بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

نحوه تعیین پایه‌های منتخب ون (*Fraxinus excelsior*) برای تشکیل باغ بذر با روش مولکولی

نگارندگان:

یوسف محمدی و فرزاد بنائی اصل

اعضای هیئت علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

۱۴۰۴

عنوان طرح منتج به دستورالعمل	شماره مصوب
ارزیابی قرابت‌های ژنتیکی پایه‌های منتخب ون برای تشکیل باغ بذر در ایستگاه تحقیقات چمستان	۱۲-۰۹-۰۹-۰۲۸-۰۹۵۵۳-۹۸۰۶۵۶

عنوان دستورالعمل: نحوه تعیین پایه‌های منتخب ون (*Fraxinus excelsior*) برای تشکیل باغ بذر با روش مولکولی

نگارش:

یوسف محمدی- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

فرزاد بنائی اصل- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

صفحه‌آرا: مریم نوبخت

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی/ بخش تحقیقات زیست‌فناوری

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.

صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵ **تلفن**: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وب‌سایت:** www.rifr-ac.ir

شمارگان: الکترونیکی

نوبت و سال انتشار: اول - ۱۴۰۴

این نشریه به شماره ۶۷۲۹۷ در تاریخ ۱۴۰۴/۰۲/۱۵ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

ISBN : 978-964-473-597-4

❖ مخاطبان دستورالعمل:

- کارشناسان، پژوهشگران و اعضای هیئت علمی بخش‌های زیست‌فناوری، جنگل، ژنتیک و به‌نژادی گیاهی مؤسسات تحقیقاتی و دانشگاه‌ها

❖ شما با مطالعه این دستورالعمل با موارد زیر آشنا می‌شوید:

- نحوه استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آشکارسازی فراورده‌های آن و معرفی نشانگرهای مورد استفاده در تجزیه‌وتحلیل مولکولی و بهترین نشانگرهای SSR مورد استفاده در مطالعات تجزیه تنوع ژنتیکی ون و تعیین پایه‌های مناسب برای تشکیل باغ بذر ون

فهرست

چکیده ۱
مقدمه ۲
مراحل انجام کار ۵
استخراج DNA..... ۵
تعیین کمیت و کیفیت DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۰
الکتروفورز عمودی محصولات PCR ۱۲
امتیازدهی مولکولی پایه‌ها و تجزیه داده‌ها..... ۱۹
معرفی بهترین نشانگرهای مورد استفاده برای ون ۱۹
خوشه‌بندی ژنتیکی پایه‌ها..... ۲۱
نتیجه‌گیری کلی ۲۲
منابع ۲۳

چکیده

در موضوع بازسازی و گسترش جنگل‌ها، همیشه نبود یا کمبود بذر اصلاح شده با تنوع ژنتیکی بالا یکی از مهمترین عوامل محدودکننده بوده است. از سوی دیگر، هزینه بالای فعالیت‌های لازم در زمینه‌های مختلف جنگلداری از تولید بذر و کاشت تا برداشت جنگل، موجب شده تا مدیران جنگل‌ها در مورد کیفیت بذرهای مورد استفاده در موضوع جنگل‌کاری نگرانی داشته باشند.

یکی از اولین گام‌هایی که در راستای بهبود شرایط نامناسب و جلوگیری از پسروی ژنتیکی درختان و درختچه‌های جنگلی برداشته می‌شود، احداث باغ بذر گونه‌های درختی و درختچه‌ای جنگلی است. تشکیل باغ بذر علاوه بر تأمین بذرهای تکرارپذیر و نهال‌های با کیفیت، در تأمین تنوع ژنتیکی کافی برای مطالعات آینده نیز نقش مهمی ایفا می‌کند.

در این راستا ارزیابی قرابت‌های ژنتیکی پایه‌های منتخب ون (*Fraxinus excelsior*) از مهمترین مطالعات پژوهشی برای تشکیل باغ بذر است. در این نشریه، با نحوه استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، الکتروفورز عمودی، معرفی بهترین نشانگرهای چند شکل برای بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعات ون، خوشه‌بندی پایه‌های منتخب و انتخاب پایه‌های مناسب برای تشکیل باغ بذر ون در ایستگاه چمستان آشنا خواهید شد.

