مطالعه تمایز ژنتیکی در بین نسلهای جمعیتهای راش (*Fagus orientalis* lipsky) جنگلهای خزری

پروین صالحی شانجانی*[۱] و جوزپه جوانی و ندرامین[۲]

[۱] تهران ، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

[۲] ایتالیا، فلورنس، موسسه ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت:۸٤/۹/۲۲ تاریخ پذیرش:۸۵/٤/٤

چکیده

نسلها در توده های طبیعی معمولاً در حالت تعادل panmictic قرار ندارند بطوریکه ترکیب ژنتیکی توده های طبیعی با نتاج آنها متفاوت است. از آنجایی که برنامه های حفاظت ژن راش ترجیحاً بر استفاده از بذر برای زادآوری استوار است، بنابراین شناخت فرآیندهای موثر بر ساختار و میزان گوناگونی ژنتیکی در طی تولید مثل توده بسیار مهم است. در این پژوهش، ترکیب ژنتیکی درختان مادری (حداقل ٤۰ درخت در هر توده) و نتاج شان (بذر ۱۰ درخت، هر درخت ۷ بذر) بصورت تصادفی در ۱۰ توده از جنگلهای خزری بوسیله مارکرهای میکروساتلایتی تعیین شد. ساختار آللی درختان مادری و بذرهای آنها نشان داد که تمام لوکوسها پلی مورفیسم بالایی در همه جمعیتها داشتند. تکثر آللی در نسل نتاج بعلت وجود جریان مؤثر ژن از توده های مجاور عموماً بیشتر از درختان مادری است. تفاوت تعداد آللهای فراوان (با فراوانی بیش از ۵ درصد) دو نسل در میان جمعیتهای مورد مطالعه چندان اهمیتی ندارد، ولی تعداد آللهای محلی عمومی (با فراوانی کمتر یا مساوی ۲۵ درصد) نتاج بطور قابل ملاحظه ای بیش از درختان مادری است که نشان دهنده نقش انتخاب طبیعی در افزایش فراوانی برخی آللها می باشد. اما آنچه مهم است هیچگونه انحراف مهمی از تعادل هاردی–وینبرگ مشاهده نمی شود. کاهش جزئی تنوع ژنتیکی نتاج در مقایسه با درختان مادری احتمالاً بدلیل جمع آوری بذر از تعداد محدودی درخت است. این اطلاعات نشان می دهد که با جمع آوری بذر از تعداد بیشتری درخت می توان حفاظت از تنوع ژنتیکی راش را تضمین نمود.

کلمات کلیدی: *Fagus orienalis* ، جنگلهای خزری، تمایز ژنتیکی، میکروساتلایت، بذر راش

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: **٤٤۱۹۵۹۰۱**، پست الکترونیکی: Psalehi@rifr-ac.ir

مقدمه

جنگلها مهمترین ذخایر تنوع زیستی روی زمین بوده و حفاظت از تنوع زیستی جنگل برای پایداری ارزش تولیدی جنگلها، حفظ سلامت و حیات اکوسیستمهای جنگلی و بنابراین برای حفظ نقشهای حمایتی، زیست محیطی و فرهنگی ضروری است (۲۲). اولین گام در ارائه یک برنامه حفاظتی، تعیین سطح مورد نظر برای نمونه برداری از تنوع ژنتیکی است. نمونه برداری از بیشترین گوناگونی موجود، ایده آل ترین حالت حفاظت تنوع ژنتیکی است. ولی محدودیتهای فیزیکی و مالی در بیشتر روشهای *ex situ* و *in situ* مهمترین عوامل تعیین کننده نوع و میزان گوناگونی ژنتیکی نمونه هائی هستند که می بایست نمونه برداری و نهایتاً حفاظت شوند (۱). مطالعات بسیاری بر روی راش ثابت کرده است که ترکیب ژنتیکی توده های طبیعی با نتاج آنها متفاوت است. از آنجایی که برنامه های حفاظت ژن در راش ترجیحاً بر استفاده از بذر برای زادآوری استوار است، بنابراین شناخت فرآیندهایی ایجاد

Archive of SID

www.SID.ir

کننده تغییر ساختار و مقدار گوناگونی ژنتیکی در طی تولید مثل توده بسیار مهم است. نمونه برداری نامناسب هنگام جمع آوری بذر برای حفاظت *ex situ* ممکن است موجب از دست رفتن پتانسیل سازگاری ژنتیکی جمعیتهای آینده شود. کمترین اندازه یک منبع ژنی برای حفاظت *ex situ* می بایست دقیق تعیین گردد. زیرا در حفاظت *in situ* معمولاً کل توده زادآوری می نماید بنابراین نیازی نیست روی اندازه مناسب نمونه، اندازه مؤثر جمعیت و عواملی که آنها را تحت تأثیر قرار می دهد بحث شود (٤). در حالی که در حفاظت *ex situ* مقداری از بذر می تواند نماینده منبع مورد نظر باشد که حداقل یک نسخه از هر آلل با فراوانی معین در جمعیت وجود داشته باشد. میزان فراوانی مورد نظر با هدف حفاظت مرتبط می باشد، بطوریکه حفاظت وسیع منابع ژنتیکی بوسیله آللهای نادر با پراکندگی وسیع (نشان دهنده پتانسیل سازگاری جمعیتها) امکان پذیر است. برای مثال با جمع آوری بذر از ۲۰۰ درخت می توان تمام آللهای با فراوانی نسبی ۲ درصد و بیشتر را (با احتمال ۹۹ درصد) لحاظ نمود. در مواردی که انحرافهای مهمی از ساختارهای هاردی–وینبرگ در جمعیت مشاهده می شود، اندازه نمونه برداری می بایست افزایش یابد. حفاظت از آللهای عمومی با پراکندگی وسیع در جمعیتهای راش با میزان نمونه کمتری نیز تأمین می گردد ولی در این حالت ضمانتی برای حفاظت از پتانسیل سازگاری جمعیت وجود ندارد (۲۳).

