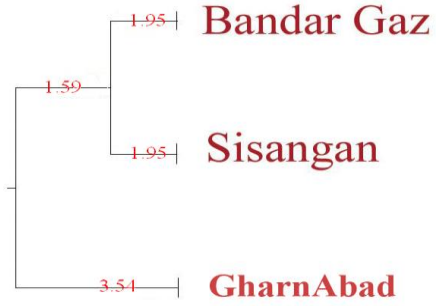
جمعیت	لوکوس‌های چندشکل (درصد)	تنوع ژنی نئی (h) (درصد)			شاخص شانون (I) (درصد)		
		کمینه	بیشینه	متوسط	کمینه	بیشینه	متوسط
بندرگز	۷۹/۴۹	۱۰/۷۸	۴۹/۹۶	۲۷/۲	۲۵/۱۲	۶۷/۲۷	۴۱/۰
سیسنگان نوشهر	۷۶/۹۲	۵/۷۹	۴۹/۶۴	۲۸/۳	۱۳/۴۲	۶۸/۹۸	۴۱/۹
قرن‌آباد گرگان	۶۶/۶۷	۱۰/۷۸	۴۹/۹۰	۲۲/۹	۱۸/۸۲	۶۹/۲۲	۳۴/۳
کل	۹۴/۸۷		۲۹/۱۴			۴۴/۸۷	

براساس ضریب تشابه ژنتیکی نئی، سه جمعیت مورد بررسی شباهت ژنتیکی زیادی داشتند (بین ۹۲/۹ تا ۹۶/۲ درصد) (جدول ۴). کمترین فاصلهٔ ژنتیکی بین دو ذخیره‌گاه بندرگز و سیسنگان نوشهر (۳/۹ درصد) و بیشترین آن، بین جمعیت قرن‌آباد گرگان و سیسنگان نوشهر مشاهده شد (۷/۴ درصد) که تفاوت محسوسی با فاصلهٔ ژنتیکی میان جمعیت بندرگز و قرن‌آباد گرگان (۶/۸ درصد) نشان نداد.

جدول ۴- ضرایب تشابه نئی (مقادیر بیشتر از قطر اصلی) و فاصلهٔ ژنتیکی نئی (مقادیر کمتر از قطر اصلی) بین سه رویشگاه مورد بررسی که از الگوی باندهی آغازگرهای RAPD به‌دست آمده است.

رویشگاه	چشمه‌بلبل بندرگز	سیسنگان نوشهر	قرن‌آباد گرگان
چشمه‌بلبل بندرگز	-	۹۶/۲	۹۳/۴
سیسنگان نوشهر	۳/۹	-	۹۲/۹
قرن‌آباد گرگان	۶/۸	۷/۴	-

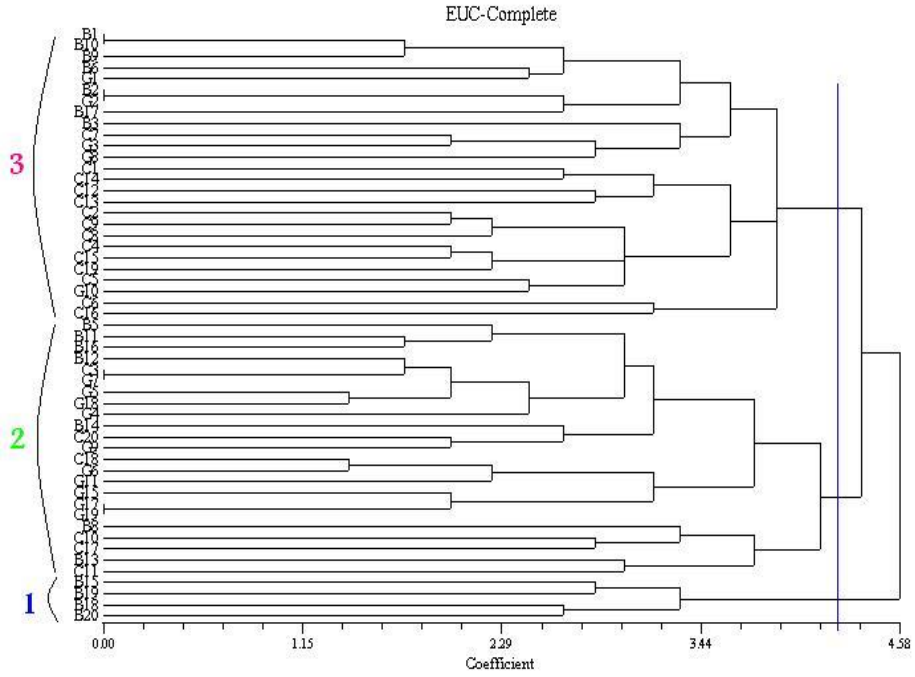
بر اساس تجزیهٔ خوشه‌ای با روش UPGMA، دو جمعیت بندرگز و سیسنگان نوشهر در فاصلهٔ ژنتیکی ۱/۵۹ در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهندهٔ قرابت ژنتیکی بیشتر آنهاست و جمعیت قرن‌آباد گرگان در گروه جداگانه‌ای قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲- گروه‌بندی سه جمعیت مورد بررسی با روش UPGMA بر اساس فاصلهٔ ژنتیکی نئی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- گروه‌بندی نمونه‌های سه جمعیت (بندرگز B، قرن‌آباد G و سیسنگان C) با روش Complete بر اساس ضریب تشابه اقلیدسی

