

ارزیابی تنوع ژنتیکی شاهبلوط اروپایی (*Castanea sativa* Mill.) در جوامع مختلف استان گیلان با استفاده از نشانگرهای SSR

شیرین علی پور^{۱*}، کامبیز طاهری آبکنار^۲، اسد اسدی آبکنار^۲ و پیام پتکی^۴

^۱ کارشناس ارشد جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان

^۲ دانشیار، گروه جنگلداری دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان

^۳ استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور، گیلان

^۴ کارشناس بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور، گیلان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۷)

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی برای شناسایی ژنوتیپ‌های برتر، نخستین گام در هر برنامه پایش و گسترش پایدار کشت گونه‌های گیاهی است. در این پژوهش، تنوع و ساختار ژنتیکی سه جمعیت شاهبلوط اروپایی (*Castanea sativa* Mill.) دربرگیرنده ۴۱ ژنوتیپ در استان گیلان با بهره‌گیری از نشانگرهای SSR بررسی شد. استخراج DNA از برگ‌های جوان به روش CTAB و سپس تکثیر با ۱۴ آغازگر ریزماهوره به روش PCR انجام گرفت. فرآورده‌های تکثیرشده با به‌کارگیری ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد، الکتروفورز شدند. این ۱۴ آغازگر SSR، ۱۰ آغازگر چندریختی نشان دادند. الگوهای نواری برپایه اندازه‌شان با حرف‌های الفبا امتیازدهی شدند. روی هم، ۳۱ آلل چندریخت شناسایی شد. میانگین تعداد آلل‌های دیده‌شده به‌ازای هر جایگاه ژنی ۳/۱۰ بود. میانگین هتروزیگوسیتی دیده‌شده و انتظارداشته، به‌ترتیب ۰/۵۴۲ و ۰/۵۵۶ به‌دست آمد. اندازه شاخص F_{ST} و جریان ژنی (N_m) به‌ترتیب ۰/۱۷۴ و ۱/۱۸ به‌دست آمد که نشان‌دهنده جدایی ژنتیکی زیاد میان منطقه‌هاست. بیشترین فاصله ژنتیکی، میان جمعیت‌های شفت و سفارود و کمترین آن، میان جمعیت‌های سفارود و فومن بود. دستاوردهای این پژوهش نشان داد که نشانگرهای SSR در شناخت اندازه تنوع ژنتیکی و جداسازی جامعه‌های شاهبلوط اروپایی از کارایی فراوانی برخوردارند. همچنین جدایی جغرافیایی و مانع‌های طبیعی و نیز جابه‌جایی بذرها از سوی انسان، در این زمینه بسیار اثرگذارند.

واژه‌های کلیدی: جریان ژنی، چندریختی، ریزماهوره، ساختار ژنتیکی.

مقدمه و هدف

شاهبلوط اروپایی (*Castanea sativa* Mill.) یکی از گونه‌های کمیاب و باارزش جنگل‌های معتدل و مرطوب است و تنوع ژنتیکی فراوانی در جهان دارد (Martin *et al.*, 2012). گسترشگاه این گونه، قاره اروپا، شمال آفریقا و بخشی از آسیاست. شاهبلوط اروپایی در ایران، بومی استان گیلان است که در شرایط اداپتیکی (خاکی) و اقلیمی ویژه‌ای گسترش یافته است. این گونه چندمنظوره، در رویشگاه‌های طبیعی ویسرود، سیاهمزیگی، قلعه رودخان و سفارود در استان گیلان پراکنش دارد؛ البته به صورت لکه‌ای در لاهیجان (شاهبلوط محله و غریب‌آباد) نیز دیده شده است. عامل‌هایی مانند بهره‌برداری سنتی از بذر درختان شاهبلوط، چرای دام و آلودگی درختان به بیماری خشکیدگی، به کاهش زادآوری طبیعی و شمار این گونه در هکتار انجامیده است. از آنجا که تنوع ژنتیکی یکی از ویژگی‌های بنیادین در تندرستی جنگل است (Schaberg *et al.*, 2008)، پایش آن می‌تواند راهبردی ارزشمند برای بهره‌برداری پایدار از منابع طبیعی باشد. تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیک جمعیت، عنصرهای مهمی‌اند که توانایی گونه‌ها را در پاسخ به انتخاب طبیعی یا مصنوعی آشکار می‌کنند (Fady and Ralls, 2010). نشانگرهای مولکولی جایگاه بسیار برجسته‌ای در آشکار کردن تاریخچه، گوناگونی، جداسازی و ساختار جمعیت دارند و با شناسایی و پایش منبع‌های ژنتیکی می‌توانند به مدیریت جامعه‌های جنگلی کمک کنند (Rischkowsky and Pilling, 2007). نشانگر مولکولی SSR^۱، نشانگری فراتنوع‌پذیر^۲ است؛ بدین معنا که هنگامی که هدف، بررسی گوناگونی ژنتیکی باشد، این نشانگر یکی از بهترین نشانگرها برای این کار است و می‌تواند گوناگونی آلی بسیار زیادی را در هر جایگاه نشان دهد (Muchugi *et al.*, 2008). همچنین این نشانگر برای شناخت گونه‌هایی که آگاهی از پیشینه مولکولی آنها در دست نیست،

