

## تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های توس (*Betula pendula*) ایران، با استفاده از چند شکلی DNA سه ناحیه (CD، DT و K1K2) ژنوم کلروپلاستی

اباصلت حسین زاده کلاگر<sup>۱\*</sup>، فاطمه فلاح<sup>۱</sup> و حامد یوسف زاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

<sup>۲</sup> نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه جنگلداری

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۶

### چکیده

تنوع ژنتیکی توس (*Betula pendula*)، که یک گونه ارزشمند دارویی و در معرض خطر انقراض است، در سطح اندک جمعیت‌های باقیمانده از آن در نیم‌رخ شمالی ایران شامل: مارمیشو، سیاه مرزکوه، سنگده و شهرستانک، با استفاده از پلی مورفیسم DNA کلروپلاستی سه منطقه ۳۸۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۷۰۰ جفت بازی و تکنیک PCR-RFLP مطالعه شد. این مناطق به ترتیب *CD*، *DT* و *K1K2* نامیده می‌شوند. درصد جایگاه پلی مورفیک، هتروزیگوتی مورد انتظار (*He*) و شاخص شانون (*I*) در چهار جمعیت، به ترتیب برابر با ۲۴/۵۱ درصد، ۰/۰۹۶ و ۰/۱۴ محاسبه شد. آنالیز واریانس مولکولی نیز نشان داد که ۶۶ درصد از کل تنوع مربوط به درون جمعیتها و ۳۴ درصد آن بین جمعیتی است. محاسبه شاخص تمایز ژنتیکی ( $Gst = ۰/۲۰۶$ )، تمایز بالای جمعیت‌های توس از یکدیگر را نشان داد. مقایسه دو به دو میزان تمایز ژنتیکی جمعیتها از یکدیگر نشان داد که جمعیت مارمیشو بیشترین تمایز را از سایر جمعیتها نشان داد. برآورد میزان جریان ژنی بین جمعیتها حاکی از وقوع رانش ژنتیکی بین آنها است ( $Nm = ۰/۹۶$ ). همچنین نتایج آزمون مانتل همبستگی معنی‌داری (۷۷ درصد  $r =$ ) را بین تمایز ژنتیکی جمعیت و فاصله جغرافیایی آنها از یکدیگر نشان داد. نتایج تحقیق حاضر وقوع رانش ژنتیکی در جمعیت‌های توس ایران و خطر در معرض انقراض بودن این گونه را تأیید می‌کند. که به‌کارگیری راهکاری سریع و مناسب برای حفاظت آن را تأکید می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: توس؛ *Betula pendula*؛ رانش ژنتیکی؛ DNA کلروپلاستی؛ Touch-down PCR

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۲ پست الکترونیکی: [ahcolagar@umz.ac.ir](mailto:ahcolagar@umz.ac.ir)

### مقدمه

L.، متعلق به اواخر دوران سوم زمین‌شناسی (۲۲)، یکی از اجزای مهم اکولوژیکی و اقتصادی جنگلهای معتدله نیمکره شمالی محسوب می‌شوند. توس از جمله گونه‌های پیشگام است که به دلیل تولید دانه فراوان و زایا به سرعت در مناطق تخریب شده از جمله مناطق قطع شده و آتش سوزی جایگزین می‌شود (۹). متأسفانه تراکم اندک و آسیب‌پذیری بالا سبب قرارگرفتن آن در لیست قرمز گیاهان در معرض خطر انقراض شد (۱۱).

نوسانات شدید آب و هوایی مربوط به اواخر دوران سوم و چهارم زمین‌شناسی، به ویژه دوره چهارم یخبندان، تأثیر به‌سزایی در تغییر محدوده پراکنش و ساختار جمعیت گونه‌های گیاهی داشت (۲۰). این تغییرات آب و هوایی منجر به جدایی، مهاجرت، انقراض جمعیت و تسریع در میزان تکامل آنها شد (۷ و ۱۳). علاوه بر این، ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی می‌تواند تحت تأثیر محدودیت جریان ژنی از طریق پراکندگی دانه و فعالیت گرده افشانها نیز قرار گیرد (۱۹). درختان و درختچه‌های جنس توس (*Betula*)

