



بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ارس (*Juniperus excelsa* M. Bieb.) در اردبیل با نشانگرهای SCoT

یوسف محمدی^{۱*}، محمدرضا مشایخی^۲ و شیوا قیطران پور سهریق^۳

^۱استادیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

^۲استادیار، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

^۳دکتری اصلاح نباتات، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵)

چکیده

مقدمه: درخت ارس از مهم‌ترین گونه‌های درختی جنگل‌های جنوب اردبیل است و کارکرد مهمی در برنامه‌های جنگلکاری استان دارد. تأمین بذر و نهال استاندارد از مهم‌ترین دغدغه‌های مدیران منابع طبیعی است. محوطه‌های بذری به همراه باغ بذر از مهم‌ترین منابع پایدار تأمین بذر و نهال درختان و درختچه‌های جنگلی به‌شمار می‌روند. هدف این پژوهش، ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی محوطه‌های بذری ارس در استان اردبیل است. **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق تنوع ژنتیکی درون و بین پنج جمعیت مختلف ارس شامل ۳۸ پایه مختلف با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT ارزیابی شد. ابتدا نمونه‌های برگ‌ی از پایه‌های مختلف جمع‌آوری شد و پس از استخراج DNA، واکنش PCR با استفاده از شش نشانگر مولکولی SCoT انجام پذیرفت. محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها با استفاده از اکسل محاسبه و پارامترهای تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل، تعداد مؤثر، شاخص شانون، شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص هتروزیگوسیتی تصحیح‌شده با استفاده از نرم‌افزار GenALEX 6.5 برآورد شد. از نرم‌افزار NTSYS-2.10 برای برآورد فواصل ژنتیکی Nei در بین جمعیت‌ها و از روش UPGMA برای تجزیه و تحلیل خوشه‌ای استفاده شد. تجزیه واریانس مولکولی و همچنین تجزیه به مختصات اصلی با نرم‌افزار GenALEX 6.5 انجام گرفت.

یافته‌ها: براساس الکتروفورز ژل آگارز، ۱۲۵ آلل برای این نشانگرها مشاهده شد که همگی چندشکل بودند. تعداد آلل‌ها از ۱۶ تا ۲۴ متغیر بود. نشانگر SCoT62 با ۲۴ آلل بیشترین و نشانگر SCoT41 با ۱۶ آلل کمترین تعداد آلل چندشکل را داشتند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرها ۰/۴۰۴ بود. در این تحقیق SCoT9 با داشتن بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۴۴) نقش مهمی در تمایز پایه‌های مختلف ارس داشت و پایین‌ترین مقدار با ۰/۳۸۴ مربوط به آغازگر SCo41 بود. میانگین پارامترهای تنوع ژنتیکی شامل تعداد آلل، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی تصحیح‌شده به ترتیب ۰/۱۶۹، ۰/۱۴۵، ۰/۴۲۰، ۰/۲۷۶ و ۰/۲۹۵ بود.

نتیجه‌گیری: تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۹۲ درصد واریانس کل در درون جمعیت‌ها و ۸ درصد بین جمعیت‌ها توزیع شده است که نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها بود. براساس الگوریتم UPGMA ترسیم درخت فیلوژنتیک برای پایه‌های ارس انجام گرفت و پایه‌های مختلف ارس در پنج گروه مشخص قرار گرفتند. یکی از مهم‌ترین نکات در تشکیل باغ بذر، استفاده از پایه‌هایی است که قرابت ژنتیکی کمتری داشته باشند تا نتایج تنوع ژنتیکی زیادی داشته باشد و از پسروی ژنتیکی جنگل در آینده جلوگیری شود. در نتیجه پیشنهاد می‌شود برای تشکیل باغ بذر ارس در اردبیل از پایه‌های A1، A3، B4، B6، B2، C2، B3، D3، C7، D1، D2، E2، D7، E4 و A5 استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: اردبیل، ارس، تنوع ژنتیکی، نشانگر SCoT.

مقدمه

تحت بررسی نشان داده‌اند، به طوری که شاخص هتروزیگوسیتی در دامنه ۰/۱۳۰-۰/۷۹۵ و سهم تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و بین جمعیت‌ها در محدوده ۸۲-۹۱ درصد و ۱۸-۹ درصد تبیین شده است.

پژوهش‌های اندکی در ایران درباره تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف ارس صورت گرفته است. Khoshal Sarmast et al. (2018) تنوع ژنتیکی پنج جمعیت ارس در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان را با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی کردند. آنان از چهار نشانگر منتخب برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۲ پایه استفاده کردند و نتیجه گرفتند که ۴۸ درصد تنوع مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها و ۵۲ درصد مربوط به تنوع درون جمعیت‌هاست. در پژوهشی دیگر Rahimian Boogar & Salehi (2021) از دوازده نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۵۰ پایه از پنج جمعیت ارس جنوب ایران استفاده کردند که ۷۰ درصد تنوع مربوط به درون جمعیت و ۳۰ درصد مربوط به بین جمعیت تخمین زده شد. Kermani et al. (2010) نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ پایه (شش جمعیت) از هفت آغازگر RAPD استفاده کردند و دریافتند که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بیشتر از بین جمعیت‌ها بود.