گروه‌بندی بر اساس تنوع درون جمعیتی نیز با استفاده از نشانگرهای RAPD صورت گرفت که در بین ۱۲ روش ترکیبی به‌کاررفته برای گروه‌بندی، روش Complete بر اساس ضریب تشابه اقلیدسی (Euc)، دارای بیشترین ضریب کوفنتیک (۰/۸۱۷) برای گروه‌بندی نمونه‌های سه جمعیت مورد بررسی بود (شکل ۳). همان‌گونه که در شکل دیده می‌شود، نمونه‌های سه جمعیت به سه گروه اصلی ۱، ۲ و ۳ تقسیم شده‌اند. گروه یک فقط از نمونه‌های رویشگاه بندرگز، گروه ۲ بیشتر از نمونه‌های رویشگاه قرن‌آباد و گروه سه نیز بیشتر از نمونه‌های رویشگاه سیسنگان تشکیل شده است، هر چند برخی نمونه‌های رویشگاه بندر گز در دو گروه اخیر پراکنده شده‌اند. بررسی تعادل ژنتیکی هاردی-واینبرگ نشان داد که به‌طور کلی جمعیت‌های مورد بررسی در بیشتر لوکوس‌ها در وضعیت تعادل ژنتیکی قرار دارند؛ البته استثناهایی در مورد برخی لوکوس‌ها وجود داشت (جدول ۵).

جدول ۵- ارزش کای اسکویر به‌عنوان معیار سنجش تعادل ژنی هاردی-واینبرگ در برخی لوکوس‌های نامتعادل

	لوکوس RAPD					
جمعیت	OPA04.4	OPA04.10	OPA09.10	OPA09.12	OPB10.3	OPC05.5
بندرگز	۶/۸۹*	۳/۹۹*	۰/۵۷	۳/۲۳*	۱/۳۵	۱/۶۹
سیسنگان	۲/۷۳	۳/۹۹*	۶/۹۵*	۰/۰۱۳	۱/۲۷	۴/۸۱*
قرن‌آباد گرگان	۱/۶۰	۲۷/۱*	۵/۶۳*	۳/۶۴*	۸/۶۴*	۱/۳۱

*: نبود تعادل ژنی در آن جمعیت در لوکوس مربوط

میانگین ضریب تنوع ژنی کل (Ht) ۲۹/۰۲ درصد و میانگین سهم ضریب تنوع ژنی درون جمعیتی (Hs) و تفاوت ژنتیکی بین جمعیتی (Gst) به‌ترتیب ۲۶/۱۱ (۹۰ درصد از تنوع ژنی کل) و ۱۰ درصد برآورد شد. میانگین تعداد ژن تبادل‌یافته بین جمعیت‌های مورد بررسی (Nm) ۴/۵ ژن به ازای هر پایهٔ استقراریافتهٔ جدید برآورد شد (جدول ۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- پارامترهای مربوط به تنوع ژنی کل (Ht)، تنوع ژنتیکی درون جمعیتی (Hs)، تنوع ژنی بین جمعیتی (Dst)، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) و تعداد ژن تبادل‌یافته در یک دورهٔ زمانی معین (Nm) در لوکوس‌های نشانگری چندشکل