پیشنهاد می‌شود (Barbara *et al.*, 2007). بررسی‌های نخستینی در زمینه تنوع ژنتیکی این گونه، با رویکرد به ویژگی‌های ریخت‌شناختی برگ، گوبای گوناگونی فنوتیپی بسیار زیاد برگ در جمعیت‌های گوناگون است (اکبری‌نیا و همکاران، ۱۳۹۰). در چندین پژوهش، گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های فراوان شاهبلوط اروپایی در کشورهای دیگر با بهره‌گیری از نشانگرهای آیزوزایم^۳ (Villani *et al.*, 1991; Fernandez and Monteagudo, 2010) SSR، (Martin *et al.*, 2008; Mattioni *et al.*, 2014) RAPD^۴، (Lusini *et al.*, 2012) ISSR^۵، (Goulao *et al.*, 2001; Casasoli *et al.*, 2006) DNA و (Martin *et al.*, 2010) EST-SSR کلروپلاستی (Fineschi *et al.*, 2000) بررسی شده است. استان گیلان تنها خاستگاه گونه شاهبلوط اروپایی در ایران است. متأسفانه اپیدمی‌های شدید بیماری سوختگی شاهبلوط، یکی از چالش‌ها برای این درختان در این سال‌ها بوده است. با رویکرد به کاربردهای فراوان این گیاه ارزشمند اقتصادی در صنایع گوناگون داروسازی، خوراکی و بهداشتی، نگاه ویژه به به‌نژادی آن، در راستای پایش و بهره‌برداری مناسب از منبع‌های ژنتیکی و پیشرفت و بهبود کمی و کیفی آن بایسته می‌نماید. با آنکه آگاهی از ارزش زیاد تنوع ژنتیکی گونه‌های جنگلی، راهکاری برای کاهش نابودی آنها فراهم می‌کند و نیز، با آنکه بسترهای پژوهشی فراوان در دسترس داریم، کاوش‌های بنیادینی درباره تنوع ژنتیکی گونه شاهبلوط اروپایی در راستای پایش و نگاهداری از توان ژنتیکی آن انجام نگرفته است. هدف این پژوهش، شناخت تنوع ژنتیکی جامعه‌های شاهبلوط اروپایی با بهره‌گیری از نشانگر SSR است. از آنجا که شاهبلوط اروپایی از گونه‌های بومی استان گیلان بوده و در گزند نابودی است، ارزش اجرای این پژوهش دوچندان می‌شود.

¹ Simple Sequence Repeat

² Hypervariability

³ Isozymes

⁴ Inter Simple Sequence Repeat

⁵ Random Amplified Polymorphic DNA

مواد و روش‌ها

منطقه تحقیق

منطقه جنگلی استان گیلان با زمینه رویشگاهی متفاوت، شامل شفت (ویسرود)، شفارود (ششار) و فومن (قلعه رودخان)، گردآوری شد (جدول ۱).

۴۱ نمونه برگ از گونه شاه‌بلوط اروپایی در سه

جدول ۱- داده‌های منطقه‌های نمونه‌برداری شاه‌بلوط اروپایی

شمار نمونه‌ها	بلندی از سطح دریا	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	منطقه گردآوری	جمعیت
۲۲	۲۰۰-۵۰۰	۴۹°۱۵'۰۳"	۳۷°۱۵'۵۳"	ویسرود	۱
۱۲	۲۰۰-۳۶۰	۴۹°۰۲'۲۴"	۳۷°۳۰'۱۷"	ششار	۲
۷	۲۰۰-۴۰۰	۴۹°۱۴'۴۳"	۳۷°۰۵'۴۹"	قلعه‌رودخان	۳

روش تحقیق

TAE^۱ الکتروفورز شدند. سپس همه DNAها برای رسیدن به چگالی ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با بهره‌گیری از دستگاه‌های دماگردان^۲ (ABI و ASTEC) با ۱۴ جفت آغازگر ویژه SSR (جدول ۲) انجام گرفت. این آغازگرها، بر پایه بررسی مقاله‌های (Buck et al., 2003) و (Nishio et al., 2011)، برگزیده و سفارش داده شدند.

واکنش‌های PCR با بهره‌جستن از ماده‌های خریداری‌شده از شرکت سیناژن و در اندازه ۱۵ میکرولیتر انجام گرفت. این اندازه، دربرگیرنده ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با چگالی ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۰/۶ میکرولیتر کلرید منیزیم با چگالی ۵۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs با چگالی ۲ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای رفت و برگشت با چگالی ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، ۰/۲ میکرولیتر از آنزیم Taq Polymerase DNA با چگالی ۵ واحد در میکرولیتر و ۷/۲ میکرولیتر آب سترون بود. چرخه دمایی واکنش‌ها به روش فرودی^۳ و به ترتیب زیر بود؛ گام نخست در ۹۴ درجه سانتی‌گراد در سه دقیقه، گام

پنج تا شش برگ تازه و جوان از هر درخت، گرفته شد. گرچه فاصله درختان از الگوی ویژه‌ای پیروی نمی‌کرد (قندهاری و همکاران، ۱۳۹۲)، با رویکرد به جایگاه درختان، میانگین فاصله پایه‌های درختی از یکدیگر، کمابیش ۵۰ متر در نظر گرفته شد. همچنین به‌ازای هر درخت، طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا و جهت، با دستگاه GPS ثبت شد (Martin et al., 2012). ارتفاع منطقه‌های جنگلی از ۲۰۰ تا ۵۰۰ متر بود. نمونه‌های گردآوری‌شده تا زمان استخراج DNA و بررسی‌های مولکولی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور (رشت) نگهداری شدند.

برای استخراج DNA ژنومی، دو گرم از بافت برگ در هاون چینی دارای ازت مایع خرد شد و استخراج DNA به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) همراه با اندکی بهینگی انجام گرفت. برای شناخت خلوص DNA، از دستگاه نانودراپ Thermo مدل ۲۰۰۰ با نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بهره گرفته شد. همه نمونه‌ها دارای خلوص زیاد (در دامنه ۱/۸ تا ۲) بودند. همچنین برای تأیید نتیجه به‌دست آمده، DNAها بر روی ژل‌های آگارز درصد درون بافر

^۱ Tris-Acetic acid-EDTA

^۲ Thermal cycler

^۳ Touch Down

دوم در ۱۰ چرخه؛ دربردارنده^۱ ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه (که این دما، در هر چرخه، ۰/۵ درجه کاهش می‌یافت) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، گام سوم در ۲۵ چرخه؛ دربردارنده ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه (که این دما، در هر چرخه، ۰/۵ درجه کاهش می‌یافت) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه، گام چهارم و پایانی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ دقیقه بود.