نشانگر SCoT¹ اولین بار در برنج به عنوان نوعی نشانگر مولکولی براساس تکثیر تک‌آغازگری پیشنهاد شد (Collard & Mackill, 2009). این نشانگر براساس نواحی محافظت‌شده جناحین کدون آغازین (ATG) طراحی شده و جزو نشانگرهای نیمه تصادفی بارز است. هدف این رویکرد، شناسایی درصد زیادی از نشانگرهای چندشکل غالب در نواحی ژن‌های عملکردی با استفاده از روشی ساده و کم‌هزینه است. در مقایسه با بقیه نشانگرهای رایج مانند RAPD²، AFLP³، SSR⁴ و ISSR⁵، نشانگرهای SCoT در

گونه ارس با نام علمی *Juniperus excelsa* متعلق به تیره Cupressaceae است. بیشتر گونه‌های جنس *Juniperus* در نیمکره شمالی گسترش دارند که از جنس‌های مهم درختان همیشه‌سبز به حساب می‌آید (Adams & Schwarzbach, 2013). این جنس حدود ۶۰ گونه و تعداد زیادی زیرگونه دارد که بعد از جنس‌های *Podocarpus* و *Pinus* بیشترین تعداد گونه و زیرگونه از سوزنی‌برگان را به خود اختصاص داده است (Kartoolinejad et al., 2024). بررسی‌ها نشان می‌دهد که حدود پنج تا شش گونه از این جنس شامل *Juniperus communis* L.، *Juniperus foetidissima* Willd.، *Juniperus polycarpus* K. و *Juniperus sabina* L. در نقاط مختلف کشور مانند گلستان، سمنان، گیلان، مازندران، اردبیل، فارس، یزد، کرمان، خراسان و هرمزگان پراکنش داشته (Kasaian et al., 2011) و مقاومت زیادی در مقابل تنش‌های محیطی دارند (Fallah et al., 2022).

ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گیاهی برای توسعه راهبردهای اصلاح و حفظ منابع ژنتیکی، بسیار مهم است (Bruschi et al., 2003; Meloni et al., 2006). تحقیقات ژنتیکی روی جمعیت‌های گیاهان چوبی، نشان‌دهنده تنوع زیاد بین جمعیت‌هاست (Hao et al., 2018; Motahari et al., 2022; Buer et al., 2021). با اینکه جنس *Juniperus* پراکنش بسیار وسیعی در سراسر جهان دارد، پژوهش‌های ژنتیکی اندکی درباره گونه‌های این جنس در سطح درون گونه صورت گرفته است (Terrab et al., 2008; Douaihy et al., 2011; Korshikov & Nikolaeva, 2013; Yücedağ & Gailing, 2013; Teixeira et al., 2014; Kim et al., 2018; Ju et al., 2022; Lu et al., 2022; Evren & Kaya, 2022; Yermagambetova et al., 2023).

پژوهش‌ها تنوع ژنتیکی چشمگیری را در گونه‌های

1. Start Codon Targeted
2. Random Amplified Polymorphic DNA
3. Amplified fragment length polymorphism
4. Simple Sequence Repeat
5. Inter Simple Sequence Repeats

۳۷ درجه و ۲۵ دقیقه و ۵۵ ثانیه تا ۳۷ درجه و ۲۸ دقیقه و ۲۹ ثانیه عرض شمالی قرار دارد. ارتفاع منطقه از سطح دریا حداقل ۱۲۱۳ و حداکثر ۲۰۲۳ متر است.

شیوه اجرای پژوهش

در این پژوهش، برگ‌های جوان ۳۸ پایه ارس از پنج محوطه بذرگیری جنوب اردبیل نمونه برداری شد (شکل ۱ و جدول ۱). نمونه‌ها با حداقل فاصله ۵۰ متری جمع‌آوری و برگ‌ها قبل از آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

پژوهش‌های آزمایشگاهی

DNA ژنومی از ۵۰ میلی‌گرم برگ با استفاده از روش CTAB تغییر یافته (Saghai-Marouf et al., 2007) استخراج شد. در نهایت، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (Thermo Fisher nanodrop 2000) و ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد. ۲۹ آغازگر SCoT براساس پژوهش‌های قبلی (Luo et al., 2010; Vivodik et al., 2019) انتخاب و توسط شرکت Metabion (آلمان) سنتز شدند. در غربال اولیه، شش آغازگر SCoT که چندشکلی زیادی داشتند، انتخاب و برای آنالیز ۳۸ پایه استفاده شدند. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۵ میکرولیتر مسترمیکس قرمز (Ampliqon، دانمارک)، ۱ میکرولیتر پرایمر SCoT در غلظت ۱۰ پیکومول، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (۲۰ نانوگرم) و ۳ میکرولیتر آب استریل انجام گرفت.

شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفت، کارآمدتر و مؤثرترند و ابزاری ارزشمند در اصلاح به کمک نشانگرهای مولکولی به شمار می‌روند (Buer et al., 2022). این نشانگرها به‌طور گسترده برای بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گونه‌های گیاهی استفاده شده‌اند.

به دلیل برنامه‌های تصویب شده در کشور برای احیا و توسعه جنگل در نواحی رویشگاهی هیرکانی، ارسبارانی، زاگرس، صحارا سندی و ایرانی تورانی، تأمین بذر و نهال استاندارد اهمیت فراوانی دارد. بذر و نهال استاندارد افزون بر کیفیت خوب، باید از لحاظ ژنتیکی نیز تنوع کافی داشته باشد. چراکه با تأمین بذر و نهال استاندارد، به‌جز جلوگیری از پسروری ژنتیکی جنگل در آینده، تاب‌آوری جنگل در مقابل اثرهای نامطلوب تغییرات اقلیم (انواع تنش زیستی و غیرزیستی) نیز بهبود می‌یابد. بنابراین شناسایی ارزیابی مولکولی و آزمون نتایج محوطه‌های بذرگیری باید جزو برنامه‌های تحقیقاتی کشور باشد. با توجه به اهمیت ارس در ترکیب و تنوع زیستی جنگل‌های جنوب اردبیل، هدف این تحقیق ارزیابی مولکولی محوطه‌های بذرگیری ارس اردبیل و تعیین قرابت‌های ژنتیکی آنهاست.

