دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
بوم‌شناسی جنگل‌های ایران

ارزیابی تنوع ژنتیکی سروکوهی نواحی شمال ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR

مصطفی خوشحال سرمست[۱]، سید جواد موسوی زاده[۲] و مهدی شریفانی[۳]

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: khoshhal.sarmast@gmail.com)
۲ و ۳- استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۱

چکیده

هدف پژوهش حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی میان و درون پنج رویشگاه طبیعی سروکوهی (*Juniperus* spp.) در سه استان گلستان، مازندران و گیلان بود. استفاده از چهار نشانگر منتخب ISSR از میان ۱۵ نشانگر، در ۳۲ ژنوتیپ منجر به تولید ۲۸۵ نوار مشخص شد که برای بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مربوط به تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار GeneAlEx بیانگر این است که ٤٨٪ از تنوع مشاهده شده مربوط به تنوع میان جمعیت‌ها و ٥٢٪ از آن مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها است. متوسط درصد مکان‌های ژنی چند شکل در هر جمعیت ٣٨/٦٤٪ بود. تکثیر جنسی طبیعی با استفاده از بذر در رویشگاه به احتمال دلیل اصلی بالا بودن مکان های ژنی چند شکل است. نکته جالب توجه دیگر این است که حتی بین دو پایه نر و ماده متعلق به یک گونه خاص تفاوت ژنتیکی مشاهده می‌شود که در هنگام افزایش غیر جنسی نباید این تفاوت مشاهده شده در میان گونه‌های دارای ظاهری مشابه را از نظر دور نگه‌داشت. نتایج بیانگر این است که تنوع ژنتیکی بالای مشاهده شده درون جمعیت‌ها که به احتمال به‌دلیل گل‌های تک جنسه و دو پایه بودن گیاه می‌باشد و ترکیبات آللی خاص که در دیگر مناطق پراکنش آن گونه دیده نمی‌شود، اهمیت بالایی برای برنامه‌های احیاء این گونه‌ها دارند. ارزیابی مقدار پراکنش و تنوع ژنتیکی دیده شده در میان این گونه‌ها می‌تواند گام مهمی در رابطه با شناسایی و راهنمایی در راستای برنامه‌های حفظ این گونه‌های با اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: سرو کوهی، نشانگرهای مولکولی، تنوع ژنتیکی، چند شکلی، ISSR

مقدمه

سروکوهی یکی از جنس‌های تیره Cupressaceae می‌باشد. از دیدگاه تاکسونومی بین ۵۰ تا ۶۷ گونه سرو کوهی در سرتاسر نیم‌کره شمالی گسترش یافته است. در برخی گزارش‌ها حتی تا ۷۵ گونه برای آن متصور شده‌اند (۱۷). بیشتر آنها در نواحی معتدل جنوبی، شمال و شرق آفریقا وجود دارند. این جنس در بین سوزنی‌برگان از نقطه نظر تعداد گونه‌ها، مقام دوم را دارا می‌باشد. بزرگ‌ترین جنگل‌های شناخته شده این جنس در ارتفاع ۴۹۰۰ متری در جنوب شرقی تبت و هیمالیای شمالی وجود دارد (۷). سته‌های جنس سروکوهی به‌عنوان ادویه کاربرد دارد. برخی از گونه‌های آن مانند سرو کوهی چینی در باغبانی اهمیت بالایی داشته و محبوبیت بالای آن برای تولید بونسای می‌باشد. در قدیم برای درمان دیابت استفاده می‌شد و امروزه شواهدی وجود دارد که این امر را تأیید می کند (۹). در چندین دهه اخیر جنگل‌های سرو کوهی به‌شدت در حال نابودی بوده است. دخالت انسان در طبیعت به‌همراه توانایی باززایی کم این گونه‌ها در طبیعت و شرایط رشد ضعیف (مانند دمای زمستانه کم، شرایط نامطلوب خاک و خشکی تابستانه) از جمله دلایل کاهش این گونه‌های درختی در طبیعت است (۱۰،۱۲). به‌دلیل اهمیت بالای بوم‌شناختی و اقتصادی جنگل‌های سرو کوهی علاقه برای حفظ و احیاء این جنگل‌ها به‌شدت افزایش پیدا کرده است (۴). جنس *Juniperus* دارای پنج تا شش گونه در ایران می‌باشد (۱۶،۱۲). نام‌های فارسی زیادی برای آن ذکر شده است به‌عنوان مثال کوکلان، ناژون، سروکوهی، ورس، اورس، برس، وهل و سندروس برخی از نام‌های آن می‌باشد (۱۶).