هاپلوتایپ در تمامی مناطق تحت مطالعه مشترک بودند. محققان به این نتیجه رسیدند که اروپا بعد از عصر یخبندان از دو مسیر، یک مسیر از غرب و مسیر دیگر از شرق اروپا مجدداً توسط گونه *B. pendula* Roth مورد اشغال قرار گرفت. همچنین آنها دو جمعیت از گونه *B. pendula*، یکی در ایتالیا و دیگری در شبه جزیره ایبرین (Iberian) را به دلیل عدم وجود هاپلوتایپ عمومی A، جمعیت‌های متمایزی از سایر جمعیت‌های بررسی شده معرفی نمودند که دارای منشاء متفاوتی نیز بودند (۲۹). همچنین در ادامه این مطالعات مالیوچنکو و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از نشانگرهای کلروپلاستی و ریزوماهواره‌ای ساختار ژنتیکی و فیلوژغرافیایی ۵۳ جمعیت از دو گونه *B. pendula* و *B. pubescens* مورد مقایسه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که این دو گونه علی‌رغم دارا بودن هاپلوتایپ مشترک، ساختار ژنتیکی متفاوتی دارند که علت آن را به تفاوت شرایط اکولوژیکی بین دو گونه مرتبط دانستند (۲۵). در چین نیز تنوع ژنتیکی چهار جمعیت از گونه *B. luminifera*، در کوه‌های ویای (Wuyi) مورد بررسی قرار گرفت که تجزیه واریانس مولکولی حاکی از بالا بودن سطح تنوع ژنتیکی بین جمعیتها بود. همچنین ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که تنوع ژنتیکی در داخل جمعیتها همبستگی معنی‌داری با ارتفاع از سطح دریا و عوامل آب و هوایی از جمله؛ متوسط درجه حرارت سالانه، میزان بارش و عوامل مغذی خاک دارد (۴۱). محققان DNA کلروپلاستی گونه *B. maximowicziana* واقع در محدوده مرکزی ژاپن را با تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار دادند و ۱۱ هاپلوتایپ شناسایی کردند که مرز اصلی دو هاپلوتایپ اصلی (شمالی و جنوبی) از این گونه در منطقه توهوکو در شمال شرقی ژاپن واقع شده بود. آنها تنوع ژنتیکی بالایی را میان ۲۵ جمعیت مورد مطالعه شناسایی و در نهایت با مقایسه الگوی ساختار ژنتیکی به دست آمده از ژنوم کلروپلاستی و هسته‌ای به این نتیجه رسیدند که ژنوم هسته‌ای منتقل شده از طریق دانه‌گرده از هاپلوتایپ شمالی

در ایران نیز پراکنش توس به چند ناحیه کوچک در نیم‌رخ شمالی کشور محدود شده است. لکه‌های کوچک از این گونه در ارتفاعات بالای مرز جنگل، شامل ارتفاعات طالقان و دره غربی شهرستانک در کرج، دره لار در شهرستان آمل، رویشگاه سنگده در ساری، رویشگاه سیاه مرزکوه در علی‌آباد و شاهرود در استان سمنان گزارش شد (۶). همچنین تنها یک رویشگاه از این گونه در زاگرس شمالی، منطقه مارمیشو در استان آذربایجان غربی گزارش شده است (۲).

عدم آگاهی از تاریخچه زیستی و پراکنش لکه‌ای و پراکنده رویشگاه‌های این گونه و کاهش جریان ژنی به دلیل فاصله زیاد جمعیتها از یکدیگر، میزان آسیب‌پذیری این گونه را نسبت به تخریب رویشگاه بیشتر نمود. بنابراین آگاهی از ساختار و میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این گونه اهمیت ویژه‌ای در ارائه راهکار حفاظتی و مدیریتی مناسب دارد (۴، ۱۵ و ۲۱). در سالیان اخیر هم از ژنوم هسته‌ای و هم از ژنوم کلروپلاستی برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی گونه‌های گیاهی استفاده فراوان شده است (۲۷، ۲۳، ۱۷، ۳ و ۳۲). اما با توجه به عدم وقوع نوترکیبی و توارث تک‌والدی ژنوم کلروپلاستی (وراثت مادری) و همچنین از آنجاییکه جریان ژنی در نهاندانگان بیشتر از طریق بذر صورت می‌گیرد تا از طریق دانه‌گرده، نشانگرهای کلروپلاستی عموماً سطوح بالاتری از تمایز ژنتیکی را نسبت به نشانگرهای هسته‌ای نشان می‌دهند (۱۷ و ۲۹). تاکنون مطالعات متعددی در مورد چند شکلی DNA کلروپلاستی در طیف وسیعی از گونه‌های درختی از جمله جنس توس گزارش شده است (۲۲، ۲۹ و ۳۷).

با توجه به پراکنش وسیع گونه‌های توس در اروپا مطالعات زیادی هم در زمینه تنوع ژنتیکی و هم با رویکرد فیلوژغرافیایی صورت گرفت. یکی از این مطالعات به کارگیری تکنیک PCR-RFLP روی نواحی مختلف کلروپلاستی گونه *B. pendula* Roth، در سرتاسر اروپا بود که در نهایت از بین ۱۳ هاپلوتایپ شناسایی شده دو

یکدیگر جهت تعیین میزان ضرورت اتخاذ تدابیر حفاظتی برای رویشگاه‌های این گونه را مورد بررسی قرار دهد.

### مواد و روشها

**نمونه برداری:** برای انجام این تحقیق چهار رویشگاه طبیعی این گونه در ایران انتخاب شدند (جدول ۱). از هر رویشگاه حداقل ۶ درخت و با فاصله حداقل ۱۰۰ متر (در صورت امکان) از یکدیگر به روش Miles و همکاران انتخاب و نمونه‌های برگ آنها تهیه شد (۲۶).

به جنوبی بسیار بیشتر از انتقال آنها در جهت مخالف است (۳۷).

بنابراین با توجه به اینکه تا کنون هیچ گونه مطالعه‌ای با رویکرد مولکولی مبتنی بر DNA کلروپلاستی در زمینه تنوع ژنتیکی گونه‌های توس در ایران گزارش نشد، تحقیق حاضر در نظر دارد تا با استفاده از تکنیک PCR-RFLP نواحی مختلف کلروپلاستی، میزان تنوع ژنتیکی در سطح جمعیت‌های توس در ایران و همچنین میزان تمایز آنها را از

جدول ۱- اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های مورد بررسی

منطقه	استان	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی (شرقی)	عرض جغرافیایی (شمالی)
سیاه‌مرزکوه	گلستان	۲۳۴۴	۵۵°۱۰'	۳۶°۳۸'
سنگده	مازندران	۱۶۰۰	۵۳°۱۰'	۳۶°۵۸'
شهرستانک	البرز	۲۴۰۴	۵۱°۲۳'	۳۵°۴۴'
مارمیشو	آذربایجان غربی	۱۷۴۱	۴۴°۳۵'	۳۷°۳۴'

سازی طولانی و طراحی مجدد پرایمر به ویژه برای نمونه‌هایی که تکثیر آنها مشکل است، صورت می‌گیرد (۳۰).