شناسایی پراکنش جغرافیایی جمعیتهای درختی یا پرووننانسهای درختی نیز از عوامل مهمی است که در طراحی روشهای نمونه برداری برای حفاظت *ex situ* و *in situ* می بایست مد نظر قرار داد. بعبارت دیگر برای احیاء جمعیتهای محلی تخریب یافته درختان جنگلی، می بایست در صورت امکان از پرووننانسهای محلی استفاده نمود. از عوامل بسیار مهم برای حفاظت از بیشترین تنوع میان و درون جمعیتی یک گونه تعیین تعداد درخت در هر جمعیت، تعداد جمعیتهایی از یک گونه، و نیز محل جمعیتهای مورد استفاده برای نمونه برداری، می باشد. نحوه انتخاب و تعیین اولویت نمونه برداری از درختان و توده ها بستگی به اطلاعات ما در مورد تمایزهای ژنتیکی یا ارزشهای بالقوه آنها (برای مثال جمعیتهای دور افتاده یا جمعیتهایی با ویژگیهای منحصر به فرد)، سطح مخاطرات تهدید کننده جمعیتها، و نیز امکانات جمع آوری و ذخیره ژرم پلاسم، دارد (۱). با این وجود هنوز بدرستی مشخص نیست که چه مقدار از گوناگونی ژنتیکی جمعیتهای طبیعی می بایست در یک توده مصنوعی لحاظ گردد تا حداقل تنوع ژنتیکی برای نسلهای آینده تأمین گردد. از این نقطه نظر اطلاعات کمی در منابع موجود است.

در این پژوهش راش شرقی بعلت نقش مهمی که در ترکیب و ساختار اکوسیستمهای جنگلهای خزری بازی می کند، و بلحاظ افزایش توجه به احیاء جنگلها با گونه های بومی بعنوان یک گونه مدل انتخاب و بررسی گردید. بنابراین در پژوهش حاضر شباهت ژنتیکی درختان مادری و نتاج جمعیتهای مختلف مطالعه شد تا نحوه جریان ژن بین دو نسل مورد مطالعه، مقایسه و انحراف آنها از تعادل هاردی–وینبرگ بررسی، و سپس مناسبترین استراتژی نمونه برداری برای برنامه های حفاظت ژنتیکی منابع درختی بحث شود.

مواد و روشها

نمونه های گیاهی بوسیله نمونه‌برداری از ۱۰ توده طبیعی راش صورت گرفت که بخش وسیعی از گسترهٔ پراکنش راش (*Fagus orientalis* Lipsky) را در شمال ایران زیر پوشش قرار می دهد. جنگلهای راش ایران روی شیب شمالی رشته کوه البرز در محدوده ارتفاعی ۵۰۰–۲۱۰۰ متر از سطح دریا واقع است که نوار جنگلی به طول ۷۰۰ کیلومتر را در سه استان گیلان، مازندران و گلستان تشکیل می‌دهد. باین منظور پنج نقطه در طول گسترشگاه راش از غرب به شرق جنگلهای خزری (اسالم در استان گیلان، خیرود، سنگده و نکا در استان مازندران و گرگان در استان

Archive of SID

www.SID.ir

گلستان) انتخاب و در هر نقطه دو پایگاه (پایین بند و میان بند) مستقر شد (شکل ۱ و جدول ۱). در تمام جمعیتها ٤٠ درخت (غیر مجاور بعنوان درختان مادری) بصورت تصادفی انتخاب گردیده و ژنوتیپ آنها توسط ٤ میکروساتلایت هسته ای (١٤) تعیین گردید. در هر جمعیت، بذور ١٠ درخت مادری (هر درخت ٧ بذر) بعنوان نسل نتاج جمع آوری و ژنوتیپ کلیه بذرها با استفاده از همان ٤ میکروساتلایت هسته ای تعیین شد. این نوع روش جمع آوری بذر با توجه به نتایج حاصل از مطالعه Turok و Hattemer (23) انتخاب گردید. بطوریکه در پژوهش مذکور ٢ نوع روش جمع آوری بذر اعمال شده بود: ١) جمع آوری بذر بصورت توده ای ٢) جمع آوری تعداد معینی بذر از تعداد معینی درخت. مطالعه تمایز ژنتیکی درختان مادری و بذرها با دو روش فوق نشان داد: در روش اول که بصورت معمول بوسیله سرویسهای جمع آوری بذر انجام می شود فراوانی ژنوتیپ آن دسته از درختانی که بذر بیشتری از آنها جمع آوری می شود، در جمعیت آینده بیشتر تظاهر خواهد کرد و احتمالاً تعداد درختانی که از طریق گرده در ترکیب ژنتیکی بذر دخالت می کنند بیشتر از تعداد درختانی است که از طریق تخمک ژنهای خود را بروز می دهند. بنابراین روش دوم می تواند امکان کاهش گوناگونی ژنتیکی مادری را جبران نماید. لذا در این پژوهش از روش دوم برای جمع آوری بذر استفاده شد.

شکل ١- توزیع مناطق مورد بررسی در ایران

جدول ١- ویژگیهای مکانی جمعیتهای راش مورد مطالعه

منطقه	ارتفاع از سطح دریا (m)	نام اختصاری	عرض جغرافیایی (N)	طول جغرافیایی (E)	تعداد نمونه	تاج پوشش (٪)	سطح دخالت
گرگان	١٤٠٠	گ- ١٤٠٠	°36٤١´	°54٠٥´	56	٩٠	مدیریت شده *
گرگان	٦٠٠	گ- ٦٠٠	°36٤٢´	°54٠٦´	40	٩٠	مدیریت شده *
نکا	١٤٠٠	ن- ١٤٠٠	°36٢٢´	°53٣٣´	40	٨٠	مدیریت نشده
نکا	٩٠٠	ن- ٩٠٠	°36٢٩´	°53٢٧´	39	٩٠	مدیریت شده *
سنگده	١٤٠٠	س- ١٤٠٠	°36٠٣´	°53١٤´	34	٧٠	مدیریت شده *
سنگده	٩٠٠	س- ٩٠٠	°36٠٦´	°53 ١٦´	43	٩٥	مدیریت شده *
خیرود	١٢٠٠	خ- ١٢٠٠	°36٣٢´	°51٣٩´	40	٩٠	مدیریت شده **
خیرود	٦٠٠	خ- ٦٠٠	°36٣٥´	°51٣٣´	31	٩٠	مدیریت شده **
اسالم	١٢٠٠	الف- ١٢٠٠	°37٣٨´	°48٤٨´	40	٩٠	مدیریت شده *
اسالم	٦٠٠	الف- ٦٠٠	°37٤١´	°48٤٨´	32	٧٠	مدیریت شده *