جدول ۲- آغازگرهای SSR به‌کاررفته در این پژوهش

آغازگر	توالی آغازگر	توالی تکراری	دامنه اندازه آللی
EMCS2	F-GCTGATATGGCAATGCTTTTCCTC R-GCCCTCCAGCCTCACCTTCATCAG	(CGG)	۱۷۲ - ۱۷۸
EMCS4	F-CGCCGAACTCACCGACCTC R-GCCAAAACGACACCCAATCC	(GSS)	۱۷۰ - ۱۷۹
EMCS11	F-ATCCACTCCACCAACAACAACC R-GGAGGGAGATGGGACGACG	(GGC) (GGA)	۹۶ - ۱۱۱
EMCS14	F-GTGCTTCAGGGACCTTTCTTCTC R-GCCGCCGCTCCTGCTGCTC	(GAG)	۱۴۳ - ۱۵۳
EMCS15	F-CTCTTAGACTCCTTCGCCAATC R-CAGAATCAAAGAAGAGAAAGGTC	(CAC)	۸۳ - ۹۵
EMCS32	F-TTCCACACTTATCTCTTAACCCAAAA R-CTCCGGTACGGTATTGACTTCCTT	(AG)	۹۰ - ۱۱۶
EMCS38	F-TTCCCTATTTCTAGTTTGTGATG R-ATGGCGCTTTGGATGAAC	(AG)	۲۲۸ - ۲۷۰
PRD2	F-AGGCAGGGATGGGTTTTAGT R-GTTTCTTTGTGAAGAGAGAAGACAACCC	(TG)	۱۳۰ - ۱۴۶
PRD25	F-CACGCCGGTGACGAATAATA R-GTTTCTTTCTCCAACGGAACCAACACA	(GT)	۸۲ - ۱۵۶
PRD42	F-AAACAACCAACACTCGGAC R-GTTTCTTCAAAGGTTCTCTCGGCAAG	(GA)	۱۳۶ - ۱۶۲
PRD52	F-CTTGTCATGGTGCATTGGTG R-GTTTCTTCCGAGTGGTGATCCATTAT	(AG)	۱۶۰ - ۱۷۰
PRA67	F-TGGGTATCCCTCAGAATCCA R-GTTTCTTCCGTTGGAGACCAGAGGAGAG	(AG)	۲۷۱ - ۲۸۷
PRA75	F-GTGAAGAACCAACGGACCA R-GTTTCTTACCGAATGAGCTGTCTGGAA	(TG)	۱۸۲ - ۲۰۸
PRA86	F-ATCCCTGCACCAAGAACAAG R-GTTTCTTGCTTTGGTCTCTTGCCAT	(CT)	۳۰۸ - ۳۴۰

چندریختی به‌دست‌آمده، نوارها برپایه اندازه‌شان با حرف‌های الفبای انگلیسی (A, B, C, D و...) ...

۱ درگام‌های دوم و سوم ۹۴ درجه سانتی‌گراد جزو اصول پایه‌ای PCR است. PCR دارای سه مرحله؛ واسرشتگی، پیوند آغازگر و همچنین ساخت رشته مکمل است و این سه مرحله به‌صورت چرخه‌ای تکرار می‌شود. پس از پایان هر چرخه (ساخت رشته مکمل)، و آغاز دوباره این چرخه (واسرشتگی) باید پیوندهای هیدروژنی میان بازهای آلی مکمل در روی دو رشته از هم باز شوند و این کار باز شدن، باید در مرحله واسرشتگی (و در دمای ۹۴ درجه) انجام گیرد.

برای اطمینان از تکثیر فراورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از ژل‌های آگارز با چگالی ۲ درصد و همچنین، برای دیدن ناهمسانی در میان نوارهای به‌دست‌آمده و آشکارسازی آنها، از ژل‌های پلی‌اکریل‌امید ۶ درصد با روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره (Bassam et al., 1991) استفاده شد.

از آنجا که آغازگرهای SSR، بیشتر، تنوع درون جایگاه ژنی را نشان می‌دهند، برای ارزیابی

نتایج

در این پژوهش از میان ۱۴ جفت آغازگر ویژه SSR برای شاه‌بلوط، ۱۰ جفت الگوی نواری چندریخت نشان دادند. روی هم ۳۱ آلل چندریخت در ژنوتیپ‌های بررسی شده شناسایی شد. تعداد آلل‌ها در هر جایگاه ژنی، از ۲ تا ۵ با میانگین ۳/۱۰ بود. بیشترین آلل دیده‌شده متعلق به جایگاه ژنی PRD2 با پنج آلل بود. تعداد آلل‌های مؤثر در جایگاه‌های ژنی، در دامنه ۱/۳۸۴ تا ۳/۹۱۶ با میانگین ۲/۴۴۹ بود. بیشینه شاخص نی متعلق به جایگاه ژنی PRD2 (با ۰/۷۴۴) بود که با توجه به تعداد زیاد آلل آن (پنج آلل)، منطقی می‌نماید. کمینه شاخص نی هم متعلق به جایگاه ژنی EMCS32 (با ۰/۲۷۷) بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (H_0) و هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) به ترتیب ۰/۵۴۲ و ۰/۵۵۶ بود. در این بررسی، بیشترین اندازه PIC، متعلق به جایگاه‌های ژنی PRD2، EMCS14، PRD52، EMCS38 و PRA86 به ترتیب با ۰/۷۰۳، ۰/۶۷۲، ۰/۵۸۷، ۰/۵۲۳ و ۰/۵۱۱ و کمترین اندازه هم متعلق به جایگاه‌های ژنی EMCS15 و EMCS32 به ترتیب با ۰/۲۹۳ و ۰/۲۳۹ بود (جدول ۳).

امتیازدهی شدند. شاخص‌های تنوع ژنتیکی (Nei, 1987) مانند تعداد آلل‌های مؤثر (Kimural and Crow, 1964)، تعداد آلل‌های دیده‌شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Levene, 1949)، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده، شاخص تنوع ژنتیکی نی (Nei, 1973) و محتوای داده‌های چندریختی (Botstein et al., 1980) با نرم‌افزار PopGene (نسخه ۱/۳۲) و Microsatellite tools for Excel (نسخه ۳/۵۷) به دست آمد. همچنین N_m و شاخص‌های F_{IS} و F_{ST} برای جمعیت‌ها در هر جایگاه ژنی با نرم‌افزار PopGene (نسخه ۱/۳۲) و GenALEX (نسخه ۶/۵) (Peakall et al., 2012) اندازه‌گیری شد. شناخت فاصله و تشابه ژنتیکی (Nei, 1972) میان جمعیت‌ها با نرم‌افزار PopGene (نسخه ۱/۳۲) آزموده شد و نمودار درختی آن با روش UPGMA کشیده شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) و تجزیه خوشه‌ای به روش Neighbor Joining با نرم‌افزار DARwin (نسخه ۵/۰/۱۵۸) (Perrier et al., 2003) انجام گرفت.

جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی به دست آمده در جامعه‌های شاه‌بلوط اروپایی به‌ازای هر جایگاه ژنی SSR

آغازگر	شمار آلل‌های دیده‌شده (N_a)	شمار آلل‌های مؤثر (N_e)	هتروزیگوسیتی دیده‌شده (H_0)	هتروزیگوسیتی انتظارداشته (H_e)	شاخص نی (Nei)	چندریختی (PIC)
EMCS14	۴	۳/۵۹۹	۰/۹۷۵	۰/۷۳۱	۰/۷۲۲	۰/۶۷۲
EMCS15	۲	۱/۵۵۲	۰/۲۱۹	۰/۳۶۰	۰/۳۵۶	۰/۲۹۳
EMCS32	۲	۱/۳۸۴	۰/۰۰۰	۰/۲۸۱	۰/۲۷۷	۰/۲۳۹
EMCS38	۳	۲/۵۴۱	۰/۴۳۹	۰/۶۱۴	۰/۶۰۶	۰/۵۲۳
PRD2	۵	۳/۹۱۶	۰/۶۰۰	۰/۷۵۴	۰/۷۴۴	۰/۷۰۳
PRD25	۳	۲/۱۱۷	۰/۵۵۰	۰/۵۳۴	۰/۵۲۷	۰/۴۶۲
PRD52	۴	۲/۸۳۷	۰/۷۰۷	۰/۶۵۵	۰/۶۴۷	۰/۵۸۷
PRA67	۲	۱/۸۸۲	۰/۲۰۰	۰/۴۷۴	۰/۴۶۸	۰/۳۵۹
PRA75	۳	۲/۱۹۷	۰/۷۵۶	۰/۵۵۱	۰/۵۴۴	۰/۴۴۱
PRA86	۳	۲/۶۴۸	۰/۹۷۵	۰/۷۳۱	۰/۷۲۲	۰/۵۱۱
میانگین	۳/۱۰	۲/۴۴۹	۰/۵۴۲	۰/۵۵۶	۰/۵۴۹	۰/۴۷۹

(جدول ۴).

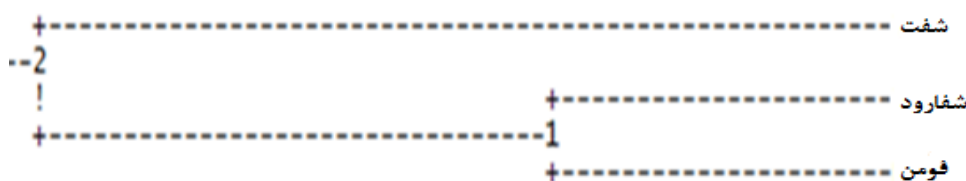
نمودار درختی به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای داده‌های ۱۰ نشانگر SSR در جامعه‌های شاهبلوط اروپایی با بهره‌گیری از ضریب تشابه نی و روش UPGMA، تأییدکننده این گفته است (شکل ۱).

فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها برپایه ضریب تشابه نی، نشان داد که بیشترین تشابه ژنتیکی، میان دو رویشگاه فومن و سفارود با ضریب تشابه ۰/۸۳۰ و فاصله ژنتیکی ۰/۱۸۵ و کمترین تشابه ژنتیکی در میان رویشگاه سفارود و شفت با ضریب تشابه ۰/۵۹۸ و فاصله ژنتیکی ۰/۵۱۳ بود.

جدول ۴- دوری و نزدیکی ژنتیکی میان جمعیت‌های شاهبلوط اروپایی برپایه ضریب تشابه نی (۱۹۷۸)

شماره جمعیت	شفت	سفارود	فومن
شفت	****	۰/۵۹۸	۰/۷۲۷
سفارود	۰/۵۱۳	****	۰/۸۳۰
فومن	۰/۳۱۷	۰/۱۸۵	****

اندازه‌های نزدیکی ژنتیکی، در بالای قطر و دوری ژنتیکی در پایین قطر آمده است.

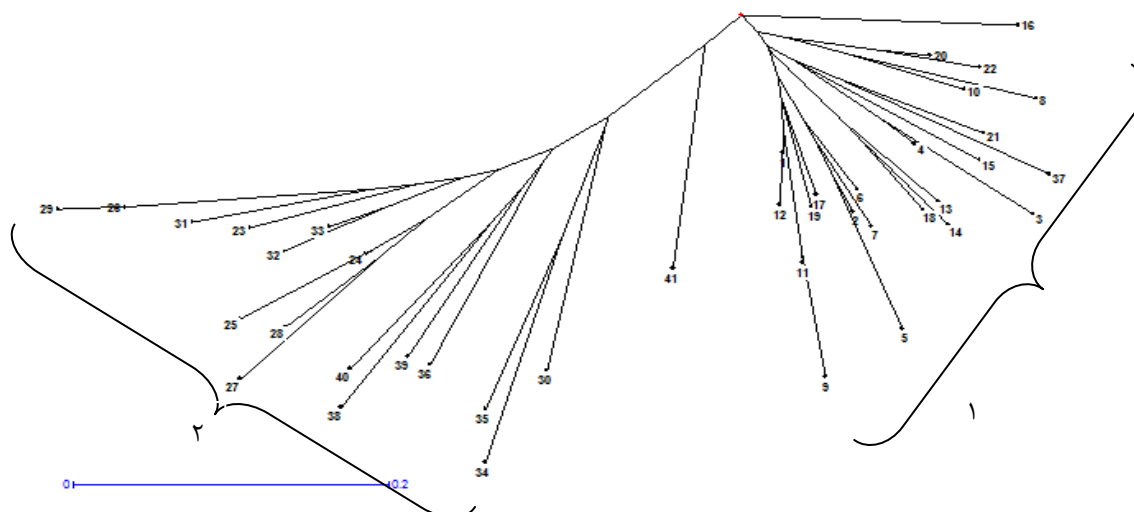


شکل ۱- نمودار درختی تنوع ژنتیکی میان رویشگاه‌های شاهبلوط اروپایی برپایه ضریب همسانی نی (۱۹۷۸) و روش UPGMA

