

ارزیابی قرابت‌های ژنتیکی پایه‌های منتخب ون برای تشکیل باغ بذر در ایستگاه تحقیقات چمستان

یوسف محمدی^{۱*}، فرزاد بنائی اصل^۲ و کامبیز اسپهبدی^۳

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. (y.mohamadi@rifr-ac.ir)
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. (f.banaei@rifr-ac.ir)
۳- دانشیار، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. (espahbodi.k@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵

چکیده

در امر بازسازی و گسترش جنگل‌ها، نبود یا کمبود بذر اصلاح‌شده با تنوع ژنتیکی بالا، یکی از مهم‌ترین عوامل بازدارنده است. تشکیل باغ بذر علاوه بر تأمین بذور تکرارپذیر و نهال‌های با کیفیت، در تأمین تنوع ژنتیکی کافی برای پژوهش‌های آینده نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. ۱۸ پایه مادری که از فنوتیپ مناسب (ظاهر سالم و بدون آفت و بیماری) برخوردار بودند، در جنگلی به مساحت تقریبی ۱۰۰ هزار هکتار شناسایی و پس از جمع‌آوری نمونه‌های برگ، استخراج DNA با روش CTAB تغییر یافته انجام شد و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از نشانگرهای SSR انجام شد. مشخصات آللی نشانگرهای تکثیر شده و همچنین شاخص‌های ژنتیکی با نرم‌افزار GenALEX محاسبه و ماتریس ضرایب تشابه جاکارد و خوشه‌بندی ۱۸ پایه منتخب با روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از الکتروفورز عمودی محصولات PCR، از ۱۵ جفت نشانگر SSR، در ۱۰ نشانگر SSR تکثیر قطعه انجام شد. در مجموع برای ۱۰ نشانگر SSR، ۵۷ آلل چند شکل در ۱۸ پایه منتخب ون شناسایی شد، به‌طوری که نشانگر FE3 با ۱۰ آلل چند شکل، بیشترین و نشانگر FE5 با دو آلل، کمترین تعداد آلل چند شکل را به‌خود اختصاص دادند. خوشه‌بندی ۱۸ پایه مختلف بر اساس روش UPGMA، نشان داد که پایه‌های منتخب با در نظر گرفتن ضریب تشابه ۰/۸۰، در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به‌دست آمده و برای تشکیل باغ بذر می‌توان از پایه‌های P1، P2، P3، P4، P8، P9، P10، P15، P17 و نهایتاً P18 استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، خوشه‌بندی، نشانگرهای ریزماهواره، ون

مقدمه

محوطه‌های بذرگیری و ایجاد باغ بذر در نظر گرفته شد (Mohammadi and Gheytranpour-Sehrigh, 2022). بنابراین با توجه به اهمیت درخت ون در جنگل‌های هیرکانی و لزوم ایجاد باغ بذر گونه‌های مهم و همچنین تدوین برنامه‌های توسعه و احیا جنگل‌ها، بررسی تنوع ژنتیکی پایه‌های منتخب ون برای تشکیل باغ بذر دارای اهمیت است. بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف یک گونه بر اساس صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌شود. معایب نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مثل تعداد کم صفات، وابسته بودن به محیط و زمان، موجب شده که محققین از نشانگرهای مولکولی به‌ویژه نشانگرهای مبتنی بر PCR، برای پژوهش‌های مختلف ژنتیکی استفاده کنند. ریزماهورها، تکرار موتیف‌های نوکلئوتیدی ۶-۱ جفت بازی هستند که به‌طور گسترده در ژنوم توزیع شده و به‌دلیل هم بارز بودن، تعداد زیاد، تکرار پذیری بالا، کاربرد ساده و تفسیر آسان، استفاده فراوانی در بررسی تنوع ژنتیکی دارند (Gao et al., 2020; Taheri et al., 2022). تاکنون تحقیقات کمی در بحث تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف ون انجام شده است. (Runġis et al., 2016) تحقیقی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ جمعیت ون جمع آوری شده از لتونی را با استفاده از ۶ نشانگر SSR کلروپلاستی و ۶ نشانگر SSR هسته‌ای انجام داده و به این نتیجه رسیدند که تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌های مورد بررسی وجود دارد و نشانگرهای SSR در تفکیک جمعیت‌های مورد بررسی، کارایی بالایی دارند. در تحقیقی دیگر، (Ferrazzini et al., 2007) از ۶ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ جمعیت ون در ایتالیا استفاده کردند. در این تحقیق تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده شد. (Pliūra and Baliuckas, 2007) از نشانگرهای RAPD برای بررسی

درخت ون یا زبان‌گنجشک معمولی یا اروپایی (*Fraxinus excelsior*) از خانواده Oleaceae بوده که در اروپا از شرق شبه جزیره ایبری تا بخش‌های مرکزی روسیه و از مناطق مدیترانه‌ای جنوب اروپا تا شمالی‌ترین حد آن در نروژ، در آسیا نیز در مناطق قفقاز و ایران و در شمال آفریقا به‌طور بومی وجود دارد (Dobrowolska et al., 2011). این گونه به‌دلیل سرعت رشد زیاد در بازه زمانی کوتاه و همچنین تولید چوب ارزشمند، حائز اهمیت بوده و در بریتانیا به‌عنوان دومین درخت پهن برگ است که به‌وفور در جنگل‌کاری استفاده می‌شود (Kerr and Cahalan, 2004). گونه ون به‌دلیل تخریب و بهره‌برداری بی‌رویه در حال نابودی است (Hamidoost et al., 2019).