مواد و روش‌ها

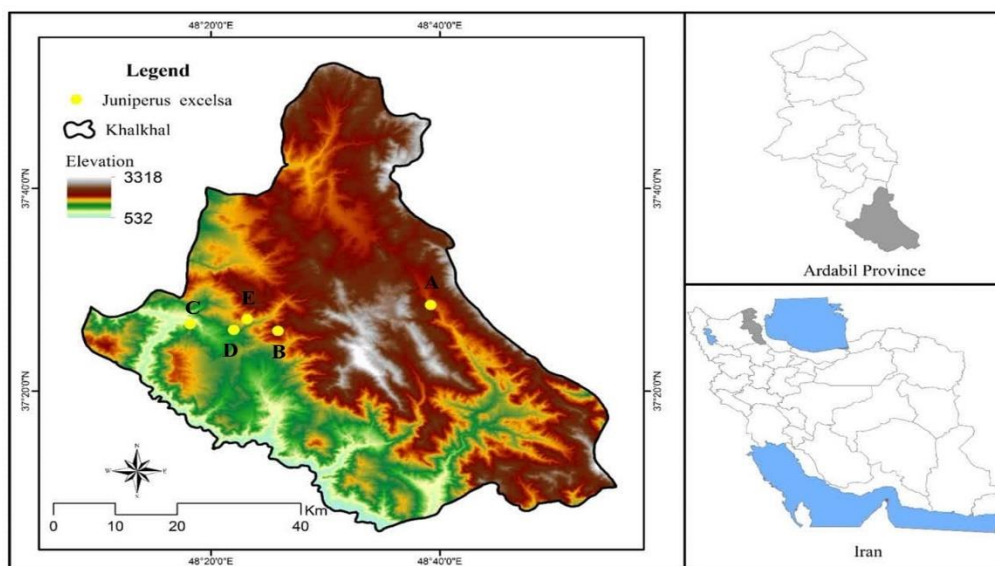
منطقه پژوهش

جنگل‌های ارس در جنوب استان اردبیل و در موقعیت جغرافیایی ۴۸ درجه و ۱۸ دقیقه و ۱۰ ثانیه تا ۴۸ درجه و ۳۹ دقیقه و ۱۱ ثانیه طول شرقی و

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی محوطه‌های بذرگیری ارس اردبیل

Table 1. Geographical characteristics of seed production areas of *J. excelsa* in Ardabil

تعداد پایه Tree number	ارتفاع از سطح دریا Elevation (m)	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude	محوطه بذرگیری Population name
8	1882	48°39'11.9"E	37°28'29.7"N	محوطه بذرگیری A
7	2033	48°25'50.8"E	37°25'55.8"N	محوطه بذرگیری B
8	1213	48°18'10.7"E	37°26'36.2"N	محوطه بذرگیری C
7	1405	48°21'59.2"E	37°26'01.3"N	محوطه بذرگیری D
۸8	1574	48°23'09.7"E	37°27'05.6"N	محوطه بذرگیری E



شکل ۱- نقشه جمعیت‌های ارس در منطقه پژوهش
Figure 1. Map of *J. excelsa* populations in the study area

شاخص شانون (I)، شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و شاخص هتروزیگوسیتی تصحیح شده (uHe) با استفاده از نرم‌افزار GenALEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) برآورد شد. از نرم‌افزار NTSYS-2.10 (Rohlf, 2000) برای برآورد فواصل ژنتیکی Nei در بین جمعیت‌ها و روش UPGMA برای تجزیه و تحلیل خوشه‌ای ۳۸ پایه استفاده شد. تجزیه واریانس مولکولی^۲ (AMOVA) برای ارزیابی تمایز ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها و همچنین تجزیه به مختصات اصلی^۳ (PCoA) برای تجسم روابط ژنتیکی بین افراد با نرم‌افزار GenALEx 6.5 انجام گرفت.

نتایج

چندشکلی SCoT

در غربال ۲۹ آغازگر مورد استفاده، شش آغازگر در *J. excelsa* SCoT نوارهای چندشکل با وضوح زیاد تولید کردند (جدول ۲). اطلاعات آغازگرهای مذکور برای بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی بین و میان جمعیت‌ها استفاده شد. برای نشانگرها در مجموع

تکثیر قطعات SCoT در دستگاه Mastercycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf، آلمان) با استفاده از برنامه زیر انجام گرفت: مرحله نخست واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه؛ مرحله دوم ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای اختصاصی آغازگر به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه؛ مرحله سوم شامل بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE تفکیک شدند و عکس‌برداری صورت گرفت.

روش تحلیل

محتوای اطلاعات چندشکلی^۱ (PIC) نشانگرها، بیانگر قدرت تمایز هر آغازگر است. این اندازه‌گیری به‌عنوان قدرت تشخیص نشانگر، هم به تعداد نشانگرهای چندشکلی در هر آغازگر و هم به فراوانی هر نشانگر بستگی دارد (Nagy et al., 2012). پارامتر PIC با استفاده از اکسل محاسبه شد. پارامترهای تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل (Na)، تعداد آلل مؤثر (Ne)،

2. Analysis of molecular variance
3. Principal coordinates analysis

1. Polymorphic Information Content

تولیدشده از ۱/۵۶۰ تا ۱/۸۴۸ با میانگین ۱/۶۹۱ متغیر بود. تعداد آل مؤثر از ۱/۴۲۶ تا ۱/۵۰۵ با میانگین ۱/۴۵۳، شاخص شانون از ۰/۳۸۹ تا ۰/۴۷۰ با میانگین ۰/۴۲۰، شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار از ۰/۲۵۶ تا ۰/۳۰۹ با میانگین ۰/۲۷۶ و در نهایت شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار تصحیح شده، از ۰/۲۷۳ تا ۰/۳۲۹ با میانگین ۰/۲۹۵ در نوسان بود (جدول ۳).