لوکوس نشانگری	Ht	Hs	Dst	Gst	Nm
OPA04.1	۰٫۲۵۷۴	۰٫۲۴۱۳	۰٫۰۱۶۱	۰٫۰۶۲۶	۷٫۴۸۱۹
OPA04.4	۰٫۲۱۰۳	۰٫۱۵۳۳	۰٫۰۵۷۱	۰٫۲۷۱۳	۱٫۳۴۳۲
OPA04.5	۰٫۳۲۵۲	۰٫۳۱۸۹	۰٫۰۰۶۴	۰٫۰۱۹۶	۲۵٫۰۰۰۹
OPA04.6	۰٫۲۰۰۴	۰٫۱۹۲۴	۰٫۰۰۸	۰٫۰۴۰۱	۱۱٫۹۸۳۳
OPA04.7	۰٫۴۹۶۳	۰٫۴۷۶	۰٫۰۲۰۲	۰٫۰۴۰۸	۱۱٫۷۴۳۳
OPA04.8	۰٫۲۰۲۷	۰٫۱۸۹۴	۰٫۰۱۳۳	۰٫۰۶۵۵	۷٫۱۲۹
OPA04.9	۰٫۲۸۲	۰٫۲۴۸۵	۰٫۰۳۳۵	۰٫۱۱۸۹	۳٫۷۰۵۸
OPA04.10	۰٫۳۹۶۲	۰٫۰۹۹۹	۰٫۲۹۶۳	۰٫۷۴۷۹	۰٫۱۶۸۶
OPA09.1	۰٫۰۹۱۲	۰٫۰۸۲	۰٫۰۰۹۲	۰٫۱۰۰۶	۴٫۴۷۱
OPA09.2	۰٫۰۹۱۲	۰٫۰۸۲	۰٫۰۰۹۲	۰٫۱۰۰۶	۴٫۴۷۱
OPA09.3	۰٫۰۹۱۲	۰٫۰۸۲	۰٫۰۰۹۲	۰٫۱۰۰۶	۴٫۴۷۱
OPA09.4	۰٫۴۰۹۸	۰٫۳۷۶۲	۰٫۰۳۳۶	۰٫۰۸۱۹	۵٫۶۰۶۲
OPA09.5	۰٫۲۸۲۹	۰٫۲۷۱۷	۰٫۰۱۱۱	۰٫۰۳۹۴	۱۲٫۱۷۸۳
OPA09.6	۰٫۲۶۶۳	۰٫۲۶۲۳	۰٫۰۰۴	۰٫۰۱۵	۳۲٫۹۳۳
OPA09.7	۰٫۰۵۹۸	۰٫۰۵۶	۰٫۰۰۳۸	۰٫۰۶۳۶	۷٫۳۵۶۸
OPA09.8	۰٫۱۲۹۱	۰٫۱۲۸۴	۰٫۰۰۰۷	۰٫۰۰۵۵	۹۱٫۱۰۲۲
OPA09.9	۰٫۴۱۸۱	۰٫۴۱۶۲	۰٫۰۰۱۹	۰٫۰۰۴۵	۱۰۹٫۷۴۴۳
OPA09.10	۰٫۴۱۷۸	۰٫۲۷۸۳	۰٫۱۳۹۵	۰٫۳۳۳۹	۰٫۹۹۷۵
OPA09.11	۰٫۴۸۶	۰٫۴۵۵۱	۰٫۰۳۰۹	۰٫۰۶۳۶	۷٫۳۶۵۹
OPA09.12	۰٫۳۵۴۱	۰٫۲۸۷۳	۰٫۰۶۶۸	۰٫۱۸۸۷	۲٫۱۴۹۵
OPA09.13	۰٫۴۹۹۸	۰٫۴۸۸۶	۰٫۰۱۱۱	۰٫۰۲۲۳	۲۱٫۹۳۳۸
OPB10.1	۰٫۳۶۳۶	۰٫۳۴۴۴	۰٫۰۱۹۲	۰٫۰۵۲۹	۸٫۹۵۸۶
OPB10.2	۰٫۴۸۹۸	۰٫۴۸۳۷	۰٫۰۰۶۱	۰٫۰۱۲۵	۳۹٫۵۷۱۷
OPB10.3	۰٫۱۸۸۶	۰٫۱۴۴۲	۰٫۰۴۴۵	۰٫۲۳۵۷	۱٫۶۲۱۷
OPB10.4	۰٫۲۲۸۸	۰٫۲۰۴۵	۰٫۰۲۴۳	۰٫۱۰۶۲	۴٫۲۱۰۱
OPB10.5	۰٫۴۹۶۸	۰٫۴۹۶۱	۰٫۰۰۰۶	۰٫۰۰۱۳	۳۸۹٫۴۴۴۹
OPC05.1	۰٫۴۹۳۴	۰٫۴۸۷	۰٫۰۰۶۴	۰٫۰۱۲۹	۳۸٫۱۷۶۳
OPC05.2	۰٫۴۴۱۷	۰٫۴۳۵۹	۰٫۰۰۵۸	۰٫۰۱۳۱	۳۷٫۶۶۳۹
OPC05.3	۰٫۲۷۴	۰٫۲۶	۰٫۰۱۴	۰٫۰۵۱۱	۹٫۲۹۲۷
OPC05.4	۰٫۴۹۹۸	۰٫۴۸۶۲	۰٫۰۱۳۶	۰٫۰۲۷۲	۱۷٫۸۴۹
OPC05.5	۰٫۱۴۱۲	۰٫۱۱۷۹	۰٫۰۲۳۴	۰٫۱۶۵۶	۲٫۵۱۹۲
OPC05.6	۰٫۳۷۸۲	۰٫۳۱۱۲	۰٫۰۶۷	۰٫۱۷۷۲	۲٫۳۲۱۷
OPC05.7	۰٫۱۷۷۸	۰٫۱۷۷۴	۰٫۰۰۰۴	۰٫۰۰۲۵	۲۰۳٫۴۳۷
OPC05.8	۰٫۴۶۷۱	۰٫۴۱۸	۰٫۰۴۹۱	۰٫۱۰۵۱	۴٫۲۵۷۷
OPC05.9	۰٫۱۴۵۶	۰٫۱۳۸۶	۰٫۰۰۷	۰٫۰۴۷۸	۹٫۹۶۵۳
OPC05.10	۰٫۳۳۴۸	۰٫۲۷۸۹	۰٫۰۵۵۸	۰٫۱۶۶۸	۲٫۴۹۷۴
OPC05.11	۰٫۲۲۷۱	۰٫۲۱۴۸	۰٫۰۱۲۳	۰٫۰۵۴	۸٫۷۵۶۴
میانگین	۰٫۲۹۰۲	۰٫۲۶۱۱	۰٫۰۲۹	۰٫۱۰	۴٫۵۰۰۹