*، مدیریت تحت شیوه پناهی، **، مدیریت تحت برشهای آزادسازی

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایش میکروساتلایتی: کل DNA ژنومی از جوانه‌های خواب درختان مادری و رویانهای بذور (۱۰۰ میلی‌گرم بعنوان ماده اولیه) با استفاده از کیت (Germany, Macherey Negel Nucleospin plant) استخراج گردید. ٤ میکروساتلایت با استفاده از پرایمرهای جدول شماره ۲ از طریق واکنش زنجیری پلی مراز (PCR) تکثیر شد. محیط فرایند PCR با حجم نهایی 20 µl شامل ۱۰ نانوگرم DNA الگو، 2 µlاز بافر واکنش (Tris-HCl 100mM) با pH = 9، ۵۰ میلی مولار KCL، ۱۵ میلی مولار $MgCl_2$ با مقادیر درج شده در جدول ۲، ۰/۲ میلی مولار از هر داکسی نوکلئوزید تری فسفات ((dNTP، 4/0 µM از هر پرایمر و ۱ واحد Taq DNA polymeras می باشد که پس از نگهداری محلول واکنش بمدت ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی گراد، محلول واکنش با ۳۰ چرخه دمایی (یک دقیقه در دمای واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی گراد، یک دقیقه در دمای اتصال طبق جدول ۲ و یک دقیقه در دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی گراد) تکثیر شد. سپس فرآورده‌های تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۸ دقیقه نگهداری شدند. دستگاه PCR مورد استفاده ساخت شرکت Perkin Elmer 9700 می باشد. طول قطعات تکثیر شده با توالی یاب اتوماتیک Alf Express, Pharmacia اندازه گیری و نتیجه توسط برنامه نرم افزاری (Fragment Manager 1.2 Pharmacia) بررسی شد.

جدول ۲- ویژگیهای ٤ مارکر میکروساتلایتی پلی مورفیک مورد استفاده در بررسیهای تنوع ژنتیکی

لوکوس میکروساتلایت	توالی پرایمر	دمای اتصال	غلظت $MgCl_2$	تکرار توالی	اندازه آللهای مشاهده شده در *Fagus orientalis* از اروپا	تعداد آللهای مشاهده شده در *Fagus orientalis* از اروپا	شماره دسترسی بانک ژن
FS1-15	TCAAACCCAGTAAATTTCTCA GCCTCAATGAACTCAAAAAC	٦۰	۲/۵	$(GA)_{26}$	۱۳۳-۸۳	۱۲	AF528095
FS1-03	CACAGCTTGACACATTCCAAC TGGTAAAGCACTTTTTCCCACT	٦۰	۱/۵	$(GA)_{18}$	۱۱۲-۸٦	۱۲	AF528090
FS1-11	TGAATTCAATCATTTGACCATTC GGAAGGGTGCTTCAATTTGG	٦۳	۲/۵	$(GA)_{15}$	۱۲۰ -۹۸	۹	AF528091
FS3-04	AGATGCACCACTTCAAATTC TCTCCTCAGCAACATACCTC	٦۰	۱/۵	$(GCT)_5(GTT)_3(GCT)_6$	۲۰٤-۱۹۲	٤	AF528092

روشهای آماری: مطالعه گوناگونی ژنتیکی درون جمعیتی توسط نرم افزار (GENALEX 15) با معیارهای زیر انجام گرفت: میانگین تعداد آلل بر لوکوس یا تکثر ژنتیکی Na (multiplicity)، تعداد آللهای مختص به محل، تعداد آللهای محلی عمومی (locally common)، تعداد موثر آللها Ne، هتروزیگوزیتی مشاهده شده Ho، هتروزیگوزیتی مورد انتظار از معادله هاردی-وینبرگ He، ضریب لقاح درون گروهی یا اندیکس ثبوت (Fixation Index Fis). انحراف فراوانیهای ژنوتیپی از نسبتهای هاردی-وینبرگ با برنامه نرم افزاری GENEPOP (نسخه ۱٦۳.٤ ;D) بدست آمد.

فاصله ژنتیکی میان جمعیتها بر اساس معادله Nei 1978، (13) برآورد شد. از آزمون خوشه بندی با استفاده از روش

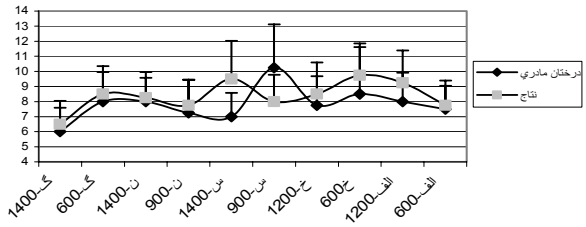
Archive of SID
www.SID.ir

UPGMA برای تفسیر ماتریکس فاصله ژنتیکی استفاده گردید. ساختار ژنتیکی جمعیتی کل نمونه ها با فرمول آماری F توسط نرم افزار ARLEQUIN (۱۹و ۲۰) محاسبه شد. ضریب لقاح درون گروهی کلی (Fit)، و نسبت واریانس ژنتیکی از طریق اجزاء زیر محاسبه گردید: گوناگونی در میان کل جمعیتها (Fst)، گوناگونی در میان جمعیتهای هر منطقه و گوناگونی میان مناطق. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان جمعیتی و منطقه ای توسط آزمون واریانس ملکولی (AMOVA؛ ۳) و برنامه نرم افزاری (ARLEQUIN 1.1؛ ۲۰) تعیین شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون 3) permutation) مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