برای تکثیر ناحیه CD، از Touch-down PCR در شرایط دمایی واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در دو مرحله؛ مرحله اول با ۱۴ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰-۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه که در هر چرخه به اندازه نیم درجه تا رسیدن به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه) و مرحله دوم با ۱۸ چرخه (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۰ درجه به مدت سه دقیقه) و در پایان فرآورده‌های تکثیر به منظور بسط نهایی در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه نگهداری شدند.

برای تکثیر ناحیه K1K2، از Touch-down PCR در شرایط دمایی واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در دو مرحله؛ مرحله اول با ۱۴ چرخه (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۶۰ درجه که در هر

**استخراج DNA، تکثیر نواحی کلروپلاستی:** استخراج کل DNA ژنومی از برگ توس، با استفاده از روش CTAB و به کارگیری غلظت نمکی بالا (به منظور حذف پلی ساکاریدها) صورت گرفت (۳۴). سه قطعه ژنی *trnD*، *trnD-trnT*، *trnD*، *trnK1-trnK2* (شکل ۱- A) با استفاده از پرایمرهای عمومی کلروپلاستی (شکل ۱- B) و از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز (شکل ۱- C) تکثیر شدند (۸ و ۱۲).

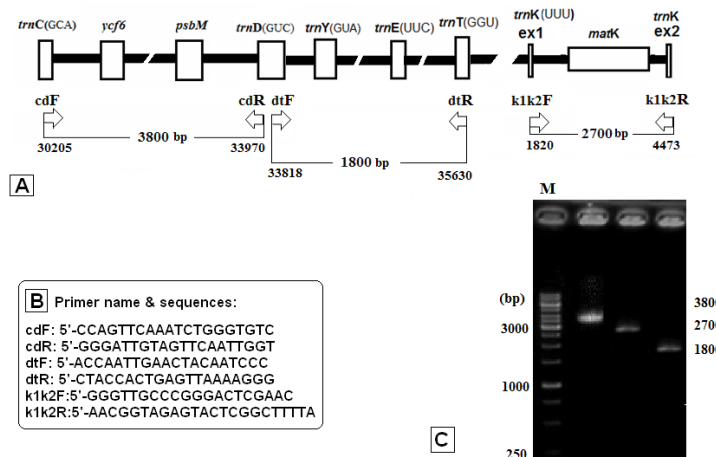
**بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلیمرز:** قطعات *CD*، *DT* و *K1K2* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در شرایط بافری PCR 1X، ۲ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میکرومولار dNTP، در غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌گرم از آلبومین سرم گاوی یا همان BSA (Bovine serum albumin)، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر و ۰/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمرز *Taq* تکثیر شد. سپس هر ناحیه به روش Touch-down تکثیر شدند، این روش با هدف افزایش اختصاصیت، حساسیت و محصول PCR بدون نیاز به بهینه

فرآورده‌های تکثیر به منظور بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۶۸ درجه نگهداری شدند.

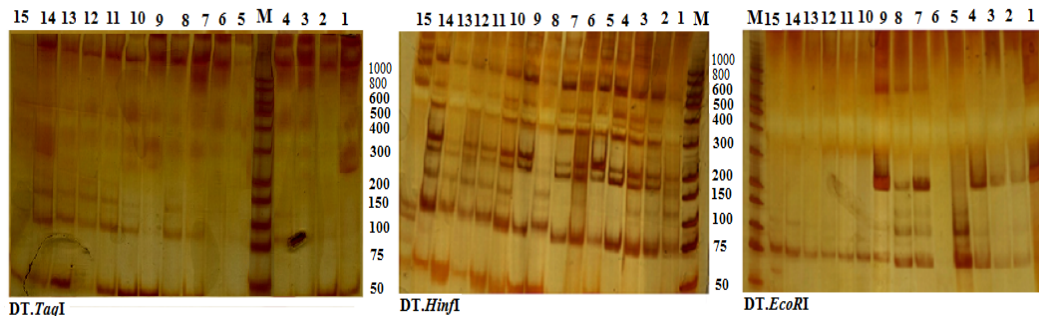
**هضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره ای پلیمراس:** تمامی نواحی تکثیر یافته به جز ناحیه CD (که فقط با *HinfI*، *TaqI* *HinfI* برش زده شد) با سه آنزیم برشگر *EcoRI*، *EcoRI*، *EcoRI* برش زده شدند. مقدار ۹ میکرولیتر (تقریباً ۱۰۰ نانو گرم) از قطعات تکثیر شده *CD*، *DT* و *KIK2*، با ۳ واحد آنزیمهای *HinfI* و *TaqI* و *EcoRI* در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به مدت ۱۶ ساعت به ترتیب در دمای اپتیمم ۳۷، ۶۵ و ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند. محصول نهایی به وسیله الکتروفورز پلی اکریل آمید ۸ درصد جداسازی شدند (شکل ۲). کلیه واکنش‌گرهای PCR و RFLP از شرکت سیناژن (ایران) تهیه گردید.