بحث

در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای RAPD، حد تنوع بین و درون جمعیت‌های طبیعی شمشاد شمال کشور بررسی شد. نشانگرهای RAPD مورد استفاده، ۹۴٫۸۷ درصد چندشکلی نشان دادند که در مقایسه با دیگر تحقیق‌ها به‌نسبت زیاد است. برای مثال، درصد چندشکلی به‌دست‌آمده در تحقیق مشابهی (Huang *et al*., 2008) که روی شش جمعیت شمشاد *Buxus sinica* var. *parvifoli* با استفاده از ۲۱ نشانگر RAPD انجام گرفت، ۷۹٫۹۰ درصد بود. Ge (1988) میانگین چندشکلی را در ۲۴ گونه از خانوادهٔ مخروطیان شامل نراد، لاریکس، پیسه آ، کاج و نوش، ۶۱٫۶ درصد گزارش کرد.

میانگین شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC) آغازگرها در تحقیق حاضر ۳۱٫۷ درصد بود. با توجه به اینکه مقادیر

Archive of SID

www.SID.ir

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) سیستم‌های نشانگری غالب مانند RAPD از صفر تا ۰/۵ متغیر است و بزرگ‌تر بودن این عدد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت مورد بررسی است (فابریکی اورنگ و همکاران، ۱۳۸۸)، در این پژوهش محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بیشتر آغازگرهای مورد استفاده، عدد بزرگی بود که نشان‌دهندهٔ انتخاب صحیح و کارایی زیاد این آغازگرهاست.

شاخص‌های دیگر محاسبه‌شده در این تحقیق، شاخص‌های تنوع ژنی نئی و شانون بود. تنوع ژنی کل ۲۹/۱۴ درصد براساس شاخص نئی و ۴۴/۸۷ درصد براساس شاخص شانون، محاسبه شد. بر اساس فرمول Nei (1978) حداکثر تنوع ژنتیکی قابل محاسبه برای نشانگرهای غالب ۵۰ درصد است. مقدار به‌دست‌آمده در این تحقیق، حدود ۵۸/۳ درصد از حداکثر تنوع ژنتیکی قابل محاسبه بود که نشان می‌دهد در مجموع تنوع ژنتیکی مطلوبی در جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد. پژوهش‌های کم‌تعدادی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جنس شمشاد *Buxus sp.* و گونه‌های آن انجام گرفته است. در بررسی Huang *et al.* (2008) بر روی جمعیت‌های شمشاد *B. sinica* var *parvifoli*، تنوع ژنتیکی با استفاده از شاخص شانون ۴۳/۴۳ درصد (با نشانگر RAPD) به‌دست آمد که از مقدار محاسبه‌شده در این تحقیق اندکی کمتر است. در بررسی Peng *et al.* (2007) بر روی جمعیت‌های *Picea likiangensis* با استفاده از نشانگرهای RAPD، شاخص تنوع شانون در محدودهٔ ۲۶/۷ تا ۴۲/۱ درصد و تنوع ژنی نئی در محدودهٔ ۱۷/۹ تا ۲۸/۹ درصد قرار داشت که از تنوع به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر کمتر است. بیشتر بودن تنوع ژنتیکی به‌دست‌آمده در تحقیق حاضر در مقایسه با تحقیق‌های یادشده ممکن است به دو دلیل ۱) شرایط محیطی بهتر برای رشد و نمو شمشاد و ۲) جریان ژنی زیاد بین پایه‌ها باشد. شکی نیست که شرایط اقلیمی در شمال کشور برای رشد و نمو شمشاد مناسب است، اما در خصوص جریان ژنی زیاد، همان‌طورکه نتیجهٔ محاسبات نشان داد، حدود ۴/۵ ژن به ازای هر پایهٔ استقراریافته جدید بوده است (جدول ۶). با توجه به اینکه شمشاد گیاه آزاد گرده‌افشان است (مظفریان، ۱۳۸۳) و از طرفی اندازهٔ ژنوم آن ۷۰۶/۶ مگا جفت باز و تعداد ژن‌های منحصر بفرد آن حدود ۷۰۰۰۰ ژن تخمین زده می‌شود (Van Laere *et al.*, 2011)، براساس نظر Lynch & Milligan (1994) اگر طول فاصلهٔ نسلی ۱۰ سال در نظر گرفته شود، برای اینکه جمعیت‌های استقراریافتهٔ نهایی مبادلهٔ ژنی ۱۰ درصدی را تجربه کنند (زیرا براساس محاسبات مندرج در جدول ۶ فقط در ۱۰ درصد ژن‌های خود تفاوت دارند)، حدود ۱۵۵۰۰ سال زمان نیاز است که از دیدگاه تکاملی زمان زیادی به‌حساب نمی‌آید. بنابراین مشاهده می‌شود که این مقدار جریان ژن در روند تکامل شمشاد، سبب تحلیل تفاوت‌های ژنتیکی بین این جمعیت‌ها شده است و اگر همین روند جریان ژن ادامه داشته باشد، انتظار می‌رود پس از ۱۵۵۰۰ سال، تفاوت ژنتیکی بین جمعیتی به کلی تحلیل رود و به شرط حفاظت از رویشگاه‌ها، احتمالاً تفاوت درون جمعیتی تنها منبع تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های شمشاد خزری خواهد بود.