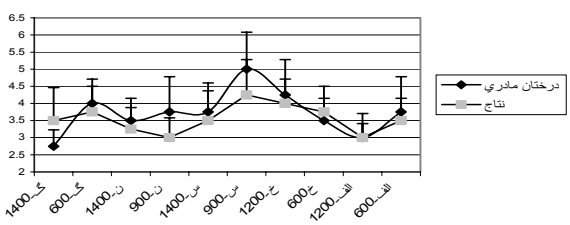
نتایج تکثر (multiplicity) آللی نشان دهنده گوناگونی قابل ملاحظه ای در جمعیتهای راش ایران است. در کل ٦١ آلل در ٤ لوکوس ژنی در نمونه های درختان مادری مشاهده شد که از ٢٤ آلل در جمعیت گرگان-١٤٠٠ تا ٤١ آلل در جمعیت سنگده-٩٠٠ متغیر بود. کوچکترین و بزرگترین اندازه آللها در ٣ لوکوس ژنی (FS1-03، FS1-11 و FS1-15) مشاهده شده در نمونه های درختان مادری، در نمونه های نتاج ثبت نشد. در تمام جمعیتها باستثنای سنگده-٩٠٠ تعداد آلل مشاهده شده در نسل نتاج بیشتر از نمونه های درختان مادری بود. این آللهای جدید در نمونه های نتاج می بایست از توده های راش مجاور توسط جریان ژن آمده باشند، ولی برای کمتر بودن تعداد آلل در نمونه های نتاج جمعیت سنگده-٩٠٠ توضیح مناسبی وجود ندارد (شکل ٢).

ساختار آللی نمونه های درختان مادری و نتاج ١٠ جمعیت مطالعه شده نشان داد که تمام لوکوسها، پلی مورفیسم بالایی در همه جمعیتها دارند. در هر منطقه گوناگونی آللی بین ارتفاعهای مختلف متفاوت است ولی این اختلاف از نظر آماری مهم نمی باشد.



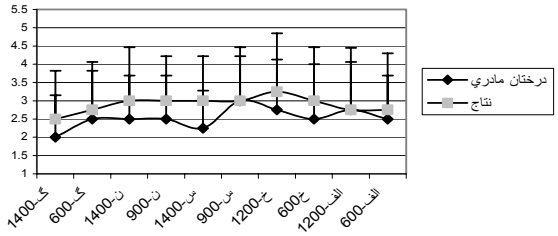
شکل ٢- تعداد آلل مشاهده شده در لوکوس توده های مورد مطالعه درختان مادری و نتاج

در حالی که ناهمگونی فراوانی آللی بین نمونه های درختان مادری و نتاج در تمام لوکوسهای مورد بررسی از نظر آماری معنی دار است. اگرچه تفاوت تعداد آللهای فراوان (با فراوانی بیش از ٥ درصد) دو نسل در میان جمعیتهای مورد مطالعه چندان مهم نیست ولی تعداد آنها در درختان مادری اندکی بیشتر از نتاج می باشد (شکل ٣). در مورد آللهای محلی عمومی (locally common) با فراوانی کمتر یا مساوی ٢٥ درصد و ٥٠ درصد (شکلهای ٤ و ٥) می بایست اظهار داشت که در هر دو مورد تعداد آللهای محلی عمومی نتاج بیش از درختان مادری است ولی این تفاوت در آللهای محلی عمومی با فراوانی کمتر یا مساوی ٢٥ درصد بسیار قابل ملاحظه است. مطالعه تعداد آللهای مختص به محل در هر دو درختان مادری و نتاج نشان داد که از ١٠ توده مطالعه شده فقط در دو توده تفاوت قابل ملاحظه ای مشاهده می شود. بطوریکه در توده سنگده-١٤٠٠ تعداد آللهای مختص به محل نتاج بسیار بیشتر از درختان مادری است در حالی که در خیرود-٦٠٠ آللهای فوق در درختان مادری بیشتر مشاهده می شوند (شکل ٦).

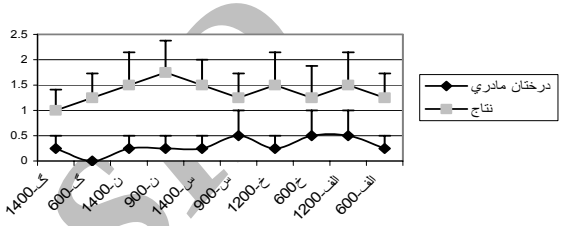


شکل ٣- تعداد آللهای فراوان در لوکوس (با فراوانی مساوی یا بیشتر از ٥ درصد) توده های مورد مطالعه درختان مادری و نتاج

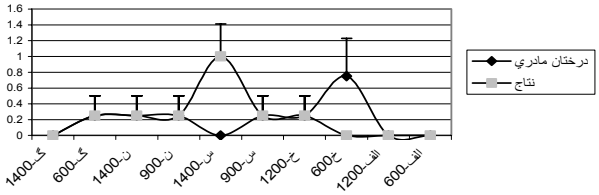
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٤- تعداد آللهای عمومی محلی در لوکوس با فراوانی مساوی یا کمتر از ۵۰ درصد ، درختان مادری و نتاج، توده های مورد مطالعه