این گونه‌ها بر اساس نوع برگ دو دسته می‌باشند. گونه‌های دارای برگ‌های سوزنی و نیزه‌ای (در زمان بلوغ) شامل گونه *J. oxycedrus* با دورگه سفید در روی برگ و گونه *J. communis* با یک رگه سفید در روی برگ می‌باشد. گونه‌های دارای برگ‌های فلسی خود شامل دو دسته می‌باشند. یک نوع برگ خاردار داشته که شامل *J. excelsa* با شاخه‌های فرعی باریک و گرد و دیگری *J. foetidissima* با شاخه‌های فرعی قطور و چهار وجهی است. دسته دوم دارای برگ‌های بی‌خار می‌باشد که در *J. polycarpos* شاخه‌ها ایستاده و راست و در *J. sabina* شاخه‌ها خوابیده است (۱۶). بررسی جنس‌های سروکوهی به‌صورت ژنتیکی در سطح درون و برون‌گونه‌ای بیانگر تنوع ژنتیکی بالای سروکوهی است (۲). افزون بر این، برخی مطالعات ژنتیکی گروه‌ها و تاکساهای خاصی را مورد پژوهش قرار داده‌اند. به‌عنوان مثال تنوع ژنتیکی بالایی در گونه *J. thurifera* L. و *J. excels* M. Bieb زیرگونه excelsa گزارش شده است (۶،۱۱). با به‌کارگیری فاکتورهای مانند توالی DNA، مورفولوژی و ترپنوئید برگ مشخص شده است که *J. oxycedrus* L. var *oxycedrus*, با یکدیگر و *J. deltoids* R.P. Adams متفاوت هستند (۳). این تفاوت درست به‌اندازه‌ای است که *J. navicularis* و *J.macrocarpa* را از گونه *J. oxycedrus* L. var *oxycedrus*, متمایز می‌کند.

گونه‌های سروکوهی ایران شامل *J. communis* L. ، *J. sabina* L.، *J. oblonga* M.B. ، *J. foetidissima* Willd. و *J. excelsa* M.B. که خود دارای دو زیرگونه polycarpus و excelsa است (۱۲). Kermani و همکاران

(۱۳) تنوع ژنتیکی برخی از نمونه‌های سروکوهی موجود در پارک ملی تندوره واقع در شمال استان خراسان رضوی را با استفاده از نشانگر RAPD ارزیابی نمودند (۱۳). در این تحقیق تنها زیرگونه *J. polycarpus* مورد بررسی قرار گرفت و فواصل بین گونه‌های جمع‌آوری شده کوچک بود. درصد چند شکلی به‌دست آمده در این آزمایش ۱۲٪ بیشتر از درصد چند شکلی مشاهده شده در پژوهش ملونی و همکاران (۱۵) با استفاده از نشانگر ISSR بود. آن‌ها گزارش نمودند که تنوع ژنتیکی درون هر رویشگاه بیشتر از تنوع ژنتیکی بین رویشگاه‌های مختلف است. این پژوهشگران میزان بالای جریان ژنی در این گونه را به علت ویژگی گل‌های تک‌جنسه و دوپایه بودن زیرگونه *J. polycarpos* بیان کردند.

بیشتر گونه‌های یافت شده در شمال غرب ایران و نواحی مرکزی ایران مانند شهرستان فسا در استان فارس مربوط به *J. polycarpos* بود (۱). کساییان و همکاران (۱۲) تنوع ژنتیکی سرو کوهی در استان گلستان و شرق آذربایجان را با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار دادند. در گزارش آن‌ها گونه‌های سرو کوهی زیر گونه excelsa و polycarpos که از نظر شکل ظاهری شباهت زیادی با یکدیگر نشان می‌دادند از نظر ژنتیکی متفاوت بودند. هم‌چنین دو گونه *J. Sabina* و *J. foetidissima* در یک خوشه قرار گرفتند. در پژوهشی تنوع ژنتیکی*J. phoenicea* را با استفاده از سه نشانگر ISSR در پنج جمعیت مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که جدایی جغرافیایی مانع بزرگی در جریان ژنی در این گونه می‌باشد (۱۵). متاسفانه پژوهش به نسبت جامع برای بررسی گونه‌های سروکوهی در نوار شمالی کشور انجام نشده است. یکی از پرسش‌های این پژوهش این بود که آیا درون جمعیت‌های مربوط به یک گونه در یک منطقه، تفاوتی وجود دارد یا خیر؟ یا اینکه گونه‌های سروکوهی خوابیده فلسی با گونه‌های ایستاده آن در منطقه توسکستان تفاوتی دارند یا خیر؟ نتایج این گزارش قادر خواهد بود تا به پژوهشگران فعال در حوزه افزایش جنسی و غیرجنسی و هم‌چنین به حفظ گونه‌های سرو کوهی و پیشبرد به‌نژادی این گیاه کمک کند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی و بررسی‌های میدانی