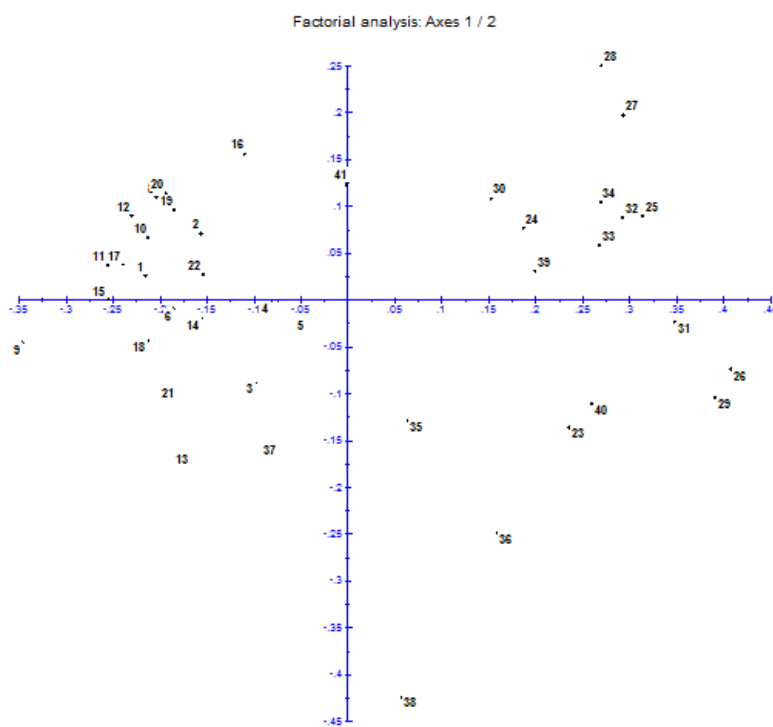
همچنین برای کامل شدن روش بررسی کلاستر، آزمون تجزیه به مختصات اصلی هم به-کار رفت. طرح دوبعدی به‌دست آمده از این آزمون، الگوی پراکنش نمونه‌های بررسی شده را در نمودار درختی بالا تأیید کرد (شکل ۳).

اندازه به‌دست آمده F_{ST} (برابر با ۰/۱۷۴)، جدایی بسیاری را میان جمعیت‌ها نشان داد. همچنین اندازه جریان ژنی ۱/۱۸ به‌دست آمد که نشان‌دهنده جریان ژنی کم میان این سه رویشگاه است (جدول ۵).

برای شناخت خویشاوندی ژنوتیپ‌های بررسی شده و گروه‌بندی آنها برپایه داده‌های مولکولی، تجزیه کلاستر با روش Neighbor Joining و با استفاده از ضریب تطابق ساده (Sokal and Michener, 1958) انجام گرفت (شکل ۲). ژنوتیپ‌های سه رویشگاه، به دو گروه تقسیم شدند. گروه نخست، ژنوتیپ‌های رویشگاه شفت و گروه دوم، ژنوتیپ‌های رویشگاه‌های سفارود و فومن را دربرگرفت. البته برخی از نمونه‌های هر سه رویشگاه در این دو گروه پراکنده شدند.



شکل ۲- نمودار درختی تنوع ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های شاه‌بلوط اروپایی بر پایه ضریب همخوانی ساده و روش اتصال همسایه^۱.
 ۱-۲۲: رویشگاه شفت، ۲۳-۳۴: رویشگاه سفارود و ۳۵-۴۱: رویشگاه فومن



شکل ۳- نمودار دوبعدی پراکنش ژنوتیپ‌های شاه‌بلوط اروپایی با بهره‌گیری از آزمون تجزیه به مختصات اصلی

¹ Neighbor Joining

جدول ۵- سنجش شاخص‌های تشابه ژنتیکی میان رویشگاه‌ها به‌ازای هر جایگاه ژنی

آغازگر	F _{IS}	F _{ST}	Nm
EMCS14	-۰/۵۹۹	۰/۱۴۰	۱/۵۲
EMCS15	۰/۰۶۸	۰/۲۳۸	۰/۷۹
EMCS32	۱/۰۰۰	۰/۴۶۶	۰/۲۸
EMCS38	۰/۲۰۳	۰/۱۰۰	۲/۲۴
PRD2	-۰/۱۴۶	۰/۳۰۳	۰/۵۷
PRD25	-۰/۱۸۳	۰/۱۲۸	۱/۷۰
PRD52	-۰/۱۶۲	۰/۱۲۵	۱/۷۴
PRA67	۰/۴۳۷	۰/۳۵۲	۰/۴۵
PRA75	-۰/۳۵۸	۰/۰۳۴	۶/۹۰
PRA86	-۰/۶۸۵	۰/۳۵۸	۶/۷۲
میانگین	-۰/۱۷۵	۰/۱۷۴	۱/۱۸

بحث

در توالی‌های تکراری نوار هدف این آغازگرها در ژنوتیپ‌های بررسی‌شده در پژوهش ما، کاهش یا افزایش رخ نداده است. (Costa *et al.* (2005). بررسی ۹۲ نمونه گردآوری‌شده از رقم‌های شاهبلوط در پرتغال با بهره‌گیری از پنج نشانگر SSR، سه تا شش آلل را برای این آغازگرها شناسایی کردند. تعداد آلل‌های گزارش‌شده از سوی پژوهشگران دیگر برای برخی از جایگاه‌های ژنی، بیشتر از تعداد دیده‌شده در بررسی حاضر است. این تفاوت می‌تواند به‌سبب به‌کارگیری نمونه‌های ناهمانند و دخالت نداشتن انسان‌ها در آنها، تفاوت در محیط جغرافیایی و شمار بیشتر جمعیت‌های بررسی‌شده در مقایسه با این پژوهش باشد. آلل‌های دیده‌شده در هر جایگاه ژنی، به تعداد نمونه‌ها وابستگی بسیار زیادی دارد و از همین‌رو، به‌نظر می‌رسد در آزمایش‌های گوناگون با تعداد نمونه‌های متفاوت، تعداد آلل‌های واقعی گوناگونی برای یک جایگاه ویژه به‌دست آید.