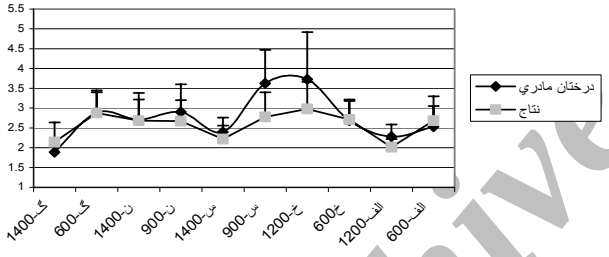


شکل ۵- تعداد آللهای عمومی محلی در لوکوس با فراوانی مساوی یا کمتر از ۲۵ درصد ، لوکوس درختان مادری و نتاج، توده های مورد مطالعه

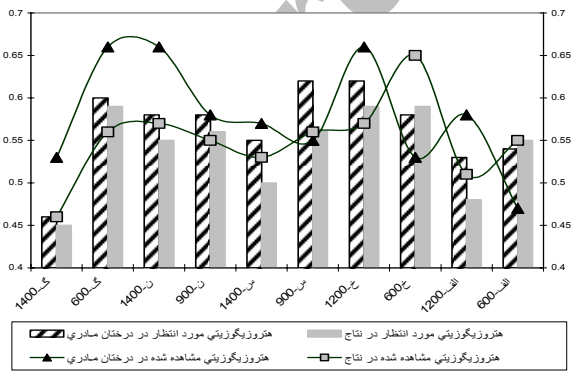


شکل ٦- تعداد آللهای مختص به محل درختان مادری و نتاج در توده های مورد مطالعه

تعداد مؤثر آللها که مقیاسی برای محاسبه تنوع ژنتیکی است در میان جمعیتها از ۱/۸۹ تا ۳/۷۲ در درختان مادری و از ۲/۰۱ تا ۲/۹۸ در نمونه های نتاج متغیر است (شکل ۷). هتروزیگوزیتی مشاهده شده (۰/٤۷ تا ۰/٦٦ در درختان مادری و ۰/٤٦ تا ۰/۵۸ در نتاج) و هتروزیگوزیتی مورد انتظار (۰/٤٦ تا ۰/٦۲ در درختان مادری و ۰/٤٦ تا ۰/۵۹ در نتاج) نیز نشان داد که عموماً میزان هر دو هتروزیگوزیتی در نمونه های درختان مادری بیشتر از نتاج است (شکل ۸). بعلاوه در بیشتر جمعیتهای مورد مطالعه میزان هتروزیگوزیتی مشاهده شده درختان مادری بیش از هتروزیگوزیتی مورد انتظار است که این موضوع نشان دهنده وجود کمبود هموزیگوتها در توده ها است. این ویژگی را اگر در نتاج بررسی نماییم متوجه تغییر این وضعیت در نتاج می شویم بطوریکه در بسیاری از جمعیتها تعداد هموزیگوتها افزایش یافته است. اندیکس ثبوت (Fis) انحراف از توزیع تصادفی ژنوتیپی را اندازه گیری می کند و ارتباط بین آللهای مشابه را درون افراد و جمعیتها نشان می دهد. بعبارت دیگر مقیاسی برای مطالعه میزان لقاح درون گروهی (inbreeding) است. مقادیر اندیکس ثبوت در ٤ لوکوس در سطح جمعیتها نشان داد که از ۱۰ جمعیت مورد مطالعه، میانگین Fis درختان مادری هفت جمعیت منفی می باشد که نشان دهنده کمبود هموزیگوتها در جمعیتهای فوق است (شکل ۹).

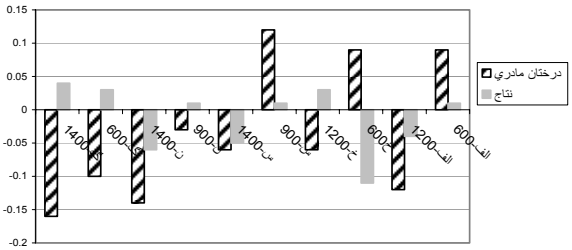


شکل ۷- تعداد موثر آلل در لوکوس، درختان مادری و نتاج، توده های مورد مطالعه



شکل ۸- هتروزیگوزیتی مورد انتظار و مشاهده شده ، درختان مادری و نتاج ، توده های مورد مطالعه

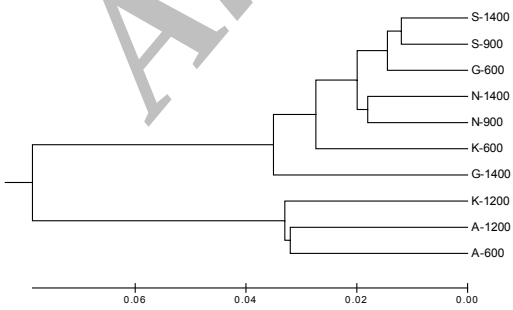
www.SID.ir

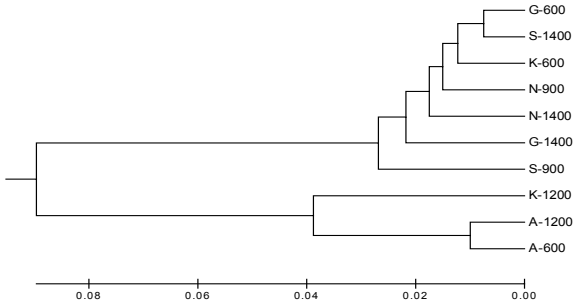


شکل ۹- میزان اندیکس ثبوت ، درختان مادری و نتاج ، توده های مورد مطالعه

فرمول آماری F اغلب برای مطالعه پلی مورفیسم ژنی در جمعیتها مورد استفاده قرار می گیرد که با برآورد آنها مقیاس مناسب برای شناخت اثرات انتخاب و سیستم تولید مثلی حاصل می شود. جدول شماره ۳ مقادیر فرمول آماری F را در ٤ لوکوس نمونه های درختان مادری و نتاج مقایسه می نماید. همانگونه که مشاهده می شود هیچ برآوردی صفر نمی شود. Fst نشان می دهد که چطور تک تک لوکوسها در تمایز ژنتیکی دخالت می کنند. FS3-03 که کمترین میزان Fst را دارد لوکوسی با کمترین درجه پلی مورفیسم است. برآورد Fst بعنوان مقیاس تمایز ژنتیکی در بیشتر لوکوسهای مورد مطالعه نشان داد که نمونه های نتاج تمایز ژنتیکی بیشتری نسبت به درختان مادری دارند.