واژه‌های کلیدی: باغ بذر، تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، نشانگرهای مولکولی، ون

مقدمه

درخت ون یا زبان‌گنجشک معمولی[1] یا اروپایی[2]، با نام علمی *Fraxinus excelsior* از خانوادهٔ Oleaceae بوده که در سراسر اروپا پراکنش دارد. در اروپا از شرق شبه جزیرهٔ ایبری تا بخش‌های مرکزی روسیه و از مناطق مدیترانه‌ای جنوب اروپا تا شمالی‌ترین حد آن در نروژ، پراکنش دارد. در آسیا نیز در مناطق قفقاز و ایران (ناحیهٔ رویشی هیرکانی) و بنا بر گزارش‌هایی در شمال آفریقا نیز این گونه به‌طور بومی وجود دارد. ایران شرقی‌ترین حد پراکنش این گونه از زبان‌گنجشک محسوب می‌گردد (Dobrowolska *et al*., 2011).

کمترین و بیشترین حد ارتفاعی رویش آن از ۴۵۰ متر از سطح دریا در مناطق پست بریتانیا تا ۱۶۵۰ متر در والیز واقع در جنوب سوئیس است. درحالی‌که در ایران تا ارتفاع ۲۲۰۰ متر از سطح دریا وجود دارد (Fraxigen, 2005). ازجمله ویژگی‌هایی که این گونه را برای جنگل‌کاری مورد توجه زیادی قرار داده، سرعت رشد زیاد، تحمل شرایط تنش‌های آبی، سهولت استقرار نونهال و نهال، زنده‌مانی بالا در مراحل اولیهٔ استقرار و ارزش تجاری چوب آن است؛ به‌نحوی‌که کمتر گونه درختی چنین ویژگی‌هایی را به‌طور همزمان دارد. آلمان، دانمارک، سوئد، فرانسه، اتریش، بلژیک، رومانی، چک، بلغارستان، اسلواکی و سایر کشورها ازجمله مناطقی هستند که در جنگل‌کاری‌ها به این گونه توجه زیادی دارند (Beck *et al*., 2016).

امروزه باغ بذر گونه‌های جنگلی، سنگ بنای گسترش و بازسازی منطقی و علمی جنگل‌ها قلمداد می‌شود و برای دستیابی به یک منبع مطمئن و تکرارپذیر بذر اصلاح شده درختان و درختچه‌های جنگلی، تشکیل باغ بذر ازجمله ضروریات انکارناپذیر است. باغ بذر حلقه اتصال بین جنگلداران از یک سو و پژوهشگران و به‌نژادگران گونه‌های گیاهی از سوی دیگر محسوب

---

1. Common ash
2. European ash

می‌شود. بازسازی جنگل‌ها شاید به‌صورت طبیعی یا مصنوعی انجام شود (میرزایی ندوشن، ۱۳۹۴). در بازسازی مصنوعی جنگل‌ها، بذر مورد نیاز از توده‌های طبیعی جنگلی، محاوط بذرگیری و یا از باغ بذر تأمین می‌شود. در تأمین فوری بذر گونه‌های جنگلی، گاهی بذر از تک درختانی که ظاهر مناسبی دارند یا از توده‌هایی با شرایط عمومی مناسب، انتخاب می‌شود. همین موضوع به دلیل یکنواختی و شباهت ژنتیکی بذرهای جمع‌آوری شده، منجر به پسروی ژنتیکی جنگل‌های بازسازی شده و در نهایت حساس بودن گونه‌های جنگلی به انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی و کاهش عملکرد می‌شود (Mohammadi and Gheytaranpour, 2022). بنابراین در تأمین نیازهای درازمدت، عاقلانه‌ترین راه، احداث باغ بذر و تولید بذر کافی و با کیفیت ژنتیکی، فیزیکی و فیزیولوژیکی مناسب از پایه‌های مستقر در آنهاست. علاوه بر این، امروزه تغییرات شدیدی که در دما، رطوبت و ترکیبات شیمیایی جو و خاک کره زمین اتفاق افتاده است، میدان و عرصه جدیدی را به چالش‌های گذشته در تقویت و توسعه جنگل‌ها اضافه کرده است. بنابراین ایجاد باغ بذر برای تولید بذرهای اصلاح شده برای مقابله با چنین تغییراتی، بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