نمونه‌های سروکوهی (شکل ۱) از سه استان گلستان، مازندران و گیلان جمع‌آوری شدند. پنج رویشگاه (ارتفاع) مختلف برای این پژوهش در نظر گرفته شد. نمونه‌برداری در فصل بهار با چهار تکرار انجام شد و از برگ‌های بالغ هر گونه گیاهی که با فاصله به‌تقریب ۱۰۰ متر از یکدیگر در رویشگاه خود قرار داشتند نمونه تهیه شد. در برخی از رویشگاه‌ها دو گونه متفاوت نزدیک یکدیگر در حال رشد بودند. نمونه‌های مربوط به استان‌های مختلف به‌همراه رویشگاه، موقعیت جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا در جدول ۱ مشخص شده است. در این پژوهش از هشت جمعیت (در پنج رویشگاه) نمونه‌برداری صورت گرفت. از ارتفاعات چهار باغ (توسکستان) استان گلستان سه نمونه متفاوت از دو ارتفاع جمع‌آوری شد (جدول ۱) که دو گونه آن خوابیده و یک مورد آن دارای عادت رشدی ایستاده می‌باشد. نمونه دارای عادت رشد خوابیده یکی *J. sabina* می‌باشد که با تراکم بسیار بالا و با ارتفاع بسیار کم نسبت به زمین رشد می‌کند و دارای برگ‌های فلسی می‌باشد. گونه خوابیده دوم*J. communis* می‌باشد که دارای برگ‌های تیغ‌دار است. این دو گونه دو پایه می‌باشند. هر کدام از پایه‌های نر و ماده به عنوان جمعیت مستقل در نظر گرفته شدند. گونه سوم که با فاصله‌ای در حدود چند صد متر از این دو گونه در همان منطقه درحال رشد می‌باشد به صورت قائم رشد کرده و دارای تنه اصلی تنومدی است. این گونه به دیگر گونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق دیگر از نظر شکل ظاهری برگ شباهت دارد و به احتمال *J. excelsa* می‌باشد که با گونه *J. polycarpos* شباهت ظاهری فراوانی دارد (۱۶).

در مجموع ۳۲ نمونه برای آزمایش جمع‌آوری شد. در بررسی‌های میدانی وجود یا عدم وجود مخروط (میوه) به عنوان معیاری برای تک یا دو پایه بودن گیاه در نظر گرفته شد.

جدول ۱- موقعیت جغرافیایی نمونه‌های سروکوهی جمع‌آوری شده در استان‌های مختلف.

Table 1. Geographic position of *Juniperus* spp. collected from different provenance

استان	منطقه	موقعیت جغرافیایی	ارتفاع (متر)
گلستان	توسکستان (سرپیچ علی‌آباد)	۳۶ درجه، ۴۰ دقیقه،۴۳ ثانیه شمالی ۵۴ درجه، ۳۳ دقیقه، ۴۱ ثانیه شرقی	۲۳۴۸
گلستان	چهارباغ	۳۶ درجه، ۳۵ دقیقه، ۱۷ ثانیه شمالی ۵۴ درجه، ۲۷ دقیقه، ۲۹ ثانیه شرقی	۲۲۳۰
گیلان	هرزویل منجیل	۳۶ درجه، ۴۴ دقیقه، ۴۳ ثانیه شمالی ۴۹ درجه، ۲۷ دقیقه، ۲ درجه شرقی	۸۸۰
گیلان	دیلمان	۳۶ درجه، ۵۴ دقیقه، ۳۶ ثانیه شمالی ۴۹ درجه، ۵۵ دقیقه، ۲۸ ثانیه شرقی	۱۷۴۳
مازندران	جاده هراز	۳۶ درجه، ۰۸ دقیقه، ۲۵ ثانیه شمالی ۵۲ درجه ۱۹ دقیقه، ۲۴ ثانیه شرقی	۸۰۰

استخراج DNA

برای استخراج DNA از روش استانگ و همکاران (۱۸) استفاده شد. تغییرات اعمال شده در این روش شامل حذف PVP و استفاده از ذغال فعال به جای آن بود. هم‌چنین در روش تغییر داده شده از اسید آسکوربیک و DIECA برای استخراج DNA استفاده نشد. در مجموع از ۳۲ نمونه استخراج DNA انجام شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برای استخراج در نظر گرفته شد. DNAهای موردنظر روی ژل

آگاروز ۱٪ برای بررسی کیفیت DNA رانده شدند و برای بلند مدت در دمای $-20\ ^{\circ}C$ نگه‌داری شد.

