ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۵۱۰- ۵۰۱

تنوع ژنتیکی توده‌های غان (*Betula pendula* Roth) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Genetic diversity in white birch (*Betula pendula* Roth) stands using microsatellite markers

محمد اسماعیل‌پور[۱]، کامبیز طاهری‌آبکنار[۱]، علی اعلمی*[۱]، امیر اسلام‌بنیاد [۱]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیاران، دانشیار، دانشگاه گیلان

Esmaeilpour M[1], Taheri Abkenar K[1], Aalami A[*1], Eslam Bonyad A[1]

1. PhD Student, Assistant Professors, Associate Professor, University of Guilan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ali_aalami@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱- تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۴)

چکیده

با وجود دارا بودن خواص ممتاز دارویی، در معرض خطر بودن و ارزش بالای درخت غان در صنایع مختلف، اطلاعاتی از تنوع و ساختار ژنتیکی این درخت در ایران وجود ندارد. بنابراین در این تحقیق تنوع، تمایز و تنگنای ژنتیکی پنج رویشگاه طبیعی این گونه در ایران با استفاده از ۱۳ نشانگر ریزماهواره بررسی شد. نتایج نشان دادند که تنوع ژنتیکی موجود در توده‌های غان بر اساس شاخص‌های تعداد آلل، تعداد آلل موثر، هتروزیگوسیتی و جریان ژنی در نشانگرهای مختلف ریزماهواره با هم تفاوت دارند. بالاترین میزان شاخص تثبیت F_{ST} برای نشانگرL7.3 بود که می‌توان آن را به عنوان نشانگر آگاهی‌بخش در شناسایی و گروه‌بندی جمعیت‌های این گونه پیشنهاد کرد. با توجه به نتایج تجزیه واریانس مولکولی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های غان ۳۴ درصد تعیین شد که نشان‌دهنده تنوع بالای داخل جمعیت‌هاست. بیشترین مقادیر مربوط به درصد آلل‌های چندشکل، تعداد آلل، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، آلل‌های اختصاصی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت سنگده مشاهده شد. همچنین بر اساس نتایج آزمون‌های تنگنای ژنتیکی به نظر می‌رسد جمعیت‌های شهرستانک و مارمیشو دچار تنگنای ژنتیکی شده باشند که توصیه می‌شود به اجرای "تکنیک‌های حفاظت بیولوژی" در این دو جمعیت توجه اساسی شود.

واژه‌های کلیدی

جریان ژنی
درخت غان
در معرض انقراض
شاخص شانون
SSR

Archive of SID

مقدمه

درخت غان (*Betula pendula* Roth) گیاهی است تک‌پایه، دگر-گرده‌افشان و دیپلوئید (۲n=۲x=۲۸) که اندازه تقریبی ژنوم آن ۴۰۰ Mb می‌باشد (Atkinson 1992). این گونه دارای خواص ممتاز دارویی (ضد سرطان قوی و موثر در درمان ایدز و هپاتیت) بوده (Zyryanova 2010) و می‌تواند در حفاظت خاک و مقابله با بهمن در ارتفاعات استفاده شده و قابلیت کاشت در مناطق سردسیر کشور را نیز دارد. علی‌رغم نادر بودن رویشگاه‌ها، بومی بودن، در معرض تهدید بودن، ارزش بالای چوب آن در صنایع مختلف و حفظ سیمای طبیعی کشور توسط این گونه ارزشمند جنگلی، اطلاعاتی از تنوع و ساختار ژنتیکی این درخت وجود ندارد که این امر ممکن است به دلیل گسترش این گونه در مناطق صعب‌العبور، آب و هوای نامساعد و پراکنش محدود آن در ایران باشد به طوری‌که به علت عدم شناخت محل دقیق رویشگاه‌های غان، نبود جاده و دوری راه، جمع‌آوری توده‌های مختلف آن دشوار می‌باشد. از اهداف زیربنایی سازمان جنگلها، مراتع و آبخیزداری "دستیابی به بهترین روش توسعه جنگل در ارتفاعات بالای جنگل‌های شمال متصل به مراتع کوهستانی" است که یقینا موفقیت چنین برنامه‌های دراز مدتی مستلزم شناخت کافی از ساختار تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم موجود است. به طور کلی از نظر مدیریتی حفظ توده‌های جنگلی به صورت پایدار، نیازمند دریافت اطلاعات مستمر در زمینه میزان تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها است (Thormann et al. 1994). تعیین جمعیت برتر در توسعه جنگل با عنایت به انتقال source-sink (منظور از source جمعیت‌های برتر می‌باشد که به عنوان اهدا کننده به جمعیت‌های در معرض خطر یا sink در برنامه‌های حفاظتی استفاده می‌شود)، اطلاع از فرسایش و خلوص ژنتیکی و ارزیابی استعداد آنها برای کاربری‌های تخصصی مانند قرق و بازسازی از دیگر ضروریات جدید در تحقیقات جنگلداری می‌باشد. مدیریت موثر منابع ژنتیکی مستلزم داشتن اطلاعات جامع در خصوص اندازه و ساختار جمعیت، پراکنش جغرافیایی، محیط رویشگاه و تنوع ژنتیکی بین و داخل آنها می‌باشد. همچنین در جمعیتی که جدا و کوچک مانده باشد، احتمال بوجود آمدن تنگنای ژنتیکی می‌رود که بررسی و شناسایی آنها حائز اهمیت است (Lowe et al. 2005). پدیده تنگنای ژنتیکی می‌تواند باعث کاهش اندازه جمعیت موثر و در نتیجه کاهش تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها شود (Freeland 2005).