با توجه به برنامه‌های میان‌مدت و بلند توسعه منابع طبیعی ایران مانند سند توسعه منابع طبیعی ایران در افق ۱۴۰۴، برنامه راهبردی احیاء و توسعه جنگل‌های ایران و قانون برنامه پنج‌ساله ششم توسعه کشور، حدود ۲۰۰۰۰۰ هکتار جنگل‌کاری و احیای جنگل در چهار برنامه پنج‌ساله برای رویش‌گاه‌های پنج‌گانه ایران پیش‌بینی شده است (Espahbodi et al., 2011). برای دستیابی به چنین اهداف و برنامه‌های منسجمی، تولید بذر و نهال استاندارد بسیار مهم بوده و بذور مورد نظر علاوه بر داشتن کیفیت مناسب، بایستی از نظر ژنتیکی نیز تنوع کافی را داشته باشند تا از پسروی ژنتیکی جنگل و کاهش مقاومت جنگل در مواجهه با اثرهای تغییر اقلیم ممانعت به‌عمل آید (Mohammadi and Gheytranpour-Sehrigh, 2021).

برای تأمین چنین بذوری می‌توان از محوطه‌های بذرگیری یا از باغ‌های بذر استفاده کرد. در مدل بومی شده برای تشکیل باغ بذر در ایران، تعیین محوطه‌های بذرگیری و جمع‌آوری بذر از پایه‌های ممتاز داخل

تنوع ژنتیکی بین ۱۰ جمعیت ون لیتوانی و ۱۴ جمعیت ون اروپای غربی استفاده کردند و تنوع ژنتیکی را در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده کردند.

با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این تحقیق: (۱) تعیین قرابت ژنتیکی بین پایه‌های مختلف ون با نشانگرهای SSR، (۲) تعیین پایه‌های مادری مناسب برای انتقال نهال آن‌ها به باغ بذر و (۳) انتخاب پایه‌های منتخب غیرخویشاوند از طریق نشانگرهای مولکولی برای تشکیل باغ بذر است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۸ پایه ون که از فنوتیپ مناسبی (شاداب، ظاهر سالم، هرس طبیعی، چیره) برخوردار بودند و از سه ناحیه پل سفید، دهمیان و سنگده در استان مازنداران جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. قطر پایه‌های مادری ۱۰/۶ تا ۵۷/۸ سانتی‌متر و ارتفاع آن‌ها از ۷/۸ تا ۲۹ متر متغیر بود (جدول ۱). بیشتر پایه‌های مادری میانسال بودند. از ۱۸ پایه مورد بررسی دو پایه در مناطق جنگلی جنوب شهر پل سفید سوادکوه معروف به جنگل سرت، نه پایه مادری در مناطق جنگل کاری شده اطراف روستای دهمیان سوادکوه و هفت پایه مادری در مناطق جنگل کاری شده روستای سنگده ساری واقع بودند. در اواخر شهریور و اوایل مهر سال ۱۳۹۸، از هر پایه مادری به اندازه کافی بذر تهیه شد.

بذرها پس از بوجاری، در نهالستان لاجیم واقع در فاصله ۱۵ کیلومتری رویشگاه‌هایی که پایه‌های مادر در آن قرار داشتند، در ماسه مرطوب، به تفکیک پایه‌های مادری، تحت استراتیفه قرار گرفتند. نهالستان لاجیم در ۳۰ کیلومتری جنوب غربی ساری در مختصات ۵۳ درجه و ۵ دقیقه و ۵۸ ثانیه طول شرقی، در ۳۶ درجه و ۱۵ دقیقه و ۳۵ ثانیه عرض شمال و در ارتفاع ۶۷۲ متر

از سطح دریا قرار دارد. بذرهای لایه‌گذاری شده، در اواخر سال ۱۳۹۸ به تفکیک پایه مادری در کرت‌هایی به ابعاد ۱۰۰ در ۱۵۰ سانتی‌متر در ۵ ردیف با فاصله ۲۰ سانتی‌متر از هم و نیز روی خطوط کاشت با فاصله ۱۵ سانتی‌متر کاشت شد. در هر کرت ۵۰ عدد بذر کاشته شد.

از ابتدای سال ۱۳۹۹ به صورت هفتگی نهال‌ها مورد بازدید قرار گرفتند. وجین علف‌های هرز و آبیاری طبق روال معمول نهالستان انجام شد. برای بررسی‌های مولکولی در اواسط بهار سال ۱۳۹۹ از هر یک از کرت‌های مورد نظر از چهار نهال نمونه برگ تازه-تشکیل شده برای بررسی‌های مولکولی تهیه شد و در محتوای سیلیکاژل به آزمایشگاه منتقل شد.