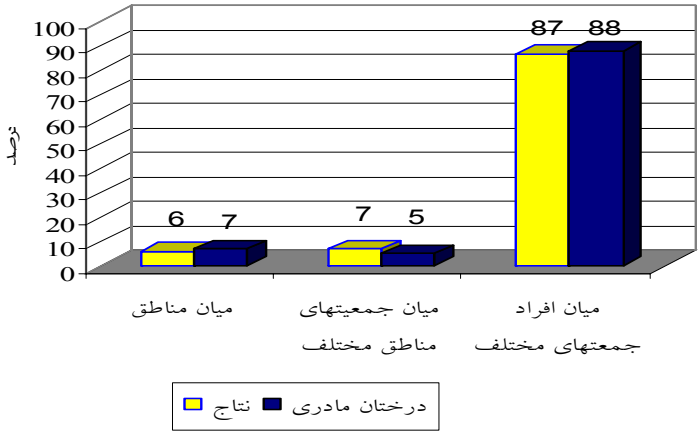
برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی بین جمعیتها بر اساس برآورد unbiased فاصله ژنتیکی (Nei) در نمونه های درختان مادری و نتاج مطالعه شد. میانگین فاصله ژنتیکی کل (محاسبه شده از فاصله ژنتیکی در ٤ لوکوس) در هر دو نمونه های درختان مادری (۰/۱۱) و نتاج (۰/۱۰) بسیار پایین است. از فاصله ژنتیکی بین جمعیتها برای آنالیز خوشه بندی UPGMA استفاده شد. دندروگرامهای تشکیل شده نشان دهنده انطباق بالای تمایز ژنتیکی با فاصله جغرافیایی بود که نشان دهنده وجود اطلاعات جغرافیایی مهمی در داده های ژنتیکی ما است (شکل ۱۰). مقایسه دو دندروگرام درختان مادری (شکل بالا) و نتاج (شکل پایین) نشان می دهد که در هر دو مورد دو خوشه اصلی وجود دارد. در خوشه اول هر دو درختان مادری و نتاج، توده های اسالم دریک خوشه کوچکتر قرار گرفته و خوشه اسالم با خیرود-۱۲۰۰ یک خوشه را ایجاد می کنند. ۷ توده دیگر خوشه دوم را تشکیل می دهند که در نتاج، توده ها تمایز بیشتر نسبت به درختان مادری نشان می دهند. این نحوه خوشه بندی با نتایج مطالعه تمایز ژنتیکی، نشان دهنده تمایز بیشتر نتاج نسبت به درختان مادری، نیز انطباق دارد. تجزیه واریانس ملکولی (جدول شماره ۱۱) سطح نسبتاً بالایی از تمایز ژنتیکی را در میان جمعیتها (حدود ۱۲ درصد) میان مناطق مختلف (٦ – ۷ درصد) در هر دو درختان مادری و نتاج نشان می دهد.





شکل ۱۰- دندروگرام فاصله ژنتیکی میان ۱۰ توده مورد مطالعه در درختان مادری (شکل بالا) و نتاج (شکل پایین)بدست آمده ز روش UPGMA

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱۱– آزمون واریانس ملکولی (AMOVA) در درختان مادری و نتاج

جدول ۳- مقایسه تمایز ژنتیکی بین درختان مادری و نتاج در ٤ لوکوس میکروساتلایتی مورد مطالعه

لوکوس میکروساتلایتی	Fst	
	درختان مادری	نتاج
FS1-03	۰/۱٤۷	۰/۱۲۱
FS1-03	۰/۰۳۷	۰/۰٥٤
FS1-11	۰/۰۲۱	۰/۰۳۹
FS3-04	۰/۰۱٥	۰/۰۱۷
میانگین	۰/۰۳ ± ۰/۰٥٥	۰/۰۲ ± ۰/۰٥۸

بحث

تعداد مؤثر آلل (Ne)، هتروزیگوزیتی مشاهده شده ((Ho، هتروزیگوزیتی مورد انتظار از معادله هاردی–وینبرگ (He) و تمایز ژنتیکی (Fst) در درختان مادری به ترتیب ۲/۸، ۵۸، ۵۷ و ۵/۵ درصد و در نتاج ۲/٦، ۵۵، ٥٤ و ۵/۸ درصد بود. تکثر آللی (Na) به استثناء توده سنگده–۹۰۰ در نتاج بیشتر از درختان مادری است. مقادیر فوق نشان می دهد که جریان ژن از توده های مجاور موثر است. Muller-Stark، (12) ، نیز وجود گرده خارجی را در یک توده راش ایزوله گزارش می نماید. بعلاوه مقادیر تمایز ژنتیکی (Fit و Fst) به میزان جزئی (اگرچه از نظر آماری مهم نیست) در نسل نتاج بیش از درختان مادری است. اگرچه تنوع ژنتیکی (Ne و He) در درختان مادری بیشتر است ولی تفاوت مشاهده شده تعداد مؤثر آلل در این دو نسل بارزتر از میزان هتروزیگوزیتی مورد انتظار است. از آنجایی که هر دو بمقدار کمتری، مستقیماً تحت تأثیر تغییرات دموگرافی قرار می گیرند، بنابراین تعداد موثر آلل نسبت به کاهش اندازه جمعیت حساستر است (٦). Hamrick و Godt (1990) (6) اظهار داشتند که سطوح تنوع ژنتیکی درون جمعیتی متأثر از برخی ویژگیهای گونه است. بطوریکه با استفاده از نحوه انتشار بذر، سیستم تولید مثلی و گستره جغرافیایی می توان میزان تنوع ژنتیکی را پیش بینی نمود.