نشانگرهای مولکولی به دلیل عدم وابستگی به سن، شرایط فیزیولوژیکی و محیطی گیاه، ابزاری قدرتمند جهت شناسایی گونه‌های دارویی، بررسی تنوع، طبقه‌بندی ذخایر توارثی و تعیین نقشه آنها می‌باشند (Omidi and Farzin 2012). از میان نشانگر-های مولکولی مختلف، ریزماهواره‌ها به دلیل طبیعت چندآللی، چندشکلی بالا و هم بارزی نسبت به ایزوآنزیم‌ها و AFLP ترجیح داده می‌شوند (Zane et al. 2002). بر این اساس از این نشانگر به عنوان ابزاری کارا در تحقیقات جنگلداری و منابع طبیعی استفاده می‌شود. در همین رابطه پژوهشگران بسیاری در مناطق مختلف دنیا تنوع درختان جنگلی را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی کرده‌اند: تعیین میزان تنوع ژنتیکی در ۱۲ جمعیت اروپایی از درخت ون (*Fraxinus excelsior*) برای درک علت وجود تفاوت معنی‌دار بین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Morand et al. 2002)، ساختار ژنتیکی ۱۳ جمعیت از درخت کاج‌جنگلی (*Pinus sylvestris*) در مناطق مدیترانه‌ای (Robledo Arnuncio et al. 2005)، تمایز ژنتیکی در بین نسل-های مختلف درخت راش در جنگل‌های خزری (Salehi Shanjani and Vendramin 2007)، تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی در شش جمعیت از درخت کمیاب بارانک (*Sorbus torminalis*) در جنگل‌های اروپا (Rasmussen and Kollmann 2008)، تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت از گونه بلوط ایرانی (*Quercus branti*) در جنگل‌های غرب ایران (Zolfaghari et al. 2009)، تنوع ژنتیکی درخت در معرض خطر شیشم (*Dalbergia monticola*) در جنگل‌های تخریب شده در ماداگاسکار (Andrianoelina et al. 2009) و ساختار ژنتیکی ۱۶ جمعیت از درخت غان (*Betula maximowicziana*) در جنگل‌های چی چیبو در ژاپن (Tsuda et al. 2010).

بر این اساس، با توجه به اهمیت و ارزش بالای گونه غان در ایران و نبود هیچ‌گونه اطلاعاتی از تنوع ژنتیکی این گونه، در این تحقیق در نظر است ساختار ژنتیکی این گونه در رویشگاه‌های مهم آن ارزیابی و مورد مقایسه قرار گیرد تا بر اساس نتایج بدست

Archive of SID
www.SID.ir

آمده، راهکارهای کاربردی برای بهبود حفاظت این گونه ارزشمند ارائه شود.

مواد و روش‌ها

در اوایل بهار از پنج رویشگاه اصلی غان در ایران، در مجموع ۴۶ درخت به طور تصادفی انتخاب و از برگ‌ها نمونه‌گیری انجام شد (جدول۱). برگ‌ها تا رسیدن به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان در یخ خشک نگهداری شدند.

بهینه‌سازی روش استخراج DNA

در ابتدا برگ‌های جمع‌آوری شده با اتانول ۷۰ درصد مورد شستشو قرار گرفته و سپس با نیتروژن مایع کاملا خرد شدند. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ پودر شده به همراه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی‌مولار تریس، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۰/۲ درصد حجمی- حجمی مرکاپتواتانول و ۱/۴ مولار کلرید سدیم و دو درصد CTAB) و ۱۰ میلی‌گرم PVP - 40 داخل هاون ریخته و به خوبی مخلوط می‌شود. سپس به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم: ایزوپروپانول (به نسبت ۲۴ : ۱) به هر تیوپ اضافه و به خوبی مخلوط شده و سپس سانتریفیوژ می‌شود. محلول رویی جدا و به تیوپ جدید منتقل می‌شود. نصف حجم محلول NaCl پنج مولار به آن اضافه و به خوبی مخلوط می‌شود. سپس دو برابر حجم تیوپ اتانول مطلق (۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه و محلول حاصل به آرامی تکان داده می‌شود و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی ۲۰ گذاشته می‌شود. سپس تیوپ‌ها سانتریفیوژ شده و مایع رویی آن خالی می‌شود. اتانول ۷۰ درصد، استات سدیم دو مولار و سه میکرولیتر Proteinase K اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شود. تیوپ‌ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی جدا و با اتانول ۷۰ درصد و استات سدیم دو مولار شستشو می‌شوند. تیوپ‌ها سانتریفیوژ و پس از حذف محلول رویی در دمای اتاق قرار گرفته تا خشک شوند. ۱۰۰ میکرولیتر TE (بافر تریس- EDTA) اضافه شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری می‌شود. جهت خالص‌سازی DNA، حجم محلول با TE به ۳۰۰ میکرولیتر رسانده می‌شود. سپس به هر تیوپ ۱۵۰ میکرولیتر فنول اشباع شده در TE و کلروفرم اضافه شده و پس از تکان مختصر سانتریفیوژ شده و لایه بالایی به تیوپ جدید منتقل می‌شود. یک دهم حجم آن استات سدیم دو مولار و دو برابر حجم آن اتانول مطلق ریخته و یک شب در ۲۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته و سپس سانتریفیوژ می‌شود. در ادامه DNA استخراج شده با اتانول ۷۰ درصد شستشو و پس از تبخیر اتانول، DNA در TE حل می‌شود. (تمامی سانتریفیوژها به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام می‌شود).