چرخه به اندازه نیم درجه تا رسیدن به دمای ۵۳ درجه کاهش می‌یابد. سه دقیقه در ۷۲ درجه) و مرحله دوم با ۱۴ چرخه (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۵۳ درجه، سه دقیقه در ۷۲ درجه) و در پایان فرآورده‌های تکثیر ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه به منظور تکمیل سنتز نگهداری شدند.

برای تکثیر ناحیه DT، از Touch-down PCR در شرایط دمایی واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه به مدت ۴ دقیقه در دو مرحله؛ مرحله اول با ۲۰ چرخه (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۵۳ درجه که در هر چرخه به اندازه نیم درجه تا رسیدن به دمای ۴۳ درجه کاهش می‌یابد. سه دقیقه در ۶۸ درجه) و مرحله دوم با ۲۰ چرخه (۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، ۴۵ ثانیه در ۴۳ درجه، سه دقیقه در ۶۸ درجه) و در پایان



شکل ۱- شماتیک قطعات ژنی تکثیر شده موقعیت و توالی پرایمری و محصولات PCR در ژل آگارز: شماتیک قطعات ژنی تکثیر شده کلروپلاستی (A)؛ نام و توالی پرایمری (B)؛ محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR-RFLP منطقه DT برش زده با سه آنزیم *EcoRI*، *TaqI*، *HinfI* در ژل پلی آکرلامید با رنگ آمیزی نیترات نقره آمونیاکی: نمونه های شماره ۱ تا ۴ از (منطقه سیاه مرزکوه)، ۵ تا ۸ (سنگده)، ۹ تا ۱۲ (شهرستانک)، ۱۳ تا ۱۵ (شهرستانک) جمع آوری شد؛ M: نمایانگر مارکر DNA

جمعیت از یکدیگر با استفاده از آزمون تجزیه به مؤلفه های هماهنگ اصلی (PCoA) انجام شد.

### نتایج

نواحی *CD*، *K1K* و *DT* ژنوم کلروپلاستی با استفاده از برنامه Touch-down PCR تکثیر شدند به طوری که اندازه تقریبی این مناطق به ترتیب ۳۸۰۰، ۲۷۰۰ و ۱۸۰۰ جفت باز در الکتروفورز ژل آگارز را نشان داد (شکل ۱- C). هر سه ناحیه برش یافته با سه آنزیم محدودکننده *TaqI*، *HinfI*، *EcoRI*، قطعات پلی مورفیک نشان دادند. به عنوان نمونه، الگوی هضم آنزیمی ناحیه *DT* با سه آنزیم برشگر *HinfI*، *TaqI*، *EcoRI* روی ژل پلی‌آکریل‌آمید نشان داده شد (شکل ۲). تعداد کل باندهای RFLP و طول قطعات پلی مورفیک هر ناحیه نیز به طور جداگانه گزارش شد (جدول ۲).

**تجزیه و تحلیل:** به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت توس در ایران ضرایب ژنتیکی مختلف از جمله درصد باند چند شکل (P)، شاخص شانون (I)، تعداد آلل مشاهده شده (Na) و تعداد آلل مؤثر (Ne) با استفاده از نرم افزار Popgene v1.32 محاسبه شد (۲۸ و ۴۲). برآورد تمایز ژنتیکی (Gst یا Fst) با استفاده از فرمول  $Gst = (HT - HS) / HT$  انجام شد. همچنین میزان جریان ژنی (Nm) بین جمعیت‌های توس با استفاده از فرمول  $Nm = \{1 / (Fst - 1)\}$  محاسبه شد (۳۹). آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، به منظور برآورد تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی با استفاده از نرم افزار GenAlEx v6.5 مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۱). معنی داری همبستگی بین تمایز ژنتیکی و فاصله جغرافیایی با استفاده از آزمون مانتل و نمایش فضایی فاصله ژنتیکی بین افراد و میزان تمایز افراد هر

جدول ۲- قطعات تکثیر شده *CD*، *K1K*، *DT*، آنزیمهای برشگر، طول قطعات پلی مورفیک در RFLP و نوع متغیرهای مشاهده شده

نام و اندازه تقریبی فرآورده PCR	آنزیم برشگر	تعداد کل باند RFLP	اندازه باندهای پلی مورفیک (جفت باز)	نوع جهش هر متغیر
CD (۳۸۰۰ جفت باز)	<i>HinfI</i>	۱۴	۷۵؛ ۱۰۰؛ ۱۲۰؛ ۴۰۰؛ ۴۲۰؛ ۸۰۰	حذف / اضافه
K1K2 (۲۷۰۰ جفت باز)	<i>HinfI</i>	۸	۱۳۰؛ ۲۲۰	حذف / اضافه
	<i>TaqI</i>	۹	۴۵۰؛ ۴۸۰	حذف / اضافه
	<i>EcoRI</i>	۴	۲۳۰	حذف / اضافه
DT (۱۸۰۰ جفت باز)	<i>HinfI</i>	۷	۱۲۰	حذف / اضافه
	<i>TaqI</i>	۴	۲۵۰	حذف / اضافه
	<i>EcoRI</i>	۴	۲۰۰؛ ۸۰۰	حذف / اضافه

است به طوری که ۶۶ درصد از کل تنوع، درون جمعیتی و ۳۴ درصد بین جمعیتی بود (جدول ۴).

