بوم‌شناسی کاربردی/ سال یازدهم / شماره اول / بهار ۱۴۰۱/ صفحات ۱۵ تا ۲۶

تنوع ژنتیکی *Avicennia marina* در اکوسیستم های ساحلی جنوب ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی و ریخت شناسی

ستاره کوچکی چنانی[۱]، ساسان بابایی کفاکی[۲*]، هادی کیادلیری[۳]، آسا ابراهیمی[۴] و علیرضا اطمینان[۵]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۳)

چکیده

جنگل‌های مانگرو ایران زیستگاه‌های ساحلی درختان حرا در منطقه جنوب غربی آسیا هستند. آگاهی از تنوع ژنتیکی جنگل‌های مانگرو اطلاعات ارزشمندی را جهت جلوگیری از فرسایش ژنتیکی در خزانه ژنی این اکوسیستم‌های گیاهی و حفاظت از آنها فراهم می‌نماید. هدف تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی در جنگل‌های مانگرو چهار منطقه ساحلی جنوبی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و ویژگی‌های ریخت‌شناسی می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی با استفاده از الگوریتم Neighbor joining تعداد ۶۰ درخت نمونه‌برداری شده از مناطق ساحلی مختلف را در چهار گروه دسته‌بندی نمود. تجزیه واریانس مولکولی داده‌ها نشان داد سهم عمده واریانس کل (۷۷٪) مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد. بیشترین مقدار تعداد آلل مؤثر، شاخص تنوع شانون و میزان هتروزیگوسی برای جمعیت قشم به‌دست آمد که نشان داد این جمعیت دارای بیشترین تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های مورد بررسی است. نتایج ارزیابی‌های ریخت‌شناسی درختان نشان داد که از نظر صفات ارتفاع، قطر برابر سینه و قطر یقه درختان و همچنین اندازه برگ، قطر ریشه‌های هوایی و طول این ریشه‌ها تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های گیاهی چهار منطقه وجود دارد. نتایج این تحقیق اطلاعات مفیدی در زمینه تنوع ژنتیکی جنگل‌های مانگرو ایران فراهم نمود که می‌تواند در مطالعات تکاملی و برنامه‌های حفاظت از این اکوسیستم‌های گیاهی با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریخت‌شناسی، زیستگاه ساحلی، مانگرو، نشانگر مولکولی

۱. دانشجوی دکتری جنگلداری، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. دانشیار، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. دانشیار، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۴. استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران.

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: S.babaie.rs@gmail.com

مقدمه

نواحی جزر و مدی در سواحل گرمسیری و نیمه گرمسیری دنیا رویشگاه‌های عمده جنگل های مانگرو محسوب می‌شوند و چیزی در حدود نیم درصد از خطوط ساحلی در جهان پوشیده از این اکوسیستم‌های جنگلی می‌باشد. جنگل‌های مانگرو ایران تنها رویشگاه‌های طبیعی ساحلی از درختان حرا در ناحیه جنوب غرب آسیا هستند. این جنگل‌ها که به‌صورت غالب در موقعیت جغرافیایی ۲۵°۱۹′N و ۲۷°۸۴′ E واقع شده‌اند در حدود ۹۳ کیلومتر مربع از خطوط ساحلی ایران را شامل می‌شوند (۳۵ و ۳۶). جنگل‌های مانگرو ایران با الگوی پراکنش از جنوب شرق در سواحل دریای عمان که در خلیج گواتر تشکیل جوامع جنگلی داده‌اند (۲۵°N و ۶۱°E) تا سواحل خلیج فارس (۲۷°N و ۵۱°E) گستره وسیعی را به‌خود اختصاص داده و به لحاظ اقتصادی و زیست محیطی حائز اهمیت بسیار زیادی برای منطقه هستند. این اکوسیستم‌های جنگلی در جزیره قشم و بندر خمیر به‌صورت انبوه استقرار داشته و به سمت غرب خلیج فارس تا استان بوشهر مشاهده می‌شوند (۷). این اکوسیستم جنگلی ایران، با توجه به کارکرد منحصربه‌فرد و ارزش و اهمیت ویژه از نظر زیستگاهی بسیار مورد توجه بوده و توسط کنوانسیون تنوع زیستی نیز تحت نظارت می‌باشد (۱۹).

گیاهان حرا از نظر ساختاری بسیار پیچیده و منحصربه‌فرد هستند. این اکوسیستم های گیاهی بی نظیر کارکردهای مفید و مختلفی دارند. این جنگل‌ها نقش مهمی در جمع‌آوری آلودگی‌های فیزیکی معلق در دریا و رسوبات آب ایفا می‌کنند (۱،۱۱). علاوه بر این، با فیلتراسیون آب دریا محیطی مناسب برای ماهی‌های مختلف و برخی بی‌مهرگان ایجاد می‌کنند و با توجه به سیستم ریشه‌ای متراکم خود، زیستگاه بسیار مناسبی برای گونههای دریایی فراهم می‌کنند و نقش مهمی در تداوم تولید در شیلات ساحلی دارند. از سوی دیگر این اکوسیستم‌ها نقشی بافری در برابر اثرات ناشی از فعالیت‌های انسانی در محیط زیست اقیانوس دارا می‌باشند (۱۴ و ۱۷). گونه حرا با نام علمی *Avicennia marina* یکی از گونه های درختی مانگرو است که به‌طور پراکنده در جنوب ایران دارای پراکنش بوده و گونه غالب در امتداد سواحل خلیج فارس و دریای عمان محسوب می‌شود (۱۸).