واکنش‌های PCR

در این تحقیق از آغازگرهای ریزماهواره‌ای معرفی شده توسط Kulju et al. (2003) استفاده شد (جدول۲). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر، دو میلی مولار کلرید منیزیم، بافر PCR (یک برابر) و یک واحد آنزیم Taq که در نهایت حجم نهایی با استفاده از آب دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه حرارتی به صورت Touchdown طراحی شد. به طوری که مرحله اول شامل سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته شدن اولیه DNA الگو، مرحله دوم شامل۱۰ چرخه که هر کدام شامل۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها و یک دقیقه در۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط آغازگرها بود. مرحله سوم شامل ۲۶ چرخه، که هر کدام شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۴، ۳۰ ثانیه دمای اتصال مناسب برای هر آغازگر (جدول۲) و یک دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. مرحله ۴ یا بسط نهایی نیز شامل ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از اتمام واکنش PCR جهت تفکیک قطعات تکثیر شده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید هشت درصد بدون اوره و یا ژل آگارز سه درصد استفاده و آشکارسازی با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام شد.

تجزیه آماری

بر اساس راهنمای نرم‌افزار GenAlEx 6.4 (Peakall and Smouse 2006) نمره‌دهی باندها به صورت عددی (۱، ۲، ۳ و ...) و با توجه به دیپلوئید بودن این گونه در دو ستون برای هر نشانگر ریزماهواره انجام شد. برآورد تنوع ژنتیکی با استفاده از شاخص‌های مهم به کمک نرم‌افزار GenAlEx 6.4 صورت گرفت: تعداد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- نام و مشخصات جمعیت‌های نمونه گیری شده در این تحقیق

نام جمعیت	استان	تعداد درختان نمونه‌گیری شده	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
سیاه‌مرزکوه	گلستان	۱۰	۲۳۴۴	۵۵°۱′	۳۶°۳۸′
سنگده	مازندران	۱۶	۲۵۷۹	۵۳°۱۳′	۳۵°۵۹′
نوشهر	مازندران	۳	۲	۵۱°۴۸′	۳۶°۶۵′
شهرستانک	البرز	۱۲	۲۴۰۴	۵۱°۲۳′	۳۵°۴۴′
مارمیشو	آذربایجان غربی (مرز ایران و ترکیه)	۵	۱۷۴۱	۴۴°۳۵′	۳۷°۳۴′

جدول ۲- نام و مشخصات نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده در این تحقیق

نام نشانگر	توالی آغازگر (′۳-′۵)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	تکرار توالی
L1.10	ACGCTTTCTTGATGTCAGCC TCACCAAGTTCCTGGTGGAT	۶۰	$(GA)_4AA(GA)_{10}$
L2.2	AGACCATGCCTGGGCCTT CGCAACAAAACACGATGAGA	۵۸	$(TC)_8(TTTC)_2$
L2.7	CCGCCGGTAACACTAAACC GAGGGAAGAAAATTCAACGG	۵۷	$(TC)_8(TA)_8(TG)_{11}TT(TG)_3$
L3.1	CTCCTTAGCTGGCACGGAC CCCTTCTTCATAAAACCCTCAA	۵۹	$(CT)_3CC(CT)_2CC(CT)_{13}AT(CT)_5$
L3.4	AACCCTCGTTTGGCTACTGA GAACAGTTACTAGTCAAACTGAAAACC	۵۸	$(GTAT)_3(GT)_5$
L4.4	TTGAGATAGACGATAGAGGTAAAGCA AGGCATTTCTCCAATTTTCTT	۶۰	$(AG)_{17}$
L5.4	AAGGGCACCTGCAGATTAGA AAAATTGCAACAAAACGTGC	۵۸	$(TC)_{26}$
L5.5	GAGGAAGTCTCAGCTGACGTG TCCTTTTCAGTTTTCTGATTTCTG	۵۷	$C_{12}CTCC(CT)_7TT(CT)_5$
L7.1	GTTTTGGGTTTCCACTTCCA ACTGGTAATACCTTTACCAAGCC	۵۹	$(CT)_{12}CCTT(CT)_4$
L7.3	GGGGATCCAGTAAGCGGTAT CACACGAGAGATAGAGTAACGGAA	۵۹	$(GT)_{18}(GA)_{14}$
L7.4	TGAAACGAACGGAAGAGTTG ATACGCCAGACTTTCATCCG	۵۷	$(GA)_7$
L7.8	GGCCAACAGATATAAAACGACG TTTTAAATGCCCACCTTCCC	۶۰	$(CT)_{11}GC(AATG)_2$
L022	AACGGACAAATTCACGGGTA GGAGTTCATGGATTGGAGGA	۵۸	$(CT)_{18}$

آلل، تعداد آلل مؤثر (Ne = ۱/(۱– He)، شاخص شانون $I = -\sum p_i \ln p_i$، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (N / تعداد هتروزیگوت های موجود در جمعیت) = H_O، هتروزیگوسیتی مورد انتظار $He = ۱ - \sum p_i^۲$ (Hartl and Clark 1997)، جریان ژنی $Nm = [(۱/ F_{ST}) - ۱] / ۴$ (Frankham et al. 2002)، شاخص درون‌آمیزی $F_{IS} = (H_e - H_o) / H_e$ و شاخص تثبیت $F_{ST} = V_{AP} / (V_{AP}+V_{WP})$ (Peakall et al. 1995) برای هر یک از آغازگرها استفاده شد. همچنین پارامترهای ژنتیکی برای هر یک از جمعیت‌ها مانند درصد آلل‌های چندشکل، تعداد آلل در هر نشانگر، تعداد آلل موثر و شاخص شانون نیز محاسبه شد. سپس انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ برای نشانگرهای مختلف در هر یک از جمعیت‌ها بدست آمد (Hartl and Clark 1997). از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای یافتن ساختار ژنتیکی معنی-دار بین جمعیت‌ها نیز استفاده شد (Peakall et al. 1995). ماتریس فاصله ژنتیکی بر اساس فرمول Nei (1978) و F_{ST} نیز بین جمعیت‌های مختلف به کمک همین نرم‌افزار محاسبه شد. دندروگرام فاصله بین جمعیت‌ها بر اساس فاصله نی Nei (1972) رسم شد. تنگنای ژنتیکی به کمک نرم‌افزار Cornuet Bottleneck)