۱۲۵ آل مشاهده شد که هر ۱۲۵ آل یا به عبارت دیگر ۱۰۰ درصد آل ها به عنوان آل چندشکل تشخیص داده شدند. تعداد آل های چندشکل برای آغازگر در این پژوهش از ۱۶ تا ۲۴ متغیر بود که آغازگر 62 SCoT با ۲۴ آل بیشترین و 41 SCoT با ۱۶ آل کمترین آل را در بین آل های تولیدی توسط هر یک از آغازگرها داشتند. برای پارامترهای تنوع ژنتیکی، مقادیر تعداد آل

جدول ۲- مشخصات و محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرهای SCoT

Table 2. Characteristics and PIC value of SCoT primers

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال آغازگر AT(°C)*	تعداد آل چندشکل Polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism percentage	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC Value
SCoT 9	CAACAATGGCTACCAGCA	51	20	100	0.440
SCoT 12	ACGACATGGCGACCAACG	55	22	100	0.401
SCoT 26	ACCATGGCTACCACCGTC	55	21	100	0.402
SCoT 41	CAATGGCTACCACTGACA	51	16	100	0.384
SCoT 62	ACCATGGCTACCACGGAG	55	24	100	0.392
SCoT 35	CATGGCTACCACCGGCC	60	22	100	0.409
	میانگین (Mean)			100	0.306

* Annealing Temperature

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی پنج جمعیت تحت بررسی

Table 3. Genetic diversity parameters of five studied populations

جمعیت Population label	تعداد پایه N	تعداد آل Na	تعداد آل مؤثر Ne	شاخص شانون I	هتروزیگوسیتی مورد انتظار He	هتروزیگوسیتی مورد انتظار تصحیح شده uHe
A	8	1.560	1.426	0.389	0.256	0.273
B	7	1.576	1.451	0.407	0.270	0.291
C	8	1.848	1.505	0.470	0.309	0.329
D	7	1.744	1.442	0.419	0.272	0.293
E	8	1.728	1.440	0.417	0.272	0.290
میانگین (Mean)	7.6	1.691	1.453	0.420	0.276	0.295

Sample size (N); the number of alleles (Na); the effective number of alleles (Ne); Shannon's information index (I); expected heterozygosity (He); unbiased expected heterozygosity (uHe)

تمایز ژنتیکی

کمترین شباهت ژنتیکی بین جمعیت D و B مشاهده شد.

براساس مقادیر PhiPT، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که سهم تنوع ژنتیکی درون جمعیت ها ۹۲ درصد از کل تنوع و بین جمعیت ها ۸ درصد است (جدول ۵).

ماتریس ضرایب تشابه Nei تولیدشده توسط برنامه NTSYS-2.10 نشان داد که شباهت ژنتیکی از ۰/۹۰۹ تا ۱ متغیر است که نشان دهنده تشابه ژنتیکی زیاد در جمعیت های *J. excelsa* است (جدول ۴). دو جمعیت A و C شبیه ترین جمعیت ها بودند. در مقابل،

تجزیه خوشه‌ای

با استفاده از ضرایب ژنتیکی Nei برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی، یک خوشه شناسایی شد (شکل ۲). نمودار دندان‌های به دست آمده پایه‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل پایه‌های A1، A7، A8، C8، C6 -C4، A3، C3، E3، A2، B4، A4، A8، A6، B6.

B1، B7، B3، B5، E8، C1، C2، گروه دوم شامل پایه B2، گروه سوم شامل پایه‌های D3، D4، D6، C7، E5، E7، D1، D5، D2، E6، E2، گروه چهارم شامل پایه‌های D7، E1، E4 و در نهایت گروه پنجم شامل پایه A5 است.

جدول ۴- ماتریس ضرایب تشابه نی بین جمعیت‌ها

Table 4. Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Identity

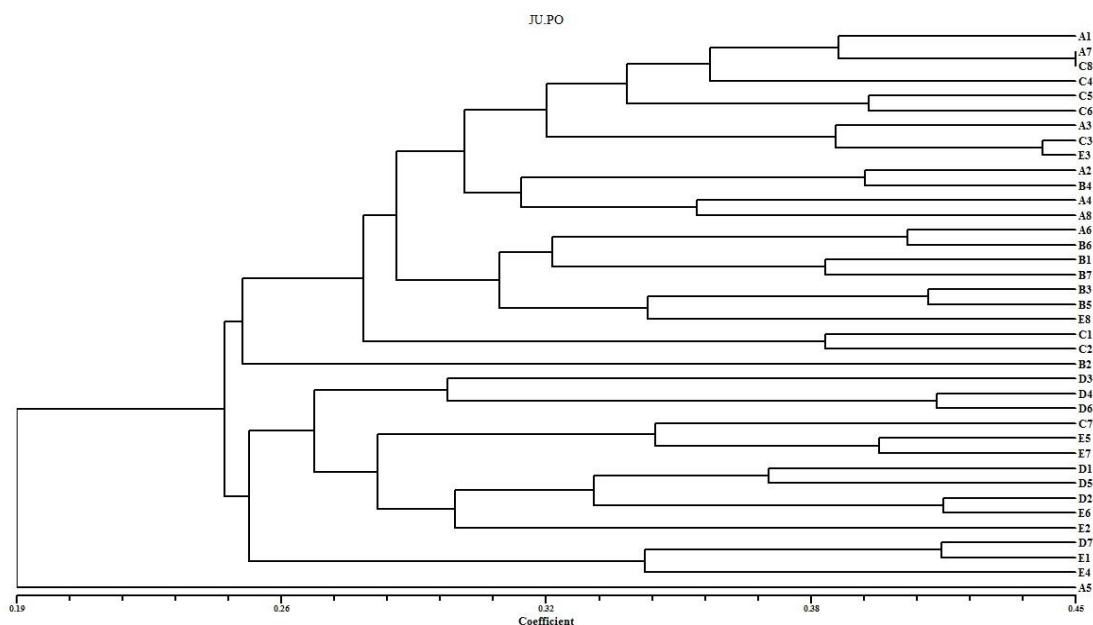
A	B	C	D	E	جمعیت Population
1					A
0.947	1				B
0.948	0.942	1			C
0.918	0.909	0.944	1		D
0.928	0.918	0.947	0.946	1	E