متأسفانه این اکوسیستم‌های گیاهی با ارزش در مناطقی از دنیا و همچنین در ایران به‌دلیل بهره‌برداری بیش از حد، آلودگی‌های زیست محیطی به‌ویژه آلودگی‌های نفتی و تغییرات اقلیمی سال‌های اخیر، در معرض تخریب شدید و خطر انقراض قرار گرفته‌اند. این موضوع نه تنها به کاهش سطح این جنگل‌ها منجر شده بلکه تنوع ژنتیکی موجود در این اکوسیستم‌های گیاهی را نیز با خط جدی مواجه کرده است.

وجود تنوع ژنتیکی کافی در هر جمعیت گیاهی با کمک به سازگاری با تغییرات محیطی و تاب آوری در برابر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی ضامن بقای آن جمعیت خواهد می باشد؛ از این‌رو، در کنار فعالیت‌های حفاظتی و کنترل آلودگی‌های زیست محیطی، بررسی تنوع ژنتیکی در این مجموعه‌های گیاهی منحصربه‌فرد جهت انتخاب راهکارها و استراتژی‌های مؤثر در حفظ این گونه‌های گیاهی ارزشمند نقشی مهم و اساسی دارا می‌باشد (۱۰). در اختیار داشتن اطلاعات جامع در خصوص منابع ژنتیکی و آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی نقش بسیار مهمی در مدیریت منابع ژرم پلاسم دارا می‌باشد (۳۴). عدم آگاهی از تاریخچه زیستی و پراکنش لکه‌ای و پراکنده رویشگاه‌های این گونه و کاهش جریان ژنی به‌دلیل فاصله زیاد جمعیت‌ها از یکدیگر، میزان آسیب‌پذیری این گونه را نسبت به تخریب رویشگاه بیشتر نمود (۲۷).

یکی از روش‌های مناسب بررسی تنوع ژنتیکی موجود در یک مجموعه ژرم‌پلاسم، استفاده از انواع نشانگرهای ژنتیکی می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی با انواع مختلفی از نشانگرهای ژنتیکی صورت می‌گیرد که از این نشانگرها در تحقیقات مختلف استفاده شده است. این نشانگرها عموما به یکی از انواع نشانگرهای ریخت‌شناسی و یا مولکولی تعلق دارند. نشانگرهای مولکولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ابزارهای ارزیابی تنوع

ژنتیکی در ژرم پلاسم‌های گیاهی به‌شمار می‌روند. نشانگرهای DNA دارای مزایایی از قبیل قابل کاربرد بودن برای هر قسمت از ژنوم (اینترون‌ها، اگزون‌ها و نواحی تنظیمی)، عدم تاثیرپذیری از محیط و دقت و سرعت بالا می‌باشند که آنها را از سایر نشانگرها متمایز می‌سازد. همچنین این نشانگرها قادر به تمایز چندشکلی‌هایی هستند که ممکن است از نظر فنوتیپی قابل تشخیص نباشند. نشانگرهای Simple Sequence Repeats (SSRs) از جمله نشانگرهای مولکولی پرکاربرد در مطالعات مولکولی به‌حساب می‌آیند. این نشانگرها بسیار آگاهی بخش و قابل اعتماد بوده و با توجه به ویژگی‌هایی مانند نحوه توارث هم‌بارز، سیستم چندالللی و تکرارپذیری بالا برای مطالعات تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت، نقشه‌یابی، و بررسی های فیلوژنتیکی بسیار مفید می‌باشند (۱۳). مواردی از کاربرد نشانگرهای DNA در بررسی تنوع ژنتیکی حرا گزارش شده است که به عنوان مثال می توان به بررسی تنوع ژنتیکی در گونه *Avicennia marina* در جنگل های حرای ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره اشاره نمود(۹)؛ لیکن این بررسی اولین گزارش جامع مطالعه تنوع ژنتیکی این گونه گیاهی در اکوسیستم‌های ساحلی جنوب ایران از غرب تا شرق بر اساس ویژگیهای ریخت‌شناسی و مولکولی می باشد.