Archive of SID
www.SID.ir

and Luikart 1996) با سه مدل جهش ریزماهواره‌ای، مدل آللی نا محدود (Infinite Allele Model: IAM)، مدل جهش گام به گام (Stepwise Mutation Model: SMM) و مدل دو مرحله‌ای (Two-phased model of mutation: TPM) (Piry et al. 1999) و آزمون‌های آماری علامت، اختلاف استاندارد و ویلکاکسون محاسبه شد. این نرم‌افزار انحراف از تعادل جهش- رانش ژنتیکی (Drift-mutation equilibrium) را که در جمعیت‌های دچار تنگنای ژنتیکی شده اتفاق می‌افتد، بر اساس زیاد بود یا کمبود هتروزیگوسیتی می‌آزماید. در ضمن، در طی آزمایشات PCR نشانگر L3.1 به دلیل عدم تکثیر در اکثر ژنوتیپ‌ها و عدم مشاهده باند، در آنالیزها استفاده نشد.

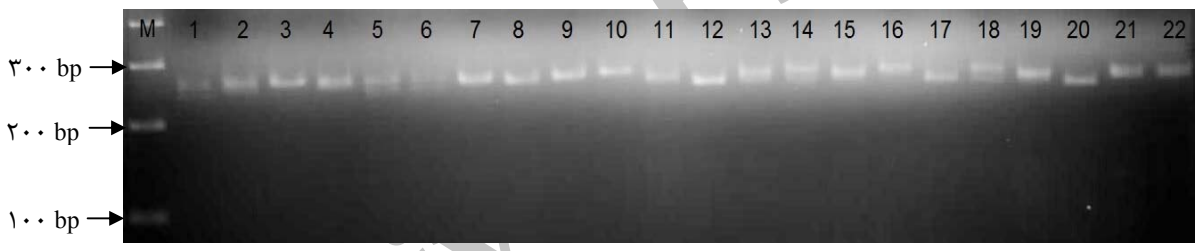
نتایج و بحث

استخراج DNA با کیفیت بالا از درختان یکی از موانع اصلی در تحقیقات ژنتیک مولکولی این گیاهان می‌باشد (Gupta et al. 2011). درخت غان در ایران به دلیل سنگلاخی بودن رویشگاه و فشار شرایط اکولوژیک دارای برگ‌هایی خشن و گاهی همراه با آسیب‌دیدگی بافتی می‌باشد. علاوه بر این دارای حجم زیادی از ترکیبات فنلی و پلی‌فنل اکسیداز است. لذا استخراج DNA با کیفیت بالا در این گیاه دشوار و نیازمند به مراحل متعدد خالص-سازی دارد. به همین دلیل به عنوان گیاهی سرسخت (Recalcitrant) در استخراج DNA محسوب می‌شود (Howland et al. 1991). بر این اساس دستورالعمل‌های متعددی برای بهینه-سازی استخراج DNA استفاده شد که در نهایت روش مورد استفاده در این تحقیق از تکمیل روش Porebski et al. (1997) بدست آمد که به عنوان دستورالعمل کارا برای حصول به DNA با کیفیت در درخت غان و گونه‌های مشابه قابل توصیه است. بر اساس نتایج حاصل در کل ۵۴ آلل در جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد (جدول ۳ و شکل ۱). میانگین تعداد آلل در جایگاه های ریزماهواره در این مطالعه ۴/۵ محاسبه شد که در این میان نشانگر L5.4 کمترین و نشانگرهای L2.2، L2.7 و L3.4 بیشترین میزان تعداد آلل را دارا بودند. متوسط تعداد آلل موثر در جایگاه های ریزماهواره در این مطالعه ۳/۱۶ محاسبه شد که در این میان نشانگر L3.4 بیشترین میزان تعداد آلل موثر را دارا بودند. میانگین شاخص شانون در جایگاه‌های ریزماهواره در این مطالعه ۱/۲۵ محاسبه شد که از ۰/۹۲ در نشانگر L5.5 تا ۱/۶۴ در نشانگر L2.7 تغییر کرد. بر اساس نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد درخت غان در نشانگر L3.4 جهش بالاتری نسبت به دیگر نشانگرهای مطالعه شده دارد، زیرا هر چه تعداد آلل در یک نشانگر ریزماهواره افزایش یابد بیانگر جهش بیشتر در آن جایگاه می‌باشد (Bowcock et al. 1991). نشانگرهای ریزماهواره‌ای در جمعیت‌های درختی معمولا دارای تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار بالایی می-باشند. برای مثال تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار به ترتیب در بلوط چوب پنبه‌ای ۱۷ و ۰/۸۴ (Streiff et al. 1998) و در بلوط سسیل ۸/۲ و ۰/۷۳ محاسبه شد (Bruschi et al. 2003). متوسط تعداد آلل و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در درختان غان در جنگل‌های فنلاند به ترتیب ۶/۴ و ۰/۶۰۳ محاسبه شد (Kulju et al. 2003) که این مقادیر با نتایج بررسی حاضر تا حدود زیادی هماهنگی دارند. البته لازم به ذکر است عوامل مختلفی از قبیل نوع سیستم لقاح (Hamrick et al. 1992) و اندازه جمعیت - (Wright 1931) در میزان تنوع ژنتیکی دخیل هستند. از آنجا که درخت غان دارای سیستم لقاح دگر گرده‌افشان است، انتظار می-رود تنوع ژنتیکی در این گونه بالا باشد. البته در بعضی مناطق، کوچک بودن جمعیت در جنگل‌های ایران سبب رانش ژنتیکی و کاهش تنوع شده است. در بررسی ساختار ژنتیکی بیشترین مقدار ضریب درون‌آمیزی (F_{IS}) برای مکان L7.3 محاسبه شد. ضریب درون‌آمیزی (F_{IS}) منفی در نشانگرهای L2.2، L7.4، L7.8 و L022 نشان از کمبود هموزیگوت‌ها در جمعیت‌ها برای نشانگرهای مذکور است. با توجه به اینکه نشانگر L7.3 در غان بالاترین ضریب درون‌آمیزی (F_{IS}) را دارد، باید توجه بیشتری به حفظ تنوع بر اساس این نشانگر داشت، یعنی سعی در توسعه آن دسته از ژنوتیپ‌هایی کرد که در نشانگر L7.3 دارای هتروزیگوسیتی بالاتری بوده و جمعیت‌هایی از این گونه که از نظر این نشانگر دارای تنوع بیشتری هستند، حفاظت شوند. از آنجا که نشانگر L7.3 میزان F_{ST} بالاتری را نسبت به دیگر نشانگرها بیان کرد لذا بهتر می‌تواند تفاوت‌های بین جمعیت‌ها را نشان دهد و همچنین از آن می‌توان به عنوان نشانگر آگاهی‌بخش برای مطالعات شناسایی و گروه‌بندی در این گونه پیشنهاد کرد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳- محاسبه پارامترهای مهم تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در ژنوتیپ‌های مطالعه شده