نشانگر مولکولی ISSR و انجام PCR

از حدود ۱۵ نشانگر ISSR تهیه شده از شرکت متابیون کره جنوبی، تنها چهار عدد آنها نوارهای چندشکل مناسب تولید نمودند (جدول ۲). برای یافتن بهترین غلظت DNA برای استفاده در این پژوهش ابتدا واکنش واکنش PCR با غلظت‌های هشت، ۴۰، ۶۱ و ۸۰ نانوگرم از DNA با استفاده از یکی از آغازگرها (GA)8C-16)) انجام شد. پس از مشخص شدن غلظت مناسب، PCR اصلی با استفاده از تمام آغازگرها (جدول ۲) انجام شد. حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود که حاوی هشت نانوگرم از DNA، دو میکرولیتر از بافر PCR x۱۰، ۰/۷ میکرولیتر از کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵میکرولیتر از dNTPs ۱۰ میلی مولار، یک میکرولیتر از آغازگر ISSR (غلظت محلول آغازگر ۵۰ میکرومولار بود) و ۲/۵ واحد از Taq DNA polymerase (Sinnagen Iran) بود. مخلوط حاضر پس از افزودن آب دو بار تقطیر گندزدایی شده به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برنامه واکنش پلی‌مراز شامل واسرشت‌سازی اولیه برای یک دور در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار دقیقه بود. سپس نمونه‌ها برای ۴۰ دور ابتدا در دمای ۹۴ سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه ، ۵۰ تا ۵۲/۷ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای یک دقیقه قرار گرفتند. گسترش نهایی برای یک دور به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام شد. محصول PCR به‌دست آمده روی ژل آگاروز ۱/۲٪ که با safe stain (تهیه شده از شرکت سیناژن، ایران) رنگ‌آمیزی شده بود با ولتاژ ۶۰ رانده شد و وضعیت نوارها با استفاده از دستگاه ژل داک شرکت کیاژن (ساخت کشور چین) بررسی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در مجموع ۳۲ نمونه برای این آزمایش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از هشت جمعیت مورد بررسی چهار تکرار برای هر گونه برای بررسی تنوع درون گونه‌ای در نظر گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های DNA، امتیازدهی نوارهای DNA به صورت (صفر) و (یک) به‌ترتیب برای عدم حضور و حضور نوار DNA انجام شد. برای محاسبه فواصل ژنتیکی و رسم دندروگرام از نرم‌افزار NTSYS pc 2.02 و برای محاسبه مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی از نرم‌افزار Excel 2003 استفاده شد (۱۴). نتایج مربوط به تجزیه واریانس در درون و میان جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GeneAlEx انجام شد.

نتایج و بحث

اگرچه که این پژوهش میزان تفاوت‌های ژنتیکی میان گونه‌های متفاوت سروکوهی (ارس) در سه استان را مورد ارزیابی قرار داد اما نمونه‌های جمع‌آوری شده تا حد زیادی دارای تفاوت‌های مورفولوژیک نیز بودند.

نشانگر مولکولی ISSR

از میان نشانگرهای مولکولی موجود ISSR به دو دلیل انتخاب شد. یکی اینکه استفاده از آن به اطلاعات مربوط به توالی ژن نیاز نداشته و دوم این‌که خیلی کمتر تحت تأثیر شرایط آزمایشگاه قرار می‌گیرد، لذا این نشانگر حتی با تعداد کم، نوارهای تکرارپذیری در شرایط آزمایشگاهی مختلف تولید می‌کند (۱۵).

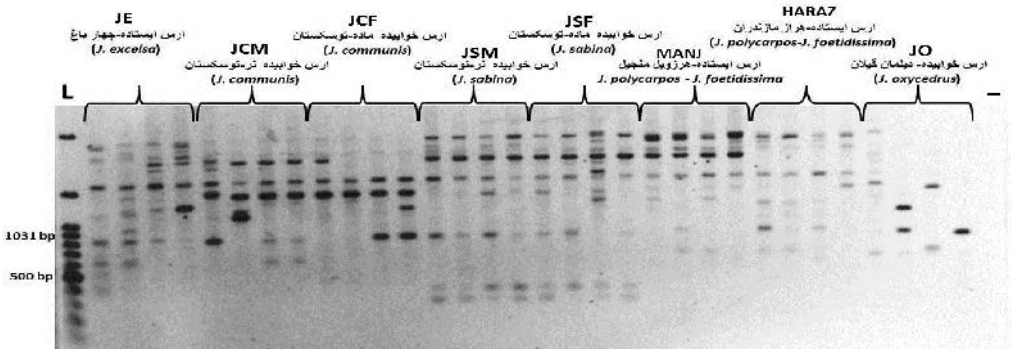
تجزیهٔ ۳۲ نمونه سروکوهی جمع‌آوری شده از سه استان متفاوت در قالب هشت جمعیت با استفاده از چهار نشانگر گزینش شده ISSR در مجموع ۲۸۵ نوار قابل امتیازدهی ایجاد کرد که اندازه آنها از ۳۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود. توانایی آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چندشکلی در بین نمونه‌های سرو کوهی متغیر بود. کمترین نوار ایجاد شده مربوط به نشانگر (GA)9A با ۳۹ نوار و بیشترین آن مربوط به نشانگر (GA)8C با ۱۲۰ نوار بود (جدول ۲). میانگین نوارهای تولید شده برای هر آغازگر ۷۸ بود. تمامی نوارهای تولید شده به وسیله این نشانگرها در چهار آغازگر چند شکل بودند که این به احتمال به‌دلیل این بوده است که گونه‌های مختلف با هم مقایسه شده‌اند. کمترین میزان PIC (محتوای اطلاعات چند شکلی) مربوط به آغازگر (GA)8C) بود که بیشترین نوارهای چند شکل را در میان دیگر نشانگرها تولید نمود (جدول ۲).