ارزیابی مولکولی

نمونه‌های برگ از پایه‌های مادری انتخاب و پس از انجماد در ازت مایع، به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد و استخراج DNA به روش CTAB (Saghai- (2007) انجام شد. کمی و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین شد. پس از تعیین کمی نمونه‌ها، به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل یک چرخه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد بسته به آغازگر به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

جدول ۱ - اطلاعات کمی و مختصات جغرافیایی پایه‌های مادری

Table 1. Maternal tree quantitative data and geographical coordinates

پایه‌ها	ناحیه*	ارتفاع از سطح دریا	جهت**	قطر درخت (سانتی‌متر)	ارتفاع درخت (متر)	مقدار بذر***
Trees	Zone	Altitude	Direction	Tree diameter (cm)	Tree height (m)	Number of seed
P1	PS	950	NW	34.4	19.5	H
P2	PS	951	NW	48.4	29	H
P3	D	1198	NE	23.1	15.5	H
P4	D	1218	NE	19.5	13.6	H
P5	D	1218	NE	10.6	8.5	H
P6	D	1221	NE	29.60	12.7	H
P7	D	1222	SW	23.10	14.5	H
P8	D	1219	SW	58.7	23.8	H
P9	D	1215	NE	16.9	7.8	H
P10	D	1229	NE	35.8	13.2	H
P11	D	1231	NE	21.5	14.7	M
P12	S	1441	N	16.2	10.5	H
P13	S	1428	SW	22	15.5	M
P14	S	1296	NE	16.4	8.7	H
P15	S	1256	NE	20.5	17.5	H
P16	S	1197	NE	31.4	12.4	H
P17	S	1197	NE	14.2	8.5	G
P18	S	1187	NW	11.78	10.2	H

* PS: پل سفید، D: ده‌میان، S: سنگده. ** NW: شمالی غربی، NE: شمالی شرقی، SW: جنوبی غربی، N: شمالی. *** H: زیاد، G: خوب، M: متوسط

* PS: Pole sefid, D: Dehmiyan, S: Sangdeh, ** NW: North West, NE: North East, SW: South West, N: North. *** H: High, G: Good, M: Medium

آغازگرهای ریزماهوره

در این بررسی از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهوره برای غربال ۱۸ پایه منتخب ون استفاده شد (Lefort et al., 1999). اسامی و توالی این آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

الکتروفورز محصولات PCR

برای تفکیک قطعات تکثیرشده از ژل پلی آکریلامید ۸ درصد و دستگاه الکتروفورز عمودی Bio-rad مدل Sequi-Gene GT استفاده شد. در این روش، نیترات نقره برای رنگ‌آمیزی قطعات استفاده شد (با ۵۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت).

امتیازدهی مولکولی پایه‌ها و تجزیه داده‌ها

الگوی نواری نشانگرهای ریز ماهوره به صورت الگوی نشانگرهای همباز (حروف انگلیسی) امتیازدهی شد. به طوری که برای وجود قطعه مورد نظر، حروف a, b,

c و ... در نظر گرفته شد. مشخصات آلی نشانگرهای تکثیر شده و همچنین شاخص‌های ژنتیکی با نرم‌افزار GenALEX محاسبه و ماتریس تشابه ضرایب جاکارد و خوشه‌بندی ۱۸ پایه منتخب با روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS 2.10e انجام شد و پس از خوشه‌بندی پایه‌های مختلف، تنوع ژنتیکی بین پایه‌های مختلف بررسی و نتیجه‌گیری شد.

نتایج

نتایج بررسی‌های مولکولی

نتایج اسپکتروفوتومتری نشان داد که کمیت DNA نمونه‌های استخراجی در وضعیت مطلوبی قرار داشتند (میانگین ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) و همچنین کیفیت نمونه‌های DNA استخراجی نیز در محدوده ۱/۶ (برای نسبت ۲۶۰/۲۳۰) و ۱/۷۳ (برای نسبت ۲۶۰/۲۸۰) قرار

داشتند که نشان از کمیت و کیفیت مناسب DNA

استخراجی بود.

جدول ۲- اسامی، توالی و دمای اتصال آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده

Table 2. Microsatellite names, sequences, and annealing temperatures

دمای اتصال Annealing temperature	توالی آغازگر معکوس Reverse primer sequence	توالی آغازگر مستقیم Forward primer sequence	نشانگر Marker
54	ATCAACTGAAGATGACGACG	AGCAGCATTATGAATGTTC	FE1
50	TACAAGGTGATATCACTTCT	TCTTTATCATCAAAAAATAA	FE2
55	GCTGTTTCAGGCGTAATGTG	TTCATGCTTCTCCGTGTCTC	FE3
54	TCCGAGTGATGCCTACTCTA	GGATTGAGATTCAATTTGCA	FE4
55	AGCGTTGTCCTTAACTTTT	TGTAGCTCAGGATTGGCAAT	FE5
50	AAATATCCGGTGCTTGTGTA	TTGAGCAACATGTAATTATG	FE6
50	TAGTTCTACTACTTCAAGAA	GATAGCACTATGAACACAGC	FE7
50	GATGGACGGGCATCTTAAT	TTTTTGGAACCTTGATTTT	FE8
52	CAACATACAGCTACTAATCA	TTTAAACAGTTAACTCCCTTC	FE9
52	TGCTCGCATATGTGCAGATA	CTGTTCAATCAAAGATCTCA	FE10
56	GGACCCAAACACACTGTCG	AGTAGCCCACTGCCACTAGC	FE11
56	TGGAGAGATTAGCAGCAAGC	TCTTCAATGCCTCTACTCAGTAACC	FE12
56	TGGATGAATGCTATGGGTCC	GCTTCCCAATACTAAACTCAGACG	FE13
56	GATTGAGGTAAGAGACTGAAATGG	ATAGGATGCCATACATGCCG	FE14
56	CACTCCACAAGCTAAAGAGGG	ACAGAGGTTGAAGTGGCAGG	FE15

