دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ijrfpbgr.2018.110973.1260
جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۲۰۶-۱۹۶ (۱۳۹۷)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف سماق (*Rhus coriaria* L.) ایرانی با استفاده از نشانگر ISSR

رسول محمدی آلاگوز[۱]، رضا درویش‌زاده[۲*]، احمد علیجانپور[۳]، حمید حاتمی ملکی[۴] و رویا حیدری[۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲*- نویسنده و مسئول مکاتبات، استاد، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

پست الکترونیک: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

۳- دانشیار، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه

۴- استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

۵- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸

چکیده

سماق (*Rhus coriaria* L.) ازجمله درختچه‌های جنگلی است که در مناطق مدیترانه و آسیای شرقی به‌ویژه ایران پراکنش دارد و دارای کاربردهای مختلف دارویی و صنعتی می‌باشد. در این پژوهش، از نشانگرهای بین ریزماهواره به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های سماق جمع‌آوری شده از پنج رویشگاه طبیعی واقع در شمال‌غرب کشور (استان‌های آذربایجان‌غربی و شرقی) استفاده شد. بدین‌منظور از هر جمعیت ۱۵ نمونه به‌صورت تصادفی انتخاب و بعد DNA ژنومی آنها با استفاده از ۱۸ آغازگر ISSR انگشت‌نگاری شد. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی مطلوبی در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه سماق وجود دارد، به‌طوری‌که سهم تنوع ژنتیکی بین جمعیتی (۷۹/۸٪) بیشتر از سهم تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی (۲۰/۲) بود. کمترین فاصله ژنتیکی (۱۴/۱۸) بین جمعیت‌های آغبراز- هوراند (آ.ش.) و نیر- ارسباران و بیشترین فاصله ژنتیکی (۳۱/۰۸) بین جمعیت‌های کچله- ارومیه و نیر- ارسبارن مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل از گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، دو جمعیت آغبراز- هوراند و نیر- ارسباران در یک گروه و جمعیت‌های رویشگاه‌های دیگر در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که گروه‌بندی افراد با استفاده از نشانگر ISSR، با توزیع جغرافیایی آنها مطابقت دارد. نشانگرهای ISSR می‌توانند به‌صورت مؤثری نه تنها در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم سماق بلکه در شناسایی ارتباط ژنتیکی میان نمونه‌ها یا افراد شناخته شده و یا ناشناخته سماق به‌کار روند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، تجزیه واریانس مولکولی، سماق، نشانگر مولکولی ISSR

مقدمه

سماق (*Rhus coriaria*) یکی از ۲۵۰ گونه موجود در خانواده Anacardiaceae می‌باشد (Rawashdeh *et al.*, 2009). سماق دارای برگ‌های مرکب، پوشیده از کرک و دندانه‌دار است. پراکندگی جغرافیایی سماق در جهان پهنه وسیعی از جزایر قناری تا مدیترانه، ایران و افغانستان را دربر گرفته و در ایران در مناطق کوهستانی زاگرس و البرز می‌روید (Ahmadian Atari *et al.*, 2008). این گیاه نه تنها به‌عنوان گیاه پوششی برای جلوگیری از فرسایش خاکی کشت و کار می‌شود، بلکه در طب سنتی نیز از آن به‌عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

