

بررسی رابطه بین تعداد نمونه و تنوع ژنتیکی راش شرقی (*Fagus orientalis* Lipsky)

پروین صالحی شانجانی^{۱*}، جوزپه جوانی وندرامین^۲ و محسن کلاگری^۳

^۱استادیار بانک ژن منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

^۲استاد، انستیتو ژنتیک گیاهی، فلورنس، ایتالیا

^۳استادیار گروه تحقیقات صنوبر و درختان سریع‌الرشد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

(تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۵، تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۱۱)

چکیده

دستیابی به تعداد نمونه، موضوع مهمی در پژوهش‌های تنوع ژنتیکی و برنامه‌های حفاظتی است. ارزیابی تعداد نمونه لازم و کافی، به اطلاعات دقیقی در مورد تنوع و تمایز ژنتیکی نیاز دارد که به‌طور معمول در دسترس نیست. در این پژوهش تعداد نمونه مورد نیاز برای برآورد دقیق تنوع ژنتیکی در سطح درختان بالغ و نتاج در یک جمعیت راش (*Fagus orientalis* Lipsky) در مرکز جنگل‌های خزری ایران بررسی شد. به این منظور ژنوتیپ ۳۵۰ درخت بالغ و ۴۸۰ بذر از ۶۰ درخت مادری به‌وسیله ۴ میکروساتلایت هسته‌ای تعیین شد. نتایج نشان داد که حدود ۳۰۰ درخت برای اندازه‌گیری صحیح غنای آلیلی یک توده مورد نیاز است. در صورتی که برای محاسبه هتروزیگوتی مورد انتظار تعداد درخت کمتری (۳۰ درخت) کفایت می‌کند. از آنجا که بذرهای بررسی‌شده از ۵۰ درخت مادری (هر درخت حداقل ۸ بذر)، حدود ۹۰٪ از تنوع آلیلی موجود در توده مورد بررسی دربر دارند، بنابراین جمع‌آوری بذر حداقل از ۵۰ درخت از هر توده برای برنامه‌های حفاظتی توصیه می‌شود. با وجود اینکه اکثر آلل‌های موجود در درختان توده در بذرها نیز مشاهده شدند، ولی تنوع ژنتیکی بذرها به‌طور قابل توجهی کمتر از تنوع ژنتیکی درختان توده بود که نشان‌دهنده اهمیت حفاظت از توده‌های طبیعی و حفاظت *in situ* است. این نتایج برای دیگر گونه‌های درختی که توزیع (گسترده)، روش ازدیاد (بادگرده افشان، انتشار بذرها به‌وسیله جاذبه)، تراکم (حدود ۴۰۰-۲۰۰ پایه در هکتار) و ساختار ژنتیکی مشابهی با راش دارند، قابل استفاده است.

واژه‌های کلیدی: راش (*Fagus orientalis* Lipsky)، تنوع ژنتیکی، میکروساتلایت، جمع‌آوری بذر.

مقدمه و هدف

جنگل مهم‌ترین ذخیره‌گاه تنوع گونه‌های چوبی موجودات روی کره زمین است. پوشش گیاهی جنگل‌ها سبب بقای گستره وسیعی از موجودات می‌شود. در این بین درختان به‌علت طول عمر زیاد، دگرگشی، ناهمگونی و گسترش در محیط‌های بسیار متغیر، مکانیسم‌های پیچیده‌ای را توسعه داده‌اند تا بتوانند گوناگونی درون‌گونه‌ای را در سطح بالایی حفظ کنند. تنوع در جنگل‌ها و گوناگونی ژنتیکی در درختان و درختچه‌ها برای سازگاری مستمر گونه‌ها به شرایط محیطی و نیز حفظ پتانسیل اصلاح ویژگی‌های مورد نظر انسان ضروری هستند. توانایی مستمر درختان جنگلی برای حمایت از عملکرد اکوسیستم و تأمین کالاها و خدمات مورد نیاز انسان به حفاظت از تنوع زیستی جنگل‌ها و مدیریت صحیح منابع ژنتیکی جنگل وابسته است (FAO, 2001).

اولین گام در طراحی یک برنامه حفاظتی، تعیین اهداف حفاظتی است که به‌واسطه آن تعداد بذری که باید جمع‌آوری شود و سطحی از تنوع ژنتیکی که باید حفاظت شود، مشخص می‌شود. مبنای اطلاعات مورد نیاز برای جمع‌آوری مؤثر بذر در هر دو برنامه‌های حفاظت *in situ* و *ex situ* یکسان است. در هر دو مورد، حفظ بیشترین تنوع ژنتیکی موجود، اساس برنامه است، ولی در نهایت محدودیت‌های ساختاری و مالی تعیین‌کننده نوع و میزان تنوع ژنتیکی است که می‌توان در هر دو روش حفاظت *in situ* و *ex situ* جمع‌آوری و حفاظت کرد (Amaral et al., 2004).

برای ارائه استراتژی‌های جمع‌آوری بذر در حفاظت *ex situ* شناخت گستره پراکنش، جمعیت‌ها یا پرووانس‌های گونه درختی مورد نظر (هدف) اهمیت دارد، زیرا با جمع‌آوری بذر از جمعیت‌ها و توده‌های مختلف می‌توان امکان احیای جمعیت‌های جنگلی محلی که تخریب یافته، یا برای حفاظت *in situ* در نظر گرفته شده را بالا برد (مهم‌ترین اصل در عملیات جنگلکاری استفاده از پرووانس‌های محلی است). در جمع‌آوری بذر از گونه‌های درختی هدف، علاوه بر اهمیت تعیین تعداد جمعیت در برنامه حفاظت، تعداد درختی که در هر جمعیت باید بذرگیری شوند و تعداد