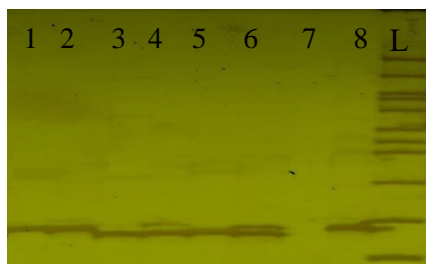
و نشانگر FE5 با ۲ آلل چند شکل کمترین تعداد آلل چند شکل را به خود اختصاص دادند. به طور میانگین ۵/۷ آلل چند شکل برای هر نشانگر SSR شناسایی شد. مشخصات آللی آغازگرهای تکثیر شده در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تمامی آغازگرهای تکثیر شده دارای ۱۰۰ درصد چند شکلی هستند و آغازگر FE5 با داشتن فراوانی ۰/۴۷۲ و ۰/۵۲۷ برای دو آلل تکثیر شده، بیشترین فراوانی آللی را در ۱۸ پایه منتخب ون دارد.

تفکیک قطعات تکثیری با ژل پلی آکرلامید

برای تفکیک قطعات تکثیری از ژل پلی آکرلامید ۸ درصد استفاده شد که نمونه‌ای از آن در شکل ۱ آورده شده است.

مشخصات آللی

بر اساس نتایج به دست آمده از الکتروفورز عمودی محصولات PCR، از ۱۵ نشانگر SSR، ۱۰ نشانگر SSR تکثیر شدند. در مجموع برای این ۱۰ نشانگر SSR، ۵۷ آلل چند شکل در ۱۸ پایه منتخب ون شناسایی شد به طوری که نشانگر FE3 با ۱۰ آلل چند شکل، بیشترین



شکل ۱- ژل پلی آکرلامید ۸ درصد قطعات تکثیری با نشانگر FE5

Figure 1. Amplified fragments in 8% polyacrylamide gel with FE5 marker

نشانگر FE5 است. همچنین کمترین و بیشترین شاخص شانون نیز در نشانگرهای FE5 و FE3 مشاهده شد. در این تحقیق کمترین هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار در نشانگر FE5 و بیشترین هتروزیگوتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب در FE3 و به صورت مشترک در FE2، FE9، FE13 و FE15 گزارش شد.

شاخص‌های ژنتیکی
شاخص تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، هتروزیگوتی مشاهده شده و هتروزیگوتی مورد انتظار در نشانگرهای تکثیرشده بررسی شد (جدول ۴). نتایج نشان می‌دهد که بیشترین تعداد آلل مؤثر با ۹ آلل، مربوط به نشانگر FE3 و کمترین تعداد آلل مؤثر با ۱/۹۹ آلل مربوط به

جدول ۳- مشخصات آلی آغازگرهای تکثیرشده

Table 3. Allelic characteristics of amplified primers

فراوانی آلی Allelic frequency										تعداد آلل No. of alleles	جایگاه Locus
10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
					0.277	0.194	0.277	0.195	0.055	5	FE1
		0.027	0.138	0.222	0.111	0.083	0.083	0.166	0.166	8	FE2
0.111	0.083	0.138	0.166	0.111	0.083	0.083	0.111	0.055	0.055	10	FE3
	0.138	0.138	0.083	0.083	0.027	0.194	0.166	0.111	0.055	9	FE4
								0.527	0.472	2	FE5
							0.361	0.305	0.333	3	FE9
			0.277	0.111	0.111	0.138	0.111	0.111	0.138	7	FE10
						0.138	0.250	0.361	0.250	4	FE13
					0.277	0.194	0.277	0.194	0.055	5	FE14
						0.138	0.250	0.361	0.250	4	FE15

جدول ۴- شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای ارزیابی شده

Table 4. The genetic properties of the tested primers

هتروزیگوتی مورد انتظار Expected heterozygosity	هتروزیگوتی مشاهده شده Observed heterozygosity	شاخص شانون Shannon index	تعداد آلل مؤثر Effective number of alleles	تعداد آلل No. of alleles	جایگاه Locus
0.767	0.778	1.509	4.291	5.000	FE1
0.849	1.000	1.963	6.612	8.000	FE2
0.889	0.778	2.248	9.000	10.000	FE3
0.866	0.944	2.084	7.448	9.000	FE4
0.498	0.389	0.692	1.994	2.000	FE5
0.665	1.000	1.096	2.986	3.000	FE9
0.835	0.722	1.881	6.056	7.000	FE10
0.725	1.000	1.335	3.640	4.000	FE13
0.767	0.778	1.509	4.291	5.000	FE14
0.725	1.000	1.335	3.640	4.000	FE15
0.759	0.839	1.565	4.996	5.700	میانگین Average