جدول ۲– نام، دما، تعداد مکان ژنی و تعداد نوارهای چند شکل و محتوای اطلاعات چند شکلی تولید شده به وسیله آغازگرهای ISSR برای نمونه‌های سروکوهی

Table 2. Name, temperature, locus number, polymorphic bands and PIC of ISSR primers for *Juniperus* spp

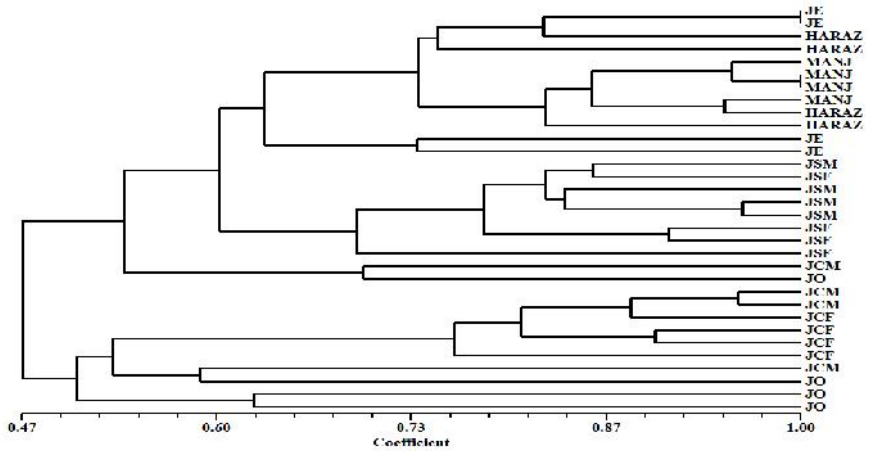
آغازگرها	دمای اتصال (°C)	تعداد کل نوارها	مکان ژنی	نوارهای چند شکل	PIC
(GA)8YC*-۲	۵۲/۷	۳۹	۳	۳	۰/۴۷۰
(GT)8YC-۶	۵۰	۱۱۸	۷	۷	۰/۴۲۷
(GA)8C-۱۶	۵۲/۵	۱۲۰	۱۰	۱۰	۰/۲۹۶
(GA)9A-۲۰	۵۱	۳۸	۳	۳	۰/۴۹۰

*Y=C/T



شکل ۱- نوارهای مربوط به نشانگر (GA)8C-16 در ۸ جمعیت بر روی ژل آگاروز ۱٪. چاهک سمت چپ مربوط به خط‌کش بیولوژیک (L) و آخرین چاهک در سمت راست تصویر ( )، کنترل منفی می‌باشد. کلمات لاتین مشخص شده در بالای هر جمعیت در دندروگرام (شکل ۲) نیز آورده شده است. MANJ مربوط به نمونه جمع‌آوری شده در هرزویل منجیل (گیلان)، HARAZ مربوط به نمونه جمع‌آوری شده در جاده هراز، است.

Fig 1. 1% Agaros Gel picture of (GA)8C-16 primer in 8 population of *Juniperus* spp. left column represents molecular marker and right column represent negative control. Abbreviation name also represent in Figure 2. MANJ represents those samples which were collected from Harzevel at Majil (Gilan), HARAZ represents those samples which were collected from Hraz road.



شکل ۲- دندروگرام خوشه‌ای به‌روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه دایس که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی بین گونه‌های سروکوهی می‌باشد. حروف کنار دندروگرام نشان دهنده ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده می‌باشند. مشخصات هر کوتاهه در شکل شماره ۱ بیان شده است.

Figure 2. ISSR dendrogram based on Dice similarity indices, showing the genetic distance among *Juniperus* spp. The letters in the right side of the figure, represent collected Accessions. The full name of each abbreviation provided in Figure 1.

نتایج دندروگرام تا حد زیادی بیانگر این است که دو گونه جمع‌آوری شده در رویشگاه جاده هراز و هرزویل منجیل (جدول ۱) که از نظر ظاهری و شباهت ژنتیکی شبیه به هم بودند (شکل ۲)، به احتمال زیاد مربوط به گونه *J. polycarpos* می‌باشند. گونه *J. excelsa* که از ارتفاعات چهار باغ گرگان جمع‌آوری شده است از نظر شباهت ژنتیکی تا حدودی از دو گونه جمع‌آوری شده از رویشگاه جاده هراز و هرزویل منجیل جدا شده است. در ابتدا انتظار می‌رفت که دندروگرام هشت جمعیت را به هشت گروه مجزا تقسیم‌بندی کند ولی نتایج متفاوت با این انتظار بود. حتی برخی از گونه‌ها درون یک جمعیت در درون دسته‌های دیگر مربوط به گونه دیگری قرار گرفته‌اند که به احتمال به‌دلیل دوپایه و دگرگرده افشان بودن این گیاهان است که منجر به جریان ژنی بالایی می‌شود (۱۳). دو گونه *J. communis* و *J. oxycedrus* که از نظر ظاهری بسیار شبیه به‌هم می‌باشند و از دو منطقه متفاوت در ارتفاعات توسکستان (سرپیچ علی‌آباد) و منطقه دیلمان جمع‌آوری شدند، با وجود فاصله ژنتیکی مشاهده شده در بین آن‌ها (شکل ۲) در یک خوشه قرار گرفتند که بیانگر این است که به احتمال دارای اجداد مشترکی بوده‌اند. یکی از ژنوتیپ‌های *J. oxycedrus* از دیگر