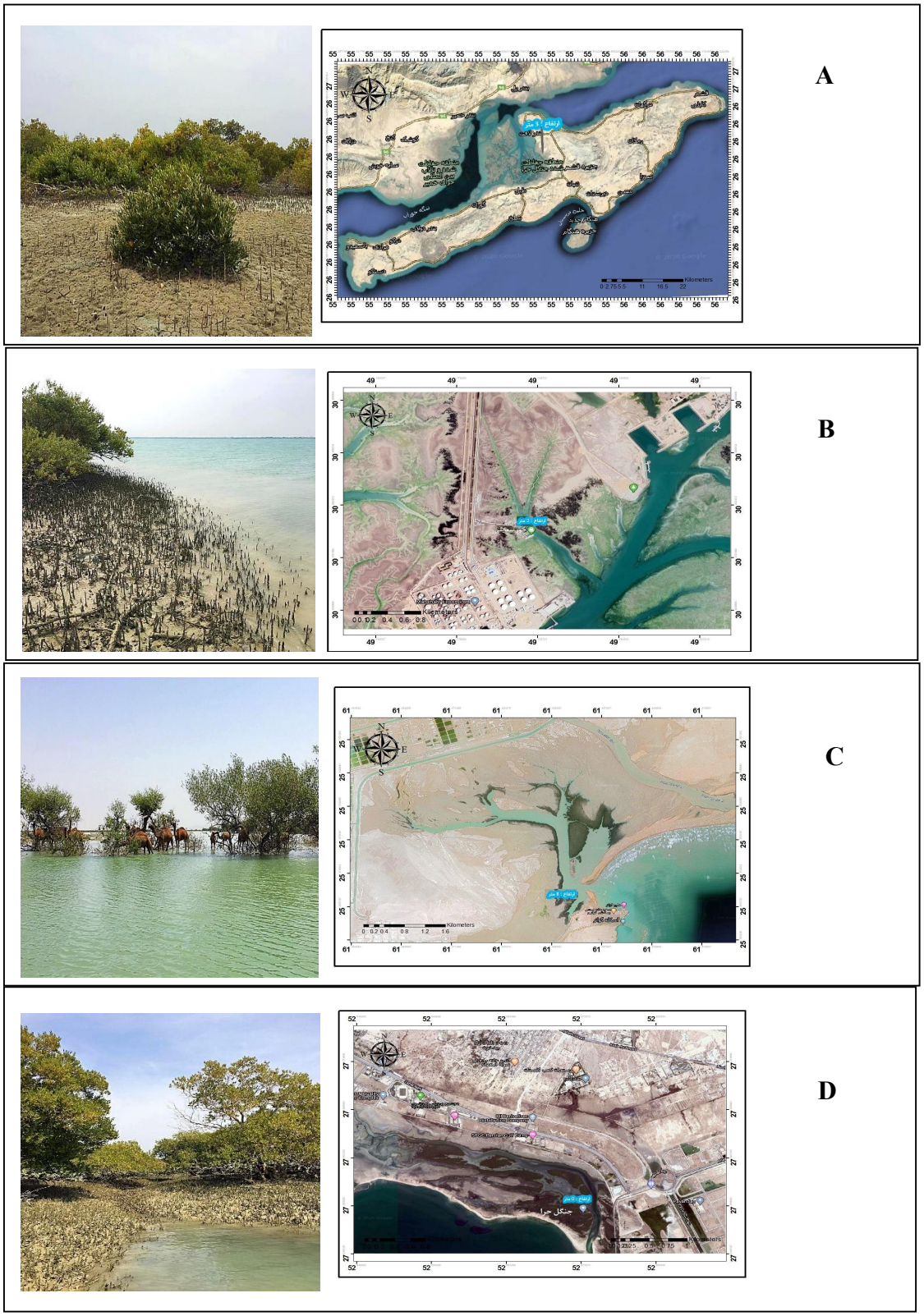
با توجه به اهمیت جنگل‌های مانگرو و در معرض آسیب بودن آنها، و نقش تنوع ژنتیکی در افزایش قابلیت سازگاری به شرایط محیطی به منظور حفظ موجودیت این اکوسیستم‌های گیاهی ارزشمند، تحقیقات مختلفی در زمینه ارزیابی و تعیین میزان تنوع در جنگل‌های مانگرو در سراسر جهان صورت می‌گیرد. بر این اساس از نشانگرهای مولکولی مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت در این اکوسیستم‌های جنگلی استفاده شده است که از میان آنها می‌توان به استفاده از نشانگرهای Amplified Fragment Length Polymorphisms(AFLP) و نشانگر (Simple-sequence repeats (SSR) (۳۲)، نشانگر های Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (۲۵، ۱۵ و ۴) وهمچنین توالیابی ژنوم (۲۶) در پژوهش های صورت گرفته در سال‌های اخیر اشاره کرد

نظر به ارزش بالای اقتصادی و زیست محیطی جنگل‌های مانگرو سواحل جنوبی ایران و اهمیت تنوع ژنتیکی این اکوسیستم‌های گیاهی منحصربه‌فرد در سازگاری با شرایط محیطی و تداوم بقای آنها، این تحقیق با هدف بررسی تنوع گونه *Avicennia marina* به‌عنوان گونه درختی غالب مانگرو در اکوسیستم‌های ساحلی جنوب ایران در چهار منطقه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و همچنین الگوهای باندی حاصل از نشانگرهای ریزماهواره انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق از جنگل‌های مانگرو در چهار منطقه مختلف ساحلی ایران شامل گواتر، قشم، عسلویه و ماهشهر برای مطالعه تنوع ژنتیکی موجود در گونه *Avicennia marina* بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی و نشانگرهای مولکولی انتخاب شدند. با توجه به پراکنش خاص و ماهیت موقعیت مکانی درختان حرا در چهار منطقه مورد مطالعه (شکل ۱) بررسی‌های میدانی با استفاده از تصاویر ماهواره‌ای و نقشه‌های توپوگرافی و همچنین با کمک و راهنمایی افراد بومی در جنگل‌های حمایتی و حفاظتی مانگرو این چهار منطقه انجام شد.

برای یادداشت برداری ویژگی‌های ریخت شناسی از روش خط نمونه استفاده شد. بدین منظور پس از ورود به هر یک از مناطق مشخص شده بر روی نقشه، مکان نمونه اولیه مشخص شد؛ آغاز هر ترانسکت در محل تماس توده گیاهی با دریا و امتداد آن عمود بر خط ساحلی و در امتداد کشیدگی توده بود. سپس با فاصله یک کیلومتر نقطه مرکزی انتخاب و در جهت عمود بر ترانسکت نمونه‌برداری انجام شد. اندازه‌گیری ویژگی‌های ریخت شناسی شامل ارتفاع، قطر برابر سینه، قطر یقه، اندازه برگ و ابعاد پنوماتوفر در ۱۵ مکان از هریک از مناطق چهارگانه انجام شد (در هر مکان سه نمونه تصادفی انتخاب و میانگین مقادیر به‌دست آمده از آنها برای انجام تجزیه‌های آماری



شکل ۱. منطقه مورد مطالعه و تصاویری از رویشگاه‌های مختلف *Avicennia marina* در سواحل جنوب ایران (A: قشم؛ B: ماهشهر؛ C: گواتر؛ D: عسلویه) که در این مطالعه نمونه‌برداری شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *Avicennia marina* جمع‌آوری‌شده از چهار منطقه ساحلی مختلف ایران