فاصله ژنتیکی بین پایه‌ها

پس از امتیازدهی قطعات تکثیرشده، ماتریس ضرایب تشابه جاکارد محاسبه شد که در شکل ۲ نشان داده شده است. فاصله ژنتیکی بین دو پایه به‌منزله تفاوت توجیه‌پذیر بین پایه‌ها بر اساس تنوع آلی است و هر چقدر این فاصله بیشتر باشد به‌معنی اختلاف ژنتیکی بالا بین پایه‌ها است. کمترین فاصله ژنتیکی (بیشترین تشابه ژنتیکی) بین پایه‌های ۱ و ۲ و همچنین پایه‌های ۱۲، ۱۳،

۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸ مشاهده شد. همچنین بیشترین

فاصله ژنتیکی (کمترین تشابه ژنتیکی) با ۰/۲۸۰ بین پایه‌های ۳ و ۱۲ گزارش شد.

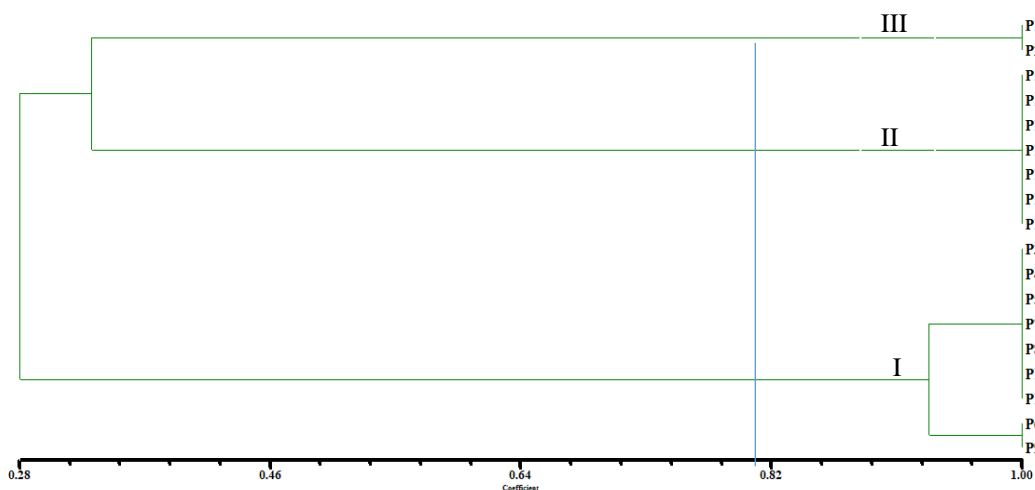
خوشه‌بندی ژنتیکی پایه‌ها

پس از محاسبه و تشکیل ماتریس ضرایب تشابه، خوشه‌بندی ۱۸ پایه منتخب ون با روش UPGMA انجام شد و نتایج آن در شکل ۳ آورده شده است.

Rows\Cols	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	
P1	1.0000000																		
P2	1.0000000	1.0000000																	
P3	0.2857143	0.2857143	1.0000000																
P4	0.2857143	0.2857143	1.0000000	1.0000000															
P5	0.2857143	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000														
P6	0.2448980	0.2448980	0.5333333	0.5333333	0.5333333	1.0000000													
P7	0.2857143	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.5333333	1.0000000												
P8	0.2857143	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.5333333	1.0000000	1.0000000											
P9	0.2448980	0.2448980	0.5333333	0.5333333	0.5333333	1.0000000	0.5333333	0.5333333	1.0000000										
P10	0.2857143	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.5333333	1.0000000	1.0000000	0.5333333	1.0000000									
P11	0.2857143	0.2857143	1.0000000	1.0000000	1.0000000	0.5333333	1.0000000	1.0000000	0.5333333	1.0000000	1.0000000								
P12	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000							
P13	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000	1.0000000						
P14	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000	1.0000000	1.0000000					
P15	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000				
P16	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000			
P17	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000		
P18	0.3333333	0.3333333	0.2807018	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	0.2509051	0.2807018	0.2807018	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000

شکل ۲- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بین پایه‌های منتخب ون

Figure 2. Jaccard's similarity coefficient matrix between chosen Ash trees



شکل ۳- خوشه‌بندی پایه‌های منتخب ون با روش UPGMA

Figure 3. UPGMA technique for clustering selected Ash trees

I، پایه‌های P11 و P10، P8، P7، P4، P5، P3، P6، P9 قرار گرفتند. همچنین در گروه II پایه‌های P12 الی P18

با در نظر گرفتن ضریب تشابه ۰/۸۰، ۳ گروه یا خوشه اصلی تشکیل شده است. به‌طوری که در گروه

قرار گرفتند و در نهایت در گروه III پایه‌های P1 و P2 قرار گرفتند. ۲ پایه مادری P1 و P2 از جنگل‌های طبیعی بوده و کاملاً در یک گروه مجزا قرار گرفتند.