بذری که از هر درخت باید جمع‌آوری شود نیز بسیار مهم است. تعداد درخت و میزان بذری که از هر جمعیت جمع‌آوری می‌شود باید به اندازه‌ای باشد که نماینده ساختار ژنتیکی آن جمعیت باشد. بنابراین در حفاظت ژنتیکی نه تنها به اثر تعداد بذر جمع‌آوری شده بر تنوع میان و درون جمعیتی باید توجه کرد، بلکه تأثیر تعداد بذر از هر درخت بر تنوع ژنتیکی نسل بعدی نیز نباید نادیده گرفته شود. انتخاب توده‌ها و درختانی که ارجحیت بیشتری برای بذرگیری دارند، به داشتن اطلاعاتی در زمینه تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌ها، ارزش بالقوه آنها (برای مثال جمعیت‌هایی که از ویژگی متمایزی برخوردارند)، سطح آسیب‌پذیری جمعیت‌ها و نیز امکانات و محدودیت‌های جمع‌آوری و ذخیره بذر، نیاز دارد (Amaral et al., 2004). یکی از مهم‌ترین مباحثی که در بررسی گونه‌های گیاهی مورد غفلت واقع شده است، تعداد نمونه کافی برای مطالعه پارامترهای تنوع ژنتیکی است. مناسب‌ترین اندازه نمونه برداری براساس قوانین آماری برای برآورد میانگین هر صفت در جمعیت، ۳۰ فرد است (Sjogren & Wyoni, 1994; Petit et al., 1998). بسیاری از دانشمندان ژنتیک جمعیت گیاهی برای اطمینان از صحت برآورد تمامی پارامترهای ژنتیکی در هر جمعیت، به‌طور متوسط ۵۰ فرد را مطالعه می‌کنند. درحالی‌که برای برخی مطالعات از جمله بررسی سیستم تولید مثلی، آنالیز Parentage و منحنی‌های پراکنش گرده، تعداد نمونه یا اندازه جمعیت مورد بررسی باید بیشتر از این تعداد باشد (Ritland et al., 2002; Austerlitz et al., 2004; Cavers et al., 2005; Kalinowski et al., 2007). Ohsawa et al. (2007) بیان کردند که عدم مشاهده ساختار فضایی ژنتیکی در برخی قطعه‌های نمونه *Quercus crispula* به‌علت نمونه‌برداری محدود (کمتر از ۵۰ درخت) است. آنها معتقدند که پژوهش‌های وسیع جمعیت با حداقل ۵۰۰ فرد یا بیشتر، ارزش زیادی برای ارزیابی استراتژی‌های جمع‌آوری بذر دارد. Miyamoto et al. (2008) نیز با مطالعه وسیع در یک توده بزرگ *Fraxinus excelsior* در فرانسه، تعداد نمونه بیش از ۳۰۰ فرد بالغ و کمتر از ۳۰ فرد را به‌ترتیب

به ازاء هر درخت مادری، در نمونه‌برداری برای حفاظت و احیاء یک جمعیت چقدر است؟

مواد و روش‌ها

برای بررسی اثر اندازه جمعیت یا تعداد نمونه مورد بررسی روی تنوع ژنتیکی، نمونه‌برداری از ۲۵ درخت (با قطر متوسط ۳۰-۴۰ سانتی‌متر) در یک جمعیت (در جنگل خیرود واقع در استان مازندران) به‌عنوان گروه پایه انجام شد، سپس با افزایش تعداد درختان به ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ درخت، ویژگی‌های ژنتیکی در هر گروه بررسی و مقایسه شد.

بررسی اثر مقدار بذرگیری در ساختار نسل آینده، از دو جهت مورد نظر قرار گرفت: الف) اثر تعداد درخت، ب) اثر تعداد بذر از هر درخت. برای مورد الف، در ابتدا بذرهای ۱۰ درخت مادری به‌عنوان گروه پایه جمع‌آوری شد، سپس با افزایش تعداد درختان مادری به ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درخت ویژگی‌های ژنتیکی بذرهای جمع‌آوری‌شده بررسی شد. برای بررسی مورد ب، تعداد ۴ بذر (۴S) و ۸ بذر (۸S) به ازاء هر درخت مادری در هر یک از گروه‌های درختان مادری ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درختی، جمع‌آوری شد. در همه نمونه‌برداری‌ها برای اینکه سطح احتمال تلاقی درون‌گروهی به حداقل رسانده شود، انتخاب درختان به‌طور تصادفی و با درنظر گرفتن حداقل فاصله ۳۰ متر بین درختان، صورت گرفت.

DNA کل از بذرها و جوانه‌های خواب درختان (۱۰۰ میلی‌گرم به‌عنوان ماده اولیه) با استفاده از کیت Nucleospin plant (Germany, Macherey Negel) جداسازی شد. عصاره‌ها (یک میکرولیتر به ازای هر چاهک) به‌وسیله دستگاه الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ (W/V) با نیروی برق ۱۰ ولت در سانتی‌متر به‌مدت یک ساعت و بافر TEA x ۵۰ حاوی ۰/۵ mgml⁻¹ (W/V) اتیدیوم‌برماید کنترل‌شده و ژل‌ها پس از عکس‌برداری با یک اسکنر UVP تجزیه شدند. میکروساتلایت‌های FS1-15، FS1-03، FS1-11 و FS3-04 (جدول ۱) ارائه‌شده توسط Pastorelli et al. (2003) به‌دلیل پلی‌مورفیسم بالا، مناسب تشخیص داده شدند و از طریق PCR تکثیر شدند.

برای برآورد درست غنای آلی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار پیشنهاد کردند.

مبحث مهم دیگری که هنوز به‌درستی مورد بررسی قرار نگرفته، نقش برنامه‌های حفاظتی در تنوع ژنتیکی جمعیت‌های آینده است. به‌طوری که مشخص نشده است در عملیات جنگلکاری چه مقدار از تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی به توده‌های مصنوعی انتقال می‌یابد یا چه تعداد بذر از چند درخت باید جمع‌آوری شود تا حفظ تنوع ژنتیکی نسل‌های بعدی تضمین شود. از این نظر پژوهش‌های محدودی انجام شده است. تعیین جمعیت‌هایی که ارجحیت بیشتری برای حفاظت دارند، به‌طور معمول از طریق مطالعه ژنوتیپ نمونه‌هایی از جمعیت‌های مختلف به‌وسیله یک یا چند نشانگر خنثی انجام می‌شود (Petit et al., 1998). در مطالعه تنوع ژنتیکی، از میان نشانگرهای مختلف، میکروساتلایت‌ها به‌دلیل پلی‌مورفیسم بالا و ویژگی هم‌بارزی نسبت به ایزوآنزیم‌ها و AFLP ترجیح داده می‌شوند (Zane et al., 2002). در پژوهش‌هایی که برای تخمین تعداد نمونه مناسب بر اساس برآورد مقادیر تنوع ژنتیکی انجام شده است، نه تنها به داشتن دانش اولیه در مورد فراوانی ژنوتیپی جمعیت‌ها، بلکه بر آگاهی از اطلاعات دقیقی از ویژگی‌های جمعیت مورد مطالعه نیز تأکید شده است (Cavers et al., 2005; Ohsawa et al., 2007).