شاخص تنوع ژنتیکی، تنوع ژنتیکی Nei به تفکیک هر جمعیت و نیز تنوع و تمایز کل جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول های ۵ و ۶ آورده شد.

مقایسه دو به دو میزان تمایز ژنتیکی جمعیتها از یکدیگر نشان داد که جمعیت مارمیشو واقع در حد غربی شمال ایران در منطقه زاگرس شمالی بیشترین تمایز از سایر جمعیتها را دارد (جدول ۶). تجزیه و تحلیل (PCoA) نیز، تمایز بالای جمعیت مارمیشو را از سایر جمعیتها به‌ویژه

نتایج تجزیه و تحلیل حاصل از پارامترهای مختلف ژنتیکی که به تفکیک هر جمعیت آورده شد (جدول ۳)، نشان داد که جمعیت سنگده با ۴۱/۱۸ و جمعیت مارمیشو با ۵/۸۸ درصد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین درصد جایگاه پلی مورفیک بودند. بیشترین و کمترین میزان تنوع شانون و هتروزیگوسیتی نیز به ترتیب در جمعیت سنگده و مارمیشو مشاهده شد.

آنالیز واریانس مولکولی نشان داد تنوع درون جمعیتها سهم قابل توجه ای از میزان کل تنوع را به خود اختصاص داده

جمعیت سیاه‌مرزکوه و سنگده را تأیید می‌نماید (شکل ۳). نتایج آزمون مانتل همبستگی معنی‌داری ( $F=0.77$ ) را بین تمایز ژنتیکی جمعیت و فاصله جغرافیایی آنها از یکدیگر نشان داد، طوری که جمعیت‌های دورتر از هم تمایز ژنتیکی بیشتری از همدیگر نشان دادند.

جدول ۳- پارمترهای ژنتیکی بررسی شده بین جمعیت‌های مورد مطالعه

جمعیت	تعداد اللهای متفاوت (Na)	تعداد اللهای مؤثر (Ne)	شاخص شانون (I)	هتروزیگوتی مورد انتظار (He)	درصد جایگاه پلی مورفیک (%P)
سیاه‌مرزکوه	1/157±0/07	1/173±0/05	0/149±0/03	0/102±0/02	23/53%
سنگده	1/373±0/07	1/343±0/06	0/259±0/04	0/182±0/03	41/18%
شهرستانک	1/216±0/07	1/149±0/04	0/136±0/03	0/089±0/02	27/45%
مارمیشو	0/863±0/06	1/014±0/008	0/020±0/01	0/011±0/006	5/88%
کل	1/152±0/04	1/170±0/02	0/141±0/01	0/096±0/01	24/51%

جدول ۴- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) درون و بین جمعیت گونه *Betula pendula*

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد فراوانی	احتمال
بین جمعیت	۳	۳۱/۹۹۷	۱۰/۶۶۶	۳۴%	۰/۰۱۰
درون جمعیت	۱۸	۵۰/۸۶۷	۲/۸۲۶	۶۶%	
کل	۲۱	۸۲/۸۶۴		۱۰۰%	

جدول ۵- میزان شاخص تنوع ژنتیکی و تمایز ژنتیکی به تفکیک هر جمعیت و کل جمعیت

جمعیت	تنوع ژنتیکی در هر جمعیت	تنوع ژنتیکی Nei (H)	تنوع ژنتیکی کلی (Ht)	تمایز ژنتیکی نسبی (Fst)
سیاه‌مرزکوه	0/208	0/094	0/251	0/170
سنگده	0/200	0/181	0/245	0/183
شهرستانک	0/194	0/089	0/240	0/191
مارمیشو	0/140	0/011	0/200	0/299
کل	0/743	0/374	0/936	0/206

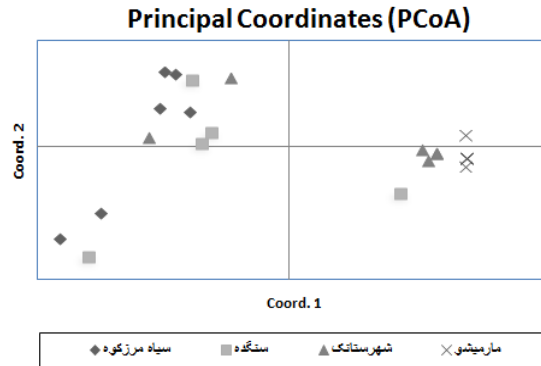
جدول ۶- میزان تمایز ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه از یکدیگر بر اساس شاخص Nei

سیاه‌مرزکوه	سنگده	شهرستانک	مارمیشو
0	0/023	0	0
0/023	0	0/027	0
0/025	0/027	0	0
0/042	0/045	0/047	0

ویژه کاهش یک یا دونسل برای گونه‌های نزدیک) اصلی دانستند که به تازگی رخ داده است. در چنین حالتی تنوع ژنتیکی بین افراد باقیمانده به شدت تحت تأثیر جمعیت بزرگتری که از قبل وجود داشتند می‌باشند (۲۴، ۳۵ و ۴۳). همچنین اختلاف شرایط محیطی نیز می‌تواند در میزان تنوع ژنتیکی مؤثر باشد به گونه‌ای که جنگلهای صخره‌ای سنگده و سیاه‌مرزکوه به دلیل برخورداری از شرایط طبیعی و جغرافیایی مناسب از جمله بارندگی و حرارت مناسب، نزدیکی به دریا، وجود کوهها و دامنه‌های متعدد با اختلاف ارتفاع شدید توانسته زیستگاه مناسبی برای اجتماعات توس و بسیاری از گونه‌های گیاهی باشند (۱)، که بیشترین تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص می‌دهند.