بحث

بذر ثمره اصلی فرایندهای مهم تکاملی و لقاح بوده که بقای نسل بیشتر گیاهان مانند درختان و درختچه‌های جنگلی که با عمر طولانی شرایط متفاوتی از تغییرات محیطی و اقلیمی تجربه می‌کنند را تضمین می‌کند. بذر حامل اطلاعات مهم ژنتیکی است که اصلاح‌گران درختان و درختچه‌ها به شکل‌های مختلف از آن سود می‌برند. در صورتی که در جنگل‌کاری‌ها با هر هدفی، از بذر مناسب استفاده نشود بخش وسیعی از تلاش‌ها و هزینه‌های هنگفتی که در این راه صرف می‌شود بی‌ثمر خواهد ماند. از این‌رو تولید بذر مناسبی که بتواند نهال‌هایی با توانمندی ویژه مناطق مورد جنگل‌کاری تولید کند از ضرورت‌های اجتناب‌ناپذیر در جنگل‌کاری‌ها است. در این تحقیق تلاش شد تا قرابت ژنتیکی بین ۱۸ پایه منتخب ون با استفاده از نشانگرهای تکرارپذیر ریزماهوره بررسی شود تا بتوان از این اطلاعات برای تشکیل باغ بذر ون استفاده شود. در ابتدا مقدار تکثیر و ویژگی‌های آللی نشانگرهای مورد استفاده بررسی و گزارش شد. در پژوهش‌های دیگر نیز قابلیت نشانگرهای ریزماهوره تشریح شد. (Runğis et al. 2016) تحقیقی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ جمعیت ون جمع‌آوری‌شده از لتونی را با استفاده از ۶ نشانگر SSR کلروپلاستی و ۶ نشانگر SSR هسته‌ای انجام داده و به این نتیجه رسیدند که تعداد آلل از ۳۷-۱۰ متغیر بوده و همچنین تعداد آلل‌های مؤثر نیز از ۱/۹۶ تا ۲۰/۸۸ عدد بوده که نشان‌دهنده نسبت بالای آلل‌های فراوانی کم است. در این پژوهش نیز تعداد آلل‌ها از ۲-۱۰ متغیر بود که در مقایسه با نتایج دیگر محققین

کم است. علت این امر در ماهیت پایه‌های منتخب برای تشکیل باغ بذر است که از مناطق نزدیک به هم انتخاب شده‌اند. همچنین (Tereba et al. 2017) با استفاده از ۶ نشانگر ریزماهوره هسته‌ای و ۴ ریزماهوره کلروپلاستی، گزارش کردند که تعداد آلل‌ها از ۱۳ تا ۴۱ و همچنین تعداد آلل‌های مؤثر از ۲/۳۰ الی ۲۴/۴۷ در نوسان بود. در تحقیق (Semizer et al. 2017) نیز از ۱۳ نشانگر ریزماهوره برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶۸ پایه استفاده و تعداد آلل‌ها به‌طور میانگین از ۴/۶۹ تا ۹/۴۶ و همچنین تعداد آلل‌های مؤثر از ۲/۱۷ تا ۳/۵۷ عدد گزارش شد که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۹۹ پایه ون با استفاده از ۶ نشانگر ریزماهوره هسته‌ای و ۴ ریزماهوره کلروپلاستی، تعداد آلل‌ها از ۵۲-۱۸ و تعداد آلل‌های مؤثر نیز از ۵/۲۶ تا ۱۷/۳۷ عدد گزارش شده است (Tollefsrud et al., 2016). تمامی پژوهش‌ها نشان‌دهنده غنای آللی بالا برای نشانگرهای ریزماهوره در جمعیت‌های مختلف ون است. در این پژوهش نیز در مجموع برای ۱۰ نشانگر SSR، ۵۷ آلل چند شکل شناسایی شد، به‌طوری که نشانگر FE3 با ۱۰ آلل چند شکل، بیشترین و نشانگر FE5 با ۲ آلل چند شکل کمترین تعداد آلل چند شکل را به‌خود اختصاص دادند. به‌طور میانگین ۵/۷ آلل چند شکل برای هر نشانگر SSR شناسایی شد که با پژوهش‌های پیشین هم‌خوانی نسبی دارد. در نتیجه می‌توان اذعان کرد که نشانگرهای ریزماهوره توانایی بالایی برای تفکیک ژنتیکی پایه‌های مختلف ون را دارند. در بحث هتروزیگوتی مشاهده‌شده و هتروزیگوتی موردانتظار نیز پژوهش‌های مختلفی انجام شده است. به‌طوری که در گزارشات مختلف مقدار هتروزیگوتی مشاهده‌شده از ۰/۴۸ تا ۰/۷۳ در نوسان بوده و برای هتروزیگوتی موردانتظار نیز از ۰/۴۷ تا ۰/۸۷ متغیر بود (Runğis et al. 2016; Tollefsrud)