راش شرقی (*Fagus orientalis* Lipsky) در ترکیب و ساختار اکوسیستم‌های جنگلی خزری نقش مهمی بازی می‌کند و تا کنون گزارش‌هایی از مطالعه تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیت‌های خزری به‌وسیله نشانگرهای مختلف مشاهده شده است (Salehi shanjani et al., 2002, 2004). به‌دلیل توجه روزافزون به حفاظت و احیاء این گونه به‌وسیله مراجع ذیربط، در این پژوهش سعی شد با مقایسه سطوح و مقادیر مختلف نمونه‌برداری و بذرگیری به‌وسیله میکروساتلایت‌ها، استراتژی‌های مناسب بذرگیری از راش مورد بررسی و بحث قرار گیرد. این پژوهش به‌ویژه به سؤالات زیر پاسخ می‌دهد: ۱) نمونه‌برداری از چند درخت بالغ نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی واقعی یک جمعیت راش است؟، ۲) حداقل تعداد درخت مادری و حداقل تعداد بذر

برنامه نرم‌افزاری (Fragment Manager 1.2 Pharmacia) بررسی شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

پس از اینکه برای هر فرد، ژنوتیپ‌های دیپلوئید شماره‌گذاری و فراوانی‌های آللی محاسبه شد، مطالعه تنوع ژنتیکی درختان خوش‌فرم و بدفرم راش با استفاده از نرم‌افزار GenALEX 6 (Peakal & Smouse, 2006) با معیارهایی چون میانگین تعداد آلل بر لوکوس Na ، میانگین تعداد آلل‌های نادر بر لوکوس Nr ، تعداد آلل‌های مؤثر Ne ، هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده Ho ، هتروزیگوسیتی مورد انتظار از معادله هاردی-وینبرگ He ، ضریب خویش‌آمیزی یا اندیکس ثبوت Fis (Fixation Index) و مقدار انحراف جمعیت‌ها از معادله هاردی-وینبرگ، انجام گرفت.

برای تکثیر با PCR، 100 mM محلول Tris-HCl با $\text{pH}=9$ ، محلول 500 mM KCL؛ محلول 15 mM MgCl_2 ؛ از هر اکسی‌نوکلئوزیدتری فسفات $200 \text{ }\mu\text{M}$ ؛ از هر پرایمر $0.4 \text{ }\mu\text{M}$ و Taq DNA polymeras (یک واحد) با حجم نهایی $25 \text{ }\mu\text{l}$ تهیه شد. پس از نگهداری محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای 95°C ، این محلول در معرض چرخه‌های دمایی ۳۰ چرخه: 95°C به مدت یک دقیقه، دمای اتصال (جدول ۱) به مدت یک دقیقه و 72°C به مدت ۱ دقیقه قرار گرفت. سپس فرآورده‌های تکثیر در 72°C به مدت ۸ دقیقه نگهداری شدند. در این کار از دستگاه PCR ساخت شرکت Perkin Elmer 9700 استفاده شد. طول قطعات تکثیرشده به وسیله توالی‌یاب خودکار (Alf Express, Pharmacia) اندازه‌گیری شد و نتیجه به وسیله

جدول ۱- ویژگی‌های ۴ نشانگر میکروساتلایت هسته‌ای (Pastorelli et al., 2003) به کاررفته برای بررسی تمایز درختان و بذرها حاصل

Gene Bank Accession no.	تعداد آلل‌ها	اندازه آلل‌های مشاهده شده	تکرار	غلظت MgCl_2 (mM)	دمای اتصال ($^\circ\text{C}$)	توالی پرایمر 5'-3'	لوکوس
AF528095	۱۲	۱۳۳-۸۳	(GA) ₂₆	۲۵	۶۰	TCAAACCCAGTAAATTTCTCA GCCTCAATGAACTCAAAAAAC	FS1-15
AF528090	۱۲	۱۱۲-۸۶	(GA) ₁₈	۱۵	۶۰	CACAGCTTGACACATTCCAAC TGGTAAAGCACTTTTTCCCCT	FS1-03
AF528091	۹	۱۲۰-۹۸	(GA) ₁₅	۲۵	۶۳	TGAATTCAATCATTGACCATTTC GGAAGGGTGCTTCAATTTGG	FS1-11
AF528092	۴	۲۰۴-۱۹۲	(GCT) ₅ (GTT) ₃ (GCT) ₆	۱۵	۶۰	AGATGCACCACTTCAAATTC TCTCCTCAGCAACATACCTC	FS3-04

نتایج

- غنای آللی

تمام نمونه‌های درختی و بذری در کل ۶۴ آلل در ۴ لوکوس مورد بررسی نشان دادند که ۶۲ آلل در نمونه‌های درختی (۳۵۰ درخت) و ۵۶ آلل در نمونه‌های بذری (۴۸۰ بذر) مشاهده شد. به این ترتیب حدود ۹۳ درصد از آلل‌های موجود در خزانه ژنی درختان توده در نمونه‌های بذری وجود داشت. ۲ آلل از دو لوکوس FS1-11 و FS3-04 تنها در نمونه‌های بذری وجود داشته و در نمونه‌های درختی مشاهده نشدند که احتمالاً در اثر انتقال گرده از جمعیت‌های مجاور به ذخیره ژنی بذرهاي مورد بررسی نفوذ کردند. ۸ آلل از ۴ لوکوس مختلف در ذخیره ژنی درختان وجود داشتند که در هیچ کدام از بذرها مشاهده نشدند. مقایسه فراوانی آلل‌ها

حاکی از وجود شباهت بین آلل‌های فراوان مجموعه درختی و بذری است (جدول ۲).