نام نشانگر	تعداد آلل	آلل مؤثر (effective)	شاخص شانون	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	جریان ژنی	ضریب درون‌آمیزی F_{IS}	شاخص تثبیت F_{ST}
L1.10	۴	۳/۵	۱/۳۱	۰/۷۲	۰/۵۴	۰/۷	۰/۰۸	۰/۲۵
L2.2	۶	۴/۰۱	۱/۵۸	۰/۷۵	۰/۸۹	۰/۷۸	- ۰/۵	۰/۲
L2.7	۶	۴/۵	۱/۶۴	۰/۷۸	۰/۳۹	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۴
L3.4	۶	۴/۹	۱/۶۸	۰/۸	۰/۲۸	۰/۲۶	۰/۴۳	۰/۴
L4.4	۵	۳/۱	۱/۳۷	۰/۶۸	۰/۰۷	۰/۹۶	۰/۹	۰/۲
L5.4	۳	۲/۵۳	۰/۹۶	۰/۵۷	۰/۳۷	۱/۰۶	۰/۱۸	۰/۱۹
L5.5	۴	۱/۸۹	۰/۹۲	۰/۴۷	۰/۱	۰/۶۷	۰/۶۶	۰/۲۷
L7.1	۴	۲/۸۶	۱/۱۹	۰/۶۵	۰/۲۴	۱/۰۵	۰/۶	۰/۱۹
L7.3	۴	۲/۷۲	۱/۱۳	۰/۶	۰/۰۲	۰/۳۵	۰/۹۵	۰/۴
L7.4	۴	۲/۹۱	۱/۲	۰/۶۶	۰/۵۲	۰/۶	- ۰/۲	۰/۲۷
L7.8	۴	۲/۳۷	۰/۹۶	۰/۵۸	۰/۶۳	۲/۹۹	- ۰/۳	۰/۰۷
L022	۴	۲/۶۱	۱/۰۹	۰/۶۲	۰/۵۴	۰/۴۸	- ۰/۲	۰/۳۴
میانگین	۴/۵	۳/۱۶	۱/۲۵	۰/۶۶	۰/۳۹	۰/۸۵	۰/۲۳	۰/۲۸



شکل۱- الگوی تکثیر DNA در ژنوتیپ‌های غان با استفاده از جفت آغازگر ریزماهواره‌ای M .L5.4) نشانگر اندازه؛ ۱ تا ۴ جمعیت سنگده؛ ۵ تا ۱۴) جمعیت سیاه‌مرز-کوه؛ ۱۵ تا ۱۹) جمعیت مارمیشو و ۲۰ تا ۲۲ جمعیت نوشهر.

به نظر می‌رسد که این نشانگر به علت داشتن مقدار F_{ST} بالاتر، می‌تواند فشارهای انتخاب طبیعی و سازش‌های محلی را بیشتر نشان دهد، ضمن اینکه بین شاخص F_{ST} و سازش محلی همبستگی مثبت گزارش شده است (Merila and Crokrak 2001). جریان ژنی از مهمترین فرآیندها در ژنتیک جمعیت‌هاست و بر تکامل آنها موثر است. میانگین جریان ژنی در این تحقیق ۰/۸۵ بدست آمد که تحت تاثیر عوامل مختلفی است. بررسی اثرهای متقابل بین جریان ژنی با عواملی از قبیل موانع جغرافیایی پراکنش و تکه‌تکه شدن زیستگاه برای تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود تا موانع پخش جریان ژنی در رویشگاه‌های طبیعی غان مشخص شود.