بذر ثمره اصلی فرایندهای مهم تکاملی و لقاح بوده که ضامن بقای نسل بیشتر گیاهان ازجمله درختان و درختچه‌های جنگلی است که با عمر طولانی شرایط متفاوتی از تغییرات محیطی و اقلیمی را تجربه می‌کنند. بذر حامل اطلاعات مهم ژنتیکی می‌باشد که اصلاح‌گران درختان و درختچه‌ها به شکل‌های مختلف از آن سود می‌برند. درصورتی که در جنگل‌کاری‌ها (با هر هدفی) از بذر مناسب استفاده نشود، بخش وسیعی از تلاش‌ها و هزینه‌های هنگفتی که در این راه صرف می‌شود بی‌نتیجه خواهد شد.

از این‌رو تولید بذر مناسبی که بتواند نهال‌هایی با توانمندی ویژه مناطق مورد جنگل‌کاری تولید نماید، از ضرورت‌های اجتناب‌ناپذیر در جنگل‌کاری‌ها، اعم از مناطق مرطوب، نیمه‌مرطوب و خشک است (قمری زارع و همکاران، ۱۴۰۲).

متأسفانه در کشور ما به موضوع باغ بذر به صورت اصولی پرداخت نشده است. شاید یکی از دلایل آن، سطح کم جنگل‌های اقتصادی در کشور است. در سال ۱۳۹۸ سازمان جنگل‌ها و مراتع کشور برنامه توسعه و احیاء زیست بوم زاگرس را تصویب نموده و بنا دارد با شناسایی ده‌ها محوطه بذری و جمع آوری بذر از آنها نسبت به احیاء بیش از ۱۲۰۰۰۰ هکتار اراضی جنگلی از طریق بذرکاری و نهال اقدام نماید. از سویی دیگر، همسو با برنامه زیست‌بوم زاگرس، در برنامه‌ای با عنوان توسعه و احیاء جنگل‌های ایران در نظر دارد در افق ۱۰ ساله حداقل ۲ میلیون هکتار به سطح جنگل‌های ایران در نواحی مختلف رویشی ازجمله هیرکانی، ارسبارانی، ایران- تورانی، خلیج- عمانی و صحارا- سندی اضافه کند (Espahbodi *et al.*, 2011).

در ایران با وجود گذشت بیش از ۵۰ سال از سابقه سازمان جنگل‌ها، مراتع و آبخیزداری، هنوز منبع اصلی تأمین بذر، تک‌پایه‌هایی با فنوتیپ برتر در خارج از شمال و تک‌پایه‌ها و محوطه‌های بذری در شمال کشور می‌باشد. اگرچه انگشت شمار باغ بذرهایی در ناحیه هیرکانی ایجاد گردید، ولی هنوز از بذر آنها استفاده نمی‌شود.

بنابراین با توجه به اهمیت درخت ون در جنگل‌های هیرکانی و لزوم ایجاد باغ بذر گونه‌های مهم و تدوین برنامه‌های توسعه و احیا جنگل‌ها، تدوین دستورالعمل فنی برای بررسی تنوع ژنتیکی پایه‌های منتخب ون در راستای تشکیل باغ بذر حائز اهمیت است.

مراحل انجام کار

استخراج DNA

در این دستورالعمل از ۱۸ پایه ون که از فنوتیپ مناسبی (شاداب، ظاهر سالم، هرس طبیعی، چیره) برخوردار بودند و از سه ناحیه پل سفید، دهمیان و سنگده در استان مازندران جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. قطر پایه‌های مادری ۱۰/۶ تا ۵۷/۸ سانتی‌متر و ارتفاع آنها از ۷/۸ تا ۲۹ متر متغییر بود (جدول ۱). اکثر پایه‌های مادری میانسال بودند.

از ۱۸ پایه مورد بررسی دو پایه در مناطق جنگلی جنوب شهر پل سفید سوادکوه معروف به جنگل سرت، نه پایه مادری در مناطق جنگل‌کاری شده اطراف روستای دهمیان سوادکوه و هفت پایه مادری در مناطق جنگل‌کاری شده روستای سنگده ساری واقع بودند.