فاصله ژنتیکی (۱۰/٦ و ۱۰/۱) و تمایز ژنتیکی (۵/۵ و ۵/۸) در نمونه های مطالعه شده درختان مادری و نسل نتاج نسبتاً کم است. Geregorius و همکاران (٤) و Wang، (24) نیز تمایز ژنتیکی پایینی را در نمونه های نتاج راش اروپایی ۲ سال مختلف را توسط مارکرهای ژنی ایزوآنزیمی گزارش نموده اند. آنها اظهار داشتند که اگرچه در نسلهای متفاوت درختان گلده متفاوت بوده و انتشار بذر غیر تصادفی است ولی از آنجایی که در هر دو سال مورد بررسی بخشهای تولید مثل کننده توده شباهت ژنتیکی دارند، تمایز درون جمعیتی ناچیز می باشد. طبق

Archive of SID
www.SID.ir

گزارش Levy و Neal، (8) گوناگونی زمانی (Temporal) در ساختار ژنتیکی *Phacelia dubia* ممکن است ناشی از تغییرات اندازه جمعیت در طی زمان ، و یا ناشی از تفاوت تولید بذر در میان گیاهان باشد. عموماً عمده گوناگونی زمانی مشاهده شده در فراوانی آللهای نادر است. فاصله ژنتیکی برآورد شده بین درختان مادری و نمونه های نتاج بیشتر از نتایجی می باشد که با استفاده از مارکرهای آنزیمی توسط Wang، (24)، از ۲/۵ تا ٦/۵ درصد) و Muller-Stark، (12)، از ٤/۵ تا ۵/٤ درصد) بدست آمده است. بررسیهای Linhart و همکاران (۱۰)، Gregorius و همکاران (٤) و Hossaert-Mckey و همکاران (۷) نشان داد که تمایز ژنتیکی در طول زمان کمتر از تمایز ژنتیکی فضایی (spatial) است. تفاوت در ساختار ژنتیکی زمانی جمعیتهای درختی مولد باعث تولید بذرهائی می گردد که از نظر ژنتیکی با هم تفاوت دارد (۵). بیشترین عواملی که باعث بروز اختلاف ژنتیکی بین درختان مادری و نمونه های نتاج می شود درجات مختلف خودلقاحی و افراد بارور متفاوت است (۲۵). همگونی ساختار ژنتیکی و تنوع ژنتیکی در میان ۵ کلاس سنی *Neolitsea serica* ممکن است ناشی از وقوع وقایع تولید مثلی مشابه در سالهای مختلف باشد (۲).

چنانچه ارزش F در بیشتر لوکوسها مثبت باشد، محتمل ترین علت این وضعیت خودلقاحی درون گروهی بین درختان است. در حالی که ناهمگونی اندیکسهای ثبوت (Fixation) در نمونه های مورد مطالعه نشان می دهد که خود لقاحی درون گروهی تأثیر قابل ملاحظه ای روی ساختارهای ژنوتیپی توده های راش مورد بررسی ندارد. بویژه اینکه ارزش F در لوکوس FS1-11 بشدت از نظر آماری در جهت منفی معنی دار بود. این نتایج با گزارشات قبلی در مورد راشهای ایران (۱۸) و راشهای اروپا (۹،۱۱، ۱۲، ۲۱، ۲٤ و ۲۵) که توسط مطالعات آنزیمی صورت گرفته بود منطبق است. مختصری مثبت بودن ارزش F در برخی لوکوسها می تواند ناشی از خودلقاحی، تولید مثل انتخابی و یا اثر انتخاب باشد. ارزش F در نتاج بیشتر جمعیتها بصورت جزئی مثبت تر از درختان مادری می باشد. چنین گوناگونی اندیکس ثبوت در نسلهای مختلف نشان دهنده وجود فرایندهای انتخابی در دسته های بذری و درحین بلوغ است (۱۷).

بر اساس نتایج این پژوهش تنوع ژنتیکی درختان مادری نسبت به نمونه های نتاج بیشتر است. این وضعیت می تواند ناشی از جمع آوری بذر از تعداد درخت مادری معدود (فقط ۱۰ درخت) باشد که با افزایش آن می توان این وضعیت را بهبود بخشید. علی رغم تعداد محدود درخت، ولی نحوه مناسب انتخاب درختان مادری (حداقل ۳۰ متر دور از هم) باعث شده که لقاح درون گروهی مشاهده نشود. از آنجاییکه ساختار ژنتیکی جمعیتهای مورد مطالعه انحراف مهمی از تعادل هاردی–وینبرگ نشان نمی دهند بنابراین در مورد جمعیتهای راش ایران نیز همان تعداد ۲۰۰ درخت برای نمونه برداری که توسط Turok و Hattemer، (23) پیشنهاد شده است برای جمع آوری بذر توصیه می گردد. بررسیهای بیشتری می بایست انجام شود تا تأثیر عوامل مختلف بصورت جداگانه روشن شود و نیز استفاده از بذرهای بیش از یک سال در جنگل کاری مشخص گردد.