بررسی میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های توس ایران حاکی از تمایز ژنتیکی بالای ( $Gst=0/206$ ) جمعیت‌های توس ایران است. در واقع اگر میزان  $Gst$  بین محدوده  $0/05-0/15$  باشد نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم و اگر بین  $0/15-0/5$  باشد نمایانگر تمایز ژنتیکی متوسط و در نهایت اگر بین  $0/25-0/15$  باشد نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بسیار بالاست (۵، ۱۶ و ۴۰).

گونه‌های گیاهی از دو طریق مهاجرت دانه‌گرده و انتقال بذر به جمعیت‌های مجاور با یکدیگر جریان ژنی برقرار می‌کنند. در واقع این دو مکانیسم بر میزان تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی تأثیر به‌سزایی دارند (۳۳). در این تحقیق میزان جریان ژنی بین جمعیت‌های توس ایران پایین بود ( $Nm=0/96$ ). این مسئله را می‌توان ناشی از شرایط رویشگاهی و فاصله زیاد جمعیت‌های توس ایران از یکدیگر دانست به‌طوری که ۴ رویشگاه مورد بررسی در مناطق کوهستانی و صخره‌ای و با شیب بسیار تند عموماً بالای مرز جنگل حضور دارند. در واقع محدودیت جریان ژنی از هر دو طریق بذر و دانه‌گرده در جمعیت‌های پراکنده منجر به تمایز ژنتیکی بالا در جمعیت‌های توس در ایران شده



شکل ۳- نمودار دو بعدی (PCoA) حاصل از داده‌های PCR-

RFLP جمعیت‌های توس *B. pendula*

### بحث

یکی از مهم‌ترین راه‌های حفاظت و مدیریت گونه‌های گیاهی در معرض خطر انقراض، آگاهی از ساختار ژنتیکی و میزان تنوع آنها می‌باشد (۲۱ و ۴). در این پژوهش مشخص شد که سطح تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های توس ایران ( $ht=0/9$ ) نسبت به جمعیت‌های توس در اروپا از میزان بالاتری برخوردار است (۲۵ و ۲۹). که البته این میزان برای گونه‌های درختی دیرزی با سیستم تولید مثلی دگرلقاحی و باد‌گرده‌افشان قابل انتظار است (۱۵ و ۳۶). برای طیف گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی خصوصیات تاریخیچه زندگی از جمله سیستم لقاحی، سیستم پرورشی، مکانیسم پراکنش، محدوده جغرافیایی (به عنوان یک عامل مهم در اکوسیستم جنگل) نقش مهمی را در الگوی تنوع ژنتیکی آنها بازی می‌کنند (۱۵). به‌طور کلی قابل انتظار است که گونه‌هایی با پراکنش جغرافیایی محدود به مراتب از تنوع ژنتیکی کمتری در مقایسه با گونه‌های با پراکنش وسیع برخوردار باشند (۲۴، ۳۸ و ۴۳). اما بر خلاف انتظار میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های کوچک و جدا افتاده توس ایران بالا است. این موضوع علی‌رغم تخریب رویشگاه‌های توس ایران و شرایط سخت رویشگاهی آن تعجب‌برانگیز است. مشابه این تحقیق برای گونه‌های *Betula humilis*، *Prunus spinosa* و *Nouelia insignis* نیز گزارش شده (۲۲، ۲۴ و ۴۳) و دلیل آن را کاهش اندازه جمعیت (به

گونه *Betula pendula* یکی از گونه‌های با ارزش دارویی و در معرض خطر انقراض است که ارائه راهکار مدیریتی مناسب برای حفاظت و بهره‌برداری از آن مستلزم آگاهی از سطح و میزان تنوع ژنتیکی در سطح جمعیت‌های آن است. در این تحقیق علاوه بر تمایز ژنتیکی بالا بین جمعیت‌ها، بر خلاف انتظار، تنوع درون جمعیتی نیز در سطح هر جمعیت بالا بود. این موضوع که مشخصه مناطق پناهگاه (Refuge) در عصر یخبندان است فرضیه قدمت طبیعی بالای رویشگاه‌های توس ایران را تقویت می‌نماید. همچنین در این تحقیق مشخص شد که عملاً امکان تبادل ژنی بین جمعیت‌های توس ایران وجود ندارد. از آنجایی که میزان بالای تمایز درون جمعیتی و جریان ژنی کم، خطر واگرایی جمعیت‌ها را به دنبال دارد و با توجه به اینکه اندازه جمعیت در جمعیت‌های توس ایران عموماً کمتر از استاندارد حداقل اندازه جمعیت مؤثر تخمین زده شده برای اغلب گیاهان است، بنابراین تعداد و اندازه جمعیت‌های توس ایران حفظ تنوع ژنتیکی باقی مانده را تضمین نمی‌کند و اقدامات حفاظتی باید در جهت ایجاد تعداد زیاد نهال، به کارگیری افراد مختلف به عنوان والدین به منظور حفظ همان اندازه تنوع ژنتیکی موجود، در نسل‌های بعدی صورت گیرد. نتایج تحقیق حاضر ضمن تأیید وقوع رانش ژنتیکی در جمعیت‌های توس ایران، خطر در معرض انقراض بودن این گونه ارزشمند دارویی تأیید و به‌کارگیری راهکاری سریع و مناسب برای حفاظت از آن را تأکید می‌نماید.