بذرها پس از بوجاری، در نهالستان لاجیم واقع در فاصله ۱۵ کیلومتری رویشگاه‌هایی که پایه‌های مادر در آن قرار داشتند، در ماسه مرطوب، به تفکیک پایه‌های مادری، تحت استراتیفه قرار گرفتند.

نهالستان لاجیم در ۳۰ کیلومتری جنوب غربی ساری در مختصات ۵۳ درجه و ۵ دقیقه و ۵۸ ثانیه طول شرقی، در ۳۶ درجه و ۱۵ دقیقه و ۳۵ ثانیه عرض شمال و در ارتفاع ۶۷۲ متر از سطح دریا قرار دارد. بذرهای لایه‌گذاری شده، به تفکیک پایه مادری در کرت‌هایی به ابعاد ۱۰۰ در ۱۵۰ سانتی‌متر در ۵ ردیف با فاصله ۲۰ سانتی‌متر از هم و نیز روی خطوط کاشت با فاصله ۱۵ سانتی‌متر کاشت گردید. در هر کرت ۵۰ عدد بذر کاشته شد. به‌صورت هفتگی نهال‌ها مورد بازدید قرار گرفتند. وجین علف‌های هرز و آبیاری طبق روال معمول نهالستان انجام شد. برای بررسی‌های مولکولی از هر یک از کرت‌های مورد نظر از ۴ نهال نمونه برگ تازه تشکیل شده برای بررسی های مولکولی تهیه گردید و در محتوای سیلیکاژل به آزمایشگاه منتقل گردید.

جدول ۱- اطلاعات کمی و مختصات جغرافیایی پایه‌های مادری

پایه‌ها	ناحیه*	ارتفاع از سطح دریا	قطر پایه (cm)	ارتفاع (متر)
P1	PS	950	34.4	19.5
P2	PS	951	48.4	29
P3	D	1198	23.1	15.5
P4	D	1218	19.5	13.6
P5	D	1218	10.6	8.5
P6	D	1221	29.60	12.7
P7	D	1222	23.10	14.5
P8	D	1219	58.7	23.8
P9	D	1215	16.9	7.8
P10	D	1229	35.8	13.2
P11	D	1231	21.5	14.7
P12	S	1441	16.2	10.5
P13	S	1428	22	15.5
P14	S	1296	16.4	8.7
P15	S	1256	20.5	17.5
P16	S	1197	31.4	12.4
P17	S	1197	14.2	8.5
P18	S	1187	11.78	10.2

* **PS:** پل سفید، **D:** دهمیان، **S:** سنگده

استخراج DNA به روش CTAB (سقای معروف و همکاران، ۱۹۸۴) (جدول ۲) به شرح زیر انجام شود (شکل ۱).

۱) حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونهٔ برگی در حضور ازت مایع پودر و به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری استریل حاوی ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج استریل گرم (حدود ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و ۴۰ میکرولیتر PVP منتقل و پس از چند بار وارونه کردن در زیر هود، ۳ میکرولیتر بتا مرکاپتواتانول به هر تیوب اضافه شود.

۲) تیوب‌ها به‌مدت یک ساعت در بن‌ماری در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شوند. هر ۱۰ دقیقه یک‌بار نمونه‌ها به آرامی وارونه شوند تا بافر استخراج به‌طور کامل با پودر برگی مخلوط شود.

۳) نمونه‌ها را پس از خارج کردن از بن‌ماری، به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در هوای اتاق قرار دهید تا خنک گردد.

۴) هم‌حجم نمونه‌ها، محلول کلروفورم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴-۱) به آنها اضافه و نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه به آرامی وارونه شوند.

۵) نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شود و قسمت مایع بالایی لوله‌ها به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل جدید منتقل گردد و ۳۰۰ میکرولیتر NaCl سرد (نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) برای حل کردن پروتئین‌ها و ۸۰۰ میکرولیتر اتانول خالص (۱۰۰٪) به هر تیوب اضافه شود.

۶) پس از رؤیت کلاف DNA، تیوب‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شوند.

۷) پس از تشکیل رسوب، محلول رویی تیوب تخلیه و از محلول‌های شستشوی ۱ و ۲ (جدول ۳ و ۴) هریک به‌مدت ۱۰ دقیقه برای شستشوی رسوب استفاده شود.

