مجلهٔ جنگل ایران، انجمن جنگلبانی ایران
سال شانزدهم، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۴۰۳
ص ۵۰۱-۴۸۹
*مقاله پژوهشی*

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22034/ijf.2024.428309.1956
CC BY 4.0

# تنوع ژنتیکی پایه‌های منتخب شیردار (*Acer cappadocicum* Gled.) با استفاده از نشانگرهای SSR برای تشکیل باغ بذر

**فرزاد بنائی‌اصل[1*] و یوسف محمدی[1]**

[1]استادیار، مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۹)

## چکیده

**مقدمه:** تشکیل باغ بذر افزون‌بر تأمین بذرهای تکرارپذیر و نهال‌های باکیفیت، در تأمین تنوع ژنتیکی کافی برای پژوهش‌های آینده نیز اهمیت دارد. شیردار یا شیرپلت (*Acer cappadocicum* Gled.) از سرده افرا و از درختان بومی ایران و از گونه‌های مهم جنگل‌های هیرکانی است. در این پژوهش، فواصل ژنتیکی پایه‌های مادری شیردار که به‌منظور احداث باغ بذر کشت شدند ارزیابی شد. هدف اصلی این پژوهش اجتناب از پس‌روی خویش‌آمیزی و یکنواختی ژنتیکی جمعیت حاصل از این پایه‌های مادری بود.

**مواد و روش‌ها:** به‌منظور تولید نهال و انتقال آنها به باغ بذر شیردار، ۲۱ پایهٔ مادری دارای فنوتیپ مناسب از سه جمعیت در جنگلی به مساحت تقریبی ۱۰۰هزار هکتار شناسایی شد و از آنها بذر جمع‌آوری و به تفکیک پایه‌های مادری به نهال تبدیل شد و نمونه‌های برگی جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگرهای SSR برای تکثیر باندهای DNA انجام گرفت. براساس نتایج، در ۱۵ مکان SSR تکثیر قطعه صورت گرفت.

**یافته‌ها:** در مجموع برای ۱۵ جفت آغازگر SSR، ۶۳ آلل چندشکل در ۲۱ پایهٔ منتخب شیردار شناسایی شد. بیشترین مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جمعیت دهمیان و کمترین مقادیر برای کلیج‌کلا برآورد شد. هتروزیگوسیتی (H) بین ۰/۲۳ (جمعیت دهمیان) و ۰/۱۶ (جمعیت کلیج‌کلا) متغیر بود. افزون‌بر این، این دو جمعیت (دهمیان و کلیج‌کلا) نیز به‌ترتیب بیشترین (۱/۳۸) و کمترین (۱/۰۸) مقدار ضریب شانون را نشان دادند. میزان شباهت ژنتیکی جاکارد در ژنوتیپ‌ها از ۰/۰۰۱ تا ۰/۵۲ متغیر بود که نشان‌دهندهٔ شباهت کم پایه‌ها در داخل هر کدام از گروه‌ها بود. بنابراین گزینش برای بذرگیری باید از پایه‌های دارای قرابت ژنتیکی کمتر که در خوشه‌های مجزا قرار گرفته‌اند صورت گیرد تا از پسروی ژنتیکی حاصل جلوگیری شود.

**نتیجه‌گیری:** در بررسی تنوع ژنتیکی دو جمعیت، نشانگرهای به‌کاررفته کارایی زیادی در تفکیک ژنوتیپ‌ها داشتند. تنوع ژنتیکی بین دو جمعیت کمتر از تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بود. با این‌حال فواصل ژنتیکی براساس معیارهای مربوط محاسبه شد و با در نظر گرفتن ضریب تشابه، پایه‌های مادری در سه خوشهٔ اصلی جای گرفتند. پایه‌هایی با تشابه زیاد مانند کلیج‌کلا ۳، ۷ و ۵، از طرفی دهمیان ۹ و کلیج‌کلا ۷ مشاهده شد. اطلاعات حاصل از این پژوهش برای مدیریت پایه‌های کشت‌شده در باغ بذر و چینش پایه‌ها و کشت نکردن پایه‌های دارای قرابت ژنتیکی زیاد در کنار یکدیگر و جلوگیری از پسروی خویش‌آمیزی کاربرد دارد.

**واژه‌های کلیدی:** افرا، ریزماهواره، قرابت ژنتیکی، باغ بذر.

*نویسندهٔ مسئول
شمارهٔ تماس: ۰۲۱۴۴۷۸۷۵۸۳
ایمیل: banaei.farzad@gmail.com

**مقدمه**

امروزه باغ بذر گونه‌های جنگلی، سنگ بنای گسترش و بازسازی علمی و عملی جنگل‌ها قلمداد می‌شود و تشکیل باغ بذر برای دستیابی به منبع مطمئن و تکرارپذیر بذر اصلاح‌شدهٔ درختان و درختچه‌های جنگلی، از ضروریات انکارناپذیر است. باغ بذر حلقهٔ اتصال بین جنگلداران از یک طرف و پژوهشگران و به‌نژادگران گونه‌های گیاهی از طرف دیگر محسوب می‌شود. بازسازی جنگل‌ها شاید به‌صورت طبیعی یا مصنوعی صورت گیرد. در بازسازی مصنوعی جنگل‌ها، بذر از توده‌های طبیعی جنگلی، محوطه‌های بذرگیری یا باغ بذر تأمین می‌شود. در تأمین فوری بذر گونه‌های جنگلی، گاهی بذر از تک‌درختانی با ظاهر مناسب یا از توده‌های دارای شرایط عمومی مناسب انتخاب می‌شود. همین امر به‌دلیل یکنواختی و شباهت ژنتیکی بذرهای جمع‌شده، سبب پسروی ژنتیکی جنگل‌های بازسازی‌شده و در نهایت حساس بودن گونه‌های جنگلی به انواع تنش زیستی و غیرزیستی و کاهش عملکرد می‌شود (Tambarussi et al., 2017).