از ۶۲ آللی که در گروه نهایی درختان بالغ (با ۳۵۰ درخت) مشاهده شد، ۳۴ آلل در گروه پایه با ۲۵ درخت وجود داشتند (جدول ۲). افزایش قابل توجه تعداد آلل در گروه ۳۰۰ درختی نسبت به گروه پایه ۲۵ درختی (۸۲ درصد) بسیار محسوس بود. همان‌گونه که در جدول ۳ و شکل ۱ مشاهده می‌شود با افزایش تعداد نمونه، میانگین تعداد آلل در لوکوس (Na) نیز افزایش می‌یابد. بیشترین میزان افزایش Na با افزایش تعداد نمونه از ۲۵ به ۵۰ درخت (Na از ۸/۵ آلل به ۱۰/۲۵ آلل افزایش یافت) و از ۵۰ به ۱۰۰ درخت (Na از ۱۰/۲۵ آلل به ۱۲/۲۵ آلل افزایش یافت) ثبت شد. در حالی که افزایش‌های بعدی روند

دارد. با این حال بررسی این نتایج نشان داد که حتی با افزایش تعداد درختان مادری و تعداد بذرها از هر درخت مادری، برخی آل‌ها هرگز در نتاج مشاهده نمی‌شوند.

- تنوع ژنتیکی

برخلاف غنای آلی، روند تغییرات تعداد آل موثر (Ne) و هتروزیگوتی (He) به‌عنوان معیارهای تنوع ژنتیکی در توده‌های طبیعی متفاوت است. در درختان بالغ مقدار آنها با افزایش اندازه جمعیت تا ۱۵۰ درخت کاهش می‌یابد و سپس روند تغییرات ثابت می‌ماند (جدول ۳ و شکل ۱). بنابراین در مطالعه تنوع ژنتیکی، چنانچه تعداد نمونه کمتر از ۱۵۰ درخت باشد، باید به همگنی تعداد نمونه جمعیت‌های مختلف اهمیت زیادی داد. در غیر این صورت مقایسه جمعیت‌های مختلف با تعداد نمونه متفاوت نتایج گمراه‌کننده‌ای به‌دست خواهد داد.

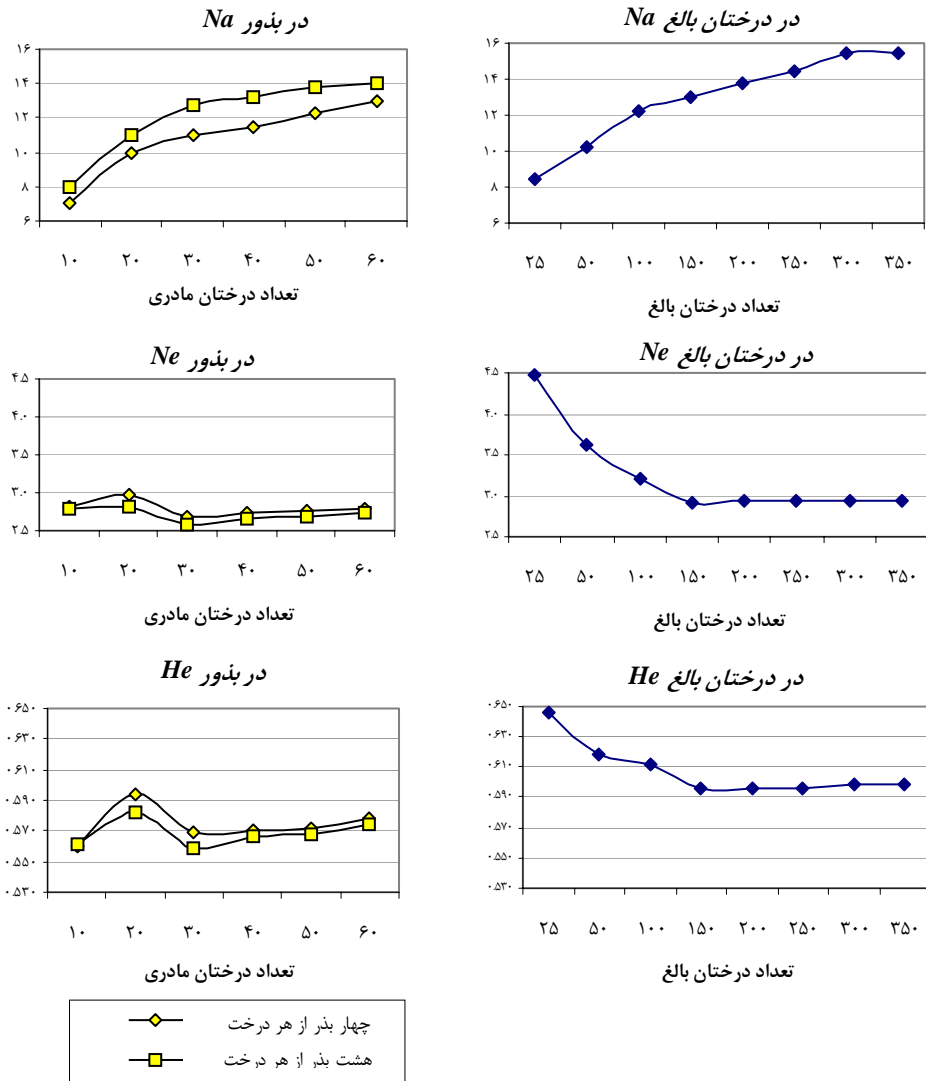
در گروه‌های نتاج، روند تغییرات Ne و He نیز همانند Na ، با افزایش تعداد درخت مادری از ۱۰ به ۲۰ درخت، افزایشی بود، در حالی که با افزایش از ۲۰ درخت به ۳۰ درخت، کاهش شدیدی در Ne و He نتایج دیده شد. بعد از آن افزایش تعداد درختان مادری به افزایش نامحسوسی در Ne و He نتایج منجر شد. همانند نتایج حاصل از درختان، مقایسه دسته بذرها با تعداد بذرها متفاوت، نتایج نادرستی به‌دست خواهد داد.