۸) تیوب‌های حاوی رسوب DNA در دمای اتاق برای خشک شدن قرار داده شده و پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها، به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر TE، [Tris(10Mm), EDTA(1mM)] اضافه گردد و تیوب‌ها به‌مدت یک شب در دمای اتاق قرار داده شوند تا رسوب DNA کاملاً حل شود.

۹) برای حذف RNA، دو میکرولیتر RNase ۱۰٪ (۱۰ mg/ml) به هر تیوب اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در بن‌ماری در دمای ۳۷oC قرار داده شود.

جدول ۲- اجزاء بافر استخراج CTAB

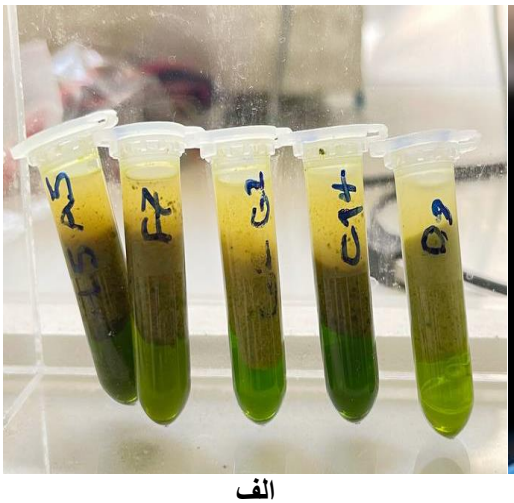
استوک	غلظت نهایی	حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر
Tris ۱ M pH = ۷/۵	۱۰۰ mM	۲۰ ml
NaCl ۵ M	۷۰۰ mM	۲۸ ml
EDTA ۰/۵ M pH =۸	۵۰ mM	۲۰ ml
CTAB	٪۱	۲g
H_2O		۱۳۰ ml

جدول ۳- اجزاء محلول شستشوی ۱

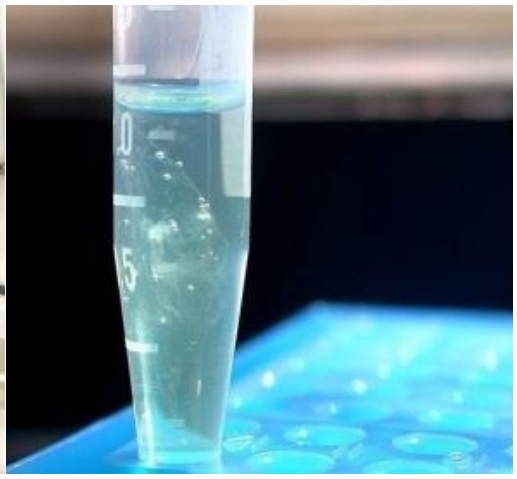
استوک	حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر
Absolute EtOH	۷۶ ml
NaOAc ۲/۵ M	۸ ml
dH_2O	۱۶ ml

جدول ۴- اجزاء محلول شستشوی ۲

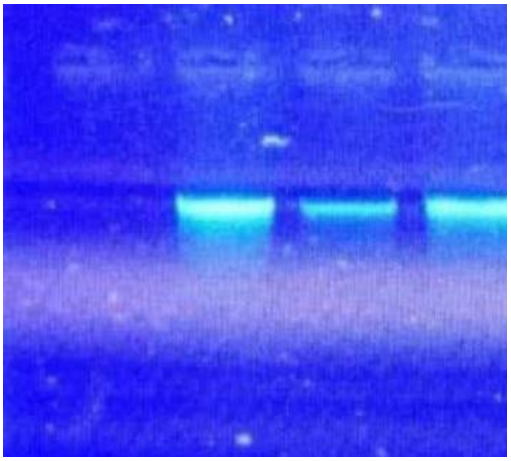
استوک	حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر
Absolute EtOH	۷۶ ml
NH_4OAc	۱ ml
dH_2O	۲۳ ml



الف



ب



د

ج

شکل ۱- مراحل استخراج DNA

الف) تشکیل سه فاز در مرحله استخراج،

ب) تشکیل کلاف DNA،

ج) دستگاه الکتروفورز مورد استفاده،

د) DNA الکتروفورز شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد

تعیین کمیت و کیفیت DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

با توجه به اهمیت کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده در انجام واکنش PCR، بررسی کمیت و کیفیت با روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین شود. پس از تعیین کمیت نمونه‌ها، آنها به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رقیق شوند. آنگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با اجزای مندرج در جدول ۵ انجام شود.