شیردار یا شیرپلت (*Acer cappadocicum* Gled.) نام یک گونه از سرده افرا و از درختان بومی ایران است (Rahimnezhad et al., 2022). تاکنون پژوهش‌های کمی دربارهٔ تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف شیردار صورت گرفته است. جمعیت‌های طبیعی مربوط به جنس *Acer* در جنگل‌های جنوب ایتالیا توسط Guarino et al., (2008) با استفاده از هفت نشانگر مربوط به مکان‌های ژنی ریزماهواره (SSR) گونهٔ *Acer pseudoplatanus* L. در شش گونهٔ *Acer* Ten. *Acer pseudoplatanus*، *Acer campestre* L.، *lobelii* L.، *Acer obtusatum* Ten. و *Acer monspessulanum* L. بررسی شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی گونهٔ *Acer opalus* Mill.، از هشت نشانگر SSR استفاده و در مجموع ۸۷ آلل در یک نمونه مشتمل بر ۱۴۲ فرد از یک جمعیت شناسایی شد. در این آزمایش قابلیت استفاده از این نشانگرها برای گونه‌های دیگر Acerceae نیز بررسی و برای آنها پیشنهاد شد Segarra-Moragues et al., (2008). Baucom et al. (2005) گزارش کردند که عملیات قطع درختان و جنگل‌زدایی به‌طور معنی‌داری موجب کاهش تنوع ژنتیکی و غنای آللی گونهٔ *A. saccharum* Marsall شد. آنها پیشنهاد کردند که قبل از قطع درختان از روش‌های ژنتیکی برای بررسی قرابت ژنتیکی و باقی گذاشتن درختان دارای تنوع ژنتیکی زیاد استفاده شود. در پژوهشی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۱۶ جمعیت ون جمع‌آوری‌شده از لتونی با استفاده از ۶ نشانگر SSR کلروپلاستی و ۶ نشانگر SSR هسته‌ای، Ruņģis et al. (2016) تنوع ژنتیکی زیادی بین جمعیت‌های مورد پژوهش و کارایی زیادی نشانگرهای SSR در تفکیک جمعیت‌های مورد پژوهش را گزارش کردند. در تحقیقی دیگر، Ferrazzini et al (2007) از ۶ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ جمعیت ون در ایتالیا استفاده کردند. در این پژوهش تنوع ژنتیکی زیادی در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده شد. Baliuckas & Pliura(2007) از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی بین ۱۰ جمعیت ون لیتوانی و ۱۴ جمعیت ون اروپای غربی استفاده و تنوع ژنتیکی را در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده کردند.

در سال‌های ۱۳۷۳ تا ۱۳۷۵ طرح پژوهشی تشکیل باغ بذر گونه‌های ون و نمدار توسط Dastmalchi et al. (2013) در ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع چمستان اجرا شد. بذر از پایه‌های نخبهٔ ون و نمدار تهیه و نهال تولید شد. نهال‌ها در سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۷۷ در فاصلهٔ ۳ در ۳ متر در ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع چمستان کاشته شد. همچنین تعدادی از نهال‌های ون پیوند شد و در سال ۱۳۸۷ به عرصه اصلی انتقال یافت و در فواصل ۵ در ۵ متر کاشته شد. در مورد درختان نمدار، به‌رغم پیوند نهال‌ها در نهایت به‌دلیل کافی نبودن نهال‌های پیوندی، باغ بذر پیوندی

احداث نشد. براساس مدارک موجود در پروندۀ طرح، نهال‌ها به‌صورت گروهی و بدون شجره کاشته شدند. زنده‌مانی درختان بذری ون، پیوندی ون و بذر نمدار در دورۀ ۱۶ ساله به‌ترتیب ۱۰۰ ، ۹۱ و ۹۴ درصد بوده است. ضریب قدکشیدگی درختان در نمدار حدود ۸۷، در ون بذری حدود ۹۰ و در ون پیوندی حدود ۸۳ به‌دست آمده است.

با توجه به اهمیت درخت شیردار در جنگل‌های هیرکانی و لزوم ایجاد باغ بذر گونه‌های مهم و همچنین تدوین برنامه‌های توسعه و احیای جنگل‌ها، اجرای چنین پروژه‌هایی برای بررسی تنوع ژنتیکی پایه‌های منتخب شیردار برای تشکیل باغ بذر حائز اهمیت است. بررسی تنوع و قرابت ژنتیکی پایه‌های مادری شیردار که با استفاده از روش‌های مولکولی و نشانگرهای اختصاصی تکرارپذیر SSR انجام‌گرفته معتبرترین و کاراترین ابزار برای تعیین موارد مذکور یا کاشت پایه‌هایی با تنوع زیاد است و مانع پسروی ژنتیکی در تشکیل بذر می‌شود.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق، بذر از ۲۱ پایۀ شیردار دارای فنوتیپ مناسب از دو ناحیۀ کلیج‌کلا و دهمیان در سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری و در سال ۱۳۹۶ کشت شد و در سال ۱۳۹۹ نمونۀ برگی برداشت شد. قطر پایه‌های مادری از ۱۰ تا ۴۸/۵ سانتی‌متر و ارتفاع آنها از ۸ تا ۲۵/۵ متر متغیر بود (جدول ۱). از ۲۱ پایۀ مادری بررسی‌شده، ۱۰ پایه مربوط به کلیج‌کلا و ۱۱ پایه مربوط به دهمیان بودند که پایه‌های P10 و P17 به‌دلیل نزدیکی به یکدیگر با کد مشترک D9 مشخص شدند.

پس از تهیۀ بذر از پایه‌های مورد نظر در پاییز ۱۳۹۸، بذرها در نهالستان در فاصلۀ حدود ۱۵ کیلومتر از منشأ بذر پس از اقداماتی برای شکستن خواب بذر کشت شدند. نهالستان لاجیم در ۳۰ کیلومتری جنوب غربی ساری در مختصات ۵۳ درجه و ۵ دقیقه و ۵۸ ثانیۀ طول شرقی و ۳۶ درجه و ۱۵ دقیقه و ۳۵ ثانیۀ عرض شمالی در ارتفاع ۶۷۲ متر از سطح دریا قرار دارد. از ابتدای سال ۱۳۹۹ به‌صورت هفتگی نهال‌ها بازدید شدند. وجین علف‌های هرز و آبیاری طبق روال معمول نهالستان انجام گرفت. برای بررسی‌های مولکولی در اواسط بهار ۱۳۹۹ از هر یک از کرت‌های مورد نظر از چهار نهال نمونۀ برگ تازه تشکیل‌شده تهیه شده و در تانک ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شد.

نمونه‌های برگی حاصل از بذرهای پایه‌های مادری انتخاب و پس از انجماد در ازت مایع، به فریزر ۸۰ – درجۀ سانتی‌گراد منتقل شد و استخراج DNA به روشCTAB Saghai-Maroof et al. (1984) انجام گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین شد. پس از تعیین کمیت نمونه‌ها، از ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل یک چرخۀ واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجۀ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجۀ سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۶۰ -۵۰ درجۀ سانتی‌گراد بسته به آغازگر به‌مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجۀ سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخۀ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجۀ سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه بود.

### آغازگرهای ریزماهواره

در این بررسی از ۱۵ جفت آغازگر ریزماهواره برای غربال ۲۱ پایۀ منتخب شیردار استفاده شد. اسامی و توالی این آغازگرها در جدول ۲ آمده است.