در این تحقیق بیشترین تشابه ژنتیکی با نشانگرهای RAPD بین ذخیره‌گاه بندرگز و سیسنگان نوشهر، و بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی (۷/۴ درصد) بین جمعیت قرن‌آباد گرگان و سیسنگان نوشهر دیده شد که تفاوت محسوسی با فاصلهٔ ژنتیکی دو جمعیت سیسنگان نوشهر و بندرگز (۶/۸ درصد) نداشت. البته در کل نمی‌توان گفت این فواصل ژنتیکی زیاد است، اما نکتهٔ شایان ذکر این است که دو جمعیت قرن‌آباد گرگان و سیسنگان نوشهر از نظر جغرافیایی فاصلهٔ بیشتری (حدود ۲۸۰ کیلومتر) از هم دارند و به‌نظر می‌رسد موانع اکولوژیکی، جریان ژن بین این جمعیت‌ها را نسبت به دو جمعیت سیسنگان نوشهر و بندرگز اندکی بیشتر محدود می‌کند، هر چند نمی‌توان همهٔ تفاوت‌های بین‌جمعیتی را به فاصلهٔ جغرافیایی ربط داد. 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 خواهند شد و با تجمع این تفاوت‌های بین‌جمعیتی طی تکامل، گونهٔ جدیدی خلق خواهد شد. اما اگر مبادلهٔ ژن بین دو جمعیت بیشتر باشد (مثلا از طریق انتشار دانهٔ گرده یا بذر از یکی به دیگری و برعکس)، به مرور زمان این دو جمعیت شباهت بیشتری خواهند یافت (Hartel & Clarck, 1994). شاید یکی از دلایل تفاوت ژنتیکی متوسط میان سه رویشگاه مورد بررسی،

Archive of SID

www.SID.ir

همین جریان زیاد ژن باشد. در عین حال که تنوع درون جمعیتی در حد قابل قبولی حفظ شد، جریان زیاد ژن، تشابه جمعیت‌ها را زیاد کرده است. بی‌تردید برای ایجاد این‌گونه جریان ژنی، انتقال بذر را نمی‌توان عامل مهمی به حساب آورد، بلکه باید بیشتر بر انتشار دانهٔ گرده تمرکز کرد، به‌ویژه اینکه شمشاد نوعی گیاه آزاد گرده‌افشان است و چگونگی انتشار دانهٔ گرده به دوردست را باید در آینده بررسی کرد. البته اشتقاق از یک نیای مشترک در زمان‌های نه چندان دور و سپس ادامهٔ حیات در شرایط اقلیمی مشابه، ممکن است از دیگر دلایل شباهت زیاد دو جمعیت باشد (Hartel & Clarck, 1994). شرایط اقلیمی در هر سه منطقه، تقریباً مشابه و برای حیات گونهٔ شمشاد مناسب است، اما نقش دو عامل دیگر (جریان ژنی و اشتقاق از نیای مشترک در زمان‌های نزدیک) ناشناخته است و باید در آینده با بررسی‌های دوره‌ای (نمونه‌گیری در فواصل زمانی ده تا بیست ساله) ارزیابی شود.