تسکین‌دهنده دردهای شکمی، اسهال، خونریزی و مشکلات پوستی استفاده می‌شود (Rawashdeh *et al.*, 2009). از سماق در ایران، ترکیه و سایر کشورهای عربی به‌عنوان چاشنی غذا نیز استفاده می‌شود. اندازه‌گیری تنوع زیستی فاکتوری مهم برای ارزیابی اکوسیستم‌ها است، اکوسیستم‌هایی با تنوع زیستی بالاتر دارای پایداری اکولوژیکی و تولید بیشتری هستند. ارزیابی دقیق میزان و پراکنش تنوع ژنتیکی در گونه‌های نادر و در معرض خطر به‌منظور تدوین راهبرد حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Hamrick & Godt, 1996). نشانگرهای مولکولی[1] اطلاعات مفیدی در مورد میزان و توزیع اختلاف ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها فراهم می‌کنند (Belletti *et al.*, 2008) و می‌توانند به‌عنوان ابزاری ضروری در توصیف و کمی کردن تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Avise, 1994). از میان نشانگرهای مولکولی، نشانگر ISSR[2] (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) شبیه نشانگر RAPD[3] به دانش قبلی درباره ژنوم و روش‌های طراحی آغازگرهای خاصی نیاز ندارد و در آن از تعدادی آغازگرهای منفرد برای انگشت‌نگاری افراد استفاده می‌شود. ازجمله مزایای این تکنیک سریع بودن، تکرارپذیری بالا و هزینه پایین آن می‌باشد (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Reddy *et al.*, 2002). نشانگر ISSR به‌صورت گسترده و موفقیت‌آمیز در مطالعات تنوع ژنتیکی و بیولوژی تکاملی در محدوده وسیعی از گونه‌های گیاهی زراعی، دارویی و غیره استفاده شده است (Reddy *et al.*, 2002). سماق ازجمله گونه‌های مهم دارویی است که دارای پراکنش محدودی بوده و به‌تدریج در دوره‌های زمانی مختلف از سطح آن کاسته شده است. در زمینه استفاده از نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی در این گونه گزارش‌های محدودی وجود دارد. این در حالی است که گزارش‌هایی از ارزیابی ژنتیکی سایر گونه‌های جنگلی مانند زیتون (Koohi Dehkordi *et al.*, 2006) و درمنه (Rawashdeh, 2011) به‌وسیله نشانگرهای مولکولی وجود دارد. در مطالعه‌ای Shabanian و همکاران (۲۰۱۶)، از نشانگر ISSR برای ارزیابی تمایز و تنوع ژنتیکی بین و درون هشت جمعیت بلوط ایرانی (*Quercus blanti*) متشکل از ۱۰۴ ژنوتیپ با شرایط رویشگاهی متفاوت از جنگل‌های ایلام استفاده کردند. نتایج تحقیق آنان نشان داد که ۷۹ درصد از کل تنوع ژنتیکی موجود مربوط به درون جمعیت‌ها و ۲۱ درصد باقیمانده ناشی از تنوع بین جمعیت‌ها بود. در بررسی تنوع کلکسیون عناب‌های ایران (Ghouth *et al.*, 2014) شامل نمونه‌های جمع‌آوری شده از هشت استان کشور با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD مشخص شد که این گیاه در سه استان مازندران، اصفهان و خراسان دارای تنوع بالایی است و استان خراسان جنوبی تقریبا کل تنوع موجود در ایران را به‌عنوان یک هسته مرکزی تنوع دارد. با توجه به نبود گزارش‌های کافی در زمینه مطالعات ژنومی و سطح تنوع ژنتیکی گونه سماق به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم دارویی، جنگلی و چند منظوره بومی شمال‌غرب کشور، این پژوهش با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیتی در جمعیت‌های مختلف سماق جمع‌آوری شده از شمال‌غرب کشور با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق پنج جمعیت طبیعی سماق از شمال‌غرب کشور شامل ۲ منطقه از آذربایجان‌شرقی (آغبراز در هوراند و نیر در ارسباران) و ۳ منطقه از آذربایجان‌غربی (دره خان در ارومیه، دره نیژ در ارومیه و کچله در ارومیه) مورد بررسی قرار گرفتند. ناحیه آغبراز- هوراند در موقعیت طول جغرافیایی '۲۳ °۴۷ و عرض جغرافیایی '۵۹ °۳۸ در ۵۰ کیلومتری شهرستان اهر و ناحیه نیر- ارسباران در موقعیت طول جغرافیایی '۵۰ °۴۶ و عرض جغرافیایی '۰۲ °۳۹ در ۶۰ کیلومتری شهرستان خدافرین واقع شده است. نواحی دره خان و دره نیژ در ۳۰ کیلومتری شهرستان ارومیه با طول

1 . Molecular Markers
2 . Inter Simple Sequence Repeat
3 . Random Amplified Polymorphic DNA

Archive of SID

www.SID.ir

جغرافیایی '۸۰ °۴۵ و عرض جغرافیایی '۱۶ °۳۷ و ناحیه کچله در ۸۰ کیلومتری شهرستان ارومیه به‌ترتیب با موقعیت طول '۵۲ °۴۴ و عرض جغرافیایی '۱۲ °۳۷ استقرار یافته‌اند. نمونه‌های برگی از سرشاخه‌های جوان درختچه‌های سماق با ظاهر سالم در اواخر خرداد ماه سال ۱۳۹۴ از مناطق مورد بررسی و با انتخاب ۱۵ پایه در هر منطقه انجام شد. نمونه برداری طبق الگوی خاص و با رعایت قوانین نمونه‌برداری و آماری با فاصله در حدود ۵ درخت (۱۵ متر) انجام شد. سپس برای استخراج DNA و تعیین تنوع ژنتیکی با نشانگرهای مولکولی ISSR، برگ‌های جمع‌آوری شده از هر پایه در داخل فویل آلومینیوم و در داخل تانک ازت مایع قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شد و تا مرحله استخراج DNA در دمای C °۸۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی و انگشت‌نگاری

نمونه‌های برگی با استفاده از ازت مایع در ظروف چینی خرد شدند، سپس استخراج DNA ژنومی از برگ‌های پودر شده با استفاده از کیت استخراج DNA (DBIOZOL genomic DNA extracyion Regent) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA به‌وسیله الکتروفورز افقی با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد.