جایگاه‌های ژنی که محتوای داده‌های چندریخت آنها ۰/۵ باشد، دارای چندریختی زیادی هستند. این اندازه اگر به کمتر از ۰/۲۵ برسد، نشان از چندریختی

دستاوردهای این پژوهش، چندریختی زیادی را در نشانگرهای SSR نشان داد و این نشانگرها به‌خوبی توانستند در نمونه‌های شاهبلوط، نوارهای چندریخت را تکثیر کنند؛ به‌طوری‌که ۹۶/۶۷ درصد از جایگاه‌های ژنی در ۱۰ نشانگر به‌کار رفته، چندریختی نشان دادند. (Wang *et al.* (2008). بیان داشتند که ۸۰ درصد از جایگاه‌های SSR ویژه شاهبلوط اروپایی، توانایی تکثیر نوارهای چندریخت را در شاهبلوط چینی هم دارند. (Buck *et al.* (2003). تعداد آلل‌های دیده‌شده را در سه جمعیت شاه بلوط اروپایی از انگلیس و یک جمعیت از ترکیه، از ۲ تا ۱۴ آلل گزارش کردند. یادآوری می‌شود که تعداد آلل‌های دیده‌شده برای آغازگر EMCS14 در پژوهش آنان، یک آلل بود، ولی در پژوهش ما چهار آلل در این جایگاه ژنی شناسایی شد. چهار آغازگر (PRD42، EMCS2، EMCS4 و EMCS11) در پژوهش ما یکریختی (مونومورفیسم) نشان دادند که با گزارش Nisho *et al.* (2003) و Buck *et al.* (2011) همخوانی ندارد که دلیل آن ممکن است این باشد که

مردم روستاهای شفت، سفارود و فومن، جابه‌جایی بذر آن پس از گردآوری در فصل بذردهی و فروش آن در بازار و کشت در باغ‌ها را در پی داشته است. از این‌رو، انسان‌ها جایگاه بسیار برجسته‌ای در جابه‌جایی بذر آن داشته است. می‌توان گفت این دخالت انسان در جامعه‌های شاه‌بلوط، می‌تواند تفاوت‌های ژنتیکی را حتی میان دو قاره پدید آورد.

با وجود شباهت زیاد دو جمعیت سفارود و فومن از نظر ساختار ژنتیک، تنوع زیادی بین افراد آنها وجود دارد. این تنوع زیاد ممکن است نتیجه دگرگشتن بودن شاه‌بلوط، فعالیت حشرات (به‌خصوص زنبور عسل) و تبادل دانه‌گرده بین ژنوتیپ‌ها باشد. به گفته Hartl *et al.* (1997)، شباهت ژنتیکی جمعیت‌ها و جای گرفتن آنها در یک دسته، ممکن است برآمده از نزدیک بودن زمان پیدایش، خاستگاه جغرافیایی یکسان، خویشاوندی‌های احتمالی و داشتن نیاکان یکسان باشد. در بررسی Lang *et al.* (2006) گفته شده است که گرده‌افشانی در گونه‌های جنس *Castanea* با کمک باد و حشره‌ها انجام می‌گیرد، پس جریان ژنی از این راه‌ها هم ممکن است. البته موانع جغرافیایی، جهت و سرعت باد و همچنین رطوبت، از دیگر عامل‌های اثرگذار در این زمینه‌اند (Pisani and Rinalelli, 1991). افزایش فاصله جغرافیایی میان جمعیت‌ها، بیشتر، به کاهش جریان ژن در میان جمعیت‌ها می‌انجامد (Mayr and Ashlock, 1991) و از جابه‌جایی افراد تولیدمثل‌کننده جلوگیری می‌کند.

در پژوهش Martin *et al.* (2012)، اندازه F_{ST} به‌دست‌آمده برای ۱۴ جمعیت شاه‌بلوط اروپایی با هفت نشانگر SSR برابر با ۰/۱۵۲ بود. در این بررسی، اندازه F_{ST} در همه جامعه‌ها ۰/۱۷۴ بود. اندازه F_{ST} از صفر تا ۰/۰۵ نشان‌دهنده جدایی ژنتیکی کم است. اگر از ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ باشد، نشان‌دهنده جدایی میانگین، اگر از ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ باشد، نشانه جدایی ژنتیکی زیاد، و اگر هم بیش از ۰/۲۵ باشد، نمایانگر

کم دارد و اگر از ۰/۲۵ تا ۰/۵ باشد، نشان‌دهنده چندریختی میانگین است (Botstein *et al.*, 1980). برپایه داده‌های برخی آزمایش‌ها، اندازه PIC متفاوت است و نمی‌تواند عدد ثابتی باشد. این اندازه، به عامل‌هایی همچون تعداد آلل‌ها در هر جایگاه بستگی دارد (Roder *et al.*, 1998)؛ پس آغازگر PRD2، با بیشترین اندازه در PIC، بهتر از دیگر نشانگرهای به‌کاررفته توانسته تفاوت ژنتیکی نمونه‌ها را آشکار کند. روی هم‌رفته، پنج آغازگر PRD2، EMCS14، PRD52، EMCS38 و PRA86 را می‌توان آغازگرهایی سودبخش و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی شاه‌بلوط ایران دانست. همچنین باید گفت آغازگرهای برگزیده برای این پژوهش، بهترین نشانگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی شاه‌بلوط اروپایی در سرتاسر اروپا بوده‌اند (Buck *et al.*, 2003). Cutino *et al.* (2009) گفته‌اند که نشانگر EMCS38 دارای بیشترین اندازه PIC در بررسی تنوع ژنتیکی شاه‌بلوط اروپایی در ایسلند بوده است. چنین چیزی، تأیید کننده جداسازی زیاد نوارها در این نشانگر است. نتیجه‌های نمودار درختی بررسی تشابه و فاصله ژنتیکی، تجزیه به مختصات اصلی و همچنین تجزیه خوشه‌ای، تأیید می‌کنند که جمعیت شفت به‌کل از دو جمعیت دیگر جدا شده است. شاید چنین چیزی، برآمده از پدیده جریان ژنی و زادآوری جنسی آنها در گذشته بوده باشد. (Marinoni *et al.*, 2013) به این دستاورد رسیدند که یکی از عامل‌هایی که توانسته به گوناگونی ژنتیکی شاه‌بلوط اروپایی در شمال غربی ایتالیا بینجامد، جریان ژنی میان جمعیت‌های شاه‌بلوط است. جابه‌جایی بذر از سوی آدمی، یکی از عامل‌هایی است که جریان ژنی بسیار میان رویشگاه‌ها را در پی دارد (Nisho *et al.*, 2011). چندین سده است که آدمیان، بر رویشگاه‌های شاه‌بلوط اثر گذاشته‌اند (Marinoni *et al.*, 2013). گفتنی است که ارزش خوراکی بذر شاه‌بلوط و گرایش مردم استان گیلان به خوردن آن و همچنین درآمدزایی آن برای