کد آغازگر	توالی آغازگر
M3 F:	GGTTCCTGCAAGTATGTCAACACCCTC
M3 R:	ACCTTCGATTCCTCCCCGAATGC
F: M40	CCCATAGATGACGGCAATCTTATGATCC
R: M40	ACCATCCAAAATAAAATAAATCTCCCTCCC
F: M47	TGACACCAAGGGAAATCAACATGCC
R: M47	GAACCTAGCGACCAATAGATCATCCTGG
M81 F:	GAATGATGATCGGATGTTGCTACTCCTG
M81 R:	CAATCCCAAAGCCCCAAAAATAATCC
M98 F:	CCCAAACTCGTTACGATGGATGACTTC
M98 R:	CTTACAGTTGCGGTAAAATGAGACGTGC

مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب روی هم رفته از تعداد ۱۸۰ درخت در کل مناطق اندازه‌گیری به عمل آمد). همچنین به‌منظور استخراج DNA ژنومی برای بررسی تنوع مولکولی از تعداد ۶۰ نمونه گیاهی (۱۵ نمونه از هر یک از مناطق چهارگانه) استفاده شد. نمونه‌های برگی انتخاب شده برای استخراج DNA ژنومی پس از برداشت در نیتروژن مایع فریز و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA براساس روش (CTAB) Cetyltrimethyl ammonium bromide (۲۹) از نمونه‌های برگی انجام و سپس کیفیت DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸درصد مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تعداد۱۰ توالی از آغازگرهای SSR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). واکنش های The polymerase chain reaction(PCR) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰میکرولیترX۲ master mix، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۵ نانوگرم در میکرولیتر)، یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰پیکومول بر میکرولیتر و ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل تنظیم شد و تمامی واکنش‌های تکثیر با برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴دقیقه و سپس ۳۴ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بهینه‌شده برای هریک از آغازگرها به‌مدت ۳۵ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲درصد تفکیک شده و برای رنگ‌آمیزی ژل‌های الکتروفورزی از SafeviewII (به میزان ۱۰ میکرولیتر در هر ۱۰۰ میلی لیتر ژل) استفاده گردید. پس از ثبت تصاویر الگوهای باندی، امتیازدهی باندها انجام شد.

تجزیه واریانس داده‌های ریخت شناسی در قالب طرح آشیانه‌ای انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده گردید. برای انجام تجزیه‌های آماری داده‌های مولکولی و برآورد فواصل ژنتیکی و رسم نمودارهای موبوطه شامل دندروگرام، نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی و دیگر موارد از نرم‌افزارهای DARwin ver. 6 (۱۲) و MEGA ver. 5.1 (۵) استفاده شد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی Analysis of MOlecular VAriance (AMOVA) و برآورد پارامترهای ژنتیکی شامل درصد لوکوس‌های چندشکل The percentage of polymorphic loci (PPL)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوسی (He)، تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) و تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) با استفاده از نرم GenAlEx– ver ۶.۵ انجام شد.

Na = No. of Different Alleles
Ne = No. of Effective Alleles = 1 / (p^2 + q^2)
I = Shannon's Information Index
= -1* (p * Ln (p) + q * Ln(q))
uHe = Unbiased Expected Heterozygosity
= (2N / (2N-1)) * He
PPL = No. of polymorphic bands/ No. of total bands

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۷۷درصد از واریانس کل مربوط به جزء درون گروهی بوده و ۲۳درصد باقیمانده از تنوع کل توسط تنوع بین جمعیت‌ها تبیین می‌شود (جدول ۲). بالا بودن تنوع درون گروهی در مقایسه با جزء بین جمعیتی بیانگر وجود سطح بالایی از تنوع و اختلاف ژنتیکی افراد در داخل جمعیت‌ها می‌باشد که به نوبه خود این تنوع می‌تواند در یافتن آلل‌های متنوع موثر باشد. این موضوع در مورد گیاهان در خطر انقراض و اکوسیستم‌های گیاهی در معرض خطر تخریب به‌واسطه تغییرات اقلیمی و شرایط نامناسب زیست محیطی می‌تواند دارای اهمیت زیادی دارد باشد چرا که وجود تنوع کافی عاملی مهمی برای سازگاری با شرایط نامساعد محیطی و در نتیجه جلوگیری از فرسایش ژنتیکی گونه‌های گیاهی خاص مانند مانگروها خواهد بود (۱۰).

پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده برای هر یک از جمعیت‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود در بین چهار منطقه مورد مطالعه، جمعیت منطقه قشم با فاصله زیاد نسبت به سایر جمعیت‌ها از میزان درصد مکان‌های چندشکل بیشتری (۸۹ درصد) برخوردار است. همچنین با توجه به مقادیر شاخص شانون (I) که یکی دیگر از شاخص‌های تنوع می‌باشد، بیشترین میزان (۰/۴۳) مربوط به جمعیت قشم و کمترین میزان (۰/۱۷) مربوط به جمعیت عسلویه بود. مقایسه مقادیر برآورد شده برای شاخص هتروزیگوسیتی هم نتایج حاصل از شاخص شانون را تایید کرد. بیشترین و کمترین مقدار این شاخص (۰/۲۸ و ۰/۱۱) به‌ترتیب برای دو جمعیت قشم و عسلویه به‌دست آمد و نشان داد که بیشترین تنوع ژنتیکی در جمعیت قشم وجود دارد. جمعیت قشم از نظر تعداد آلل‌های مؤثر نیز دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای با دو جمعیت عسلویه و ماهشهر بود اما با جمعیت گواتر تقریبا برابری می‌کرد. به‌طور کلی بر اساس مجموع شاخص‌های تنوع، جمعیت قشم و سپس جمعیت گواتر به‌ترتیب بیشترین میزان تنوع را نشان دادند. میزان تنوع این جامعه گیاهی می‌تواند در نتیجه تأثیرات فاکتورهای محیطی انتخاب طبیعی در فرآیند سازگاری درختان مانگرو به شرایط محیط و همچنین اثرات ژنتیکی باشد (۳۰). از سوی دیگر در تحقیقات گذشته، عواملی نظیر اندازه کوچک جمعیت و اینبریدینگ به‌عنوان دلایل احتمالی برای توجیه سطح پایین تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی ذکر شده‌اند (۲۲ و ۸).