برای تعیین ژنوتیپ (Genotyping) افراد از ۱۸ آغازگر ISSR (جدول ۱) استفاده شد. واکنش PCR برای آغازگرهای مورد بررسی در حجم ۲۳ میکرولیتری شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی (یک میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر بافر 10X، آب دو بار تقطیر (DDW)، ۰/۹ میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۲۸ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase یک واحد و یک میکرولیتر از هریک از آغازگرها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود. چرخه حرارتی PCR به‌ترتیب شامل C °۹۴ به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه در C °۹۴ به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر به رشته الگو (متغیر با توجه به ترکیب آغازگر) به‌مدت ۴۵ ثانیه، C °۷۲ به‌مدت ۲ دقیقه، بسط نهایی در C °۷۲ به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از تکثیر، فراورده‌های PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد و در ولتاژ ۸۰ ولت تفکیک شده و پس از پایان الکتروفورز عکس‌برداری از ژل انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

امتیازدهی نوارهای موجود به‌صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار PopGen Version 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) تعداد و درصد نشانگرهای چندشکل، تنوع ژنتیکی نی (H)، شاخص شانون (I)، فاصله ژنتیکی نی (D)، تنوع ژنتیکی کل (Ht)، تنوع بین جمعیت‌ها (Gst) و تنوع داخل جمعیت‌ها (Hst) محاسبه شد. در ضمن میزان اطلاعات چندشکلی (PIC: Polymorphism Information Content) برای هر آغازگر نیز به‌دست آمد. گروه‌بندی نمونه‌های داخل رویشگاه‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه ای بر اساس آلگوریتم حداقل تکامل (Minimum evolution) و ضریب فاصله P-distance در نرم‌افزار MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) و ۱۰۰۰ بار بوت استرپ انجام شد.

نتایج

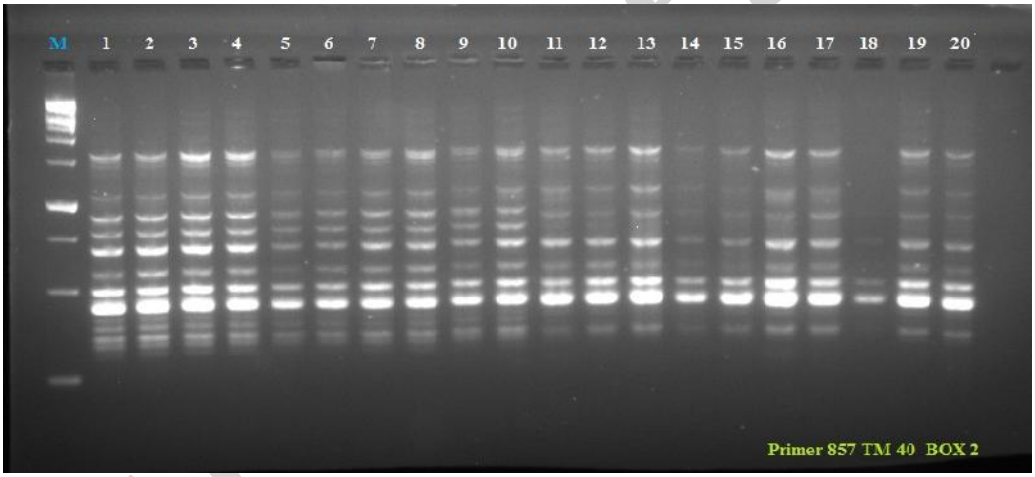
در این پژوهش، تمام ۱۸ آغازگر ISSR مورد استفاده الگوی نواردهی مناسبی برای امتیازدهی تکثیر کردند. نمونه‌ای از الگوی نواردهی در شکل ۱ نشان داده شده است. در میان آغازگرهای مورد بررسی، آغازگر UBC823 کمترین تعداد نوار (۳ عدد) و آغازگر UBC810 بیشترین تعداد نوار (۱۵ عدد) را تکثیر کرد (جدول ۲). متوسط تعداد نوار تولید شده توسط آغازگرهای ISSR، ۹ عدد بود. در مجموع تعداد ۱۳۲ نوار در افراد جمعیت امتیازدهی شد، که از این تعداد، ۱۲۴ نوار (۹۴٪) دارای چندشکلی بودند. کمترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگر UBC809 (۱۳/۹۲درصد) و بالاترین مقدار آن برای آغازگر UBC841 (۳۲/۰۸درصد) محاسبه شد. متوسط میزان PIC برای آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق ۳۰/۱۶ درصد بود (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق

شماره	کد آغازگر	توالی آغازگر از ′۵ به ′۳	شماره	کد آغازگر	توالی آغازگر از ′۵ به ′۳
۱	UBC809	(AG)8G	۱۰	UBC842	(GA)8CTG
۲	UBC810	(GA)8T	۱۱	UBC854	(TC)8RG
۳	UBC811	(GA)8C	۱۲	UBC856	(AC)8YA
۴	UBC816	(GA)8T	۱۳	UBC857	(AC)8YG
۵	UBC823	(TC)8C	۱۴	UBC864	(ATG)6
۶	UBC826	(AC)8C	۱۵	UBC866	(CTC)6
۷	UBC834	(GA)8YT	۱۶	UBC867	(GGC)8
۸	UBC835	(AG)8YC	۱۷	UBC890	VHV (GT)7
۹	UBC841	(GA)8CTC	۱۸	UBC801	(AT)8T



شکل ۱- الگوی نواردهی آغازگر UBC857 در ۲۰ نمونه سماق (M: نشانگر وزن مولکولی 1kb)

درصد جایگاه‌های ژنی چند شکل در پنج جمعیت سماق متفاوت بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که بیشترین آن به جمعیت نیر- ارسباران و کمترین آن به جمعیت کچله در استان آذربایجان‌غربی اختصاص داشت (به‌ترتیب ۶۸/۱۸ و ۳۹/۳۹ درصد). متوسط بیشینه شاخص تنوع ژنتیکی نی ۴۹/۹۹ درصد و متوسط بیشینه شاخص تنوع شانون ۶۹/۳ محاسبه شد. با توجه به شاخص‌های نی و شانون بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های نیر- ارسباران و کچله- ارومیه می‌باشد (جدول ۳).

www.SID.ir

جدول ۲- تعداد نوار تکثیر شده و چندشکل و مقدار PIC مربوط به هریک از آغازگرهای ISSR در این تحقیق

آغازگر	تعداد باندهای تولید شده	تعداد باندهای چند شکل	مقدار PIC (٪)
UBC811	۶	۶	۲۸/۷۷
UBC823	۳	۲	۱۹/۵۸
UBC826	۵	۵	۲۹/۲۴
UBC835	۱۰	۱۰	۲۶/۷۳
UBC842	۸	۸	۲۲/۱۸
UBC854	۴	۴	۱۴/۲۹
UBC856	۶	۵	۱۶/۵۵
UBC834	۷	۷	۲۴/۹۱
UBC841	۱۲	۱۲	۳۲/۰۸
UBC809	۶	۶	۱۳/۹۲
UBC810	۱۵	۱۳	۲۲/۴۵
UBC857	۹	۸	۲۴/۲۹
UBC867	۱۲	۱۰	۱۹/۹۴
UBC866	۴	۴	۱۹/۷۲
UBC864	۶	۵	۲۷/۱۳
UBC801	۷	۷	۲۴/۰۲
UBC890	۴	۴	۲۷/۲۸
UBC816	۸	۸	۳۰/۵۷
مجموع	۱۳۲	۱۲۴	
متوسط	۷/۳	۶/۸	۳۰/۱۶

جدول ۳- درصد جایگاه‌های ژنی و شاخص اطلاعات شانون در جمعیت‌های مختلف سماق

جمعیت	جایگاه‌های ژنی چندشکل (٪)	تنوع ژنی نی (H) (٪)			شاخص شانون (I) (٪)		
		کمینه	بیشینه	متوسط	کمینه	بیشینه	متوسط
آغبراز- هوراند	۶۰/۶۱	۶/۵	۵۰	۳۶/۹	۱۴/۸	۶۹/۳	۵۵/۵
نیر- ارسباران	۶۸/۱۸	۶	۵۰	۲۵/۸	۱۴/۸۱	۶۹/۳۱	۳۸
خان دره سی- ارومیه	۵۴/۵۵	۶	۴۹/۹۲	۱۹/۸۷	۱۴/۸۱	۶۹/۲۴	۲۹/۵
نیژ دره سی- ارومیه	۴۶/۲۱	۷	۴۹/۹۵	۱۶/۷	۱۵/۶۳	۶۹/۲۶	۲۴/۷۱
کچله- ارومیه	۳۹/۳۹	۱۴/۸۱	۵۰	۱۵/۱۶	۶	۶۹/۳۱	۲۲/۱۶
کل	۹۳/۹۴		۴۹/۹۹			۶۹/۳	