منابع

اکبری‌نیا، مسلم، مهرداد زرافشار، علی ستاریان، فریبا بابایی سوستانی، احسان قنبری و ایمان چاپلاق پرلیری، ۱۳۹۰. تنوع ریختی روزنه، سلول‌های همراه و کرک‌های پوششی برگ شاهبلوط اروپایی (*Castanea sativa* Mill.) در اکوسیستم خزری، تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۳ (۷): ۲۳-۳۲.

قندهاری، وجیهه، اسدالله احمدی‌خواه و وحیده پیام‌نور، ۱۳۹۲. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شمشاد در شمال ایران با بهره‌گیری از نشانگرهای ISSR. پژوهش‌های ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۱ (۱): ۱-۱۲.

Avise, J.C., 2004. Molecular Markers, *Journal of Natural History and Evolution*, 511 pp.

Barbara, T., C. Palma Silva, G.M. Paggi, F. Bered, M.F. Fay, and C. Lexe, 2007. Cross species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations, *Journal of Molecular Ecology Resources*, 16(18):3759-3767.

Bassam, B.J., G. Caetano Anolles, and P.T. Gresshoff, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Journal of Analytical Biochemistry*, 196(1): 80-83.

Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human genetics*, 32(3):331-314.

Buck, E.J., M. Hadonou, C.J. James, D. Blakesley, and K. Russell, 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.), *Journal of Molecular Ecology Resources*, 3(2): 239-241.

Casasoli, M., J. Derory, C. Morera Dutrey, O. Brendel, I. Porth, J.M. Guehl, F. Villani, and A. Kremer, 2006. Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map, *Journal of Genetics*, 172(1): 533-546.

جدایی ژنتیکی بسیار زیاد است (Avise, 2004). بر این پایه، جدایی ژنتیکی میان سه رویشگاه بررسی شده در پژوهش حاضر، در دامنه زیاد جای گرفت. البته بیشترین فاصله ژنتیکی میان دو رویشگاه شفت و سفارود بود. این دو رویشگاه از دید جغرافیایی هم کمابیش از هم دورند (۷۰ کیلومتر) و موانع اکولوژیکی، توانسته جریان ژنی را میان این دو رویشگاه کاهش دهد. به سخن دیگر، هر چه مبادله ژنی میان دو جمعیت کمتر شود، آن دو جمعیت با گذشت زمان، راه تکاملی جداگانه‌ای را خواهند پیمود و بیشتر و بیشتر از هم دور خواهند شد و با گردهم آمدن این تفاوت‌های میان‌جمعیتی، گونه تازه‌ای پدید خواهد آمد. برعکس، هر چه مبادله ژنی میان دو جمعیت بیشتر شود (مانند پخش دانه گرده یا بذر از یکی به دیگری یا هر دو به هم)، با گذشت زمان، این دو جمعیت شباهت بیشتری پیدا خواهند کرد (Hartl and Clark, 1997). یادآوری می‌شود که دو یال بلند، رویشگاه شفت را از دو سو فراگرفته‌اند و این رویشگاه در میانه آنها جای گرفته است؛ آن گونه که این گستره، کوه‌های کمابیش بلند و پرشیب را در دامنه‌های شمالی البرز غربی دربرمی‌گیرد. پس این خود می‌تواند یک بازدارنده جغرافیایی برای جدا شدن رویشگاه شفت از دو رویشگاه دیگر باشد.

با این‌همه، بررسی‌های تجزیه خوشه‌ای، PCOA و فاصله ژنتیکی، یک الگوی جغرافیایی روشن را میان سه گروه متفاوت رویشگاه‌های شاهبلوط اروپایی استان گیلان نشان داد و دستاوردهای تنوع ژنتیکی از این الگو پیروی می‌کند. در پایان باید گفت از آنجا که روش‌های مولکولی از محیط اثر نمی‌پذیرند، بررسی ساختار ژنتیکی با سودجستن از نشانگرهای مولکولی از کارایی زیادی برخوردار خواهد بود.