ژنوتیپ‌های موجود در همان جمعیت (تکرارهای دیگر در همان جمعیت) فاصله ژنتیکی زیادی پیدا کرده است که این تا حدودی توجیه کننده هتروزیگوسیتی بالای این گونه‌ها می‌باشد که با توجه به وجود گل‌های تک جنسه و دو پایه بودنشان قابل توجیه است (۱۳). نتایج آماری بیشترین درصد آلل‌های چند شکل به میزان ۶۸/۱۸ ٪ را در این جمعیت نشان می‌دهد. یکی از فرضیات این پژوهش که تا حدودی باعث شبهه شده بود این بود که آیا گونه‌های سروکوهی خوابیده فلسی (*J. sabina*) در اثر تغییر ارتفاع به‌صورت سروکوهی فلسی ایستاده (*J. excelsa*) در منطقه توسکسان در آمده‌اند. جواب این پرسش منفی است. زیرا بر اساس نتایج بررسی تنوع ژنتیکی مشاهده شده این دو گونه سروکوهی به‌صورت کامل در دو خوشه متفاوت قرار گرفته و حتی بررسی‌های میدانی تفاوت‌های واضحی را در رابطه با ویژگی‌های میوه آنها از هم نشان می‌دهد (شکل ۲). گونه *J.excelsa* شباهت بیشتری را با گونه‌های سروکوهی ایستاده جمع‌آوری شده از منطقه هرزویل منجیل و هراز نشان می‌دهد که تا حدودی بیانگر اجداد مشترک می‌باشد. ولی به هر حال برای تأیید این مطلب تنوع ژنتیکی آن‌ها بر اساس ژنوم کلروپلاست باید در آزمایش‌های آتی مورد پژوهش قرار گیرد.

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی نشانگر ISSR به دست آمده از هشت جمعیت سروکوهی

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) in 8 Juniprues spp. populations

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس اجزا	درصد واریانس	Value	*P Value*
بین جمعیت	۷	۷۵/۱۵	۷۳/۱۰	۲/۱۰	۴۸	۰/۴۷۸	۰/۰۰۱
داخل جمعیت	۲۴	۵۵/۲۵	۲/۳۰	۲/۳۰	۵۲		
کل	۳۱	۱۳۰/۴۰		۴/۴۱	۱۰۰		

تنوع درون و برون گونه‌ای

یکی از پرسش‌های این پژوهش این بود که آیا درون جمعیت‌های مربوط به یک گونه در یک منطقه، تفاوتی وجود دارد. نتایج مربوط به تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار GeneAlEx بیانگر این بود که ۴۸٪ از تنوع مشاهده شده مربوط به تنوع درون رویشگاه‌ها و ۵۲٪ از آن مربوط به تنوع در بین جمعیت‌ها یا رویشگاه‌ها است (جدول۳). یکی از عمده دلایل این تغییرات مربوط به وجود گل‌های تک‌جنسه و دوپایگی در بیشتر گونه‌های سروکوهی است که باعث هتروزیگوسیتی می‌شود. تنوع ژنتیکی کل به‌دست آمده در این پژوهش (۰/۱۳۹) نزدیک به تنوع ژنتیکی مشاهده شده برای *J. phoenicea* (۰/۱۴۸) در پژوهش همریچ و همکاران (۸) و کمتر از پژوهش کرمانی و همکاران (۱۳) (۰/۳۲۶) در گونه *J. polycarpos* بود.