جدول ۵- اجزای مورد استفاده برای PCR در تجزیهٔ ریزماهواره‌ها

اجزای مخلوط	مقدار برای ۲۰ میکرولیتر
محلول واکنش آماده	۱۰ میکرولیتر
DNA	۴ میکرولیتر
آغازگر رفت (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)	۱ میکرولیتر
آغازگر برگشت (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)	۱ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۴ میکرولیتر

چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخهٔ واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر (جدول ۶) در دمای ۶۰-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد (با توجه به آغازگر) به‌مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه و در نهایت یک چرخهٔ بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه باشد.

جدول ۶- اطلاعات نشانگرهای SSR مورد استفاده

نشانگر	توالی آغازگر مستقیم	توالی آغازگر معکوس	دمای اتصال
FE1	AGCAGCATTTATGAATGTTC	ATCAACTGAAGATGACGACG	54
FE2	TCTTTATCATCAAAAAATAA	TACAAGGTGATATCACTTCT	50
FE3	TTCATGCTTCTCCGTGTCTC	GCTGTTTCAGGCGTAATGTG	55
FE4	GGATTGAGATTCAATTTGCA	TCCGAGTGATGCCTACTCTA	54
FE5	TGTAGCTCAGGATTGGCAAT	AGCGTTGTCCTTAACTTTT	55
FE6	TTGAGCAACATGTAATTATG	AAATATCCGGTGCTTGTGTA	50
FE7	GATAGCACTATGAACACAGC	TAGTTCTACTACTTCAAGAA	50
FE8	TTTTTGGAACCCTTGATTTT	GATGGACGGGCATTCTTAAT	50
FE9	TTTAACAGTTAACTCCCTTC	CAACATACAGCTACTAATCA	52
FE10	CTGTTCAATCAAAGATCTCA	TGCTCGCATATGTGCAGATA	52
FE11	AGTAGCCCACTGCCACTAGC	GGACCCAAACACACTGTCG	56
FE12	TCTTCAATGCCTCTACTCAGTAACC	TGGAGAGATTTAGCAGCAAGC	56
FE13	GCTTCCCAATACTAAACTCAGACG	TGGATGAATGCTATGGGTCC	56
FE14	ATAGGATGCCATACATGCCG	GATTGAGGTAAGAGACTGAAATGG	56
FE15	ACAGAGGTTGAAGTGGCAG	CACTCCACAAGCTAAAGAGGG	56

الکتروفورز عمودی محصولات PCR

برای تفکیک محصولات PCR که در واقع قطعات DNA تکثیر شده مربوط به نشانگرهای ریزماهواره هستند، از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (الکتروفورز عمودی) استفاده شد.

زیرا اختلاف طولی بین قطعات تکثیر شده ریزماهواره‌ها معمولاً بسیار کم است و با الکتروفورز به وسیله ژل آگارز نمی‌توان آنها را به خوبی تفکیک کرد و بین قطعات مختلف تمایز قائل شد.

در نتیجه حتماً از الکتروفورز عمودی با ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ تا ۸ درصد استفاده شود. مواد و محلول‌های مورد نیاز برای ساختن ژل پلی‌اکریل‌آمید در جدول ۷ آمده است.

جدول ۷- مواد ومحلول‌های مورد نیاز برای ساختن ژل پلی‌اکریل‌آمید

مواد مورد نیاز برای ساخت هر ژل	میزان مورد استفاده
محلول اکریل‌آمید ۴۰ درصد	۱۲ میلی‌لیتر
بافر TBE 10X	۶ میلی‌لیتر
محلول آمونیوم پر سولفات (APS)	۴۰۰ میکرولیتر
تترا متیل اتیلن دی آمین (TEMED)	۴۰ میکرولیتر
آب مقطر	به اندازه‌ای که حجم محلول نهایی به ۶۰ میلی‌لیتر برسد

ابتدا محلول‌های لازم برای ساختن ژل طبق دستور زیر آماده شود.