مادری P1 و P2 بقیه ۱۶ پایه مادری از دو جمعیت دهمیان و سنگده، جزو جنگل‌کاری‌های سنواتی هستند. تقریباً همه پایه‌های مادری سنگده در یک گروه و همه پایه‌های مادری دهمیان در یک گروه دیگر قرار گرفتند. می‌توان گفت ۷ پایه مادری جمعیت سنگده احتمالاً حاصل از بذر یک و یا چند پایه مادری خویشاوند نزدیک به هم از جنگل‌های سنگده بوده و ۹ پایه مادری دهمیان نیز از یک و یا چند پایه مادری خویشاوند در جنگل‌های دهمیان هستند. دو پایه مادری P1 و P2 از جنگل‌های طبیعی بوده و کاملاً در یک گروه مجزا قرار گرفتند. بر اساس نتایج به‌دست آمده و برای تشکیل باغ بذر که معمولاً در ایران با نهال‌های ۱۰ پایه مادری تشکیل می‌شود، می‌توان بر اساس میانگین ارتفاع نهال‌ها ۱۰ پایه مادری از ۱۸ پایه مادری را گزینش کرد. چرا که در پژوهش‌های مختلف اشاره شد که قطر یقه در مقایسه با ارتفاع نهال‌ها از وراثت‌پذیری کمتری برخوردار است و از این‌رو ارتفاع نهال‌ها به تنهایی برای انتخاب پایه‌های مادری کفایت می‌کند (Ladrach and Lambeth, 1991; Joyce et al., 2002). از آنجایی‌که نهال‌های دو پایه مادری پل سفید در یک گروه مجزا قرار گرفتند، برای افزایش تنوع ژنتیکی، نهال‌های این دو پایه مادری بدون توجه به میانگین ارتفاع، به باغ بذر وارد می‌شوند. در ادامه از جمعیت دهمیان ۵ پایه مادری با کدهای P3، P4، P8، P9 و P10 و از جمعیت سنگده ۳ پایه مادری با کدهای P15، P17 و P18 برای تشکیل باغ بذر گزینش می‌شوند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور برگرفته‌شده از طرح ۹۸۰۶۵۶-۹۵۵۳-۰۹۵۳-۱۲-۰۹-۰۹ انجام شد و نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

et al. 2016; Tereba et al. 2017; Semizer et al. 2017). در این تحقیق کمترین هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار در نشانگر FE5 و بیشترین هتروزیگوتی موردانتظار و مشاهده شده به‌ترتیب در FE3 و به‌صورت مشترک در FE2، FE9، FE13 و FE15 گزارش شد. هتروزیگوتی مشاهده‌شده در دامنه ۳۸۹-۰/۱ و هتروزیگوتی مورد انتظار نیز در دامنه ۴۹۸/۸۸۹-۰/۰ مشاهده شد که با پژوهش‌های بالا هم‌خوانی دارد. نتایج این پژوهش و پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی مناسبی در بین جمعیت‌های مختلف و پایه‌های مختلف ون وجود دارد. پژوهش‌های (Ferrazzini et al. 2007) با استفاده از ۶ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ جمعیت ون در ایتالیا نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده شد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. (Pliura and Baliuckas 2007) از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ۱۰ جمعیت ون لیتوانی و ۱۴ جمعیت ون اروپای غربی استفاده کردند و تنوع ژنتیکی را در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده کردند که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. در تحقیق حاضر نیز ۱۰ نشانگر ریزماهواره هسته‌ای قادر به تمایز ۱۸ پایه ون به ۳ گروه متمایز شدند.

نتیجه‌گیری کلی

همانطوری که نتایج این بررسی نشان داد، ۱۸ پایه مادری مورد بررسی در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند. به‌طوری‌که در گروه I، پایه‌های P3 الی P11 قرار گرفتند که همه از جمعیت دهمیان هستند. همچنین در گروه II پایه‌های P12 الی P18 قرار گرفتند که همگی از جمعیت سنگده هستند و در نهایت در گروه III پایه‌های P1 و P2 قرار گرفتند که این دو پایه از توده‌های طبیعی نزدیک شهر پل سفید سوادکوه هستند. به‌جز پایه‌های