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی

Table 5. AMOVA analysis

سطح احتمال p	درصد %	مقدار واریانس Est. Var	میانگین مربعات MS	مجموع مربعات SS	درجه آزادی Df	منابع تغییرات Source of variation
<0.001	8%	2.112	40.280	161.119	4	بین جمعیت‌ها Among Population
<0.001	92%	24.248	24.248	800.196	33	درون جمعیت‌ها Within Population

df: degree of freedom; SS: sum of squares; MS: mean squares; Est. var: estimate of variance; %: percentage of total variation; P-value is based on 1000 permutations.

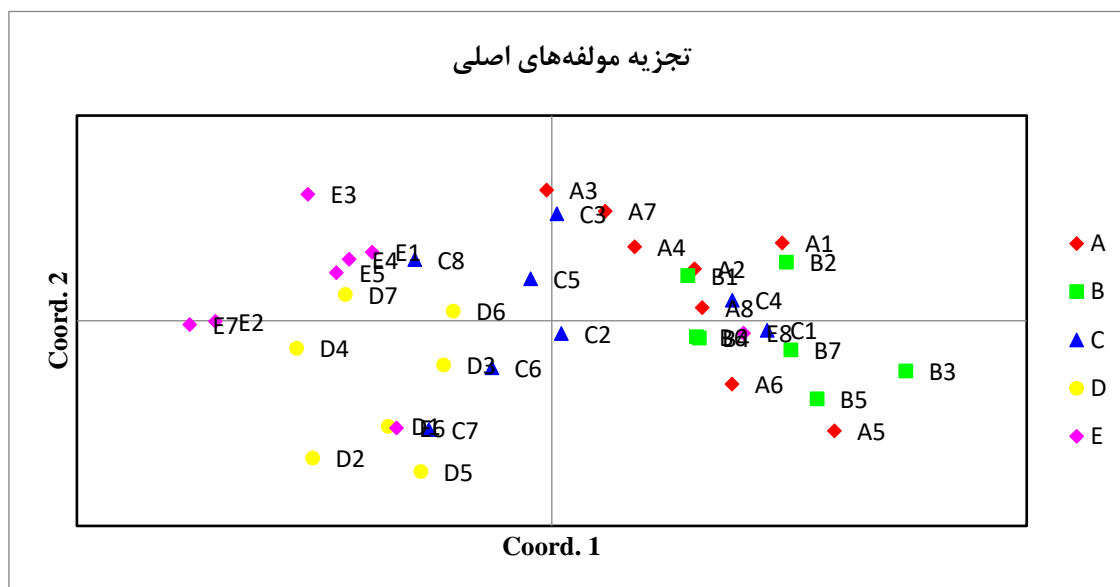


شکل ۲- خوشه‌بندی حاصل از الگوریتم UPGMA با ضریب نی

Figure 2. Clustering resulting from the UPGMA algorithm with Nei index

تغییرات را تشکیل می‌دهند. نتایج نشان داد که دو جزء اصلی ($PCA 1 = 24.92$ و $PCA 2 = 18.19$) توانایی تمایز پایه‌های مختلف براساس منطقه جغرافیایی را ندارند (شکل ۳).

تجزیه به مختصات اصلی دویعدی انجام گرفت و یک نمودار پراکندگی برای نشان دادن پراکندگی افراد براساس پارامترهای تمایز ایجاد شد. PCoA نشان داد که سه جزء مختصات اصلی در حدود ۵۶ درصد از کل



شکل ۳- پراکنش پایه‌های مختلف ارس حاصل تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

Figure 3. The distribution of different trees of *Juniperus excelsa* as a result of PCA

2021) و *Taxus media* (Hao et al., 2018) تأیید شده است.

در این پژوهش، با استفاده از شش آغازگر SCoT، نسبت بزرگی از چندشکلی (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. درصد چندشکلی زیاد در این تحقیق با یافته‌های محققان ایرانی (Kermani et al., 2010; Khoshal & Sarmast et al., 2018; Rahimian Boogar & Kim et al., 2018; Ju et al., 2021) و خارجی (Salehi, 2021) مطابقت دارد. زیاد بودن درصد چندشکلی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت‌هاست (Satio et al., 2002).