مقدار خویش‌آمیزی یا شاخص ثبوت با افزایش تعداد نمونه در گروه‌های درختی به‌طور محسوسی کاهش می‌یابد (جدول ۳). درحالی که مقدار این ضریب در دسته بذرها با تعداد متفاوتی از درخت و بذرها از روند خاصی پیروی نمی‌کند که حاکی از تصادفی بودن نمونه‌برداری و صحت آزمایش است.

ثابتی داشتند و با افزایش هر ۵۰ درخت به جمعیت، Na فقط به اندازه یک آل افزایش یافت و در جمعیت ۳۵۰ درختی افزایشی مشاهده نشد. میزان تقریباً ثابت تعداد آل و فراوانی آنها در دو گروه ۳۰۰ و ۳۵۰ درختی نشان داد که در جمعیتی با ۳۰۰ درخت، تمام آل‌های موجود در جمعیت نمونه‌برداری شدند.

در گروه نهایی بذرها، که از ۶۰ درخت مادری جمع‌آوری شد (چهار بذر (۴s) از هر درخت)، ۵۲ آل مشاهده شد. هنگامی که تعداد بذر به ازای هر درخت مادری به ۸ بذر (۸s) افزایش یافت (در ۴۸۰ بذر) تعداد آل به ۵۶ رسید. تعداد آل در لوکوس در گروه پایه حاصل از ۱۰ درخت مادری برای گروه ۴s، ۷ آل و برای گروه ۸s، ۸ آل بود. با افزایش تعداد درخت مادری به ۲۰ درخت، تعداد آل در لوکوس در گروه‌های ۴s و ۸s به ترتیب ۱۰ و ۱۱ آل بود. این نتیجه نشان داد برای افزایش حضور تعداد آل در گروه نتاج، نه تنها بذرها باید از درختان مادری بیشتری جمع‌آوری شود، بلکه تعداد بذر جمع‌آوری شده به ازای هر درخت نیز اثر محسوسی بر غنای آلی دارد (جدول ۳ و شکل ۱).

مقایسه کل آل‌های مشاهده‌شده در درختان توده‌های طبیعی و گروه‌های نتاج نشان داد که در دسته بذر حاصل از ۵۰ درخت مادری (۸s)، ۹۰ درصد از آل‌های موجود در خزانه ژنی درختان توده وجود داشتند. به‌علاوه باید به این نکته توجه کرد که اگرچه تعداد آل‌هایی که با جمع‌آوری بذر از ۶۰ درخت مادری برای ۴s (۲۴۰ بذر) و یا ۳۰ درخت مادری برای ۸s (۲۴۰ بذر) حفاظت می‌شود به‌طور تقریبی یکسان است ولی میانگین تعداد آل‌های نادر در دسته بذر ۴s (۶۰ درخت \times ۴ بذر) به‌طور محسوسی بیش از دسته بذر ۸s (۳۰ درخت \times ۸ بذر) است به‌طوری‌که در اولی ۹/۵ آل و در دومی ۷/۲۵ آل وجود دارد (جدول ۳). این نتیجه بر اهمیت جمع‌آوری بذر از درختان بیشتر تأکید



شکل ۱- مقدار Na و Ne و He در گروه‌هایی با تعداد متفاوت درخت و بذر بر اساس چهار لوکوس مورد بررسی

جدول ۳- برخی ویژگی‌های ژنتیکی گروه‌های مختلف درختی و بذری در چهار لوکوس ماکروساتلایتی مورد بررسی

تعداد درختان بالغ	۲۵	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	۳۵۰
Na	۸/۵	۱۰/۲۵۰	۱۲/۲۵۰	۱۲/۷۵۰	۱۳/۷۵۰	۱۴/۵۰۰	۱۵/۵۰۰	۱۵/۵۰۰
Ne	۴/۴۸۶	۳/۶۲۵	۳/۲۰۶	۲/۹۲۳	۲/۹۴۳	۲/۹۴۲	۲/۹۲۸	۲/۹۲۹
Nr	۳/۱۰۰	۵/۲۵۰	۸/۷۵۰	۸/۰۰	۱۰/۵۰۰	۱۱/۲۵۰	۱۲/۲۵۰	۱۲/۲۵۰
Ho	۰/۵۲۰	۰/۵۵۳	۰/۵۴۵	۰/۵۵۵	۰/۵۶۱	۰/۵۸۳	۰/۵۹۶	۰/۵۹۸
He	۰/۶۴۶	۰/۶۱۸	۰/۶۱۲	۰/۵۹۶	۰/۵۹۵	۰/۵۹۶	۰/۵۹۹	۰/۵۹۹
Fis	۰/۲۵۳**	۰/۱۲۴**	۰/۱۲۶**	۰/۰۷۰**	۰/۰۴۶	۰/۰۱۰	۰/۰۰۸	۰/۰۰۷
درخت × بذر*	۴ × ۱۰	۴ × ۲۰	۴ × ۳۰	۴ × ۴۰	۴ × ۵۰	۴ × ۶۰		
Na	۷/۱۰۰	۱۰/۰۰	۱۱/۰۰	۱۱/۵۰۰	۱۲/۲۵۰	۱۳/۰۰		
Ne	۲/۸۱۵	۲/۹۸۲	۲/۶۹۰	۲/۷۳۸	۲/۷۵۵	۲/۷۷۷		
Nr	۲/۷۵۰	۵/۷۵۰	۶/۲۵۰	۸/۰۰	۷/۷۵۰	۹/۵۰۰		
Ho	۰/۵۶۷	۰/۶۱۰	۰/۵۹۳	۰/۵۷۸	۰/۵۷۳	۰/۵۶۸		
He	۰/۵۶۱	۰/۵۹۴	۰/۵۷۰	۰/۵۷۰	۰/۵۷۲	۰/۵۷۹		
Fis	۰/۰۴۶	۰/۰۲۳	۰/۰۴۲	۰/۰۱۶	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲		
درخت × بذر*	۸ × ۱۰	۸ × ۲۰	۸ × ۳۰	۸ × ۴۰	۸ × ۵۰	۸ × ۶۰		
Na	۸/۰۰	۱۱/۰۰	۱۲/۷۵۰	۱۳/۲۵۰	۱۳/۷۵۰	۱۴/۰۰		
Ne	۲/۷۸۳	۲/۸۱۳	۲/۵۶۸	۲/۶۵۳	۲/۶۸۹	۲/۷۳۵		
Nr	۳/۷۵۰	۷/۰۰	۷/۲۵۰	۹/۷۵۰	۱۰/۵۰۰	۱۰/۷۵۰		
Ho	۰/۵۶۳	۰/۶۰۱	۰/۵۷۵	۰/۵۶۷	۰/۵۶۷	۰/۵۶۷		
He	۰/۵۶۲	۰/۵۸۲	۰/۵۵۹	۰/۵۶۶	۰/۵۶۷	۰/۵۷۴		
Fis	۰/۰۰۵	۰/۰۴۱	۰/۰۲۳	۰/۰۱۳	۰/۰۱۲	۰/۰۰۲		