تنوع ژنی کل حدود ۲۹ درصد برآورد شد (جدول ۶)، ولی تنها ۱۰ درصد آن مربوط به تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst) بود که در حد متوسطی است، یعنی تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی به‌نسبت کم است (Lynch & Milligan, 1994)، زیرا اگر تنوع بین‌جمعیتی در محدودهٔ ۱۵-۵ درصد باشد، باید آن را مقدار متوسطی در نظر گرفت (Anonymous, 2003). بنابر نظر Hamrick *et al.* (1991) اکثر گونه‌های گیاهی از لحاظ تنوع بین‌جمعیتی در وضعیتی بینابین قرار دارند. از طرفی، میانگین تفاوت ژنتیکی درون جمعیت‌ها حدود ۲۶٫۱ درصد (۹۰ درصد از تنوع ژنتیکی کل) برآورد شد (جدول ۶) که نشان می‌دهد سهم تنوع ژنتیکی درون جمعیتی، بیشتر از سهم تفاوت‌های ژنتیکی بین‌جمعیتی در تنوع ژنتیکی کل است. توزیع تنوع ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌های یک گونه با خصوصیات تاریخی حیاتی به‌ویژه جریان ژن و نحوهٔ تولید مثل مرتبط است و گونه‌هایی که ژن‌های خود را پراکنده می‌کنند (مانند گیاهان که با تولید دانهٔ گرده و بذر این عمل را انجام می‌دهند)، تفاوت بین جمعیتی (Gst) کمی دارند و به‌عبارتی تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های آنها اندک است (Hamrick *et al.*, 1979). حتی مقدار متوسطی از جریان ژن میان جمعیت‌ها می‌تواند سبب ارتباط مخازن ژنی دو جمعیت شود و به مرور زمان تفاوت ژنتیکی جمعیت‌ها را به حداقل برساند (Hamrick, 1989). در پژوهش Belaid *et al.* (2006) بر روی گونه‌های جنس *Lathyrus* با استفاده از نشانگرهای ISSR، سهم تنوع درون جمعیتی در تنوع کل بیشتر از تنوع بین‌جمعیتی برآورد شد که نشان می‌دهد بیشتر تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع درون جمعیتی است. همچنین، در پژوهش Datta *et al.* (2010) با استفاده از سه سیستم نشانگری RAPD، ISSR و SSR بر روی دو جنس از تیرهٔ حبوبات، سهم تنوع ژنتیکی بین جنس‌ها بسیار کمتر از تنوع ژنتیکی درون جنس‌ها به‌دست آمد که نشان می‌دهد حتی در سطح جنس هم تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها، بیشتر از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌هاست. نتایج تحقیق حاضر به نوعی با این تحقیقات تطابق دارد. با توجه به تشدید تخریب منابع جنگلی در سال‌های اخیر، باید به جمعیت‌های موجود از نظر حفاظت ژنتیکی توجه بیشتری شود تا به مرور زمان از تنوع ژنتیکی بین و درون آنها کاسته نشود، زیرا از دست دادن تنوع ژنتیکی ممکن است به کاهش توانایی گونه نسبت به سپری کردن تغییرات محیطی و تغییر جمعیت‌ها در کوتاه‌مدت و طولانی‌مدت منجر شود (Reed & Ellstrand & Elam, 1993; Frankham, 2003). همان‌گونه که در بخش نتایج دیده شد، نمونه‌های داخل سه جمعیت به سه گروه اصلی تقسیم شد (شکل ۳) و هر گروه منحصراً یا عمدتاً از نمونه‌های یک رویشگاه خاص تشکیل شده بود که نشان‌دهندهٔ توانایی نشانگر مولکولی RAPD در تفکیک به‌نسبت مطلوب پایه‌های داخل هر جمعیت از یکدیگر و نیز از پایه‌های جمعیت‌های دیگر است. بیشترین عدم تعادل ژنی مربوط به جمعیت قرن‌آباد گرگان برآورد شد که شاید یکی از علل آن تخریب شدیدتر جنگل‌ها و ازدست‌رفتن ذخایر توارثی گونهٔ شمشاد در این منطقه باشد؛ با توجه به اینکه این ناحیه برخلاف دو ناحیهٔ دیگر جزو ذخیره‌گاه‌های حفاظت‌شده نیست، مورد تعرض بیشتری قرار می‌گیرد و بنابراین چنین نتیجه‌ای با واقعیت تطابق دارد و می‌توان انتظار داشت که این ناحیه به مرور زمان ذخایر توارثی خود را از دست دهد، مگر اینکه این جمعیت به‌عنوان ذخیره‌گاه معرفی شود تا از آن حفاظت لازم صورت گیرد. در مجموع با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان گفت

Archive of SID

www.SID.ir

نشانگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و ژنتیک جمعیت گونهٔ شمشاد در جنگل‌های شمال کشور کارامد است.

منابع

سید طباطبایی، بدرالدین ابراهیم، مهدی رحیم ملک، مجید طالبی بداف، احد یامچی، نعمت‌اله اعتمادی و مصطفی مبلی، ۱۳۸۶. ارزیابی گوناگونی ژنتیکی ژنوتیپ‌های نارون اصفهان با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR، مجلهٔ علوم و فنون باغبانی ۴: ۲۲۴-۲۱۳.

فابریکی اورنگ، صدیقه، مسعود شمس بخش، مختار جلالی جواران و جعفر احمدی، ۱۳۸۸. بررسی تنوع ژنتیکی توده-های بومی خربزهٔ ایرانی (*Cucumis melo L.*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی بین ریزماهواره‌ای (ISSR)، مجلهٔ زیست‌شناسی ایران، ۲۲(۲): ۲۸۱-۲۷۱.

کرمانی، منصوره، سیدحسن مرعشی و فریدون ملتی، ۱۳۸۹. بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های سرو کوهی پارک ملی تندوره با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD، مجلهٔ تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۸(۱): ۱۲۴- ۱۱۵.