تهیه محلول اکریل‌آمید ۴۰ درصد

۳۸ گرم پودر اکریل‌آمید و ۲ گرم پودر بیس اکریل‌آمید با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و به وسیله همزن به خوبی حل شود. باید توجه داشت که پودر اکریل‌آمید به علت داشتن خاصیت نوروتوکسیک، بسیار خطرناک بوده و ممکن است باعث ایجاد فلجی شود.

در هنگام کار با آن باید از ماسک استفاده گردد و سعی شود که گرد حاصل از آن در هوای اطراف پخش نشود.

تهیه بافر TBE 10X

۵۵ گرم اسید بوریک، ۱۰۷/۸ گرم تریس بیس (Tris-Base) و ۷/۴۴ گرم EDTA با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و به وسیله همزن به‌طور کامل حل شود.

تهیه محلول آمونیوم پر سولفات (APS)

۰/۱ گرم پودر آمونیوم پر سولفات با آب مقطر به حجم یک میلی‌لیتر رسانده و چند بار به آرامی تکان داده تا حل شود. بهتر است محلول APS را به صورت روزانه تهیه و استفاده نمایید، زیرا در صورت باقی‌ماندن این محلول کارایی آن کاهش یافته و مدت زمان پلیمریزه شدن ژل زیاد می‌شود.

آماده سازی دستگاه و ژل

دستگاه الکتروفورز عمودی مورد استفاده در این دستورالعمل Sequi-Gen GT شرکت BIO RAD بود که می‌تواند در هر بار استفاده، یک ژل را در خود جای دهد. برای ساختن هر ژل، از دو عدد شیشه مستطیلی شکل استفاده شود. شیشه‌ها را به وسیله گیره‌ها و پیچ‌های دستگاه، در کنار هم نگه داشته و برای ایجاد ضخامت یک میلی‌متری ژل، از فاصله‌انداز (Spacer) استفاده گردید. دوازده میلی‌لیتر محلول اکریل‌آمید ۴۰ درصد به همراه ۶ میلی‌لیتر TBE 10X در یک بشر به ظرفیت ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته و با آب مقطر حجم آن به ۶۰ میلی‌لیتر رسانده شود. سپس به محلول حاصل، ۴۰۰ میکرولیتر APS و ۴۰ میکرولیتر TEMED اضافه کرده و مخلوط کنید. محلول را به آرامی در فضای بین دو شیشه دستگاه ریخته و شانه مربوط به ساخت چاهک در آن قرار گیرد. پس از طی شدن مدت زمان ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، ژل آماده می‌شود. می‌توان برای مطمئن شدن از پلیمریزه شدن اکریل‌آمید، از ژله‌ای شدن مقداری از محلول که در ته بشر باقی مانده است، به عنوان معیاری برای آماده بودن ژل موجود در بین شیشه‌های دستگاه استفاده کرد.

بعد از اطمینان از آماده شدن ژل، مجموعه متشکل از شیشه‌های حاوی ژل و بخش نگهدارنده آنها از صفحه زیرین آن جدا شده و به درون تانک الکتروفورز انتقال داده و درون آن با بافر TBE 1X پر گردد. برای تهیه بافر تانک الکتروفورز (TBE 1X)، باید TBE 10X را به نسبت یک به ۱۰ با آب مقطر رقیق کرد. مثلاً 100 میلی‌لیتر بافر 10X به وسیله ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم یک لیتر رسید. وقتی که بافر اطراف محل قرار گرفتن شانه‌ها در بالای ژل را دربر گرفت، می‌توان به آرامی شانه را از طرف دندانه‌ای در لبه ژل قرار داد.

بارگذاری نمونه‌ها در چاهک‌های ژل

با توجه به اینکه محلول واکنش آماده مورد استفاده در PCR حاوی رنگ بارگذاری است، نیازی به استفاده دوباره از رنگ بارگذاری نیست. ۳ میکرولیتر از هر نمونه به‌وسیله سمپلر درون چاهک‌ها بارگذاری شود.