در بررسی الگوی توزیع باندها در چهار جمعیت مورد مطالعه نیز وجود باندهای اختصاصی تنها در جمعیت قشم مشاهده شد و سایر جمعیت‌ها فاقد باند اختصاصی بودند. وجود باندهای اختصاصی در یک جمعیت می‌تواند بیانگر زمینه ژنتیکی خاص و منحصربه‌فرد آن جمعیت و همچنین وجود تنوع ژنتیکی بیشتر جمعیت باشد. تنوع ژنتیکی بالا بیان کننده تنوعات آللی فراوان و مکرر در یک جمعیت می‌باشد و در این راستا شرایط آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی می‌تواند بر تغییرات نهایی تنوع جمعیت تأثیرگذار باشد (۳۱). علاوه بر این، این یافته‌ها نشان می‌دهد که این مناطق می‌توانند به‌صورت بالقوه به‌عنوان منشاء آلل‌های جدید و متنوع برای فرایندهای تولیدمثل و تکامل در نظر گرفته شوند که می‌توانند از دیدگاه اهداف حفاظت از ذخایر ژنتیکی مهم باشد (۳۳).

تجزیه کلاستر بر اساس الگوریتم Neighbor Joining و ماتریس فاصله جاکارد ۶۰ نمونه مورد مطالعه را در چهار گروه اصلی دسته‌بندی کرد (شکل ۲). در این دسته‌بندی، نمونه های مربوط به مناطق جغرافیایی مشابه تا حدودی با یکدیگر دسته‌بندی شدند اما سطوح بالایی از اختلاط نمونه‌های مربوط به مناطق مخلف با یکدیگر در هر یک از کلاسترها مشاهده شد. به‌طوری‌که می‌توان بر اساس آن عدم مطابقت بین گروه‌بندی بر اساس تنوع مولکولی با موقعیت جغرافیایی را عنوان کرد.

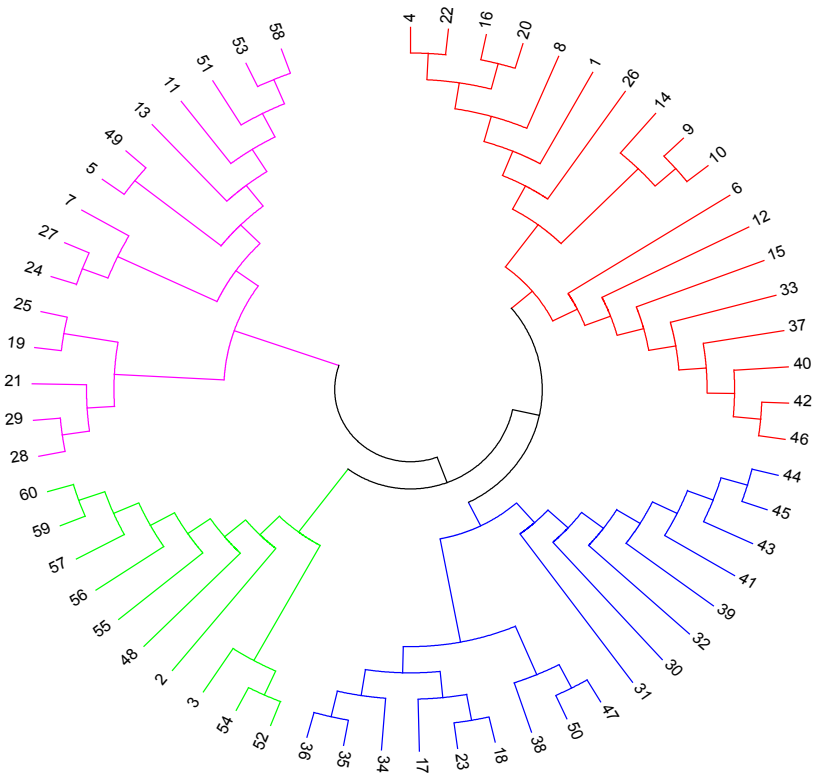
جدول ۲. تجزیه واریانس مولکولی داده‌های حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی در ۶۰ نمونه مختلف *Avicennia marina* جمع‌آوری‌شده از چهار منطقه ساحلی مختلف ایران

منابع تغییر	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	واریانس تخمینی Est.Var	درصد واریانس تبیین شده % Variance
بین جمعیت‌ها	۳	۱۵/۴۶۷	۵/۱۵۶	۰/۲۸۰	٪۲۳
درون جمعیت‌ها	۵۶	۵۳/۳۳۳	۰/۹۵۲	۰/۹۵۲	٪۷۷

جدول ۳. پارامترهای تنوع برآورد شده به تفکیک جمعیت‌ها در مطالعه تنوع ژنتیکی ۶۰ نمونه مختلف *Avicennia marina* جمع‌آوری‌شده از چهار منطقه ساحلی مختلف ایران

منطقه	اندازه جمعیت	Ne	I	He	PPL%
گواتر	۱۵	۱/۴۳	۰/۳۳	۰/۲۳	۵۵
قشم	۱۵	۱/۴۴	۰/۴۳	۰/۲۸	۸۹
عسلویه	۱۵	۱/۱۷	۰/۱۷	۰/۱۱	۳۳
ماهشهر	۱۵	۱/۱۶	۰/۱۸	۰/۱۲	۴۴

Ne، I، He، PPL% به‌ترتیب تعداد آلل موثر، شاخص شانون، شاخص تنوع نی و درصد لوکوس‌های چندشکل می‌باشند.



شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۶۰ نمونه مورد مطالعه *Avicennia marina* جمع‌آوری‌شده از چهار منطقه مختلف سواحل جنوبی ایران بر اساس روش اتصال همسایه (مجاور) Neighbor joining

جدول ۴. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی صفات ریخت شناسی در ۶۰ نمونه مختلف *Avicennia marina* جمع‌آوری‌شده از چهار منطقه ساحلی مختلف ایران

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات صفات ریخت شناسی مورد مطالعه						
		H	DBH	CD	P.L	P.D	L.W	L.L
منطقه	۳	۸/۱**	۲۱۹/۴*	۳۲۰/۲**	۵۳۴/۳**	۳۶/۲**	۳۱۷/۵**	۵۲۰۲/۹**
نمونه(منطقه)	۵۶	۰/۶۸	۶۰/۱	۷۴/۱	۴/۶	۲/۱	۳۶/۳	۳۳۸/۲

H: ارتفاع؛ DBH: قطر برابر سینه؛ CD: قطر یقه؛ P.L: طول پنوماتوفور؛ P.D: قطر پنوماتوفور؛ L.W: عرض برگ؛ L.L: طول برگ.

بنابراین نمی‌توان گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه را بر اساس داده‌های مولکولی در انطباق کامل با پراکنش جغرافیایی و محل جمع‌آوری آنها دانست. در مطالعه دیگری جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ۶ جمعیت مختلف *Avicennia marina* مربوط به دو منطقه مختلف از جنگل‌های حرای مصر با استفاده از نشانگرهای RAPD نیز تنوع ژنتیکی بالایی بین نمونه‌های مناطق مختلف گزارش شد لیکن تطابقی بین دسته‌بندی نمونه‌ها بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های RAPD با پراکنش جغرافیایی آنها وجود نداشت (۱۵). این موضوع می‌تواند در نتیجه جابجائی ژرم‌پلاسم، پراکنش وسیع در محدوده جغرافیایی و همچنین عدم پوشش ژنومی لازم به‌دلیل مکانیسم نشانگر مورد استفاده یا تعداد ناکافی آغازگرها باشد.در گزارش‌های دیگری نیز عدم تشابه گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی یا ریخت شناسی با پراکنش جغرافیائی آنها عنوان شده است (۲۱، ۱۰ و ۲۸). همچنین در طی سال‌های گذشته تحقیقات مختلفی بر روی بررسی میزان تنوع ژنتیکی در جنگل های مانگرو در رابطه با پراکنش جغرافیایی آنها (۲) و نیز در بررسی رابطه تنوع با فاکتورهای اکولوژیکی و محیطی (۲۴) صورت گرفته است که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت نشان می‌دهد.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات ریخت شناسی شامل ارتفاع درخت، قطر برابر سینه درخت، میانگین قطر یقه درخت، طول پنوماتوفور، قطر پنوماتوفور، عرض برگ و طول برگ نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین مناطق مختلف از نظر تمامی صفات مورد بررسی بود. به‌طوری‌که مقدار آماره F برای صفت قطر برابر سینه در سطح احتمال ۵درصد و برای سایر صفات یاد شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد حاکی از وجود تفاوت‌های معنی‌داری بین مناطق مختلف بود. از نظر ارتفاع درختان، بیشترین ارتفاع در جنگل‌های گواتر و کمترین ارتفاع در جنگل‌های ماهشهر مشاهده شد و از شرق به غرب ارتفاع درختان به‌صورت محسوس و معنی‌داری دارای روند کاهشی بود. در خصوص قطر برابر سینه و قطر یقه تفاوت معنی‌داری بین درختان مناطق گواتر، عسلویه و قشم وجود نداشت لیکن درختان منطقه ماهشهر به‌صورت معنی‌داری از متوسط پایین‌تری برخوردار بودند. مقایسه میانگین طول پنوماتوفورها در درختان مناطق چهارگانه نشان داد تفاوت معنی‌داری بین تمامی مناطق وجود دارد و در مسیر شرق به غرب به‌تدریج و به‌صورت محسوسی طول پنوماتوفورها افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که درختان منطقه ماهشهر دارای بیشترین اندازه پنوماتوفورها بودند. این در حالی است که قطر پنوماتوفورها در درختان شرقی‌ترین منطقه یعنی گواتر نسبت به سایر مناطق به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود و بین سه منطقه دیگر تفاوت معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. تنوع فنوتیپی پنوماتوفورها بین گیاهان رشد یافته در مناطق متفاوت از یکدیگر در تحقیقات گذشته نیز گزارش شده است و این تفاوت‌ها به‌عنوان نتیجه پاسخ گیاهان برای سازگاری به شرایط اقلیمی ذکر شده اند (۱۵). در نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده شده است که گونه *Avicennia marina* از قابلیت بسیار بالایی در سازگار نمودن سیستم ریشه‌های هوایی به تغییرات و بی‌نظمی‌های

جدول ۵. مقایسه میانگین صفات ریخت شناسی مورد بررسی در درختان حرا (*Avicennia marina*) بین چهار منطقه مورد مطالعه با استفاده از آزمون چند دامنهای دانکن (P‹0/05)