### الکتروفورز محصولات PCR

برای تفکیک قطعات تکثیرشده از دستگاه الکتروفورز افقی شرکت Bio-rad با ژل آگارز ۳ درصد استفاده شد. برای تعیین اندازۀ نسبی قطعات تکثیرشده، در چاهک‌های ابتدا و انتهای ژل، نشانگر وزن مولکولی بارگذاری شد. مدت زمان الکتروفورز، بسته به اندازۀ قطعات تکثیری بین ۶۰ تا ۹۰ دقیقه

متغیر بود. رنگ‌آمیزی ژل آگارز با Safe stain شرکت سیناکلون انجام گرفت. با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز، هیچ تفکیکی بین قطعات تکثیرشده در بین افراد مشاهده نشد که دلیل آن، تفاوت طول قطعات در تعداد کم نوکلئوتید بود. در نتیجه برای تفکیک بهتر قطعات از ژل پلی‌آکریلامید ۰/۸ درصد دستگاه الکتروفورز عمودی Bio-rad مدل Sequi-Gene GT استفاده شد که قدرت تفکیک بیشتری از آگارز دارد. در این روش از نیترات نقره برای رنگ‌آمیزی قطعات استفاده شد.

جدول ۱- اطلاعات کمی و کیفی پایه‌های مادری شیردار

Table 1. Quantitative data and geographical coordinates of *Acer cappadocicum* maternal tree

| مقدار بذر(زیاد، متوسط، کم) Seed amount (High, Medium, Low) | دوشاخه Branch | ارتفاع (متر) Altitude (m) | قطر درخت (سانتیمتر) Diameter (cm) | جهت** Direction | منطقه* Zone |
|---|---|---|---|---|---|
| زیاد High | 3.5 | 18 | 27 | SE | D1 |
| زیاد High | - | 17.5 | 29 | NW | D2 |
| زیاد High | - | 25 | 22 | NE | D3 |
| زیاد High | - | 18.2 | 34 | NE | D4 |
| زیاد High | 8 | 16 | 25.5 | N | D5 |
| زیاد High | - | 11.5 | 22 | NE | D7 |
| زیاد High | - | 14.5 | 23 | NE | D8 |
| زیاد High | 3 | 18.5 | 29.3 | NW | D9 |
| زیاد High | - | 21 | 48 | NE | D10 |
| زیاد High | - | 8.5 | 12 | SE | D11 |
| زیاد High | - | 19.2 | 20 | N | D9 |
| زیاد High | 3.5 | 25.5 | 38.22 | SE | K1 |
| زیاد High | 10 | 21 | 33 | SE | K2 |
| زیاد High | - | 22 | 48.5 | NE | K3 |
| زیاد High | - | 14 | 25 | NE | K4 |
| زیاد High | - | 19.7 | 34 | NE | K5 |
| زیاد High | - | 21.5 | 26 | N | K6 |
| زیاد High | - | 8 | 10 | SE | K7 |
| زیاد High | 1 | 19 | 27.7 | SE | K8 |
| زیاد High | - | 23 | 35.1 | SE | K9 |
| متوسط Medium | - | 14.7 | 21.5 | SE | K10 |

* K: کلیج‌کلا، D: دهمیان؛ **: W شمال‌غربی، : NEشمال‌شرقی، : SWجنوب‌غربی، : Nشمالی.

جدول ۲- اسامی، توالی آغازگرهای مستقیم و معکوس و دمای اتصال آغازگرها
Table 2. Microsatellite names, sequences, and annealing temperatures

| آغازگر Primer | توالی آغازگر مستقیم Forward primer sequence | توالی آغازگر معکوس Reverse primer sequence | دمای اتصال Annealing temperature |
|---|---|---|---|
| AC1 | GGAAATCGCTAAATGTCTACAAAG | GGCAATATGAGTTCAATG | 50 |
| AC2 | AATATCACCTCACGTCTT | ATAACAGTTCACAGCACA | 50 |
| AC3 | CACGCTTCTGTATTCTTT | CCTACGCAATGTGCTCTA | 50 |
| AC4 | TAGGACCTCATACCTCTTAC | CAAATACGAAAACATACG | 50 |
| AC5 | ATCCAGGAGAAGAATAGG | TAAGAGCAAGAGCGAAAG | 50 |
| AC6 | CTCACCCTTCCATATTCT | AACCGTTTCAAGTTCTAG | 50 |
| AC7 | CTTCCATCAAAATCCTAACACTGCA | GCTCCCTCTGGTTCCAAT | 53 |
| AC8 | ATCCGTCAACCGTATCAAGTTCTAG | CCATTCTCACCCTTCCAT | 53 |
| AC9 | GAGTAAAATCAGTTGGTGTCA | AGGAAATAAGGAAGCAGT | 56 |
| AC10 | AGTCTGATCTGTCATGGGCTC | TGCTGGAAAGTGGAACCTGT | 56 |
| AC11 | CAGGCCTGCCCAGAAACTAA | AACGGATGGCAAGCTAGCTT | 55 |
| AC12 | TGCACATGGGATGATGATCAGT | TGGTGGGTAGCAGCAAAAGA | 58 |
| AC13 | CACCACCCAACCCTTTTCCT | AAGCTGAGAAACCCAAAGCA | 58 |
| AC14 | ACAAGTCGAACAACCCGTTG | TGCAACTGTTGAGTGGTGGA | 55 |
| AC15 | AAAACCCAATTCGCCACGTG | TTGACGGAGAGCTTGGTTCC | 55 |

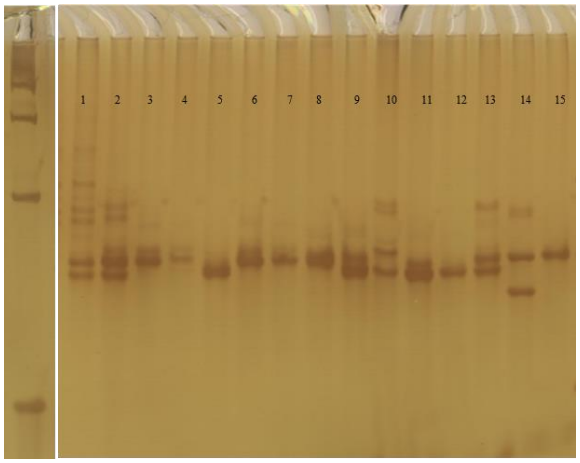
**امتیازدهی مولکولی ژنوتیپ‌ها و تجزیهٔ داده‌ها**

الگوی نواری نشانگرهای ریزماهواره به‌صورت صفر و یک امتیازدهی شد. مشخصات آللی نشانگرهای تکثیرشده و همچنین شاخص‌های ژنتیکی با نرم‌افزار GenALEx محاسبه شد و ماتریس تشابه ضرایب جاکارد و خوشه‌بندی ۲۱ پایهٔ منتخب با روش UPGMAبا نرم‌افزار NTSYS10 e.2 انجام گرفت و پس از خوشه‌بندی پایه‌های مختلف، تنوع ژنتیکی بین پایه‌های مختلف بررسی و نتیجه‌گیری شد.