محتوای اطلاعات چندشکلی، هم از فراوانی تأثیر می‌گیرد و هم از تعداد آلل‌های موجود در جمعیت. در نشانگرهای غالب، در صورت وجود آلل‌های بیشتر و فراوانی زیاد آنها، مقدار PIC به سمت ۰/۵ میل می‌کند و آغازگر توانایی زیادی برای تفکیک افراد و جمعیت‌ها خواهد داشت (Nagy et al., 2012). در این پژوهش،

بحث

علی‌رغم تنوع ژنتیکی غنی در جنگل‌های ارس جنوب اردبیل و لزوم اجرای برنامه‌های حفاظت، احیا و توسعه در این ناحیه رویشی ارزشمند، هیچ پژوهشی درباره محوطه‌های بذرگیری صورت نگرفته است. برای گونه ارس، پنج منطقه از جنگل ارس جنوب اردبیل به‌عنوان محوطه‌های بذرگیری اولیه شناسایی شد که این محوطه‌ها توزیع جغرافیایی متوازی در اردبیل داشتند. در این پژوهش مجموعه‌ای از آغازگرهای SCoT برای ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ارس اردبیل استفاده شد. همه آغازگرها نشانگرهای چندشکلی تولید کردند که اثربخشی آغازگرهای SCoT در ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت ارس را نشان می‌دهد. استفاده مؤثر از نشانگرهای SCoT برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان چوبی مانند *Prunus sibirica* L (Buer et al., 2022) و *Acer monspessulanum* L (Motahari et al.,

درباره گونه‌های سوزنی‌برگ مطابقت دارد (Jiménez et al., 2002; Renau-Morata et al., 2005; Terrab et al., 2008; Douaihy et al., 2011; Dzialuk et al., 2011). سهم زیاد واریانس ژنتیکی درون جمعیت‌ها دلایل مختلفی دارد، از جمله انتقال بذرها در فاصله‌های دور، گرده‌افشانی توسط باد، دگرگشتی، دوپایه بودن، طول عمر طولانی درخت و توزیع گسترده پایه‌ها (Douaihy et al., 2011).

در این پژوهش براساس اصول استاندارد و تعریف‌شده برای معرفی محوطه‌های بذرگیری همچون تعداد محوطه و پراکنش آن، تعداد پایه‌های بذری و فاصله بین آنها، مساحت محوطه بذرگیری و صفات درختان برتر (Mohammadi, 2023)، پنج منطقه در جنگل‌های جنوب اردبیل به‌عنوان محوطه‌های بذرگیری ارس معرفی شد. توزیع جغرافیایی محوطه‌های بذرگیری نشان می‌دهد که پراکنش متوازی در بین محوطه‌های بذرگیری وجود دارد. با توجه به اهمیت بذرهای استاندارد در بحث حفاظت، احیا، توسعه و بهره‌برداری جنگل، باید باغ بذر برای این گونه براساس نتایج پژوهش‌های مولکولی تشکیل شود. براساس فاصله ژنتیکی پایه‌ها، پیشنهاد می‌شود برای تشکیل باغ بذر ارس در اردبیل از پایه‌های A1, A3, B4, B6, C2, B2, D3, C7, D1, D2, E2, D7, A4 و E5 استفاده شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور برگرفته از طرح ۰۱۰۲۱۲-۱۲-۳۷-۰۹-۰۸۸-۰۱۰۱۲ انجام گرفته است. نویسندگان از این بابت کمال تشکر و قدردانی را دارند.

میانگین PIC برای همه جایگاه‌ها ۰/۳۰۶ بود. این سطح بالای PIC نشان می‌دهد که چندشکلی زیادی در پایه‌ها وجود دارد. SCoT9 و SCoT35 به ترتیب با ۰/۴۴۰ و ۰/۴۰۹ دارای بیشترین PIC بودند که نشان‌دهنده کارایی زیاد این آغازگرها در تمایز جمعیت‌های *J. excelsa* است.

شاخص هتروزیگوسیتی پنج جمعیت مدنظر ۰/۲۷۶ است که کمتر از پژوهش‌های قبلی در گونه‌های مختلف جنس *Juniperus* (Douaihy et al., 2011; Korshikov & Nikolaeva, 2013; Yücedağ & Gailing, 2013; Teixeira et al., 2014; Kim et al., 2018; Ju et al., 2022; Lu et al., 2022; Evren & Kaya, 2021; Yermagambetova et al., 2023) است، ولی از دو پژوهش (Meloni et al., 2006; Terrab et al., 2008) بیشتر است. این نتایج نشان می‌دهد که جمعیت‌های ارس اروپا و همچنین شمال ایران، تنوع ژنتیکی زیادی نسبت به ارس اردبیل دارد که ممکن است ناشی از عوامل جغرافیایی، سازوکارهای دخیل در گرده‌افشانی، تعداد و نوع نشانگرهای مورد استفاده باشد (Evren & Kaya, 2021).

براساس تجزیه AMOVA، سهم تنوع واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۸ درصد است که به‌طور تقریبی مشابه پژوهش‌های قبلی روی همان جنس است. در پژوهش‌های قبلی، این پارامتر در محدوده ۹ تا ۱۸ درصد محاسبه شد. این پارامتر کمتر از میانگین بازدانگان (۲۴ درصد) است (Nybom, 2004). این نتیجه ممکن است ناشی از انتقال بذرها توسط حیوانات مختلف باشد، به‌طوری که انتقال بذرها توسط این حیوانات ممکن است سبب همگنی ژنتیکی در بین جمعیت‌ها شود. سطح بالای واریانس ژنتیکی در درون جمعیت‌های ارس با یافته‌های مطالعات دیگر

References

- Adams, R.P., & Schwarzbach, A.E. (2013). Phylogeny of *Juniperus* using nrDNA and four cpDNA regions. *Phytologia*, 95(2), 179-187.
- Bruschi, P., Vendramin, G.G., Bussotti, F., & Grossoni, P. (2003). Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany*, 91(6), 707-716. doi: 10.1093/aob/mcg075