در مقایسه شاخص‌های تنوع در بین جمعیت‌های مختلف، کمترین درصد آلل‌های چندشکل، تعداد آلل، تعداد آلل موثر، آلل‌های اختصاصی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت نوشهر مشاهده شد. بیشترین مقادیر مربوط به درصد آلل‌های چندشکل، تعداد آلل، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، میانگین تعداد آلل‌های اختصاصی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت سنگده مشاهده شد (جدول۴). از آنجا که جمعیت سنگده، که در ضمن وسیع‌ترین رویشگاه غان در ایران نیز می‌باشد در پارامترهای مختلف تنوع ژنتیکی بیشترین مقادیر را به خود اختصاص داده است، می‌توان اظهار کرد این جمعیت از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار بوده و به عنوان بهترین جمعیت می‌تواند در انتقال source-sink به کار گرفته شود. البته شایان ذکر است که باید از تاثیر افراد بنیانگذار (Founder) اجتناب شود. افراد بنیانگذار همان ژنوتیپ‌های جدید منتقل شده به جمعیت دیگر می‌باشند که در بردارنده بخش اندکی از تنوع ژنتیکی جمعیت

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۴- پارامترهای مرتبط با تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه

پارامترهای تنوع ژنتیکی	سیاه‌مرزکوه	سنگده	نوشهر	شهرستانک	مارمیشو
درصد آلل‌های چندشکل	۱۰۰	۱۰۰	۸۳	۱۰۰	۱۰۰
میانگین تعداد آلل مؤثر در هر نشانگر	۲/۰۶	۲/۸۲	۱/۶	۱/۹	۲/۰
میانگین تعداد آلل در هر نشانگر	۲/۹۱	۳/۷۵	۱/۸۳	۳/۱۶	۲/۴۱
شاخص شانون	۰/۷۸	۱/۱	۰/۵۲	۰/۷۴	۰/۷۶
میانگین تعداد آلل‌های اختصاصی	۰/۰۸	۰/۲۵	۰	۰/۰۸	۰
هتروزیگوسیتی مورد انتظار	۰/۴۶	۰/۶۲	۰/۳۷	۰/۴۱	۰/۴۹

اصلی هستند که این شیوه نادرست در توسعه جنگل کاری‌ها رایج است که نتیجه آن کاهش تنوع زیستی و به خطر افتادن پایداری بلندمدت جنگل‌ها است. نکته قابل‌توجه این که شاخص شانون در جمعیت‌های سنگده، سیاه‌مرزکوه، مارمیشو، شهرستانک و نوشهر به ترتیب کاهش یافت که این موضوع با کوچک‌تر شدن مساحت آن جمعیت‌ها رابطه دارد. در همین ارتباط می‌توان به نتایج مربوط به تعداد آلل‌های اختصاصی برای جمعیت‌های مورد بررسی اشاره کرد (جدول۴) که آنها نیز تحت تاثیر محدودیت مکانی رویشگاه و کاهش تنوع قرار گرفته‌اند. آلل‌های اختصاصی آلل‌هایی هستند که در یک جمعیت به طور اختصاصی وجود دارند و در جمعیت دیگر یافت نمی‌شوند. فراوانی این آلل‌ها می‌تواند به دلیل میزان نسبتا بالایی از جهش در نشانگرهای ریزماهواره‌ای بوجود آمده باشد(Matus and Hayes 2002). در این تحقیق، ۹ نشانگر دارای انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ و سه نشانگر L1.10 ، L2.7 و L022 بدون انحراف از این تعادل بودند. جمعیت سنگده در بیشتر نشانگرها دارای عدم تعادل و جمعیت نوشهر تنها در یک جایگاه دارای عدم تعادل هاردی- واینبرگ بود (جدول ۵). در مطالعه حاضر نیز انحراف از تعادل در اکثر نشانگرهای ریزماهواره مشاهده شد که ممکن است به علت افزایش هموزیگوسیتی ناشی از مکانیزم‌های اکولوژیکی، تاثیر انتخاب طبیعی و احتمالا محدود بودن تعداد درختان نمونه برداری شده باشد، گرچه با توجه به تنوع نشانگر ریزماهواره مورد مطالعه می‌تواند اندازه نمونه تغییر کند (Freeland 2005). در یک نمونه مطالعاتی روی دوازده جمعیت اروپایی از درخت ون (*Fraxinus excelsior*) با استفاده از پنج نشانگر ریزماهواره انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ در ده جمعیت از دوازده جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد که برای چنین گونه درختی بسیار غیرمعمول به نظر می‌رسد و علت انحراف هم به دلیل کمبود هتروزیگوسیتی مشاهده شده بود (Morand et al. 2002). بر اساس تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌های غان در این مطالعه حدود ۳۴ درصد و تفاوت ژنتیکی درون جمعیت‌ها حدود ۶۶ درصد مشاهده شد که دلالت بر تنوع بالای این گونه در داخل هر گروه می‌باشد. با استفاده از نشانگر RAPD در جمعیت‌های غان در اسپانیا تنوع بین جمعیتی حدود ۶۴ درصد مشاهده شد که نسبت به تحقیق حاضر تنوع بالاتری را نشان می‌دهند (Martin et al. 2008).

در مطالعه تفاوت ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مختلف غان با استفاده از نشانگرهای مولکولی مقدار شاخص تثبیت F_{ST} برای جنگل‌های اسپانیا ۰/۶ (Martin et al. 2008)، برای جنگل‌های ژاپن ۰/۱۶ (Tsuda et al. 2004) و برای این تحقیق ۰/۲۸ بدست آمد که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی و تمایز بارز است (Freeland 2005). مقدار شاخص تثبیت (F_{ST}) از ۰/۱۰۶ بین جمعیت‌های سیاه‌مرزکوه و سنگده تا ۰/۳۰۷ بین جمعیت‌های نوشهر و شهرستانک متغیر بود. با توجه به فاصله جغرافیایی زیاد منطقه مارمیشو با سایر رویشگاه‌ها و فاصله ژنتیکی زیاد این جمعیت با جمعیت‌های دیگر (شکل۲) پیشنهاد می‌شود که جمعیت مارمیشو به عنوان واحد حفاظتی جداگانه در نظر گرفته شوند.