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی نی، پنج جمعیت مورد مطالعه دارای شباهت ژنتیکی نسبتا بالایی بودند (بین ۷۳/۲۸ تا ۸۶/۷۸ درصد) (جدول ۴). کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت نیر- ارسباران و جمعیت آغبراز-هوراند (۱۴/۱۸ درصد) و بیشترین فاصله بین جمعیت‌های کچله- ارومیه و نیر- ارسباران مشاهده شد (۳۱/۰۸ درصد).

جدول ۴- ضرایب تشابه نی (مقادیر بالای قطر) و فاصله ژنتیکی نی (مقادیر زیر قطر) بین پنج رویشگاه مورد مطالعه به‌دست آمده از الگوی نواردهی آغازگرهای ISSR

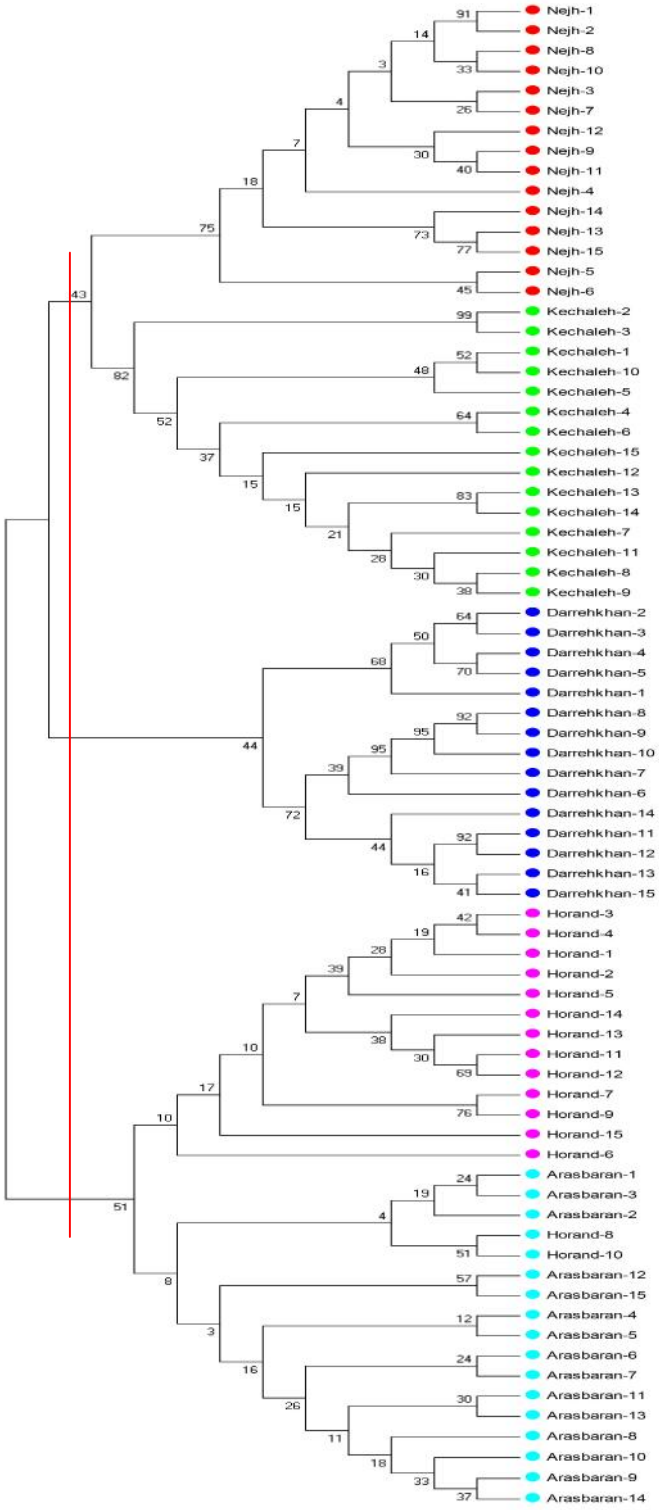
جمعیت	آغبراز- هوراند	نیر- ارسباران	خان دره سی	نیژ دره سی	کچله
آغبراز- هوراند	-	۸۶/۷۸	۸۰/۳۳	۷۷/۸۶	۷۸/۹۲
نیر- ارسباران	۱۴/۱۸	-	۸۰/۷۳	۷۷/۶۵	۷۳/۲۸
خان دره سی- ارومیه	۲۱/۹	۲۱/۴۱	-	۸۱/۴۷	۸۰/۸۷
نیژ دره سی- ارومیه	۲۵/۰۲	۲۵/۲۹	۲۰/۴۹	-	۸۱/۴۷
کچله- ارومیه	۲۳/۶۸	۳۱/۰۸	۲۱/۲۳	۲۰/۴۹	-