است. از طرف دیگر میزان جریان ژنی کمتر از یک بین جمعیت‌های گیاهی بیانگر وقوع پدیده رانش ژنتیکی است که خود می‌تواند سبب افزایش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی باشد (۱۰). همچنین نتایج آزمون آنالیز واریانس مولکولی حاکی از سهم بالای تنوع درون جمعیت‌ها (۶۶ درصد) در مقایسه با تنوع بین جمعیت‌ها (۳۴ درصد) است.

توس از جمله گونه‌هایی است که در عصر یخبندان از عرض‌های جغرافیایی بالا به سمت عرض‌های جغرافیایی پایین مهاجرت نموده است. سپس بعد از عصر یخبندان با گرم شدن تدریجی هوا، به دلیل کاهش رقابت با سایر گونه‌ها مجدداً به عرض‌های جغرافیایی بالا مهاجرت نمودند. اما در برخی از مناطق از جمله مناطق کوهستانی شمال ایران که شرایط رویشگاهی سخت است و امکان حضور سایر گونه‌ها چندین فرام نیست همچنان به حضور خود ادامه دادند. یکی از مشخصه‌های اصلی جمعیت‌های به جا مانده از عصر یخبندان (پناهگاه‌ها) وجود تنوع درون جمعیتی بالا به همراه تمایز ژنتیکی بالا از جمعیت‌های مجاور است (۱۴، ۱۸). بنابراین با توجه به اینکه چنین شرایطی بین اندک جمعیت‌های توس در ایران نیز برقرار است محتمل است جمعیت‌های کنونی باقیمانده جمعیت بزرگی باشد که در عصر پس از یخبندان مجدداً به سمت عرض‌های جغرافیایی بالا مهاجرت نمودند.

### نتیجه‌گیری نهایی

### منابع

۱. اکبری، م، زارع، ح، حسینی، م، اجتهادی، ح. ۱۳۸۳. بررسی فلور، ساختار رویشی و کورولوژی عناصر گیاهی اجتماعات توس در سنگد ساری. پژوهش و سازندگی. (۶۴) ۹۶-۸۴.
۲. ثابتی، ح، ۱۳۸۱. جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران، دانشگاه یزد.
۳. صالحی شانجانی، پ، ۱۳۸۱. مطالعه فیلوجغرافیایی DNA کلروپلاستی راش. مجله زیست‌شناسی ایران ۱۷: ۱۱۷.
۴. اشرفی جعفری، ع، صالحی شانجانی، پ، کوهی، ل، بخشی خانیکی، غ، ۱۳۹۲. بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه جغرافیایی میان ۱۱ جمعیت وحشی *Dactylis glomerata* توسط پروتئین‌های کل. مجله زیست‌شناسی ایران ۲۶: ۲۷۸.
5. Balloux, F., & Lugon-Moulin, N., 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11: 155-165.



6. Browicz, K., 1972 *Betulaceae* in KH Rechinger (ed.) Flora Iranica no. 96.
7. Comes, H. P., & Kadereit, J. W., 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*. 3: 432-438.
8. Demesure B, Sodzi N, Petit RJ., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*. 4: 129-131
9. Fischer, A., Lindner, M., Abs, C., & Lasch, P., 2002. Vegetation dynamics in central European forest ecosystems (near-natural as well as managed) after storm events. *Folia Geobotanica*. 37: 17-32.
10. Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., van Kleunen, M., & Schmid, B., 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (*Ranunculaceae*). *American Journal of Botany*. 87: 1128-1137.
11. Gardenfors, U., Hilton-Taylor, C., Mace, G. M., & Rodriguez, J. P., 2001. The application of IUCN Red List criteria at regional levels. *Conservation Biology*. 15: 1206-1212.
12. Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G. G., & Petit, R. J., 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*. 1: 345-349.
13. Hampe, A., Arroyo, J., Jordano, P., & Petit, R. J., 2003. Rangewide phylogeography of a bird dispersed Eurasian shrub: contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia. *Molecular Ecology*. 12: 3415-3426.
14. Hampe, A., & Petit, R. J., 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecology Letters*. 8: 461-467.
15. Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In *Population genetics of forest trees* (pp. 95-124). Springer Netherlands
16. Hartl, D. L., & Clark, A. G., 1997. Principles of population genetics (Vol. 116). Sunderland: Sinauer associates.
17. Heuertz, M., Hausman, J. F., Hardy, O. J., Vendramin, G. G., Frascaria-Lacoste, N., & Vekemans, X., 2004. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*. 58: 976-988.
18. Hewitt, G. M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 58: 247-276.
19. Hewitt, G. M., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405: 907-913.
20. Hewitt, G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 359: 183-195.
21. Holsinger, K. E., & Gottlieb, L. D., 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. 195-208.
22. Jadwiszczak, K. A., Banaszek, A., Jabłonska, E., & Sozinov, O. V., 2012. Chloroplast DNA variation of *Betula humilis* Schrk. in Poland and Belarus. *Tree Genetics & Genomes*. 8: 1017-1030.
23. Jarvinen, P., Palme, A., Morales, L. O., Lannenpaa, M., Keinanen, M., Sopanen, T., & Lascoux, M., 2004. Phylogenetic relationships of *Betula* species (*Betulaceae*) based on nuclear *ADH* and chloroplast *matK* sequences. *American Journal of Botany*. 91: 1834-1845.
24. Luan, S., Chiang, T. Y., & Gong, X., 2006. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (*Asteraceae*), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting. *Annals of Botany*. 98: 583-589.
25. Maliouchenko, O., Palme, A. E., Buonamici, A., Vendramin, G. G., & Lascoux, M., 2007. Comparative phylogeography and population structure of European *Betula* species, with particular focus on *B. pendula* and *B. pubescens*. *Journal of Biogeography*. 34: 1601-1610.
26. Miles, T. R., Miles Jr, T. R., Baxter, L. L., Bryers, R. W., Jenkins, B. M., & Oden, L. L., 1995. Alkali deposits found in biomass power plants: A preliminary Investigation of Their Extent and Nature. 1: 433-8142.
27. Nagamitsu, T., Kawahara, T., & Kanazashi, A., 2006. Endemic dwarf birch *Betula apoiensis* (*Betulaceae*) is a hybrid that originated from *Betula ermanii* and *Betula ovalifolia*. *Plant Species Biology*. 21: 19-29.

28. Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 70: 3321-3323.
29. Palme, A. E., Su, Q., Rautenberg, A., Manni, F., & Lascoux, M., 2003. Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. Molecular Ecology. 12: 201-212.
30. Palme, A.E., Vendramin, G.G., 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonisation and hybridisation in hazel, *Corylus avellana*. Molecular Ecology. 11:1769-1780.
31. Peakall, R., & Smouse, P. E., 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. Bioinformatics. 28: 2537-2539.
32. Petit, R. J., Kremer, A., & Wagner, D. B., 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. Theoretical and Applied Genetics. 87: 122-128.
33. Pfeifer, M., & Jetschke, G., 2006. Influence of geographical isolation on genetic diversity of *Himantoglossum hircinum* (Orchidaceae). Folia Geobotanica. 41: 3-20.
34. Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant molecular biology reporter. 15: 8-15.
35. Qiao, Q., Zhang, C. Q., & Milne, R. I., 2010. Population genetics and breeding system of *Tupistra pingbianensis* (Liliaceae), a naturally rare plant endemic to SW China. Journal of Systematics and Evolution. 48: 47-57.
36. Rusanen, M., Vakkari, P., & Blom, A., 2003. Genetic structure of *Acer platanoides* and *Betula pendula* in northern Europe. Canadian Journal of Forest Research. 33: 1110-1115.
37. Tsuda, Y., & Ide, Y., 2010. Chloroplast DNA phylogeography of *Betula maximowicziana*, a long lived pioneer tree species and noble hardwood in Japan. Journal of Plant Research. 123: 343-353.
38. Wang, X. M., Hou, X. Q., Zhang, Y. Q., Yang, R., Feng, S. F., Li, Y., & Ren, Y., 2012. Genetic diversity of the endemic and medicinally important plant *Rheum officinale* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. International Journal of Molecular Sciences. 13: 3900-3915.
39. Wright, S., 1949 The genetical structure of populations. Annals of eugenics. 15: 323-354.
40. Wright, S., 1978 Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. Vol. 4. University of Chicago press, Chicago, IL, USA.
41. Xie, Y., Li, Z., Huang, R., Xiao, X., & Huang, Y., 2009. Genetic diversity of *Betula luminifera* populations at different elevations in Wuyi Mountain and its association with ecological factors. Frontiers of Forestry in China. 4: 90-95.
42. Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T., Ye, Z. H., & Mao, J. X., 1999. POPGENE, version 1.32: the user friendly software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
43. Zhao, X., Ma, Y., Sun, W., Wen, X., & Milne, R., 2012. High genetic diversity and low differentiation of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic in southeast Yunnan, China. International Journal of Molecular Sciences. 13: 4396-4411.

## Genetic Diversity and Differentiation of the Iranian's *Betula pendula* Populations by DNA Polymorphisms of Three (CD, DT, K1K2) Chloroplast Genome Regions

Abasalt Hossinzadeh Colagar<sup>1\*</sup>, Fatemeh Fallah<sup>1</sup>, Hamed Yousefzadeh<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Molecular and Cell Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Forestry Dept., Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran

### Abstract

Genetic diversity of *Betula pendula*, which is a medicinal value and endangered species, in small populations remaining in profile of northern Iran including: Marmishoo, Siahmarzkooh, Sangdeh and Shahrestanak, studied by polymorphisms of the three (3800, 1800, 2700 bp) regions of chloroplast DNA and PCR-RFLP technique. These regions named to CD, DT, K1K2, respectively. The percentage of polymorphic loci, expected heterozygosity ( $H_e$ ) and Shannon's information index ( $I$ ) in four populations, calculated to 24.51%, 0.096 and 0.14, respectively. Analysis of molecular variance (AMOVA), revealed that 66% of total variation was found within populations, while only 34% among populations. Genetic differentiation index ( $G_{st}= 0.206$ ) revealed a high differentiation of birch populations to each other. Pair-wise comparison of genetic differentiation showed that, Marmishoo's population by highest level of differentiation from other populations. Assessment of gene flow among populations indicate the occurrence of genetic drift between them ( $N_m= 0.96$ ). In addition, Mantel test revealed a significant correlation ( $r=0.77$ ) between genetic and geographical distances. Our results confirmed that the occurrence of genetic drift in birch populations, and the extinction risk of this species. Which emphasize to deployment fast and convenient strategy to it's protect.

**Key words:** *Betula pendula*; Genetic drift; Chloroplast DNA; Touch-down PCR