*: تعداد درختان مادری × تعداد بذر از هر درخت و ** : انحراف از ساختار ژنوتیپی مورد انتظار از قانون هاردی-وینبرگ با سطح بالای ۹۵ درصد

بحث

اثر تعداد نمونه بر محاسبه مقدار تنوع ژنتیکی جمعیت و ضرورت بررسی تنوع ژنتیکی خنثی برای بررسی فرایندهای تاریخیچه‌ای و دموگرافی^۱ در تحقیقات بسیاری تأکید شده است (Holderegger *et al.*, 2006). از میان پارامترهای ژنتیکی مختلف که در ژنتیک حفاظتی برای بررسی اختلاف میان جمعیت‌ها و تعیین جمعیت‌هایی که حفاظت از آنها ضروری است، استفاده می‌شود، غنای آللی و تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی مورد انتظار) اهمیت کلیدی دارند، به‌ویژه غنای آللی که امکان مقایسه بین جمعیتی را فراهم می‌کند (Van Loon *et al.*, 2007). نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار برآورد غنای آللی ارتباط مستقیمی با تعداد نمونه دارد. در بیشتر مطالعات تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی، تعداد نمونه استاندارد، ۵۰ فرد در جمعیت است (Nybom, 2004). در صورتی که نتایج این پژوهش با مطالعه میکروساتلایت‌های هسته‌ای راش شرقی (*F. orientalis*) به‌روشنی نشان می‌دهد که مقدار غنای ژنتیکی جمعیت با چنین تعداد نمونه استاندارد (۵۰ فرد) بسیار کم محاسبه خواهد شد. به‌طوری که با مطالعه ۳۰۰ درخت به‌عنوان نماینده درختان در جمعیت بزرگی از درختان، ۶۲ آلل ثبت شد، در حالی که با بررسی ۵۰ درخت در همان جمعیت، تعداد آلل مشاهده‌شده به ۴۲ آلل کاهش پیدا کرد. نتایج این پژوهش با نتایج مطالعه میکروساتلایتی جمعیت‌های ماهی سالمون و درخت زبان‌گنجشک به‌ترتیب توسط Banks *et al.* (2000) و Miyamoto *et al.* (2008) مطابقت دارد. در این پژوهش‌ها بهترین اندازه جمعیت برای حفاظت اکثریت آلل‌ها، ۳۰۰-۲۰۰ فرد، بیان شد. برآورد آلل‌های مؤثر و هتروزیگوتی (که مقیاس‌های مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها هستند) نشان می‌دهد تعداد نمونه عامل مهمی در محاسبه است. مقایسه برآورد تعداد آلل‌های مؤثر و هتروزیگوتی نشان داد که بیشترین مقدار این دو عامل در جمعیت ۲۵ فردی وجود دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد در برآورد تنوع ژنتیکی، برای اینکه قوانین آماری نیز رعایت شوند، نمونه‌برداری محدود ۳۰ فرد کفایت می‌کند.

این نتایج منطبق با نتایج Miyamoto *et al.* (2008) است که با هدف تعیین تعداد نمونه استاندارد زبان‌گنجشک برای مطالعه تنوع ژنتیکی انجام شده بود. اما آنچه بسیار قابل توجه است رابطه پارامترهای فوق با تعداد نمونه است. به این دلیل در هنگام مقایسه جمعیت‌های مختلف باید تعداد ثابتی نمونه در تمام جمعیت‌های مورد مطالعه بررسی شود.

اثر هم‌زمان تعداد درخت مادری و تعداد بذر از هر درخت بر تنوع ژنتیکی نسل آینده جمع‌آوری بذر از تعداد محدودی درخت به دلایل مختلفی مانند کاهش اندازه جمعیت، ترجیح جمع‌آوری بذر از برخی ژنوتیپ‌های خوش‌فرم و جمع‌آوری نکردن بذر از درختان بدفرم یا کم‌بازده، در یک توده جنگلی که با هدف حفاظت *ex situ* یا جنگلکاری انجام می‌شود، می‌تواند ساختار ژنتیکی جمعیت آینده را تغییر دهد (Kätzel *et al.*, 2001). داده‌های این پژوهش نیز نشان داد که با وجود دقت در جمع‌آوری بذر، مقدار پارامترهای تنوع ژنتیکی بذرها نسبت به درختان بالغ جمعیت کمتر است. Hosius (1993) در پژوهش‌های خود نشان داد که تعداد کل آلل‌ها و آلل‌های نادر جمعیت آینده در گونه *Picea abies* کاهش و ساختار ژنتیکی آن تغییر می‌یابد. بنابراین مجریان طرح‌های حفاظتی باید سعی کنند که جمع‌آوری بذر برای نسل آینده به‌گونه‌ای باشد که کمترین تغییر ساختار ژنتیکی در آنها ایجاد شود. بر اساس نتایج این پژوهش، جمع‌آوری بذر از حداقل ۵۰ درخت در هر توده برای برنامه‌های حفاظتی توصیه می‌شود. این نتایج با یافته‌های Miyamoto *et al.* (2008) مطابقت دارد. آنها با مطالعه روی درخت زبان‌گنجشک پیشنهاد کردند که برای حفاظت از ۹۰ درصد از غنای آللی می‌بایست از ۶۰-۵۰ درخت بذر جمع‌آوری کرد. در این پژوهش بررسی تعداد درخت و تعداد بذر از هر درخت نشان داد که اگرچه تعداد آلل در دسته بذرها ۲۴۰ عددی (۴s با ۶۰ درخت) و ۸s (با ۳۰ درخت) به‌طور تقریبی یکسان است. ولی تعداد آلل‌های نادر در دسته بذر ۸s کمتر از دسته بذر ۴s است. این موضوع نشان می‌دهد هرچه تعداد درختی که بذر آنها جمع‌آوری می‌شود بیشتر باشد، خطر حذف آلل‌های نادر نیز کمتر می‌شود. به‌علت مزیت تکاملی بلندمدت فرم‌های ژنی