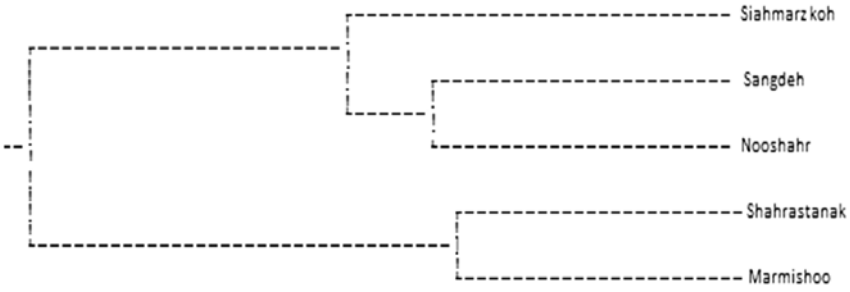
همچنین نکته قابل توجه اینکه سه جمعیت سیاه‌مرزکوه، سنگده و نوشهر در بخش جنگل‌های شمال و مارمیشو و شهرستانک جز بخش جنگل های خارج از محدوده شمالی کشور محسوب می‌شود که نتایج گروه‌بندی (شکل۲) به خوبی این تفاوت را نمایش داده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵- انحراف از تعادل هاردی- وایبنرگ برای مکان‌های ریزماهواره در جمعیت‌های مورد مطالعه

نشانگرها	سیاه‌مرزکوه	سنگده	نوشهر	شهرستانک	مارمیشو
L۱/۱۰					
L ۲/۲	D	D		D	D
L۲/۷					
L۳/۴		D	D		D
L۴/۴	D	D		D	D
L ۵/۴	D	D		D	
L ۵/۵	D	D		D	
L ۷/۱	D	D			
L ۷/۳	D	D		D	D
L ۷/۴	D	D		D	
L ۷/۸	D	D			
L ۰۲۲					

D) انحراف از تعادل هاردی- وایبنرگ



شکل۲ - دندروگرام فاصله ژنتیکی میان پنج جمعیت مختلف مورد مطالعه بدست آمده از روش UPGMA

جدول ۶ – مقادیر شاخص تثبیت (F_{ST}) (بالای قطر ماتریس) و فاصله ژنتیکی Nei (پایین قطر ماتریس) بین جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس مکان‌های ریزماهواره استفاده شده

جمعیت	سیاه‌مرزکوه	سنگده	نوشهر	شهرستانک	مارمیشو
سیاه‌مرزکوه		۰/۱۰۶	۰/۳۰۵	۰/۲۱	۰/۲۰۲
سنگده	۰/۳۰۳		۰/۲	۰/۱۳	۰/۱۶
نوشهر	۰/۹۰۳	۰/۵۹		۰/۳۰۷	۰/۱۵
شهرستانک	۰/۴۹۶	۰/۳۰۵	۰/۸۱		۰/۲۰۷
مارمیشو	۰/۵۷	۰/۶۰۸	۰/۲۰۵	۰/۸۱۶	

نتایج آزمون تنگنای ژنتیکی نشان داد که در جمعیت سیاه‌مرزکوه تقریبا هیچ‌کدام از آزمون‌های آماری، زیادبود هتروزیگوسیتی معنی‌داری را نشان ندادند. در جمعیت سنگده هم آزمون‌های آماری علامت، اختلاف استاندارد و ویلکاکسون، در SMM (مدل جهش گام به گام) زیادبود هتروزیگوسیتی معنی‌داری را از خود نشان ندادند. در جمعیت نوشهر به دلیل کمتر بودن تعداد نمونه و باند چندشکل، آزمون تنگنای ژنتیکی انجام نشد. در جمعیت شهرستانک آزمون‌های آماری علامت و اختلاف استاندارد، زیاد-بود هتروزیگوسیتی معنی‌داری را نشان دادند. در جمعیت مارمیشو واقع در استان آذربایجان غربی (مرز ایران و ترکیه) آزمون آماری علامت، زیادبود هتروزیگوسیتی معنی‌داری را از خود نشان داد (جدول۷).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۷- تنگنای ژنتیکی در جمعیت‌ها بر اساس مکان‌های ریزماهواره: IAM (مدل آللی نا محدود)، SMM (مدل جهش گام به گام)، TPM (مدل دو مرحله‌ای)، E وO به ترتیب تعداد نشانگر با زیادبود هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده).

آزمون‌ها		مدل	سیاه‌مرزکوه	سنگده	شهرستانک	مارمیشو
علامت	E	IAM	۷/۱	۷/۱	۶/۳	۴/۷
		SMM	۶/۱	۷/۲	۶/۸	۵/۸
		TPM	۶/۴	۶/۸	۶/۶	۵/۴
	O	IAM	۶	۱۰	۳	۹
		SMM	۶	۷	۳	۹
		TPM	۶	۹	۳	۹
	P-value	IAM	۰/ ۳۵	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۱
		SMM	۰/۵۷	۰/۵	۰/۰۲	۰/۰۵
		TPM	۰/۴۹	۰/۱۷	۰/۰۳	۰/۰۳
اختلاف استاندارد	P-value	IAM	۰/۳۸	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
		SMM	۰/۰۳	۰/۰۳	۰	۰/۴۷
		TPM	۰/۱۴	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۳۶
ویلکاکسون	P-value	IAM	۰/ ۵۷	۰/۰۴	۰/۵۹	۰/۱
		SMM	۰/۸۳	۰/۲۳	۰/۹۹	۰/۱۶
		TPM	۰/۶۶	۰/۰۴	۰/۹۸	۰/۱۳