گروه‌بندی جمعیت‌های سماق با استفاده از الگوریتم UPGMA نشان داد که دو جمعیت آغبراز- هوراند و نیر- ارسباران با فاصله ژنتیکی ۵/۲۷ در یک گروه قرار می‌گیرند که بیانگر قرابت ژنتیکی بیشتر آنها می‌باشد (شکل ۲). با توجه به شکل ۲، جمعیت نیژ دره سی و کچله در یک گروه و جمعیت خان دره سی در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند.

شکل ۲- گروه‌بندی ۵ جمعیت سماق مورد مطالعه با روش مبتنی بر فاصله ژنتیکی نی با استفاده از الگوریتم UPGMA

در گروه‌بندی افراد جمعیت‌های مختلف، افراد مورد مطالعه در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۳). گروه اول دارای دو زیرگروه بوده و از نمونه‌های کچله-ارومیه و نیژ دره سی- ارومیه تشکیل شده است. گروه دوم فقط دارای افراد از جمعیت خان دره سی- ارومیه می‌باشد و گروه سوم با دو زیرگروه دارای نمونه‌های جمعیت نیر- ارسباران و آغبراز- هوراند است (شکل ۳). در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) ۲ مؤلفه اول در کل درصد کمی (۳۶/۸) از تغییرات کل را توجیه می‌کنند که حکایت از پراکنش خوب نشانگرها در سراسر ژنوم دارد. در این پژوهش، میانگین ضریب تنوع ژنی کل (Ht) برای سماق، ۳۳/۳ درصد به‌دست آمد و میانگین سهم هریک از ضرایب تنوع ژنی داخل جمعیتی (Hs) و بین جمعیتی (Gst) در تنوع ژنی کل، به‌ترتیب ۲۰/۲ درصد و ۷۹/۸۰ درصد برآورد شد (جدول ۵). مقدار انحراف معیار بالای تنوع ژنی داخل جمعیت‌ها احتمالا به‌دلیل اختلاف فراوانی آللی بیشتر در داخل جمعیت باشد.

www.SID.ir



شکل ۳- گروه‌بندی افراد ۵ جمعیت مورد بررسی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم حداقل تکامل (**Minimum evolution**) و ضریب فاصله **P-distance**

www.SID.ir

جدول ۵- برآورد تنوع ژنتیکی کل (Ht)، تنوع ژنتیکی داخل جمعیت (Hs) و تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst) در جمعیت‌های مختلف سماق (*Rhus coriaria* L.) ایرانی با استفاده از نشانگر ISSR

	تنوع ژنی کل (Ht)	تنوع ژنی داخل جمعیت‌ها (Hs)	تنوع ژنی بین جمعیت‌ها (Gst)
مقدار پارامتر	۰/۳۳۳	۰/۲۰۲۰	۰/۷۹۸۰
انحراف معیار	۰/۱۳۳۲	۰/۱۵۷۶	–

بحث

ارزیابی دقیق میزان و پراکنش تنوع ژنتیکی در گونه‌های نادر و در معرض خطر به‌منظور حفاظت و استفاده از منابع طبیعی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (Gonzalez-Astorga & Castillo-Campos, 2004; Fritsh & Rieseberg, 1996). با توجه به رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی، رابطه مشابهی بین کارایی بهبود ژنتیکی یک جامعه و تنوع ژنتیکی برای صفت مورد نظر وجود دارد، بنابراین حفظ و نگهداری ذخایر ژنتیکی ضروریست (Rout & Chrungoo, 2007; Bernath, 2002; Abdi & Maddah-Arefi, 2002). در این مطالعه تنوع بین و درون جمعیت‌های طبیعی سماق جمع‌آوری شده از شمال‌غرب کشور با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت و چند شکلی قابل ملاحظه ای (۹۳/۹۴) در الگوی نواری نشانگرهای ISSR به‌دست آمد. درصد چندشکلی به‌دست آمده در این مطالعه، با میزان چندشکلی گزارش شده (۹۰/۱۵) توسط Hung و همکاران (۲۰۰۸) برای ۲۱ نشانگر ISSR بر روی شش جمعیت شمشاد *Buxus sinica Var parvifoli* مشابهت دارد.

شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) توان تمایز هر آغازگر را از طریق تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی و فراوانی آلل‌ها تعیین می‌کند. البته هر چقدر اختلاف بین فراوانی آلل‌ها در یک مکان ژنی کمتر باشد عدد PIC بزرگتر خواهد بود. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از صفر تا یک متغیر است و هرچه عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت مورد بررسی است (Fabriki Ourang *et al.*, 2009). این شاخص در انتخاب نوع نشانگر برای به‌دست‌آوردن چندشکلی کافی، نوع رابطه خویشاوندی و نوع مواد گیاهی مورد مطالعه اهمیت زیادی دارد. از آنجایی که آغازگر UBC841، PIC بیشتری را در این مطالعه نشان داد (PIC=۳۲/۰۸)، بنابراین برای بررسی چندشکلی جمعیت‌های سماق مورد مطالعه از توانایی بالاتری نسبت به سایر آغازگرها برخوردار است.

نتایج این بررسی نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتا مطلوبی در بین جمعیت‌های مورد مطالعه سماق وجود دارد (۴۹/۹۹ درصد بر اساس شاخص نی و ۶۹/۳ بر اساس شاخص شانون). با توجه به شاخص Nei (۱۹۷۸) حداکثر تنوع ژنتیکی قابل محاسبه برای نشانگرهای غالب برابر ۵۰ درصد می‌باشد، بنابراین مقدار به‌دست آمده در این تحقیق، حدود ۹۹/۹۹ درصد (با لحاظ ۴۹/۹۹ درصد از ۵۰ درصد) از حداکثر تنوع ژنتیکی قابل محاسبه بوده و بیانگر تنوع ژنتیکی بسیار بالا در ژرم‌پلاسم سماق شمال‌غرب کشور است. مطالعات بسیار محدودی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جنس سماق و گونه‌های آن انجام شده است. در تحقیقی، Huang و همکاران (۲۰۰۸) شاخص شانون را با استفاده از نشانگر RAPD برای جمعیت‌های شمشاد ۴۳/۴ درصد گزارش کردند. در مطالعات دیگری نیز جمعیت‌های مختلف از گونه‌های *Populus cathayana* Rehd (Lu *et al.*, 2006) و *Cupressus chengiana* (Hao *et al.*, 2006) با استفاده از نشانگر ISSR ارزیابی شدند و شاخص شانون به‌ترتیب ۳۳/۱ و ۴۷/۴ محاسبه شد.

در این پژوهش، بیشترین تنوع ژنی در جمعیت‌های نیر-

Archive of SID

www.SID.ir

ارسباران و کچله- ارومیه و بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های نیر- ارسباران و آغبراز- هوراند مشاهده شد. به‌دلیل همین تشابه ژنتیکی بالا، 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). بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت کچله- ارومیه و نیر- ارسباران دیده شد، این دو رویشگاه از نظر جغرافیایی فاصله نسبتاً زیادی (۵۰۰ کیلومتر) از یکدیگر دارند. در حقیقت موانع اکولوژیکی جریان ژن بین این رویشگاه‌ها را کاهش می‌دهد، به‌عبارتی هرچه تبادل ژنی بین دو جمعیت کمتر باشد، آن دو جمعیت به مرور زمان مسیر تکاملی جداگانه‌ای را طی خواهند کرد و از یکدیگر دور شده و با تجمع این تفاوت‌های بین جمعیتی در طی تکامل، گونه جدیدی بوجود می‌آید (Hartl & Clarck, 1994). نتایج این تحقیق نشان داد که قسمت اعظم تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت‌های سماق شمال‌غرب کشور، مرتبط با تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های سماق می‌باشد، بنابراین تفاوت ژنتیکی بین پنج جمعیت مورد مطالعه بیشتر از تفاوت ژنتیکی داخل جمعیت‌ها می‌باشد. علت این موضوع می‌تواند ناشی از اشتقاق از یک نیای متفاوت و بعد ادامه حیات در شرایط اقلیمی متفاوت و جریان کم ژن بین جمعیت‌ها و یا هر دو یا سه عامل فوق باشد (Hamrick *et al.*, 1979). هر چند مقدار تنوع بین جمعیتی در این مطالعه بیشتر از تنوع داخل جمعیتی 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 به‌مرور زمان از تنوع ژنتیکی داخل آنها و به‌تبع آن از تنوع کل ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی سماق در ناحیه شمال‌غرب کشور کاسته نشود. زیرا از دست دادن تنوع ژنتیکی می‌تواند منجر به کاهش توانایی گونه نسبت به تغییرات محیطی و تغییر جمعیت‌ها در طول زمان شود (Ellstrand & Elam, 1993; Reed & Frankham, 2003). در این پژوهش بین توزیع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها و گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای مطابقت وجود دارد و این امر می‌تواند بیانگر مقدار کم تنوع ژنتیکی داخل جمعیتی باشد که منجر به قرارگیری ژنوتیپ‌های یک جمعیت در یک منطقه شده است.