مظفریان، ولی‌الله، ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران، فرهنگ معاصر، ۱۰۵۰ص.

Ahmadikhah, A., 2009. A rapid mini-prep DNA extraction method in rice, *African Journal of Biotechnology*, 8(2): 234-238.

Anonymous, C., 2003. Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module, IPGRI and Cornell University, 327 pp.

Arcade, A., F. Anselin, P.F. Rampant, M.C. Lesage, L.E. Paques & D. Prat, 2000. Applicatin of AFLP, RAPD and ISSR Markers to genetic mapping of European and Japanese Larch [J], *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 299-307.

Belaid, Y., N. Chtourou-Ghorbel, M. Marrakchi & N. Trifi-Farah, 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., I. Monteleone & D. Ferrazzini, 2008. A population genetc stady in a scattered forest species, Wild service tree [*Sorbus torminalis* L. crantz], using RAPD markers, *European journal of forest research*, 127(2): 103-114.

Castro-Felix, P., J.A. Rosa, G.V. Amado, S. Velasqnez Magana, A. Santerre, F. Lopez-Dellamary Toral & A.R. Villalobos-Arambula, 2008. Genetic relationships among Mexican White Pines (Pinu, Pinaceae) based on RAPD markers, *Biochemical systematics and Ecology*, 36: 523- 530.

Datta, J., N. Lal, K. Kaashyap & P.P. Gupta, 2010. Efficiency of Three PCR based Marker Systems for Detecting DNA Polymorphism in *Cicer arietinum* L. and *Cajanus cajan* L. Millspaugh, *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 5: 1-15.

Ellstrand, N.C. & D.R. Elam, 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 217-242.

Esselman, E.J., J.Q. Li, D.J. Crawford, J.L. Windus & A.D. Wolfe, 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers, *Molecular Ecology*, 8: 443-451.

Ferreyra, L.I., J.C. Vilardi, D.S. Tosto, N.B. Julio & B.O. Saidman, 2010. Adaptive genetic diversity and population structure of the algarrobo [*Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz] analysed by RAPD and isozyme markers, Eur, *Journal of Forest Research*, 129: 1011-1025.

Ge, S. 1988. Isozymes and studies on population genetic variation in forest trees, *Journal of Nanjing Forestry University*, 1: 68-77.

Greet, B.D., L. Triest, B.D. Cuyper & J.V. Slyckens, 1998. Assessment of intra-specific variation in half-sibs of *Quercus petraea* (Matt) Liebl, plus trees, *Journal of Heredity*, 81: 284-290.

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, 268 pp.

Hamrick, J.L., Y.B. Linhart & J.B. Mitton, 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variance in plants, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10: 173-200.

Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, D.A. Murawski & M.D. Loveless, 1991. Correlation between species traits and allozyme diversity, implications for conservation biology, In: Falk, D.A. 7 Holsinger, K.E. (Eds.), Genetics and conservation of rare plants, Oxford University Press, New York, 255 pp.

Hartel, D.L. & A.G. Clark, 1994. Principles of population genetics, Sinauer Press, Sunderland, 628 pp.

Archive of SID

www.SID.ir

Huang, Y., K.Ji., Z. Jiang & G. Tang, 2008. Genetic structure of *Buxus sinica var. parvifolia*, a rare and endangered plant, *Scientia horticulturae*, 116(3): 324-329.

Jiang, S., Q. Chen & X. Fang, 1998. RAPD and ISSR analysis between photoperiod sensitive genetic male sterile rice Non gken 58s and its original variety Non gken 58 (inchinese), *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8: 63-66.

Kawasthi, A., G.M. Nagaraja, G.V. Naik, S. Kanginakudru, K. Thangavelu & J. Nagaraju, 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus Morus) as revealed by RAPD and ISSR marker assays, *BMC Genetics*, 5: 1-9.

Lynch, M. & B.G. Milligan, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Molecular Ecology*, 3: 91-99.

Malone, C.L., C.R. Knapp, J.F. Taylor & S.K. Davis, 2003. Genetic consequences of Pleistocene fragmentation: isolation, drift, and loss of diversity in rock iguanas (Cyclura), *Conservation Genetics*, 4: 1-15.

Monteleone, I., D. Ferrazzini & P. Belletti, 2006. Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra, *Silva Fennica*, 40(3): 391-406.

Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of Individuals, *Genet*, 89: 583-590.

Ngulube, M.R., J.B. Hall & J.A. Maghembe, 1997. Fruit, seed and seedling variation in *Uapaca kirkiana* from natural populations in Malawi, *Forest Ecology and Management*, 98: 209-219.

Peng, X. L., C.M. Zhao, G.L. Wu & J.Q. Liu, 2007. Genetic variation and phylogeographic history of *Picea likiangensis* revealed by RAPD markers, *Trees*, 21: 457-464.