References

- Dobrowolska, D.; Hein, S.; Oosterbaan, A.; Wagner, S.; Clark, J.; Skovsgaard, J. P., A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. *Forestry* **2011**, *84* (2), 133-148.
- Espahbodi, K.; Mehrabi, A.A.; Ghamarizareh, A., Policy for the development of seed orchards of forest tree and shrub species in Iran. *Journal of Iran Nature* **2021**, *6* (5), 7-17. (In Persian).
- Ferrazzini, D.; Monteleone, I.; Belletti, P., Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Annals of Forest Science* **2007**, *64* (2), 159-168.
- Gao, Y.; Lu, Y.; Li, X.; Li, N.; Zhang, X.; Su, X.; Feng, D.; Liu, M.; Xuan, S.; Gu, A., Development and application of SSR markers related to genes involved in leaf adaxial-abaxial polarity establishment in chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Frontiers in Genetics* **2020**, *11*, 773.
- Hamidoost, L.; Torkman, J.; Rostami Shahrabi, T.; Amanzadeh, B.A., The effect of Altitude (above sea level) on stomata and Secretory duct Characteristics in leave of (*Fraxinus excelsior* L.). *Iran Journal of Forest Research and Development* **2019**, *5* (1), 113-124. (In Persian)
- Joyce, D.; Lu, P.; Sinclair, R., Genetic variation in height growth among populations of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) in Ontario. *Silvae genetica* **2002**, *51* (4), 136-142.
- Kerr, G.; Cahalan, C., A review of site factors affecting the early growth of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Forest Ecology and Management* **2004**, *188* (1-3), 225-234.
- Ladrach, W.; Lambeth, C., Growth and heritability estimates for a seven-year-old open-pollinated *Pinus patula* progeny test in Colombia. *Silvae Genetica* **1991**, *40* (2), 169-173.
- Lefort, F.; Brachet, S.; Frascaria-Lacoste, N.; Edwards, K.; Douglas, G., Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (Oleaceae). *Molecular Ecology* **1999**, *8* (6), 1088-1089.
- Mohammadi, Y.; Gheytranpour-Sehrigh, Sh., Identification of white oak (*Quercus petraea*) seed production areas in Arsbaran. *Journal of Protection and exploitation of Hyrcanian forests* **2021**, *3* (2), 21-26. (In Persian)
- Mohammadi, Y.; Gheytranpour-Sehrigh, Sh., Principles of identification and introduction of seed production areas of Arasbaran Juniper (*Juniperus foetidissima*). *Journal of Iran Nature* **2022**, *7* (1), 59-64. (In Persian)
- Pliura, A.; Baliuckas, V., Genetic variation in adaptive traits of progenies of Lithuanian and western European populations of *Fraxinus excelsior* L. *Baltic Forestry* **2007**, *13* (1), 28-38.
- Rungis, D.; Korica, A.; Gailite, A.; Pušpure, I.; Veinberga, I. In *Analysis of the Genetic Diversity and Population Structure of Latvian Ash (L.) Stands using Nuclear and Chloroplast SSR Markers*, Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences., 2016; pp 101-108.
- Saghai-Marooif, M. A.; Soliman, K. M.; Jorgensen, R. A.; Allard, R., Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81* (24), 8014-8018.
- Semizer-Cuming, D.; Kjær, E. D.; Finkeldey, R., Gene flow of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in a fragmented landscape. *PLoS One* **2017**, *12* (10), e0186757.
- Taheri, A.; Seyedi, N.; Abdollahi Mandoulakani, B.; Mirzaghaderi, Gh; Najafi, S; Vahdati, k., Genetic diversity in Persian walnut (*Juglans regia* L.) seedlings using SSR markers. *Iran Journal of Forest Research and Development* **2022**, *8* (1), 13-26. (In Persian)
- Tereba, A.; Woodward, S.; Konecka, A.; Borys, M.; Nowakowska, J. A., Analysis of DNA profiles of ash (*Fraxinus excelsior* L.) to provide evidence of illegal logging. *Wood science and technology* **2017**, *51*, 1377-1387.
- Tollefsrud, M. M.; Myking, T.; Sønstebo, J. H.; Lygis, V.; Hietala, A. M.; Heuertz, M., Genetic structure in the northern range margins of common ash, *Fraxinus excelsior* L. *PLoS One* **2016**, *11* (12), e0167104.

Evaluation of genetic relationships of selected Ash trees for seed orchard formation at Chamestan research station

Y. mohammadi*¹, F. Banaei-Asl² and K. Espahbodi³

1- Assistant Professor, Plant breeding, Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I. R. Iran. (y.mohamadi@rifr-ac.ir)

2- Assistant Professor, Plant breeding, Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I. R. Iran. (f.banaei@rifr-ac.ir)

3- Associate Professor, Natural resources Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, I. R. Iran. (espahbodi.k@gmail.com)

Received: 21.08.2022 Accepted: 06.11.2022

Abstract

The absence or lack of improved seeds with high genetic variety has long been one of the most major obstacles to forest regeneration and growth. In addition to supplying replicable seeds and excellent seedlings, seed orchard creation is critical in providing enough genetic variety for future research. In a forest covering around 100,000 hectares, 18 maternal trees were discovered in three groups. The DNA was extracted using a modified CTAB technique, and the polymerase chain reaction was carried out with SSR markers. The allelic features of amplified markers, as well as genetic indices, were determined using GenALEX software, and the similarity matrix of Jaccard coefficients, as well as the clustering of 18 chosen trees, were performed using the UPGMA technique and NTSYS software. Fragment amplification was done in 10 SSR markers based on the findings of vertical electrophoresis of PCR products from 15 pairs of SSR markers. In all, 57 polymorphism alleles were discovered in 18 chosen ash for 10 SSR markers, with the FE3 marker having the most (ten polymorphic alleles) and the FE5 marker having the fewest (two polymorphic alleles). Each SSR marker had an average of 5.7 polymorphic alleles. The clustering of 18 distinct trees using the UPGMA algorithm revealed that the chosen trees were divided into three major clades. The P1, P2, P3, P4, P8, P9, P10, P15, P17, and ultimately P18 plants can be utilized to build a seed orchard based on the results.

Keywords: Ash, Clustering, Genetic diversity, SSR markers.

* Corresponding author

Tel: +989143089871