منابع مورد استفاده

- Abdi, N. and Maddah-Arefi, H., 2002. Study of variation and seed deterioration of Bromus tomentollus germplasm, in natural resources gene bank. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 7: 1-25.
- Ahmadian Atari, M.M., Amin, G.R., Fazeli, M.R. and Jamalifar, H., 2008. A review on antimicrobial activities of sumac fruit (*Rhus coriaria* L.). Journal of Medicinal Plants, 25: 1-9.
- Avise, J.C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. New York. 528p.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ghouth, K., Malekzadeh Shafaroodi, S., Rashed Mohassel, M.H., Akbari, M.R. and Razavi, S.H., 2014. Grouping jujubes of Iran based on quantitative characteristics and ISSR and RAPD Markers. Seed and Plant Improvement Journal, 30: 173-190.
- 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

Archive of SID

www.SID.ir

- Rawashdeh I.M., Ghzawi A.L., Rawasgdeh, N.Q., Kheirallh, K., Al-Tawaha, A.R. and Salama, B., 2009. Genetic variation among sumac (*Rhus Coriaria* L.) samples collected from three locations in Jordan as revealed by AFLP markers. Advances in Environmental Biology, 3: 107-112.
- 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.
- Shabanian, N., Havasi, A. and Mehrabi, A.A., 2016. Genetic differentiation in Persian oak (*Quercus brantii*) populations using genomic inter-microsatellite markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24: 66-78.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, M., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28(10): 2731-2739.
- 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.

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., 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.
- Koohi Dehkordi, M.A., Rahim Malek, M., Seyyed Tabtabei, B.A., Bani Nasab, B. and Mobli, M., 2006. 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.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
- Rawashdeh I.M., 2011. Genetic variability in a medicinal plant *Artemisia judaica* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. International Journal of Agriculture and Biology, 13: 279-282.

Archive of SID

www.SID.ir

Genetic diversity of several Iranian sumac (*Rhus coriaria*) populations using genomic inter-microsatellites markers

R. Mohammadi Alaghoz[1], R. Darvishzadeh[2*], A. Alijanpour[3], H. Hatami Maleki[4], R. Heidari[5]

1- M.Sc., Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.
2*- Corresponding author, Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, Urmia, I.R. Iran.
Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir
3- Assoc. Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.
4- Assist. Prof., Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, I. R. Iran.
5- M.Sc., Agricultural Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, Urmia, I. R. Iran.

Received: 07.06.2017 Accepted: 08.01.2018

Abstract

Sumac (*Rhus coriaria* L.) as a forest shrub has been dispersed in Mediterranean and Eastern Asia specially Iran and has several medicinal and industrial applications. In this research, inter-microsatellites markers were used to study genetic diversity of sumac genotypes collected from five natural habitats located in North West of Iran (West and East Azerbaijan provinces). Fifteen samples were select randomly from each population and genomic DNA was fingerprinted by 18 ISSR markers. Results revealed existence of suitable genetic variation among the studied sumac genotypes and portion of inter population (79.8%) variation were higher than intra population (20.2%) variation. Minimum value of genetic distance (14.18) was observed between Aghberaz-Horand (East Azerbaijan province) and Nir-Arasbaran (East Azerbaijan province) populations and the maximum one (31.08) was observed between Kachelleh-Urmia (West Azerbaijan) and Nir-Arasbaran populations. According to classification of genotypes based on molecular data, Aghberaz-Horand and Nir-Arasbaran populations located in the same group and populations from other habits located in distinguished groups. Classification of genotypes via ISSR markers was in agreement with their geographical distributions. ISSR markers could be effectively applicable in genetic evaluation of sumac germplasm and also in identification of genetic relatedness among known and unknown sumac samples.

Key words: Genetic diversity, ISSR molecular markers, molecular analysis of variance, Sumac.

Archive of SID

www.SID.ir