- Costa, R., T. Valdivieso, L. Marum, L. Fonseca, O. Borges, J. Soeiro, A. Assuncao, and P. Correia, 2005. Characterisation of traditional Portuguese Chestnut cultivars by nuclear SSRs, *Journal of Acta Horticulturae*, 693: 437- 440.
- Cutino, I., A. Marchese, F.P. Marra, and T. Caruso, 2009. Genetic improvement of sweet chestnut in Sicily (*Castanea sativa* Mill.) by the selection of superior autochthonous genotypes, *Journal of Acta Horticulturae*, 866: 175- 180.
- Doyle, J.J., and J.L. Doyle, 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues, *Journal of Focus*, 12: 13-15.
- Fady, B., and C. Conord, 2010. Macroecological patterns of species and genetic diversity in vascular plants of the Mediterranean basin, *Journal of Diversity Distributions*, 16(1):53– 64.
- Fernandez Lapez, J., and A.B. Monteagudo, 2010. Genetic structure of Spanish wild populations of *Castanea sativa* as measured by isozyme analysis, *Journal of Forest Systems*, 19(2): 156-169.
- Fineschi, S., D. Turchini, F. Villani, and G.G. Vendramin, 2000. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries, *Journal of Molecular Ecology*, 9(10): 1495-1503.
- Goulao, L., T. Valdivieso, C. Santana, and C. Moniz Oliveira, 2001. Comparison between phenetic characterization using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.), *Journal of Genetic Resources and Crop Evolution*, 48(4): 329-338.
- Hartl, D.L., and G.C. Clark, 1997. Principles of Population Genetics, Sinauer associates Inc., Massachusetts, 116 pp.
- Kimural, M., and J.F. Crow, 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population, *Journal of Genetics*, 49(4): 725-738.
- Lang, P., F. Dane, and T.L. Kubisiak, 2006. Phylogeny of *Castanea* (Fagaceae) based on chloroplast trnT-LF sequence data, *Journal of Tree Genetics and Genomes*, 2(3): 132-139.
- Levene, H., 1949. On a matching problem arising in genetics, *Journal of the Annals of Mathematical Statistics*, 20(1): 91–94.
- Lusini, I., I. Velichkov, P. Pollegioni, F. Chiocchini, G. Hinkov, T. Zlatanov, and C. Mattioni, 2014. Estimating the genetic diversity and spatial structure of Bulgarian *Castanea sativa* populations by SSRs: implications for conservation, *Journal of Conservation Genetics*, 15(2), 283-293.
- Marinoni, D.T., A. Akkac, C. Beltramo, P. Guaraldo, P. Boccacci, G. Bounous, A.M. Ferrara, A. Ebone, E. Viotto, and R. Botta, 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy), *Journal of Tree Genetics and Genomes*, 9(4): 1017- 1030.
- Martin, M.A., C. Mattioni, J.R. Molina, J.B. Alvarez, M. Cherubini, M.A. Herrera, F. Villani, and M.L. Martin, 2012. Landscape genetic structure of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Spain, *Journal of Tree Genetics and Genomes*, 8(1): 127-136.
- Martin, M.A., C. Mattioni, M. Cherubini, D. Turchini, and F. Villani, 2010. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers, *Journal of Tree Genetics and Genomes*, 6(5): 735-744.
- Mattioni, C., M. Cherubini, E. Micheli, F. Villani, and G. Bucci, 2008. Role of domestication in shaping *Castanea sativa* genetic variation in Europe, *Journal of Tree Genetics and Genomes*, 4(3): 563-574.
- Mayr, E., and P.D. Ashlock, 1991. Principles of Systematic Zoology, McGraw-Hill Inc., New York, 475 pp.
- Muchugi, A., C. Kadu, R. Kindt, H. Kipruto, S. Lemurt, K. Olale, and R. Jamnadas, 2008. Molecular markers for tropical trees: a practical guide to principles and procedures, World Agroforestry Centre Inc., Gigiri, 54 pp.

- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press Inc., New York, 517 pp.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations, *Journal of American Naturalist*, 106:283-292.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations, *American Journal of Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12): 3321- 3323.
- Nishio, S., T. Yamamoto, S. Terakami, Y. Sawamura, N. Takada, and T. Saito, 2011. Genetic diversity of Japanese chestnut cultivars assessed by SSR markers, *Journal of Breeding Science*, 61(2): 109-120.
- Peakall, R., and P.E. Smouse, 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update, *Oxford Journal of Bioinformatics*, 28(19): 2537-2539.
- Perrier, X., A. Flori, and F. Bonnot, 2003. Data analysis methods. In: *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, Science Inc., Montpellier, 43–76.
- Pisani, P., and E. Rinaldelli, 1991. Alcuni aspetti della biologia florale del Castagno, *Journal of Frutticoltura*, 52: 25-30.
- Rischkowsky, B., and D. Pilling, 2007. The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture, Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Inc., Rome, 467- 468.
- Roder, M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy, and M.W. Ganal, 1998. A microsatellite map of wheat, *Journal of Genetics*, 149(4): 2007-2023.
- Schaberg, P.G., D.H. DeHayes, G.J. Hawley, and S.E. Nijensohn, 2008. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience, *Journal of Forest Ecology and Management*, 256(5): 855-862.
- Sokal, R.R., and C.D. Michener, 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships, *Journal of University of Kansas Science Bulletin*, 38: 1409-1438.
- Villani, F., M. Pigliucci, S. Benedettelli, and M. Cherubini, 1991. Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations, *Journal of Heredity*, 66(1): 131–136.
- Wang, Y., M. Kang, and H.W. Huang, 2008. Microsatellite loci transferability in chestnut, *Journal of the American Society Horticultural Science*, 133(5): 692–700.

Genetic diversity of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in different populations of Guilan Province using SSR markers

S. Alipoor^{1*}, K. Taheri Abkenar², A. Asadi Abkenar³, and P. Potki⁴

¹ M.Sc., Natural Resources Faculty, University of Guilan, I. R. Iran

² Associate Prof., Department of Forestry, Natural Resources Faculty, University of Guilan, I. R. Iran

³ Assistant Prof., Biotechnology Research Institute of the North Country, Guilan, I. R. Iran

⁴ B. Sc. in Biotechnology Genomics Institute of the North Country, Guilan, I. R. Iran

(Received: 7 November 2011, Accepted: 17 April 2012)

Abstract

Gilan is one of the rich genetic resources of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.). The study on genetic variation of this gene pool is the first step in breeding programs like introducing new promising cultivars. In this study, the genetic diversity and structure of three *C. sativa* populations including 41 genotypes in Guilan province was studied using SSR markers. Among fourteen analyzed microsatellites, 10 showed polymorphism. In total, 31 polymorphic alleles were detected. The average of observed alleles was equal to 3.10 in each locus. Expected and observed heterozygosity were 0.542 and 0.556, respectively. The F_{st} and gene flow value were 0.174 and 1.18, respectively, which indicating the high genetic differentiation between populations. The highest genetic distance was found between Shaft and Shafarud populations and lowest genetic distance was found between Fuman and Shafarud populations. The results of this study showed that SSR markers are of high performance in determining the amount of genetic diversity and distinction in populations of European chestnut. Geographic separation and natural barriers and transportation of seeds by human are the important factors in this regard.

Keywords: Gene flow, Genetic Structure, Microsatellite, Polymorphic.

* Corresponding author

Tel: +98 938 9526474

Email: alipoorshirin87@yahoo.com