- Buer, H., Rula, S., Wang, Z.Y., Fang, S., & Bai, Y.E. (2022). Analysis of genetic diversity in *Prunus sibirica* L. in inner Mongolia using SCoT molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(3), 1057-1068. doi: 10.1007/s10722-021-01284-4
- Collard, B.C., & Mackill, D.J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant molecular biology reporter*, 27, 86-93. doi: 10.1007/s11105-008-0060-5
- Douaihy, B., Vendramin, G.G., Boratyński, A., Machon, N., & Bou Dagher-Kharrat, M. (2011). High genetic diversity with moderate differentiation in *Juniperus excelsa* from Lebanon and the eastern Mediterranean region. *AoB plants*, 2011, 1-14. doi: 10.1093/aobpla/plr003
- Dzialuk, A., Mazur, M., Boratyńska, K., Montserrat, J. M., Romo, A., & Boratyński, A. (2011). Population genetic structure of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in the western Mediterranean Basin: gradient of diversity on a broad geographical scale. *Annals of Forest Science*, 68(8), 1341-1350. doi: 10.1007/s13595-011-0150-7
- Evren, Ö.H., & Kaya, N. (2021). High genetic diversity within and low differentiation among *Juniperus excelsa* M. Bieb. populations: Molecular markers reveal their genetic structure patterns. *Turkish Journal of Botany*, 45(3), 192-202. doi: 10.3906/bot-2006-22
- Fallah, A., Nadi, M., Imani, M., & Hamidi, S.K. (2022). Reconstruction of precipitation using the chronology of juniper trees (*Juniperus polycarpus*) in North Khorasan Province, Iran. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 31(1), 1-13. doi: 10.22092/IJFPR.2023.361515.2089 (In Persian)
- Hao, J., Jiao, K., Yu, C., Guo, H., Zhu, Y., Yang, X., & Shen, C. (2018). Development of SCoT-based SCAR marker for rapid authentication of *Taxus media*. *Biochemical genetics*, 56, 255-266. doi: 10.1007/s10528-018-9842-0
- Jime'nez, J.F., Werner, O., Sa'nchez-Go'mez, P., Ferná'ndez, S., Guerra, J. (2003). Genetic variations and migration pathway of *Juniperus thurifera* L. (Cupressaceae) in the western Mediterranean region. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51, 11–22. doi: 10.1560/ABR5-A6MP-5XEG-VOWF
- Ju, T., Han, Z.T., Ruhsam, M., Li, J.L., Tao, W.J., Tso, S., & Mao, K.S. (2022). Reproduction and genetic diversity of *Juniperus squamata* along an elevational gradient in the Hengduan Mountains. *Plant Diversity*, 44(4), 369-376. doi: 10.1016/j.pld.2021.12.002
- Kartoolinejad, D., Ravanbakhsh, H., Fadaei, Z., Moshki, A.R., & Nikouee, E. (2024). Infection of juniper trees (*Juniperus excelsa* M. Bieb.) to juniper dwarf mistletoe (*Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb.) in forests of Miankouh Tash protected area, Shahroud. *Iranian Journal of Forest*, 15(4), 497-514. doi: 10.22034/IJF.2023.363540.1894 (In Persian)
- Kasaian, J., Behravan, J., Hassany, M., Emami, S.A., Shahriari, F., & Khayyat, M.H. (2011). Molecular characterization and RAPD analysis of *Juniperus* species from Iran. *Genetics and Molecular Research*, 10(2), 1069-1074. doi: 10.4238/vol10-2gmr1021
- Kermani, M., Maraashi, S.H., & Melati, F. (2010). Study of genetic variation of *Juniperus polycarpus* from Tandure National Park of Iran using RAPD markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 18(1), 115-124. (In Persian)
- Kim, E.H., Shin, J.K., Jeong, K.S., Lee, C.S., & Chung, J.M. (2018). Genetic variation and structure of *Juniperus chinensis* L. (Cupressaceae) in Korea. *Journal of Ecology and Environment*, 42(1), 1-9. doi: 10.1186/s41610-018-0073-4
- Khoshal Sarmast, M., Mosavizadeh, S.J., & Sharifani, M. (2018). Evaluation of *Junipers* spp. Genetic Diversity in Northern Iran using ISSR Markers. *Ecology of Iranian Forests*, 6(11), 14-20. doi: 10.29252/ifej.6.11.14. (In Persian)
- Korshikov, I.I., & Nikolaeva, A.V. (2013). Genetic variability of tall junipers (*Juniperus excelsa* Bieb.) on the northern and southern boundaries of their natural distribution. *Cytology and Genetics*, 47(3), 156-163. doi: 10.3103/S0095452713030043