۱- مطالعه ویژگی‌های جمعیت‌های گیاهی مثل اندازه، سن، رشد، تراکم، توزیع و سلامت

نشانگر مورد استفاده نیز وابسته است. در مورد نشانگرهای آلوزیمی در زبان گنجشک در مقایسه با دیگر گونه‌ها که تعداد آلل‌های بسیار کمتری از میکروساتلایت‌ها نشان داده‌اند، تعداد نمونه مورد نیاز بسیار کمتر از تعدادی است که به‌وسیله میکروساتلایت‌ها (۳۰۰ پایه) پیشنهاد شده است (Miyamoto *et al.*, 2008). بنابراین در بررسی‌های مقایسه‌ای توجه به نوع نشانگر بسیار اهمیت دارد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با کمک‌های مالی مؤسسه بین‌المللی منابع ژنتیک گیاهی با کد پروژه D06C Fellowships و مؤسسه ژنتیک گیاهی، فلورنس ایتالیا ممکن شده است که به این وسیله مراتب قدردانی خود را اعلام می‌داریم.

منابع

- Amaral, W., A. Yanchuk & E. Kjaer, 2004. Methodologies for *ex situ* conservation. Forest Genetic Resources Conservation and Management: in plantation and genebank, Volume 3, Chapter 2. IPGRI.
- Austerlitz, F., C.W. Dick, C. Dutech, E.K. Klein, S. Oddou-Muratorio, P.E. Smouse & V.L. Sork, 2004. Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve, *Molecular Ecology*, 13: 937-954.
- Banks, M.A., V.K. Rashbrook, M.J. Calavetta, C.A. Dean & D. Hedgecock, 2000. Analysis of microsatellite DNA resolves genetic structure and diversity of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in California's Central Valley, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57: 915-927.
- Cavers, S., B. Degen, H. Caron, M.R. Lemes, R. Margis, F. Salgueiro & A.J. Lowe, 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations, *Heredity*, 95: 281-289.
- FAO, 2001. Global Forest Resources Assessment, FAO Forestry Paper 140. Rome, Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/forestry/fo/fra/> [Geo-2-416].
- Hawley, G.J., P.G. Schaberg, D.H. DeHayes & J.C. Brissette, 2005. Silviculture alters the genetic structure of an eastern hemlock forest in Maine, USA. *Canadian Journal of Forest Research*, 35:143-150.

نادر، وجود نداشتن آلل‌های نادر می‌تواند به کاهش پتانسیل جمعیت‌ها برای سازگاری و نیز کاهش استمرار بقاء در برابر تغییرات محیطی منجر شود (Namkoog *et al.*, 2000; Kalinowski, 2004, 2005). بنابراین جمع‌آوری بذر از درختان بیشتر، تضمین‌کننده حفاظت ژنتیکی برنامه‌های جمع‌آوری بذر خواهد بود.

داده‌های این پژوهش به وضوح نشان می‌دهد که جمع‌آوری بذر و جنگلکاری می‌تواند ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها را تغییر دهد که نشان‌دهنده اهمیت حفاظت از توده‌های طبیعی و حفاظت *in situ* است. حذف ژن‌ها از سیستم‌های جنگلی طی برنامه‌های جمع‌آوری بذر یا تجدید حیات طبیعی گونه راش، به‌وسیله تغییر ساختار ژنتیکی و سطح تنوع ژنتیکی روی حاصلخیزی، پایداری اکوسیستم، استمرار بلندمدت و تکامل جمعیت‌ها تأثیر می‌گذارد (Howley *et al.*, 2005). بنابراین انتخاب تعداد محدود درخت برای بذرگیری یا تجدید حیات در آینده، می‌تواند در درازمدت به فرسایش ژنتیکی جمعیت‌ها منجر شود. بر اساس نتایج این پژوهش جمع‌آوری بذر حداقل از ۵۰ درخت در هر توده برای برنامه‌های حفاظتی توصیه می‌شود.

سؤالی که پیش می‌آید این است که آیا می‌توان این نتایج را به دیگر گونه‌های درختی عمومیت داد؟ آنچه مسلم است، راش شرقی یک گونه بادگرده‌افشان با پراکنش گسترده است که با استفاده از میکروساتلایت‌ها، ساختار میان‌جمعیتی محدودی ($F_{st} < 0.05$) نشان داده است. بنابراین این نتایج قابل استفاده برای دیگر گونه‌های درختی بادگرده‌افشان که دارای بذرهای سنگین و تراکم (حدود ۲۰۰-۴۰۰ پایه در هکتار) و ساختار ژنتیکی مشابهی هستند، می‌تواند استفاده شود.