## نتایج

براساس نتایج اسپکتروفتومتری، کمیت DNA نمونه‌های استخراجی در وضعیت مطلوبی قرار داشت (میانگین ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر). همچنین کیفیت DNAهای استخراجی نیز در محدودهٔ ۱/۵ (برای نسبت ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر) و ۱/۷۱ (برای نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) قرار داشت که نشان از کمیت و کیفیت مناسب DNA استخراجی دارد. با توجه به اینکه ژل آگارز ۳ درصد توانایی تفکیک قطعات تکثیری در بین ۲۱ پایهٔ منتخب را نداشت، از ژل پلی‌آکریلامید ۸ درصد برای تفکیک مجدد محصولات PCR استفاده شد که نمونه‌ای از آن در شکل ۱ آمده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از الکتروفورز عمودی محصولات PCR، از ۱۵ آغازگر SSR، در ۱۵ مکان SSR تکثیر قطعه صورت گرفت. در مجموع برای ۱۵ جفت آغازگر SSR، ۶۳ آلل چندشکل در ۲۱ پایهٔ منتخب شیردار شناسایی شد. به‌طور میانگین ۴/۲ آلل چندشکل برای هر نشانگر SSR شناسایی شد. پس از امتیازدهی قطعات تکثیرشده، ماتریس ضرایب تشابه جاکارد محاسبه شد.

بیشترین مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جمعیت دهمیان و کمترین مقادیر برای کلیج‌کلا برآورد شدند (جدول ۳). هتروزیگوسیتی (H) بین ۰/۲۳ (جمعیت دهمیان) و ۰/۱۶ (جمعیت کلیج‌کلا) متغیر بود (میانگین = ۰/۲؛ جدول ۳). این دو جمعیت (دهمیان و کلیج‌کلا) به‌ترتیب بیشترین (۱/۳۸) و کمترین (۱/۰۸) مقدار ضریب شانون را نیز نشان دادند. با وجود این، تفاوت ژنتیکی بسیار چشمگیری میان این دو جمعیت مشاهده نشد (جدول ۴) که ممکن است به‌دلیل اختلاط ژنتیکی این دو جمعیت در طول سال‌های متمادی یا دارا بودن منشأ مشترک این جمعیت‌ها باشد. با در نظر گرفتن دو جمعیت دهمیان با ۱۱ ژنوتیپ و کلیج‌کلا با ۱۰ ژنوتیپ، تجزیهٔ واریانس مولکولی انجام گرفت. تنوع ژنتیکی بین دو جمعیت ۷ درصد از تنوع ژنتیکی کل ارزیابی شد و ۹۳ درصد مربوط به تنوع درون‌جمعیتی بود.




شکل ۱- نمونه‌ای از ژل پلی‌آکریلامید ۸ درصد قطعات تکثیری با نشانگر AC9
Figure 1. Amplified fragments in 8% polyacrylamide gel for AC9

جدول ۳- نتایج تجزیهٔ واریانس مولکولی روی جمعیت‌های پایه‌های مادری شیردار
Table 3. Results of AMOVA analysis of *Acer cappadocicum* maternal tree

| منبع تغییرات<br>Source of variance | درجهٔ آزادی<br>Degree of freedom | میانگین مربعات<br>Mean of Squares | سطح معنی‌داری<br>P-value |
|---|---|---|---|
| بین جمعیت‌ها<br>Between Pops | 1 | 16.637 | 0.0001 |
| درون جمعیت‌ها<br>Within Pops | 19 | 9.104 | 0.0001 |
| جمع<br>Total | 20 | | |

میزان شباهت ژنتیکی جاکارد در بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۰۰۱ تا ۰/۵۲ متغیر بود که نشان‌دهندهٔ شباهت کم پایه‌ها در داخل هر کدام از گروه‌ها بود (جدول ۵). تجزیهٔ خوشه‌ای براساس روش UPGMA و ماتریس فاصلهٔ ژنتیکی جاکارد انجام گرفت (شکل ۲). نتایج نشان داد که با استفاده از اطلاعات حاصل از آغازگرهای ریزماهوارهٔ به‌کاررفته در این تحقیق، با اینکه بسیاری از پایه‌های مربوط به جمعیت‌های کلیج‌کلا و دهمیان در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند، پایه‌های کلیج‌کلا به‌طور کامل از پایه‌های دهمیان تفکیک نشدند. البته پایه‌های کلیج‌کلا و دهمیان از درختان مربوط به یک ناحیه‌اند، از این‌رو امکان اختلاط ژنتیکی آنها یا پایه‌های مادری آنها از طریق انتقال گرده دور از انتظار نیست. تجزیه به مختصات اصلی انجام گرفت و محور اول با مقدار مشخصهٔ[1] ۵/۸ با ۱۳/۶ درصد تبیین واریانس و محور دوم با مقدار مشخصهٔ ۴/۸ با ۱۱/۵ درصد تبیین واریانس رسم شد (شکل ۳). با توجه به اینکه در تجزیه به مختصات اصلی ۲۵/۰۶ درصد از تغییرات و اطلاعات نشانگری، گروه‌بندی را انجام می‌دهد، ناهمسویی نتایج تجزیهٔ کلاسته با تجزیه به مختصات اصلی دور از انتظار نیست.

پس از محاسبه و تشکیل ماتریس ضرایب تشابه (جدول ۵)، خوشه‌بندی ۲۱ پایهٔ منتخب شیردار با روش UPGMA صورت گرفت که نتایج آن در شکل ۳ آورده شده است. با در نظر گرفتن ضریب تشابه ۰/۸۰، سه خوشهٔ اصلی تشکیل شده است. در خوشهٔ I پایه‌های دهمیان ۸ ، دهمیان ۱۰ ، کلیج‌کلا ۵ ، دهمیان ۲ ، کلیج‌کلا ۳ ، دهمیان ۴، دهمیان ۳،