سپاسگزاری: بدین وسیله از انستیتو بین المللی منابع ژنتیک گیاهی ((IPGRI که با اعطا بورس پژوهشی (Valilov-Frankle Fllowship 2003) اجرای پژوهش حاضر را ممکن نمودند قدردانی می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Amaral, W., Yanchuk, A. and Kjaer, E. 2004. Methodologies for *ex situ* conservation. Forest Genetic Resources Conservation and Management: in plantation and genebank, Volme 3, Chapter 2. IPGRI, 20-21.
2. Chung, M.G. and Epperson, B.K. 2000. Spatial genetic structure of allozyme polymorphisms in a population of *Eurya japonica* (*Theaceae*). Silvae Genet., 49: 1-4.
3. Excoffier, L. Smouse, P. and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance infered from metric distance among DNA restriction data. Genetics, 131: 471-491.
4. Gregorius, H. R., Krauhausen, J. and Muller-Stark, G. 1986. Spatial and temporal genetic differentiation among the seeds in a stand of *Fagus sylvatica*. Heredity, 57: 255-262.
5. Gregorius, H.R. 1991. Gene conservation and preservation of adaptability. In: species conservation: A population-biological approach. Seitz, A. and Loeschcke, V. (Eds.). Birhauser Verlag, Basel., pp. 31-47.
6. Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. 1990. Allozyme diversity in plant species. In: A. H. D., Brown, M. T., Clegg, A. L. Kahler and B. S., Weir (Eds). Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sinauer Associates Inc., sunderland, Massachusetts. USA, 56-57.
7. Hossaert-McKey, M., Valero, M., Magda, D., Jarry, M., Cuguen, J. and Vernet, P. 1996. The evolving genetic history of a population of *Lathyrus sylvestris*: evidence from temporal and spatial genetic structure. Evolution, 50: 1808-1821.
8. Levy, F. and Neal, C.L. 1999. Spatial and Temporal genetic structure in chloroplast and allozyme markers in *Phcelia dubia* implicate genetic drift. Heredity, 82: 422-431.
9. Lexer, C., Heinze, B., Steinkellner, H. And Kamfer, S. 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. Theor. Appl. Genet., 99: 185-191.
10. Linhart, Y. B., Sturgeon, K. B. and Davis, M. L. 1981. Genetic variation in Space and time in a population of ponderosa pine. Heredity, 46: 407-426.
11. Merzeau, D., Comps, B., Theibaut, B. and Letouzey, J. 1994. Estimation of *Fagus sylvatica* L. mating system parameters in natural populations. Ann. Sci. For., 51: 163-173.
12. Müller-Starck, R. 1996. Genetische Aspekte der Reproduktion der Buche (Fagus sylvatica L.) unter Berücksichtigung waldbaulicher Gegebenheiten. Ber. Forschungszentrum Waldökosysteme, Reihe A, Bd. 135. Göttingen.
13. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
14. Pastorelli, R., Smulders, M.J.M., Van'T Westender, W.P.C., Vosman, B., Giannini, R., Vettori, C. and Vendramin, G.G. 2003. Characterization of microsatellite markers in *Fagua sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. Mollecular Ecology Notes, 3: 76-78.
15. Peakal, R. and Smouse, P.E. 2001. GENALEX V5.04: genetic analysis in EXCEL. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Camberra, Australia, available at ttp://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/.
16. Raymond, M. and Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 12) population genetics software for exact tests and ecunenicism. Journal of Heredity, 89: 248-249.
17. Rossi, P., Vendramin, G.G. and Giannini, R. 1996. Estimation of mating system parameters in two Italian natural populations of *Fagus sylvatica* . Can. J. For., 26: 132-140.
18. Salehi Shanjani, P., Paule, L., Khavari-Nejad, R. A., Gömöry, D. and Sagheb-Talebi, K. 2002. Allozymic variability in beech (*Fagus orientalis* Lipsky) forests over Hyrcanian zone. Journal of Forest Genetics, 9(4): 297-297.
19. Schneider, S., Kueffer, J., Roessli, D. and Excoffier, L. 1997. Arlequin ver. 1.1: software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva.
20. Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. Arlequin, Version 2000: software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
21. Spencer, C.C., Neigel, J.E. and Leberg, P.L. 2000. Experimental evolution of usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. Molecular Ecology, 9: 1517-1528.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Wang, K.S. 2004. Gene flow in European beech (*Fagus Sylvatica* L.). Genetica, 122: 105-113.

25. Ziehe, M., Gregorius, H.R., Glock, H., Hattemer, H.H. and Herzog, S. 1989. Gene resources and gene conservation in forest trees: General concepts. In: F., Scholz, H.R. Gregorius, and D., Rudin (Eds). Genetic Effects of Air Populations in Forest Tree Populations. Springer-Verlag Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 173-186

22. Thomson L., Graudal, L. and Kjaer E. 2001. Selection and management of *in situ* gene conservation areas for Target species. Forest Genetic Resources Conservation and Management: in managed natural forests and protected areas, Volme 2, Chapter 2. IPGRI, 5-12.

23. Turok, J. and Hattemer, H.H. 1994. Gene resources in beech: which populations should be chosen? Proceeding from the 5th IUFRO Beech Symposium, Denmark, 124-126.

Genetic differentiation between generations of beech (*Fagus orientalis* Lipsky) populations in Caspian forests

Salehi Shanjani P.[1] and Vendramin G.G.[2]

[1] Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R. of Iran

[2] Institute of Plant Genetic, CNR, Via Madonna del Piano, I-50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italy

Abstract

Panmictic equilibria between generations do not occur in natural populations. Gene conservation programs in beech will preferably use seed material for the regeneration of resources. Therefore, knowledge of processes changing structures and amounts of genetic variation during generative stand reproduction becomes very important. In this study, at 10 beech population along the Hyrcanian forests, genetic composition of mother trees (at least 40 trees per population) and their progenies (7 seeds of each of the 10 mother trees) were determined by means of microsatellite markers. The allelic structure of mother trees and seeds indicated that all loci showed high polymorphism in all populations. Allelic multiplicity in the seed generation is generally higher than in mother trees, which indicate effective gene flow from neighbor stands. Number of frequent alleles (> 5%) dose not vary significantly, however, number of locally common alleles (≤ 25%) in seed generation was higher than mother trees. What is important that any regular deviations from the Hardy-Weinberg structures were not observed. In comparison with mother trees, we have detected a slightly reduction in genetic diversity, probably due to an inappropriate seed collection strategy limited to a few trees. These data suggesting an increasing the number of mother trees would be a guarantee for conservation of genetic diversity of beech.

Key words: *Fagus orienalis*, Hyrcanian forests, genetic differentiation, microsatellite, beech seed

Archive of SID

www.SID.ir