نیاز شدید به حفاظت از بوم‌سازگاه درختان به دلیل ارزش‌های زینتی و بوم‌شناختی آن‌ها احساس می‌شود. تغییرات اقلیمی و دست‌اندازی غیرمسئولانه بشر برای بهره‌گیری بیشتر از منابع طبیعی و ملاک قرار دادن خواسته‌های خود و نه درنظرگیری خواسته‌های طبیعت منجر به این شده است که بسیاری از گونه‌های گیاهی ارزشمند و حتی مراکز اصلی پیدایش برخی از گونه‌ها دچار تغییراتی شود. سوزنی‌برگان یکی از گونه‌های گیاهی هستند که سهم عظیمی از نیازهای مادی و معنوی بشر را چه از دیدگاه اقتصادی و منافع مالی و چه از دیدگاه زیباسازی و چه از نظر تأمین اکسیژن فراهم می‌نمایند. سروکوهی یا ارس یکی از محدود گونه‌های سوزنی‌برگان در ایران است که از دیرباز در برخی از نقاط ایران می‌روییده است. متأسفانه دست‌اندازی بشر به رویشگاه‌های این گیاه در حال سرعت بخشیدن به روند انقراض این گونه‌ها می‌باشد (۵). شناسایی گونه‌های مختلف این جنس و بررسی تنوع ژنتیکی و پراکنش آنها در طبیعت شاید به مدیریت درست حفظ و نگه‌داری آنها و افزایش آنها به شکل مصنوعی کمک نماید. به‌دین منظور پژوهشی با استفاده از نشانگرهای تکرارپذیر ISSR بر روی هشت جمعیت سروکوهی در سه استان شمالی کشور صورت گرفت تا هم تفاوت‌های گونه‌های گیاهی این جمعیت‌ها را آشکار نماید و هم تنوع درون هر رویشگاه را نیز بررسی نماید. گونه‌های سروکوهی در این پژوهش دارای عادت رشدی خوابیده با برگ‌های فلسی یا سوزنی و عادت رشد ایستاده با برگ‌های فلسی بودند. میانگین درصد چندشکلی به‌دست آمده در پژوهش حاضر به نسبت کمتر از (به تقریب ۶٪ کمتر) درصد چندشکلی به‌دست آمده در پژوهش ملونی و همکاران (۱۵) به میزان ۴۵٪ در گونه *J. phoenicea* با استفاده از نشانگر ISSR بود. البته کرمانی و همکاران (۱۳) درصد چندشکلی بیشتری (۰/۵۷٪) را با استفاده از نشانگر RAPD در جمعیت *J. Polycarpos* مشاهده نمودند.

نکته جالب توجهی که در این پژوهش مشاهده شد این است که در تکرارهای درون هر جمعیت (۴ تکرار) تفاوت قابل ملاحظه‌ای (۵۲٪) مشاهده شد که از آن به تنوع در رویشگاه یاد می‌شود. این تنوع در پژوهش کرمانی و همکاران (۱۳) که تنها تنوع ژنتیکی گونه *J. polycarpos* را در یک پارک ملی ارزیابی نمودند نیز دیده می‌شود. این نکته از چند نظر قابل تأمل است. یکی این‌که این تبادل ژنی بالا که موجب هتروزیگوسیتی در هر گونه می‌شود توان رقابتی گونه گیاهی را در برابر محیط بالا می‌برد (۱۵). از طرفی وجود هتروزیگوسیتی کم در جمعیت، تولیدمثل و بقای گونه‌ها را کاهش خواهد داد (۱۳). نکته دیگر این است که این گونه‌ها در هر رویشگاه به احتمال قوی به روش جنسی تکثیر می‌شوند، زیرا تنها از این طریق است که این تعداد آلل چند شکل در هر جمعیت قابل توجیه خواهد بود که این موضوع با توجه به وجود گل‌های تک‌جنسه و دو پایه بودن بیشتر گونه‌های آن قابل توجیه است (۱۳). نکته جالب توجه دیگر این است که بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش حتی بین دو پایه نر و ماده متعلق به یک گونه خاص تفاوت ژنتیکی مشاهده می‌شود که این تفاوت میان خود گونه‌های نر

و یا ماده کمتر از تفاوت مشاهده شده بین نر و ماده می‌باشد. این نتیجه می‌تواند در پروژه‌های مربوط به ازدیاد غیرجنسی این گیاه مورد استفاده قرار گیرد به‌شکلی که برای حصول به نتایج دقیق‌تر بهتر است از یک پایه خاص برای ازدیاد استفاده شود و از گرفتن نمونه از گیاهان مختلف رشد یافته در یک رویشگاه اجتناب نمود زیرا هر کدام از آنها بر اساس نتایج این پژوهش تا حدود ۵۰٪ بین خودشان تفاوت ژنتیکی دارند که نتایج حاصل از ازدیاد آنها را ممکن است به شدت متأثر نماید. نتایج نشانگر این است که تبادل ژنی بسیار خوب بین گونه‌های سروکوهی و دگرگرده‌افشان بودن آنها در ایجاد این تنوع نقش داشته است. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق اطلاعات با ارزشی در راستای برنامه‌ریزی برای احیاء پوشش‌های سروکوهی و هم‌چنین شناسایی و تکثیر آنها فراهم می‌کند.