Przyborowski, J.A. & P. Sulima, 2010. The analysis of genetic diversity of *Salix viminalis* genotypes as a potential source of biomass by RAPD markers, *Industrial Crops and Products*, 31: 395-400.

Pye, G.M. & A.P. Gadek, 2004. Genetic diversity, differentiation and conservation in *Araucaria bidwillii* (Araucariaceae), Australias Bunya pine, *Conservation Genetics*, 5: 619-629.

Reed, D.H. & R. Frankham, 2003. Correlation between fitness and genetic diversity, *Conservation Biology*, 17: 230-237.

Rossetto, M., G. Jezierski, S.D. Hopper & K.W. Dixon, 1999. Conservation genetics and clonality in two critically endangered eucalypts from the highly endemic south-western Australian flora, *Biological Conservation*, 88: 321-331.

Saenz-Romero, C., R. Guzman-Reyna & G.E. Rehfeldt, 2006. Altitudinal genetic variation among Pinus oocarpa populations in Michoacan, Mexico; implications for seed zoning, conservation of forest genetic resources, tree breeding and global warming, *Forest Ecology and Management*, 229: 340-350.

Simmons, M.P., L.B. Zhang, C.T. Webb & K. Muller, 2006. A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42(2): 528-542.

Sokal, R. & J. Rohlf, 1994. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3rd edn.), Freeman & Co, NY., 545 pp.

Tani, N., N. Tomaru, Y. Tsumura, M. Araki & K. Ohba, 1998. Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila* Regel) population on Mt. Aino-Dake in Central Honshu, Japan, *Journal of Plant Research*, 111: 7-15.

Van Laere, K., D. Hermans, L. Leus & J. Van Huylenbroeck, 2011. Genetic relationships in European and Asiatic Buxus species based on AFLP markers, genome sizes and chromosome numbers, *Plant Systematics and Evol*ution, 293: 1-11.

Wang, X.R. & A.E. Szmidt, 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees Scandinavian, *Journal of Forest Research*, 16(3): 199-220.

Welsh, J. & M. Mcclelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research*, 19: 303-306.

Yeh, F.C., R. Yang & T. Boyle, 1999. POPGENE Version 1.32. Microsoft windows based freeware for population genetic analysis, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, 26 pp.

Zeng, J., Y. Zou, J. Bai & H. Zheng, 2003. RAPD analysis of genetic variation in natural populations of *Betula alnoides* from Guangxi, China, *Journal Euphytica*, 134: 33-41.

Ziehe, M. & G. Müller-Starck, 1991. Changes of genetic variation due to associatedselection: 175-189. In: Mueller-Starck, G., Ziehe, M., (Eds), Genetics variation in European populations of forest tress, Sauerla¨nder, Frankfurt, 286 pp.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation of inter- and intra- population genetic diversity of *Buxus hyrcana* in forests of north of Iran using RAPD molecular markers

V. Ghandehari[*1], V. Payamnoor[2], A. Ahmadikhah[3] and M.H. Pahlevani[4]
[1]M.Sc.Gratuate, Faculty of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I. R. Iran
[2]Assistant prof., Faculty of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I. R. Iran
[3]Assistant prof., Faculty of Agricultur, University of Zanjan, I. R. Iran
[4]Associate prof., Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I. R. Iran
(Received: 18 July 2012, Accepted: 31 December 2012)

Abstract
To investigation inter- and intra- population genetic diversity, three natural populations of *Buxus hyrcana* (Pojark.) in north of Iran (viz. Chashmeh Bolbol in Bandar Gaz, Sisangan in Nowshahr and Gharnabad in Gorgan) were investigated using RAPD markers. Results showed that there was a relatively desirable genetic variation among populations, ranging from 22.9% in Gharnabad`s poppulation (Gorgan) to 28.3% in Siasngan`s population (Nowshahr); Contribution of intra-population gene diversity in overall genetic diversity was estimated higher than inter-population gene diversity (90% vs. 10%). Also Investigation of Nei's genetic similarity coefficient showed that three studied populations had a high genetic similarity (between 92.9 to 96.2%). Least and highest genetic distances (3.9% and 7.4%, respectively) were observed between Bandar Gaz's and Nowshahr's populations, and between Gorgan's and Nowshahr's populations, that was confirmed by UPGMA-based cluster analysis. Investigation of Hardy-Winberg genetic equilibrium of populations showed that there were equilibrium at most loci, although there wasn't allelic equilibrium at some loci in some or all populations; highest genetic disequilibrium was observed for Gorgan`s population, probably due to decreasing genetic resources, It suggests that this habitat must be added to the list of *Buxus hyrcana* reservers. Altogether, on the basis of results of this research, it could be concluded that RAPD markers are efficient and reliable markers for studying the population genetic of *Buxus hyrcana* species in forests of North of Iran.

Key words: *Buxus hyrcana*, Genetic diversity, RAPD marker, North of Iran.

Archive of SID

[*]Corresponding author Tel: +98 935 3441467 Email: v.ghandehary@gmail.com
www.SID.ir