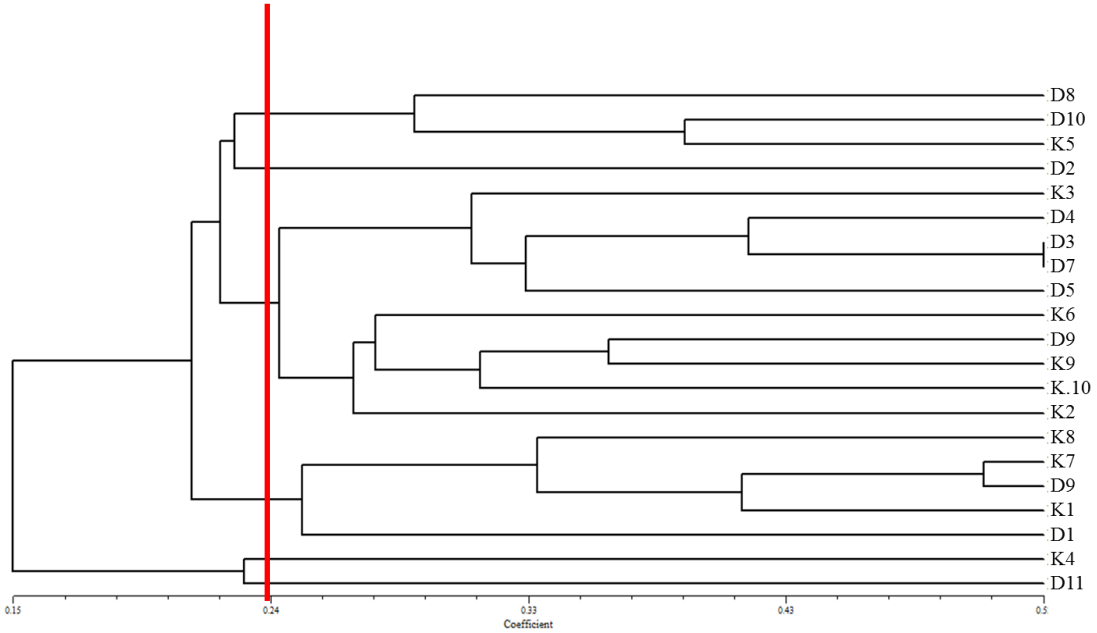
1. Eigen value

دهمیان ۷، دهمیان ۵، کلیج‌کلا ۶، دهمیان ۹، کلیج‌کلا ۹، کلیج‌کلا ۱۰، کلیج‌کلا ۲؛ در خوشهٔ II پایه‌های کلیج‌کلا ۸، کلیج‌کلا ۷، دهمیان ۹، کلیج‌کلا ۱، دهمیان ۱؛ و در خوشهٔ III پایه‌های کلیج‌کلا ۴ و دهمیان ۱۱ قرار گرفته‌اند. تا به حال پژوهش تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های شیردار با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام نگرفته و پژوهش‌های صورت‌گرفته دربارهٔ گونه‌های داخل جنس Acer بوده است.

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی جمعیت‌های کلیج‌کلا و دهمیان شیردار

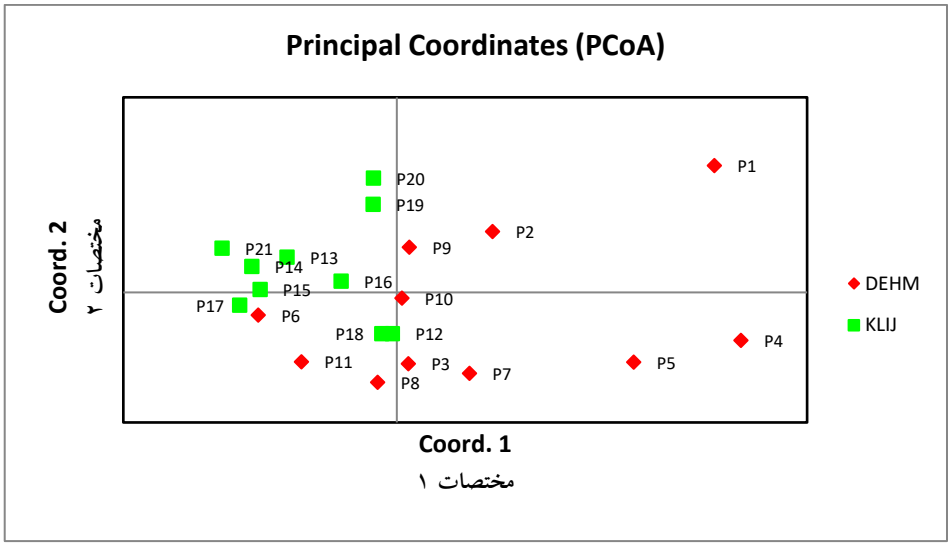
Table 4. Genetic diversity indices of *Acer cappadocicum* maternal trees

| Pop | | تعداد افراد Number of individual (N) | تعداد آلل number of alleles (Na) | تعداد آلل مؤثر Effective number of alleles (Ne) | ضریب شانون Shannon diversity index (I) | هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity (He) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DEHM | Mean | 11 | 1.810 | 1.346 | 0.364 | 0.226 |
| | SE | 0 | 0.075 | 0.036 | 0.025 | 0.019 |
| KLIJ | Mean | 10 | 1.365 | 1.230 | 0.261 | 0.158 |
| | SE | 0 | 0.118 | 0.032 | 0.027 | 0.018 |
| Total | Mean | 10.50 | 1.587 | 1.288 | 0.312 | 0.192 |
| | SE | 0.045 | 0.072 | 0.025 | 0.019 | 0.013 |




شکل ۲- خوشه‌بندی پایه‌های منتخب شیردار با روش UPGMA

Figure 3. UPGMA technique for clustering among *Acer cappadocicum* maternal trees




شکل ۳- پراکنش پایه‌های مادری شیردار روی دو محور مختصات اصلی

Figure 4. Principal coordinate analysis of *Acer cappadocicum* maternal trees distribution based on first two main components

جدول ۵- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بین پایه‌های منتخب شیردار

Table 5. Jaccard's similarity coefficient matrix between *Acer cappadocicum* maternal trees

| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D7 | D8 | D9 | D9 | D10 | D11 | K1 | K2 | K3 | K4 | K5 | K6 | K7 | K8 | K9 | K10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| D1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D2 | 0.27 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D3 | 0.22 | 0.22 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D4 | 0.37 | 0.28 | 0.34 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D5 | 0.3 | 0.2 | 0.25 | 0.48 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D7 | 0.03 | 0.15 | 0.16 | 0.12 | 0.09 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | |
| D8 | 0.21 | 0.17 | 0.33 | 0.34 | 0.52 | 0.13 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| D9 | 0.17 | 0.12 | 0.32 | 0.33 | 0.28 | 0.12 | 0.38 | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| D9 | 0.25 | 0.25 | 0.27 | 0.25 | 0.25 | 0.1 | 0.26 | 0.13 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| D10 | 0.26 | 0.32 | 0.29 | 0.27 | 0.31 | 0.17 | 0.34 | 0.23 | 0.3 | 1 | | | | | | | | | | | |
| D11 | 0.14 | 0.17 | 0.28 | 0.14 | 0.29 | 0.06 | 0.33 | 0.31 | 0.22 | 0.34 | 1 | | | | | | | | | | |
| K1 | 0.23 | 0.12 | 0.25 | 0.2 | 0.27 | 0.05 | 0.2 | 0.14 | 0.25 | 0.32 | 0.3 | 1 | | | | | | | | | |
| K2 | 0.25 | 0.22 | 0.19 | 0.18 | 0.21 | 0.23 | 0.17 | 0.21 | 0.28 | 0.36 | 0.28 | 0.2 | 1 | | | | | | | | |
| K3 | 0.15 | 0.24 | 0.26 | 0.2 | 0.18 | 0.16 | 0.19 | 0.23 | 0.25 | 0.33 | 0.19 | 0.17 | 0.26 | 1 | | | | | | | |
| K4 | 0.2 | 0.11 | 0.22 | 0.21 | 0.2 | 0.2 | 0.121 | 0.26 | 0.21 | 0.3 | 0.21 | 0.19 | 0.37 | 0.33 | 1 | | | | | | |
| K5 | 0.25 | 0.17 | 0.29 | 0.35 | 0.21 | 0.14 | 0.22 | 0.27 | 0.18 | 0.25 | 0.22 | 0.2 | 0.36 | 0.26 | 0.46 | 1 | | | | | |
| K6 | 0.1 | 0.13 | 0.26 | 0.19 | 0.17 | 0.28 | 0.26 | 0.23 | 0.19 | 0.21 | 0.17 | 0.15 | 0.26 | 0.42 | 0.5 | 0.35 | 1 | | | | |
| K7 | 0.11 | 0.22 | 0.29 | 0.26 | 0.21 | 0.23 | 0.17 | 0.12 | 0.1 | 0.25 | 0.08 | 0.2 | 0.23 | 0.14 | 0.1 | 0.23 | 0.11 | 1 | | | |
| K8 | 0.3 | 0.22 | 0.19 | 0.22 | 0.25 | 0.06 | 0.22 | 0.12 | 0.28 | 0.3 | 0.17 | 0.16 | 0.36 | 0.26 | 0.22 | 0.3 | 0.18 | 0.23 | 1 | | |
| K9 | 0.28 | 0.18 | 0.19 | 0.22 | 0.25 | 0.04 | 0.22 | 0.21 | 0.22 | 0.24 | 0.13 | 0.12 | 0.18 | 0.3 | 0.16 | 0.28 | 0.19 | 0.1 | 0.39 | 1 | |
| K10 | 0.12 | 0.07 | 0.17 | 0.09 | 0.15 | 0.001 | 0.15 | 0.14 | 0.16 | 0.08 | 0.15 | 0.08 | 0.15 | 0.25 | 0.28 | 0.22 | 0.25 | 0.0001 | 0.22 | 0.33 | 1 |

## بحث

نواحی ریزماهواره در ژنوم با توجه به فراوانی و وراثت همبارز (co-dominant)، نشانگرهای مولکولی قدرتمندی بوده و کاربرد گسترده‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی و جریان ژن در درون و بین جمعیت ارگانیسم‌های مدل و غیرمدل دارند (Imani rastabi et al., 2023; Yang et al., 2015; Nybom, 2004). افزون‌بر این، برای پژوهش‌های جریان ژنی معاصر که با واسطهٔ گرده و دانه‌ها انجام می‌گیرد، ریزماهواره‌های چندشکلی را می‌توان برای تخمین‌های تصفیه‌شدهٔ خویشاوندی و نسب به‌کار برد (Yang et al., 2015). در سال‌های اخیر، با ظهور فناوری‌های توالی‌یابی نسل بعدی، روش‌های توسعه و توصیف SSRها بهبود چشمگیری یافته است. برای مثال Lance et al. (2013) تعداد زیادی مکان SSR را در دامنهٔ وسیعی از گونه‌ها براساس توالی‌یابی NGS، و Moriguchi et al. (2016) با استفاده از فناوری توالی‌یابی Illumina، ۴۴ نشانگر ریزماهواره‌ای را برای *Neolitsea sericea* (Blume) Koidz برای پژوهش‌های ژنتیکی جمعیت و پایهٔ مادری جنگل‌های ساحلی ژاپن ایجاد کرده‌اند. افزون‌بر این، تقویت متقابل، راهبردی جایگزین برای گسترش استفاده از ریزماهواره‌هاست (Gautschi et al., 2000). در پژوهشی، ۱۱ ریزماهواره از ۲۱ ریزماهوارهٔ چندشکلی

*Acer davidii* Franchi با موفقیت تکثیر شدند و پلی‌مورفیسم‌ها را در یک جمعیت از *Acer morrisonense* Hayata نشان دادند. این نشانگرها برای تعیین بیشتر تاریخچهٔ تکامل، جریان ژن و ساختار ژنتیکی جمعیت برای دو گونه افرا بسیار مفید خواهند بود (He et al., 2017).

تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت در داخل و بین جمعیت‌ها محصول تاریخی فرایند تکاملی بلندمدت است (Hamrick & Godt, 1990). افزون‌بر این، سطح و الگوی تنوع ژنتیکی گونه‌های فعلی ارتباط نزدیکی با توانایی‌های بقا و امکانات سازگاری آنها دارد (Hamrick & Godt, 1996). در پژوهشی روی ژنوتیپ‌های توتون در کشورهای مختلف با استفاده از ۷۲ نشانگر، در کل ۱۰۳۱ آلل با میانگین ۱۴/۷ آلل برای هر نشانگر شناسایی شد و بسیاری از ژنوتیپ‌های دارای منشأ جغرافیایی یکسان در گروه‌های مشترک قرار گرفتند با این‌حال تنوع درون‌جمعیتی در تجزیهٔ واریانس مولکولی ۹۲/۱۸ درصد محاسبه شد (Moon et al., 2009). در پژوهش دیگری دربارهٔ بررسی ساختار جمعیت گونه‌های *Acer davidii* و *Acer morrisonense* با استفاده از نشانگرهای SSR، تجزیهٔ AMOVA نشان داد که بیشتر تغییرات و تنوع در بین افراد درون جمعیت و درون افراد رخ داده است (He et al., 2017). تنوع ژنتیکی زیاد در درون جمعیت نشان‌دهندهٔ وجود فواصل ژنتیکی زیاد بین افراد درون جمعیت در مکان‌های ژنی تکثیر یافته است که بیانگر غیریکنواختی درون جمعیت است. به‌طور کلی غیریکنواختی زیاد در درون جمعیت ممکن است دلایل متعددی مانند ماهیت چندپلوئیدی، دگرگشنی، تلاقی‌های مختلف بین پایه‌های مختلف و غیره داشته باشد. در اینجا می‌توان دلیل احتمالی تنوع در درون جمعیت‌های مذکور را تلاقی پایه‌های مختلف و اندازهٔ کوچک جمعیت‌های تحت بررسی ذکر کرد.