- Lu, D., Huang, H., Wang, A., & Zhang, G. (2022). Genetic Evaluation of *Juniperus sabina* L. (Cupressaceae) in Arid and Semi-Arid Regions of China Based on SSR Markers. *Forests*, 13(2), 231. doi: 10.3390/f13020231
- Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J., & Gao, M.P. (2010). Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(6), 1176-1184. doi: 10.1016/j.bse.2010.11.004
- Meloni, M., Perini, D., Filigheddu, R., & Binelli, G. (2006). Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Annals of Botany*, 97(2), 299-304. doi: 10.1093/aob/mcj024
- Mohammadi, Y. (2023). Preliminary assessment of juniper (*Juniperus excelsa*) seed production area of Ardabil. *Sustainable management of Hyrcanian forests*, 4(2), 39-43. (In Persian)
- Motahari, B., Shabaniyan, N., Rahmani, M.S., & Mohammad-Hasani, F. (2021). Genetic diversity and genetic structure of *Acer monspessulanum* L. across Zagros forests of Iran using molecular markers. *Gene*, 769, 145245. doi: 10.1016/j.gene.2020.145245
- Nagy, S., Poczaí, P., Cernák, I., Gorji, A.M., Hegedüs, G., & Taller, J. (2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical genetics*, 50, 670-672. doi: 10.1007/s10528-012-9509-1
- Nybohm, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology*, 13(5), 1143-1155. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x
- Peakall, R., & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Rahimian Boogar, A., & Salehi, H. (2021). ISSR-based genetic diversity assessment of five populations of *Juniperus polycarpos* K. Koch in southern habitats of Iran. *Flower and Ornamental Plants*, 6(1), 1-12. doi: 10.52547/flowerjournal.6.1.1. (In Persian)
- Renau-Morata, B., Nebauer, S.G., Sales, E., Allainguillaume, J., Caligari, P., & Segura, J. (2005). Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. *American Journal of Botany*, 92(5), 875-884. doi: 10.3732/ajb.92.5.875
- Rohlf, F.J. (2000). NTSYS 2.1: numerical taxonomic and multivariate analysis system. New York, Exeter Software.
- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard, R., (2007). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81 (24), 8014-8018. doi: 10.1073/pnas.81.24.8014
- Teixeira, H., Rodriguez-Echeverria, S., & Nabais, C. (2014). Genetic diversity and differentiation of *Juniperus thurifera* in Spain and Morocco as determined by SSR. *PLoS One*, 9(2), e88996. doi: 10.1371/journal.pone.0088996
- Terrab, A., Schönswetter, P., Talavera, S., Vela, E., & Stuessy, T.F. (2008). Range-wide phylogeography of *Juniperus thurifera* L., a presumptive keystone species of western Mediterranean vegetation during cold stages of the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 94-102. doi: 10.1016/j.ympev.2008.03.018
- Vivodík, M., Balážová, Ž., Gálová, Z., & Petrovičová, L. (2019). Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated castor (*Ricinus communis* L.) genotypes. *Genetika*, 51(1), 137-146. doi: 10.2298/GENSR1901137V

Yermagambetova, M., Almerkova, S., Turginov, O., Sultangaziev, O., Abugalieva, S., & Turuspekov, Y. (2023). Genetic Diversity and Population Structure of *Juniperus seravschanica* Kom. Collected in Central Asia. *Plants*, 12(16), 2961. doi: 10.3390/plants12162961

Yücedağ, C., & Gailing, O. (2013). Genetic variation and differentiation in *Juniperus excelsa* M. Bieb. populations in Turkey. *Trees*, 27, 547-554. doi: 10.1007/s00468-012-0807-3



Evaluation of genetic diversity and population structure of *Juniperus excelsa* M. Bieb. in Ardabil using SCoT markers

Y. Mohammadi^{1*}, M.R. Mashayekhi², and Sh. Gheytranpour-Sehrigh³

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

²Assistant Prof., Molecular Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

³Ph.D. Plant Breeding and Biotechnology Dept. Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(Received: 21 January 2024; Accepted: 25 May 2024)

Abstract

Introduction: The Juniper tree is one of the most important tree species in the forests of southern Ardabil and plays a significant role in the province's reforestation programs. Providing standard seeds and seedlings is one of the primary concerns of natural resource managers. Seed orchards, along with seed production areas, are among the most important sustainable sources for supplying seeds and seedlings of forest trees and shrubs. The aim of this study is to assess the genetic diversity and structure of juniper seed production areas in Ardabil province.

Material and Methods: In this study, the intra- and inter-population genetic diversity of five different juniper populations, including 38 individual genotypes, was evaluated using the SCoT molecular marker. Initially, leaf samples were collected from the various genotypes, and after DNA extraction, PCR reactions were performed using six SCoT molecular primers. The polymorphic information content (PIC) of the markers was calculated using Excel, and genetic diversity parameters such as the number of alleles, effective number of alleles, Shannon's index, expected heterozygosity, and unbiased expected heterozygosity were estimated using GenALEX 6.5 software. Nei's genetic distances between populations were calculated using NTSYS-2.10 software, and cluster analysis was conducted using the UPGMA method. Molecular variance analysis and principal coordinate analysis were also performed using GenALEX 6.5 software.

Results: Based on agarose gel electrophoresis, a total of 125 alleles were detected using these markers, all of which were polymorphic. The number of alleles ranged from 16 to 24. Among the primers, SCoT62 showed the highest number of polymorphic alleles (24), while SCoT41 had the lowest (16). The average PIC for the primers was 0.404. In this study, SCoT9 had the highest PIC value (0.440), indicating its important role in distinguishing different juniper genotypes, while the lowest PIC (0.384) was observed for SCoT41. The mean value for genetic diversity parameters, including number of alleles, effective number of alleles, Shannon's index, expected heterozygosity and unbiased expected heterozygosity were 1.69, 1.45, 0.420, 0.276, and 0.295, respectively.

Conclusion: Molecular variance analysis showed that 92% of the total variance is distributed within populations, and 8% is distributed between populations. Using the UPGMA algorithm, a phylogenetic tree was constructed for the juniper genotypes, placing them into five distinct clades. One of the most important points in the formation of a seed orchard is the use of trees that have less genetic affinity so that the progeny obtained from them has a high genetic diversity and prevents the genetic erosion of the forest in the future. As a result, it is suggested to use trees A1, A3, B4, B6, C2, B2, D3, C7, D1, D2, E2, D7, E4 and A5 to form a juniper seed orchard in Ardabil.

Keyword: Ardabil, Genetic diversity, Juniper, SCoT marker.