منابع

1. Adams, R.P. and F. Hojjati. 2012. Taxonomy of *Juniperus* in Iran: Insight from DNA sequencing. Phytologia, 94: 219-227.
2. Adams, R.P. 2011. Junipers of the World: the Genus *Juniperus*, 3rd edition. Trafford Publishing Co. Bloomington, IN, USA. p. 422
3. Adams, R.P., J.A. Morris, R.N. Pandey and A.E. Schwarzbach. 2005. Cryptic speciation between *Juniperus deltoides* and *J. oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. Biochemical Systematics and Ecology, 33: 771-787.
4. Daneshvar, A., M. Tigabu, A. Karimidoost and P. Christer Ode´n. 2017. Flotation techniques to improve viability of *Juniperus polycarpos* seed lots. Journal of Forestry Research, 28: 231-239.
5. Daneshvar, A., M. Tigabu, A. Karimidoost. and P. Christer Ode´n. 2016. Stimulation of germination in dormant seeds of *Juniperus polycarpos* by stratification and hormone treatments. New Forests, 47: 751-761
6. Douaihy, B., G.G. Vendramin, A. Boratynski, N. Machon and M. Bu Dagher-Khayat. 2011. High genetic diversity with moderate differentiation in *Juniperus excelsa* from Lebanon and the eastern Mediterranean region. AoB PLANTS, plr003, doi:10.1093/aobpla/plr003.
7. Hampe, A. and R.J. Petit. 2010. Cryptic forest refugia on the 'Roof of the World'. New Phytologist 185: 5-7.
8. Hamrich, J.L., M.J.W. Goat and S.L. Sherman-Broyle. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species, New Forest, 6: 95-124.
9. Hoffmann, D. and F.N. Hoffmann. 2003. Medical herbalism: The science and practice of herbal medicine. Healing Arts Press. 672 pp.
10. Hosseini, S.S. and V. Hosseini. 2014. Effect of Reforestation with Pinus nigra Arnold, *Pinus eldarica* Medw. and *Cupressus arizonica* Greene Spices on some Properties of Soil (Case Study: Garan region, Marivan). Ecology of Iranian Forest, 2: 37-44 (In Persian).
11. Jiménez, J.F., O. Werner, P. Sánchez-Gómez, S. Fernández and J. Guerra. 2003. Genetic variation and migration pathways of *Juniperus thurifera* L. (Cupressaceae) in the western Mediterranean region. Israel Journal of Plant Sciences 51: 11-22.
12. Kasaian, J., J. Behravan, M. Hassany, S.A. Emami, F. Shahriari and M.H. Khayyat. 2011. Molecular characterization and RAPD analysis of *Juniperus* species from Iran. Genetics and Molecular Research, 10: 1069-1074.
13. Kermani, M., A.H. Maraashi and F. Melati. 2009. Study of genetic variation of Juniperus polycarpus from Tandure National Park of Iran using RAPD markers. Rangelands and Forest Plant Breeding and Genetic Research, 18: 115-124 (In Persian).
14. Kumar, L.S., K. Tamura, I.B. Jakobsen and M. Nei. 2001. "MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software". Bioinformatics, 17: 1244-1245.
15. Meloni, M., D. Perini, R. Filigheddu and G. Binelli. 2006. Genetic variation in five Mediterranean populations of Juniperus phoenicea as revealed by Inter-Simple Sequene Repeat (ISSR) markers. Annals of Botany, 97: 299-304.
16. Mozaffarian, V. 2009. Tree and shrubs of Iran. Farhang Moaser publication. 991pp (In Persian).
17. Silvia Pinna, M., O. Grillo, E. Mattana, E. Canadas and G. Bacchetta. 2014. Inter and intraspecific morphometric variability in *Juniperus* L. seeds (Cupressaceae). Systematics and Biodiversity, 12: 211-223.
18. Stange, C., D. Prehn and P. Arce-Johnson. 1998. Isolation of *Pinus radiate* genomic DNA suitable for RAPD analysis. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 1-8.

Evaluation of *Junipers* spp. Genetic Diversity in Northern Iran using ISSR Markers

Mostafa Khoshal Sarmast[1], Seyed Javad Mosavizadeh[2] and Mehdi Sharifani[3]

1- Assistant Professor of Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (Corresponding author: khoshhal.sarmast@gmail.com)
2 and 3- Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: May 09, 2018 Accepted: June 21, 2018

Abstract

The aim of the present work was to study genetic diversity within and among of five native populations of *Juniperus* spp. in three provenances of Golestan, Mazandran and Gilan. Four out of 15 ISSR primers have yielded 285 scorable, polymorphic fragments in 32 accessions, which were utilized to estimate genetic diversity. Analysis of molecular variance with GenALEx software revealed a 48% genetic diversity among *Juniperus* populations and 52% of molecular variance was observed within the populations. The mean percentage of polymorphic loci in each population estimated to be 38.64%. Natural sexual propagation by seeds in each population likely is the main reason for the high rate of polymorphic loci. Another interesting issue is the genetic differences between male and female trees belong to one species which we should take into account during clonal propagation of designated *juniperus* species. The high rates of genetic variation within population which likely is associated with dioecy and presence of unisexual flowers in *Juniperus* species and also specific allelic combinations which could have been selected in order to adapt to particular environmental conditions are not present in other areas of distribution are prime importance for planning conservation strategies. By means of assessing the amount and distribution of genetic variability, this study represents an important step towards developing conservation guidelines and strategies for native Iranian *Junipers*.

Keywords: Juniperus, Molecular markers, Genetic diversity, Polymorphism, ISSR