در تحقیق در زمینهٔ تنوع ژنتیکی گونه‌های Acer با استفاده از صفات مورفولوژیک و داده‌های مولکولی حاصل از نشانگرهای مولکولی ITS و SSR، Nikzat-Siahkolaee et al. (2021) با استفاده از توالی ITS و ISSR گونه‌های مختلف *Acer* در جنگل‌های هیرکانی را گروه‌بندی کرده و کارایی زیاد این نشانگرها را بیان کردند. توالی‌های DNA مانند ITS[1] و DNA کلروپلاستی برای تعیین تنوع درون‌جنسی گونه‌های *Acer* نظیر *A. pictum*، *A. velutinum Boiss*، *A. campestre* L استفاده شده است (Grimm & Thomas, 2014; Siahkolaee et al., 2017). به‌صورت ایدئال گروه‌بندی گونه‌ها نباید براساس صفات کیفی صورت گیرد و اغلب بررسی تاکسونومیکی و شواهد مولکولی تنوع ژنتیکی باید مدنظر قرار گیرد (Grimm & Thomas, 2014).

در ایران علی‌رغم گذشت بیش از ۵۰ سال از سابقهٔ سازمان جنگل‌ها، مراتع و آبخیزداری هنوز منبع اصلی تأمین بذر با ابهاماتی روبه‌رو است. انگشت‌شمار باغ‌بذرهایی در ناحیهٔ هیرکانی ایجاد شده، ولی هنوز از بذر آنها استفاده نمی‌شود. Ruņģis et al. (2016) پژوهشی 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 دادند و به این نتیجه رسیدند که تنوع ژنتیکی زیادی بین جمعیت‌های مورد پژوهش وجود دارد و نشانگرهای SSR در تفکیک جمعیت‌های مورد پژوهش، کارایی زیادی دارند که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. در تحقیقی دیگر، Ferrazzini et al. (2007) از ۶ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۱ جمعیت ون در ایتالیا استفاده کردند. در این پژوهش تنوع ژنتیکی زیادی در بین جمعیت‌های مختلف مشاهده شد که از نظر کارایی زیاد نشانگر ریزماهواره با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. Pliura & Baliuckas (2007) از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع

1. Internal transcribed spacer

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

## نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه در خوشهٔ I اغلب، پایه‌های مربوط به جمعیت دهمیان دسته‌بندی شدند، در کنار اینها پایه‌های کلیج‌کلا ۲، کلیج‌کلا ۳، کلیج‌کلا ۵، کلیج‌کلا ۶، کلیج‌کلا ۹، کلیج‌کلا ۱۰ نیز قرار گرفتند؛ زیرا احتمال اختلاط جمعیتی در گذشته بین این پایه و پایه‌های مستقر در دهمیان وجود دارد که سبب شباهت ژنتیکی زیاد اینها شده است. در خوشهٔ II، پایه‌های مربوط به جمعیت کلیج‌کلا دسته‌بندی شدند که دهمیان ۹ شباهت زیادی به این جمعیت نشان داد. در تجزیه به مختصات اصلی، پایه‌ها براساس دو مشخصه تمایز یافته‌اند، که این دو مشخصه بیشترین میزان تبیین از تنوع ژنتیکی را در این منشأ جمعیتی داشتند. پایه‌های با تشابه زیاد مانند کلیج‌کلا ۳، ۵ و ۷ و از طرفی دهمیان ۹ و کلیج‌کلا ۷ مشاهده شد. برای احداث باغ بذر باید همهٔ اینها را کنار گذاشت و تنها یکی را براساس ویژگی‌های مورفولوژیک انتخاب کرد. جالب اینکه در دو پایهٔ نزدیک به هم که در منطقهٔ دهمیان نزدیک به هم قرار داشتند (به همین دلیل هر دو دهمیان ۹ کددهی شدند) فاصلهٔ ژنتیکی به اندازه‌ای بود که در دو دستهٔ متفاوت قرار گرفتند که ممکن است به‌دلیل جابه‌جایی بذر توسط عوامل زنده یا غیرزنده باشد. از نتایج این پژوهش می‌توان برای مدیریت پایه‌های کشت‌شده در باغ بذر و فواصل کاشت پایه استفاده کرد.

## سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی مؤسسهٔ تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور برگرفته از طرح ۹۸۰۶۵۵-۰۹۵۵۳-۰۲۷-۰۹-۱۲ انجام گرفت که نویسندگان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## References

Baucom, R.S., Estill, J.C., & Cruzan, M.B. (2005). The effect of deforestation on the genetic diversity and structure in *Acer saccharum* (Marsh): evidence for the loss and restructuring of genetic variation in a natural system. *Conservation genetics*, *6*(1), 39-50.

Dastmalchi, M., Ebrahimi, E., Zabihi, K., Mokhtari, J., & Khornkeh, S. (2013). Seed orchard establishment of *Fraxinus excelsior* and *Tilia platyphyllos* in Chamestan-Nour. Research report. Research Institute of Forests and Rangelands. (In Persian)

Ferrazzini. D., Monteleone, I., & Belletti, P. (2007). Genetic variability and divergence among Italian populations of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Annals of Forest Science, 64*, 159–168. https://doi.org/ 10.1051/forest:2006100

Gautschi, B., Widmer, A., & Koella, J. (2000). Isolation and characterization of microsatellite loci in the dice snake (*Natrix tessellata*). *Molecular Ecology*, *9*(12), 2192-2193.

Grimm, G.W., & Thomas, D. (2014). The Colchic region as refuge for relict tree lineages: cryptic speciation in feld maples. *Turkish Journal of Botany, 38*, 1050–1066. https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.105320.x

Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., Cipriani, G. and Testolin, R., (2008). Differentiation in DNA fingerprinting among species of the genus Acer L. in Campania (Italy). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, *142*(3), 454-461. https://doi.org/10.1080/11263500802410785

Hamrick, J.L., & Godt, M.W., (1990). Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, 43-63pp.