البته لازم به ذکر است برای نشانگرهای ریزماهواره، نتایج اندازه-گیری تنگنای ژنتیکی با استفاده از مدل جهش TPM (مدل دو مرحله‌ای) واقع‌گرایانه‌تر است (Dirienzo et al. 1994). در دو جمعیت شهرستانک و مارمیشو زیادبود هتروزیگوسیتی مشاهده شد که می‌تواند نشان‌دهنده تنگنای ژنتیکی باشد که توصیه می-شود به اجرای "تکنیک‌های حفاظت بیولوژی" در این دو جمعیت توجه اساسی شود. این پدیده غالبا باعث کاهش تنوع شده که بستگی به شدت و دوره اثر آن دارد (Freeland 2005).

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان از اداره کل منابع طبیعی گلستان، شرکت سهامی چوب فریم مازندران و دانشگاه ارومیه که نهایت همکاری را در اخذ نمونه‌های برگ از رویشگاه‌های صعب‌العبور غان داشته‌اند، سپاسگزاری می‌نماید.

منابع

Andrianoelina O, Favreau B, Ramamonjisoa L, Bouvet JM (2009) Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. Annals of Botany 104: 1231-1242.

Atkinson MD (1992) *Betula pendula* and *B. pubescens*. Journal of Ecology 80: 837-870.

Bowcock AM, Kidd JR, Mountain JL, Hebert JM, Carotenuto L, Kidd KK, Cavalli-Sforza LL (1991) Drift, admixture and selection in human evolution: a study with DNA polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 88: 839-843.

Bruschi P, Vendramin G, Bussotti F, Grossoni P (2003) morphological and molecular diversity among Italian Populations of *Quercus petraea*. Annals of Botany 91: 707-716

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.

Dirienzo A, Peterson AC, Garca JC, Valdes AM, Slatkin M (1994) Mutational processes of simple sequence repeats in human populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91: 3166-3170.

Archive of SID
www.SID.ir

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.-Freeland JR (2005) Molecular Ecology. John Wiley and Sons Press, England, 63-106.
Gupta AK, Rai MK, Phulwaria M, Shekhawat NS (2011) Isolation of genomic DNA suitable for community analysis from mature trees adapted to arid environment. Gene 487: 56-159.
Hamrick JL, Godt M, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.
Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, USA.
Howland D, Oliver RP, Davy AJ (1991) A method of extraction of DNA from Birch. Plant Molecular Biology Reporter 9: 340-344.
Kulju KM, Pekkinen M, Varvio S (2003) Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula.* Molecular Ecology Notes 4: 471-473.
Lowe AJ, Bosier D, Ward M, Bacles C, Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. Heredity 95:255-273.
Martin C, Parra T, Clemente-Munoz M, Hernandez-Bermejo JE (2008) Genetic diversity and structure of the endangered *Betula pendula* subsp. fontqueri populations in the south of Spain. Silva Fennica 42: 487-498.
Matus IA, Hayes PM (2002) Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeat. Genome 45: 1095-1106.
Merila J, Crokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. Journal of Evolutionary. Biology 14: 892-903.
Morand ME, Brachet S, Rossignol P, Dufour J, Frascaria Lacoste N (2002) a generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. Molecular Ecology 11: 377- 385.
Nei M (1972) Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 283-292.
Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, USA.
Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6, genetic analysis in excels population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology 6: 288-295.
Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. Molecular Ecology 4: 135-147.
Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. Journal of Heredity 90: 502-503.
Porebski S, Bailey L, Baum R (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15: 8-15
Omidi M, Farzin N (2012) Biotechnology approaches for improvement of medicinal plants. Modern Genetics Journal 4: 209-220. (In Farsi).
Rasmussen KK, Kollmann J (2008) Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction. Conservation Genetics 9:1533-1539
Robledo Arnuncio JJ, Collada C, Alia R, Gil1 L (2005) Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. Journal of Biogeography 32: 595-605.
Salehi Shanjani P, Vendramin GG (2007) Genetic differentiation between generations of beech (*Fagus orientalis*) populations in Caspian forests. Iranian Journal of Biology 20: 1-14. (In Farsi).
Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glossl J, Kremer A (1998) Within population genetic structure in *Quercus robur* and *Quercus petraea* assessed with microsatellites. Molecular Ecology 7: 317-328.
Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivanga JG (1994) Comparison of RFLP and RAPD to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theoretical Appliaed Genetic 88: 973-980.
Tsuda Y, Goto S, Ide Y (2004) RAPD analysis of genetic variation within and among four natural populations of *Betula maximowicziana*. Silvae Genetica 53: 234-239.
Tsuda Y, Sawada H, Takafumi O, Katsuhiro N, Hiroki N, Yuji I (2010) Landscape genetic structure of *Betula maximowicziana* in the Chichibu mountain range, central Japan. Tree Genetics and Genomes 6:377-387.
Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. Genetics 16: 97-159.
Zane L, Bargelloni L (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.
Zyryanova O (2010) White birch trees as resource species of Russia. Their distribution, ecophysiological, features, multiple utilizations. Eurasian Journal of Forest Research 13: 25-40.
Zolfaghari R, Akbarinia M, Mardi M, Ghanati F (2009) Genetic diversity in Persian oak (*Quercus branti*) from Kohkiluye and Boyerahmad using SSR. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 16: 172-182 (In Farsi).

Archive of SID

www.SID.ir