سؤال دیگر این است که آیا با استفاده از دیگر نشانگرهای ژنتیکی نیز می‌توان به نتایج مشابهی دست یافت؟ روشن است که اگر تأکید بر غنای آللی باشد، با استفاده از دیگر نشانگرهای ژنتیکی، نتایج متفاوت خواهد بود. در حقیقت، انتخاب نشانگر موضوعی بسیار پیچیده است. (Scotti *et al.* 2006). در پژوهشی روی گونه *P. abies* نشان دادند که برآورد تنوع ژنتیکی تنها با تعداد نمونه مورد بررسی رابطه ندارد، بلکه به نوع

- Holderegger, R., U. Kamm & F. Gugerli, 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics, *Landscape Ecology*, 21: 797-807.
- Hosius, B., 1993. Wird die genetische Struktur eines Fichtenbestandes von Durchforstungseingriffen beeinflusst? *Forst und Holz*, 48: 306-308.
- Kalinowski, S.T., 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs, *Conservation Genetics*, 5: 539-543.
- Kalinowski, S.T., 2005. HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness, *Molecular Ecology Notes*, 5: 187-189.
- Kalinowski, S.T., M.L. Taper & T.C. Marshall, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment, *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.
- Kätzel, R., B. Nordt & J. Schmitt, 2001. Untersuchungen zum Einfluß der Durchforstungsintensität auf die genetische Struktur von Kiefernbeständen in den Berliner Forsten auf der Grundlage von Isoenzym- und DNA-Markern. In: Wolf, H., (Ed.). Nachhaltige Nutzung forstgenetischer Ressourcen. Tagungsbericht zur 24. Internationalen Tagung der Arbeitsgem. f. Forstgenetik u. Forstpflanzenzüchtung. Sächsische Landesanstalt für Forsten, Pirna, Germany, pp. 159-170.
- Miyamoto, N., J.F. Fern´andez-Manjarr´es, M.E. Morand-prieur, P. Bertolino & N. Frascaria-Lacoste, 2008. What sampling is needed for reliable estimations of genetic diversity in *Fraxinus excelsior* L. (Oleaceae), *Annals of Forestry Science*, 65: 403-413
- Namkoong, G., M.P. Koshy & S. Aitken, 2000. Selection. In: Young, A., Boshier, D. and Boyle, T., (Eds.). *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. CSIRO and CABI, Collingwood, pp. 101-111.
- Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants, *Molecular Ecology*, 13: 1143-1155.
- Ohsawa, T., Y. Tsuda, Y. Saito, H. Sawada & Y. Ide, 2007. Steep slopes promote downhill dispersal of *Quercus crispula* seeds and weaken the fine-scale genetic structure of seedling populations, *Annals of Forestry Science*, 64: 405-412.
- Pastorelli, R., M.J.M. Smulders, W.P.C. Van't Westende, B. Vosman, R. Giannini, C. Vettori & G.G. Vendramin, 2003. Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky, *Molecular Ecology Notes*, 3: 76-78.
- Peakal, R. & P.E. Smouse, 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- Petit, R.J., A. El Mousadik & O. Pons, 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers, *Conservation Biology*, 12: 844-855.
- Ritland K., 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci, *Heredity*, 88: 221-228.
- Salehi Shanjani, P., C. Vettori, R. Giannini & R.A. Khavari-nejad, 2004. Intraspecific variation and geographic patterns of *Fagus orientalis* Lipsky chloroplast DNA, *Silvae Genetica*, 53: 193-197.
- Salehi Shanjani, P., G.G. Vendramin & M. Calagari, 2008. Assessment of genetic structure within and among Iranian populations of beech (*Fagus orientalis* Lipsky): Implications for in situ gene conservation, The 8th IUFRO International Beech Symposium, Japon.
- Salehi Shanjani, P., L. Paule, R.A. Khavari-Nejad, D. Gömöry & K. Sagheb-Talebi, 2002. Allozymic variability in beech (*Fagus orientalis* Lipsky) forests over Hyrcanian zone, *Journal of Forest Genetics*, 9(4): 297-297.
- Scotti, I., G. Paglia, F. Magni & M. Morgante, 2006. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation, *Annals of Forestry Science*, 63: 485-491.
- Sjogren, P. & P.I. Wyoni, 1994. Conservation Genetics and Detection of Rare Alleles in Finite Populations, *Conservation Biology*, 8: 267-270.
- Van Loon, E.E., D.F.R. Cleary & C. Fauvelot, 2007. ARES: software to compare allelic richness between uneven samples, *Molecular Ecology Notes*, 7: 579-582.
- Zane, L., L. Bargelloni & T. Patarnello, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

Relationship between sample size and genetic diversity in oriental beech (*Fagus orientalis* Lipsky)

P. Salehi Shanjani^{1*}, G.G. Vendramin² and M. Calagari³

¹Assistant Prof., Natural Resource Gene Bank, Research Institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran

²Prof, Institute of Plant Genetic, CNR, Florence, Italy

³Assistant Prof., Department of Populus and Fast Growing Trees, Research Institute of Forests and Rangelands, I. R. Iran

(Received: 6 July 2010, Accepted: 2 August 2011)

Abstract

Sample size is a critical issue for genetic diversity studies and conservation programs. However, sample size evaluation requires previous knowledge of genetic diversity. Here, we evaluated sample size requirements for accurate genetic diversity in adult trees and family arrays in a *Fagus orientalis* Lipsky population in central Hyrcanian forests of Iran. Data consisted of 350 adult trees and 480 offspring's from 60 mother tree genotyped at four nuclear microsatellites. Results indicated that several adult individuals (about 300) are necessary for accurate measures of allele richness. However, expected heterozygosity requires smaller samples (30). Seeds from 50 trees captured about 90% of adult allelic diversity suggesting that seed sampling is heavily finalized for allele counts, and this should be considered in conservation programs. Nevertheless, gene diversity of seeds was lower than that of the adult population, which emphasizes on conservation of natural stands and in situ conservation programs. Extrapolation of these results to other tree species with similar distribution (widespread), way of propagation (wind-pollinated, dispersion of the fruits by gravity), density (about 200-400 individuals in ha), and genetic structure as oriental beech could be possible.

Key words: *Fagus orientalis* Lipsky, Genetic variation, Microsatellite, Seed sampling.