Hamrick, J.L., & Godt, M.W., (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *351*(1345), 1291-1298. https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0112

He, Y.L., He, Y., Gong, L.L., Fang, M.F., & Li, Z.H. (2017). Population genetic structure and interspecific differentiation between *Acer davidii* Franchi. and *A. morrisonense* Hayata (*Aceraceae*) based on SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, *71*, 42-49. https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.01.009

Imani rastabi, M., Jalilvand, H., Fallah, A., & Shahin Kaleybar, B. (2023). Genetic diversity of *Parrotia persica* (DC) C.A. Meyer in Hyrcanian forests, *Iranian Journal of Forest*, *15*, 313-27. https://doi.org/10.22034/IJF.2023.330465.1858. (In Persian)

Lance, S.L., Love, C.N., Nunziata, S.O., O'Bryhim, J.R., Scott, D.E., Flynn, R.W., & Jones, K.L. (2013). 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. *PloS one*, *8*(11), 81853. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081853

Moon, H.S., Nifong, J.M., Nicholson, J.S., Heineman, A., Lion, K., Van der Hoeven, R., Hayes, A.J., & Lewis, R.S. (2009). Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources. *Crop Science*, *49*(6), 2149-2159. https://doi.org/10.2135/cropsci2009.01.0024

Moriguchi, Y., Yamanaka, H., Ohdan, T., & Fuji, S.I. (2016). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for N *eolitsea sericea* using I llumina paired-end draft sequencing data. *Plant Species Biology*, *31*(2), 163-166. https://doi.org/10.1111/1442-1984.12097

Nikzat-Siahkolaee, S., Sheidai, M., Assadi, M., Noormohammadi, Z., & Ghasemzadeh-Baraki, S. (2021). Infra-specific variation of *Acer cappadocicum* (*Sapindaceae*): morphological and molecular approaches. *Brazilian Journal of Botany*, *44*, 149-163. https://doi.org/10.1007/s40415-020-00692-7

Nybom, H., (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, *13*(5), 1143-1155. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x

Pliura, A.L., & Baliuckas, V.I. (2007). Genetic variation in adaptive traits of progenies of Lithuanian and western European populations of *Fraxinus excelsior* L. *Baltic Forestry*, *13*(1), 28-38.

Rahimnezhad, S., Hojati, S.M., Asadi, H., Jalilvand, H., & Mahmoudi, M. (2022). Effect of different soil amendments on morphological and physiological traits of one-year-old seedlings of ash (*Fraxinus excelsior* L.) and coliseum maple (*Acer cappadocicum* Gled.). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 30*, 119-34. (In Persian)

Ruņģis, D., Korica, A., Gailīte, A., Pušpure, I., & Veinberga, I. (2016) Analysis of the genetic diversity and population structure of Latvian ash (*Fraxinus excelsior* L.) stands using nuclear and chloroplast SSR markers. *Proceedings of the latvian academy of sciences. Section B. Natural, exact, and applied sciences*, *70*(3), 101–108. https://doi.org/10.1515/prolas-2016-0017

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*, 8014-8018. https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014

Segarra-Moragues, J.G., Gleiser, G., & González-Candelas, F. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acer opalus* (*Aceraceae*), a sexually-polymorphic tree, through an enriched genomic library. *Conservation Genetics*, *9*: 1059-1062. https://doi.org/10.1007/s10592-007-9451-7

Siahkolaee, S.N., Sheidai, M., Assadi, M., & Noormohammadi, Z. (2017). Do we have different varieties in *Acer velutinum* (*Sapindaceae*): morphological and molecular studies. *Phytotaxa, 321*, 151–165. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.321.2.1

Tambarussi, E.V., Boshier, D., Vencovsky, R., Freitas, M.L.M., & Sebbenn, A.M. (2017). Inbreeding depression from selfing and mating between relatives in the Neotropical tree Cariniana legalis Mart. Kuntze. *Conservation Genetics*, *18*, 225-234. https://doi.org/10.1007/s10592-016-0896-4

Yang, J., Zhao, L.L., Yang, J.B., & Sun, W.B. (2015). Genetic diversity and conservation evaluation of a critically endangered endemic maple, *Acer yangbiense*, analyzed using microsatellite markers. *Biochemical systematics and ecology*, *60*, 193-198. https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.04.027

Iranian Journal of Forest
Vol. 16, No. 4, Winter 2025
pp. 489-501
***Research Article***

DOI: 10.22034/ijf.2024.428309.1956
CC BY 4.0

# Assessment of genetic diversity among *Acer cappadocicum* Gled. Elite genotypes using Molecular markers for seed orchard formation

**F. Banaei-Asl[1*] and Y. Mohammadi[1]**

[1]Assistant Prof., Dept. of biotechnology, Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research,Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I. R. Iran.

(Received: 3 December 2023; Accepted: 18 February 2023)

## Abstract

**Introduction:** Establishing a seed orchard not only ensures the supply of reproducible seeds and high-quality seedlings but also plays a crucial role in providing sufficient genetic diversity for future research. *Acer cappadocicum* Gled., known as Cappadocian Maple, is a native tree in Iran and an important species in the Hyrcanian forests. This study evaluated the genetic distances of maternal bases of Cappadocian Maple planted for the purpose of establishing a seed orchard. The main goal of this research was to avoid inbreeding depression and genetic uniformity in the population derived from these maternal bases.

**Material and Methods:** The number of 21 maternal trees with suitable phenotypes was identified in two populations in a forest with an approximate area of 100,000 hectares and seeds were collected and transformed into seedlings. The DNA was extracted using a modified CTAB technique, and the polymerase chain reaction was carried out with SSR markers. The amplified markers, genetic indices, the similarity matrix of Jaccard coefficients, and the cluster analysis of 21 chosen trees, were performed using the UPGMA. To produce seedlings and transfer them to the Maple seed orchard, 21 maternal bases with suitable phenotypes were identified from three populations in a forest area with area of approximately 100,000 hectares. Seeds were collected from these bases, converted into seedlings, and leaf samples were collected. After DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) was performed using SSR markers to amplify DNA bands. According to the results, amplification occurred at 15 SSR loci.

**Results:** For 15 SSR markers, 63 polymorphic alleles were identified in 21 selected genotypes for 15 pairs of SSR primers. The highest genetic diversity indices were estimated for the Dahmian population and the lowest for the Kilijkola population. Heterozygosity (H) varied between 0.23 (Dahmian population) and 0.16 (Kilijkola population). In addition, these two populations (Dahmian and Kilijkola) showed the highest (1.38) and the lowest (1.08) Shannon coefficient, respectively. The Jaccard genetic similarity between genotypes ranged from 0.001 to 0.52, indicating the low similarity of trees within each of the groups. Therefore, selection for seed collection should be from bases with less genetic affinity that are placed in separate clusters to prevent genetic regression.

**Conclusion:** In this study the genetic diversity of two populations, the molecular markers used were highly efficient in distinguishing maternal trees. The genetic diversity between the two populations was less than the genetic diversity within both populations. However, the genetic distances were calculated based on the relevant criteria, and considering the similarity coefficient, maternal trees were placed in three main clades. Trees with high similarity such as KilijKala 3, 7, and 5, as well as Dahmian 9 and Kilijkola 7 were observed. Finally, the information obtained from this research was used to manage the planted bases in the seed orchard, arranging the bases, and avoiding planting bases with high genetic affinity next to each other to prevent inbreeding depression.

**Keywords:** Genetic diversity, Maple, Molecular markers, Seed orchard.

[*]Corresponding author Tel: +98 2144787583 Email: banaei.farzad@gmail.com