منطقه مورد بررسی	صفات مورد مطالعه					
	میانگین ارتفاع (m)	میانگین قطر برابر سینه(cm)	میانگین قطر یقه (cm)	میانگین ا بعاد برگ(mm^2)	میانگین طول پنوماتوفر(cm)	میانگین قطرپنوماتوفر(mm)
گواتر	۴/۷a	۱۸/۶۲a	۳۳/۰۴a	۲۰۰۵/۶a	۱۱/۴d	۱۱/۹۶a
قشم	۳/۸۶b	۱۵/۷۱ab	۳۲/۰۱a	۱۰۰۷/۶۴c	۱۵/۷۵c	۱۰/۱۴b
عسلویه	۳/۵b	۱۴/۴۴b	۳۰/۷۶a	۱۵۳۱/۸۴b	۱۹/۲b	۹/۷۸b
ماهشهر	۲/۹۵c	۹/۴۶c	۲۲/۸۸b	۱۳۲۹/۶۴b	۲۵/۴۶a	۸/۸۹b

میکروتوپوگرافی برخوردار است (۲۰). این موضوع به نوبه خود بر ترکیبات شیمیایی و همچنین توزیع نیتروژن، کربن و سولفور در رسوبات تاثیر بسزایی دارد (۴،۱۶،۶). اندازه‌گیری خصوصیات برگ نیز نشان داد که درختان مناطق قشم به مراتب از اندازه برگ کوچکتری در مقایسه با سه منطقه دیگر برخوردار هستند (جدول ۵).

بررسی همبستگی صفات مختلف نشان داد که بیشترین مقدار همبستگی مثبت و معنی‌دار بین قطر برابر سینه و قطر یقه درختان (r=۰/۸۲) و سپس بین ارتفاع و قطر برابر سینه درختان (r=۰/۷۳) وجود دارد. در مقابل، بیشترین همبستگی منفی و معنی‌دار بین طول پنوماتوفر و ارتفاع درختان مشاهده شد (r=-۰/۵۶). طول و قطر پنوماتوفور درختان نیز با یکدیگر دارای رابطه معکوس بودند.

منابع مورد استفاده

1. Alongi, D.M. 2015. The impact of climate change on mangrove forests. *Current Climate Change Reports* 1: 30-39.
2. Bradeen, J.M., I.C. Bach, M. Briard, C.V. Le, D. Grzebelus, D.A. Senalik and P.W. Simon. 2002. Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild Daucus populations reveals a genetically nonstructured composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 383-391.
3. Dahdouh-Guebas, F.R., J.G. Kairo, R. De Bondt and N. Koedam. 2007. Pneumatophore height and density in relation to microtopography in the grey mangrove Avicennia marina. *Belgian Journal of Botany* 140: 213-221.
4. Dimendra, H., T. Muthusamy, S. Sunil Kumar and K. Kathiresan. 2013. Genetic diversity in three populations of *Avicennia marina* along the eastcoast of India by RAPD markers. *Journal of Environmental Biology* 34: 663-666.
5. Doyle, J.J. and K.J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.*Phytochemical Bulletin* 19:11–15.
6. Efrén, C., I. León, J. Pinedo. 2018. Biogeochemistry of mangrove sediments in the swamp of Mallorquin,Colombia. *Regional Studies in Marine Science* 17: 38-46.
7. Ghasemi, S., M. Zakaria and N. Mola Hoveizeh. 2011. Abundance of molluscs (gastropods) at mangroveforests of Iran. *Journal of American Science*7(1):660-669.
8. Faisal, M. and M. Anis. 2002. Conservation of some rare and endangered medicinal plants adopting biotechnological approaches. In: International Symposium on Plant Biodiversity: Conservation and Evaluation December 17-20. Bose Institute, Kolkata, India.

9. Gharacheh, M., M. Salari Aliabadi, S. Ghaemmaghami and A. Qasemi. 2020. Genetic diversity of plantations and natural stands of Avicenna marina across northern coast of Persian Gulf. *Journal of Plant Ecosystem Conservation* 8(16): 217-228.
10. Gholamian, F., A. Etminan, M. Changizi, S. Khaghani and M. Gomarian. 2019. Assessment of genetic diversity in Triticum urartu Thumanjan ex Gandilyan accessions using start codon targeted polymorphism (SCoT) and CAATbox derived polymorphism (CBDP) markers. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 33(1): 1653-1662.
11. Hilaluddin, F., F.M. Yusoff, F.M.I. Natrah and P.T. Lim. 2020. Disturbance of mangrove forests causes alterations in estuarine phytoplankton community structure in Malaysian Matang mangrove forests. *Marine Environmental Research* 158: 104935.
12. Huang, J., X. Lu, W. Zhang, R. Huang, S. Chen and Y. Zheng. 2014. Transcriptome sequencing and analysis of leaf tissue of *Avicennia marina* using the Illumina platform. *PlosOne* 9: e108785.
13. Jafarnia, S., J. Oladi, S.M. Hoojati and K. Mir Akhor Loo. 2016. Status and change detection of mangrove forest in Qeshm Island using satellite imagery from 1988 to 2008. *Journal of Environmental Science and Technology*18(1): 177-191.
14. Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F, Reisch, BI. 1998. A simple and efficient method DNA extraction from grapevine cultivars and visit species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1):6-13.
15. Maguire, T.L., Peakall, R., Saenger, P. 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 104:388–398
16. Maguire, T.L., P. Saenger, P.R. Baverstock and R.J. Henry. 2000. Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Molecular Ecology* 9: 1853-1862.
17. Manson, F.J., N.R. Loneragan, B.D. Harch, G.A. Skilleter and L. Williams. 2005. A broad-scale analysis of links between coastal fisheries production and mangrove extent: a case-study for northeastern Australia. *Fisheries Research* 74: 69-85.
18. Martin, C., H. Almahasheer and C.M. Duarte. 2019. Mangrove forests as traps for marine litter. *Environmental Pollution* 247:508-499.
19. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43:1235-1248.
20. Mori, G.M., M.I. Zucchi and A.P. Souza. 2015. Multiple-geographic-scale genetic structure of two mangrove tree species: The roles of mating system, hybridization, limited dispersal and extrinsic factors. *PlosOne*10: e0118710.
21. Nowak, J.L., S. Okon and A. Wieremczuk .2020. Molecular diversity analysis of genotypes from four Aegilops species based on retrotransposon– microsatellite amplifed polymorphism (REMAP) markers. *Cereal Research Communications* 49(1):37-44.
22. Peakall, R. and P.E. Smouse. 2006. Genalex6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
23. Perrier, X., A. Flori, F. Bonnot. 2003. Data Analysis Methods. In: Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC (Eds.), Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants, London, Plymouth, UK, pp.43-76.
24. Pezhmanmehr, M., M.E. Hassani, F. Jahansooz, A.A. Najafi, F. Sefidkon, M. Mardi and M. Pirseiedi .2009.Assessment of genetic diversity in some Iranian populations of Bunium persicum using RAPD and AFLP markers.*Iranian Journal of Biotechnology* 7(2):93-100
25. Pirseyedi, M., A. Shirvany and A. Danehkar. 2008. Genetic variation of mangrove species *Avicennia marina* in Iran revealed by microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology* 7 (17):3017-3021.
26. Sabri, D.M., S.A. El-Hussieny and N. Elnwishy. 2018. Genotypic variations of mangrove (*Avicennia marina*) in Nabq protectorate, South Sinai, Egypt. *International Journal of Agriculture & Biology* 20(3): 637−646.
27. Singh, J.K. 2020. Structural characteristics of mangrove forest in different coastal habitats of Gulf of Khambhat arid region of Gujarat, west coast of India. *Heliyon* 6(8): e04685.
28. Solouki, M., H. Mehdikhani, H. Zeinali and A.A. Emamjomeh .2008. Study of genetic diversity in Chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. *Scientia Horticulturae*117: 281-287.
29. Surya, D., D. Swati and G. Parthadeb. 2015. Phylogenetic relationships among the mangrove species of Acanthaceae found in Indian Sundarban, as revealed by RAPD analysis. *Advances in Applied Science Research* 6:179- 184
30. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution* 28:2731-2739.
31. Tyge, D., G. David, T. Marijana, E. Todd and J. David. 2015. Small urban stands of the mangrove *Avicennia marina* are genetically diverse but experience elevated inbreeding. *Estuaries and Coasts* 38: 1898-1907.

32. Vieira, M.L.C., L. Santini, A.L. Diniz and C.F. Munhoz. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*39(3): 312-328.
33. Xia, P., X. Meng, Z. Li, A. Feng, P. Yin and Y. Zhang. 2015. Mangrove development and its response to environmental change in Yingluo Bay (SW China) during the last 150 years: Stable carbon isotopes and mangrove pollen. *Organic Geochemistry* 85: 32-41.
34. Yaghoubzadeh, M., A. Salmanmahiny, M. Moslehi, A. Danehkar and A.R.M. Tabrizi. 2021. Investigation of port effects on vegetative and reproductive characteristics of grey mangrove (*Avicennia marina* (Forssk.) Vierh.) of Iran. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research* 28(3). (In Persian).
35. Zahed, M.A., F. Rouhani, S. Mohajeri, F. Bateni and L. Mohajeri. 2010. An overview of Iranian mangrove ecosystems, northern part of the Persian Gulf and Oman Sea. *Acta Ecologica Sinica* 30(4):240-244.
36. Zhang, C.G., I.K.K. Leung, Y.S. Wong, N.F.Y. Tam. 2007. Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruguiera gymnorrhiza*) to lubricating oil pollution. *Environmental and Experimental Botany* 60: 127-136.

Genetic Diversity of Avicennia Marina in Costal Ecosystems of Southern Iran Based on Molecular Markers and Morphological Characteristics

S. Kuchaki chenani[1], S. Babaei Kafaki[2*], H. Kiadaliri[3], A. Ebrahimi[4] and A. Etminan[5]

(Received: February 26-2022; Accepted: July 04-2022)

Abstract

Iranian mangrove forests provides valuable information to prevent genetic erosion in the gene pool of these ecosystems. The aim of this study was to investigate the genetic diversity among mangrove forests located in four different regions of Iran, based on morphological characteristics and microsatellite markers. Cluster analysis of molecular data, using neighbor joining algorithm classified the 60 mangrove trees, sampled from different coastal areas, into four groups. Analysis of molecular variance showed that the majority (77%) of the variance explained by among-population variation and the highest values of genetic diversity parameters including number of effective alleles, Shannon's information index, and Nei's genetic diversity were obtained for the Qeshm population, indicating that region is the most diverse population among all the studied populations. Baced on the morphological analyses significant differences were observed between all populations in terms of height, diameter at breast height, collar diameter, leaf size, pneumatophore length and pneumatophore diameter. The present study, provides useful information about genetic diversity of mangrove habitats which can be used in evolutionary studies and conservation efforts for these valuable plant ecosystems.

.

Keywords: Genetic diversity, Costal habitat, Mangrove, Morphology, Molecular marker

1. Ph.D. Student of Forestry, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
5. Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran.

*: Corresponding Author, Email: S.babaie.rs@gmail.com