برای تخمین محل باندها و اندازه‌گیری تقریبی وزن مولکولی باندهای مربوط به هر نمونه، درون یکی از چاهک‌های هر ژل ۳ میکرولیتر DNA Ladder بارگذاری گردد. بعد از اتمام این مرحله، سیم‌های رابط را به منبع تغذیه (Power Supply) وصل کرده، به‌طوری‌که الکترود مربوط به قسمت بالای ژل به قطب منفی و الکترود پایینی به قطب مثبت وصل شود و ولتاژ دستگاه روی ۳۰۰ ولت تنظیم گردد. بعد از اتمام مدت زمان الکتروفورز (حدود ۲ ساعت)، دستگاه خاموش و سیم‌های رابط جدا شود.

رنگ‌آمیزی ژل‌ها

به منظور آشکارسازی باندهای موجود بر روی ژل، از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شود. یکی از مزیت‌های این روش نسبت به روش‌های دیگر (مثل رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید)، خطر کمتر آن می‌باشد.

در این روش، نیترات نقره به محل‌هایی از ژل که قطعات DNA در آن وجود دارد، متصل شده و پس از آشکارسازی، این محل‌ها به‌صورت باندهای تیره رنگی دیده می‌شوند. محلول‌ها و مواد مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی ژل در جدول ۸ آمده است.

جدول ۸- مواد و محلول‌های مورد نیاز برای رنگ‌آمیزی ژل

مواد مورد استفاده	مقدار مورد نیاز
محلول تثبیت	
اتانول	۳ میلی‌لیتر
اسید استیک	۲۰۰ میکرولیتر
محلول رنگ‌آمیزی	
نیترات نقره	۰/۲ گرم
محلول آشکارسازی	
سود	۳ گرم
فرمالدئید	۴۰۰ میکرولیتر

ساخت محلول‌های رنگ‌آمیزی

محلول تثبیت

۳ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده و در دمای یخچال نگهداری شود.

محلول رنگ‌آمیزی

۰/۲ گرم پودر نیترات نقره با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شود. در هنگام کار با نیترات نقره باید دقت کرد تا بدن، لباس‌ها و محیط اطراف آلوده نشود. زیرا رنگ تیره حاصل از نیترات نقره، به‌صورت پایدار بر روی سطوح باقی می‌ماند.

محلول آشکارسازی

۳ گرم سود را در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب حل کرده و به یخچال انتقال دهید. در هنگام حل کردن سود در آب، باید دقت کرد و در صورت امکان این عمل زیر هود شیمیایی انجام شود، زیرا گاز حاصل خطرناک می‌باشد. لحظاتی قبل از استفاده از محلول سود، ۴۰۰ میکرولیتر فرمالدئید به آن اضافه کرده و به خوبی مخلوط شود. برای بهتر انجام شدن عمل رنگ‌آمیزی و جلوگیری از پارگی ژل ها در هنگام رنگ‌آمیزی، بهتر است از آب مقطری که در دمای یخچال نگهداری شده، استفاده شود.

مراحل رنگ‌آمیزی

۱) دو شیشه دربرگیرنده ژل را از هم جدا کرده تا ژل به یکی از دو شیشه متصل بماند. باید دقت کرد در هنگام این کار ژل پاره نشود. سپس به آرامی شیشه متصل به ژل به یک ظرف (ترجیحاً پلاستیکی) انتقال یابد.

۲) محلول تثبیت را در ظرف حاوی ژل ریخته و اجازه دهید به‌مدت ۵ تا ۶ دقیقه روی شیکر با سرعت حدود ۸۰ دور در دقیقه چرخش داشته باشد. پس از اتمام این مدت زمان، محلول تثبیت به ظرف اصلی خود برگردانده شود. برای این کار بایستی حتماً یک لایه دستکش پلاستیکی (یکبار مصرف) را روی دستکش لاتکس پوشید، زیرا درصورت تماس دستکش لاتکس با ژل اکریل‌آمید در هنگام خالی کردن محلول تثبیت در ظرف اصلی خود، پس از پایان رنگ‌آمیزی، بر روی ژل لکه‌های سیاه رنگ ایجاد می‌شود.

۳) ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بر روی ژل ریخته و به‌مدت ۲ دقیقه بر روی شیکر با سرعت قبلی قرار دهید. بعد از اتمام این زمان، آب مقطر دور ریخته شود.

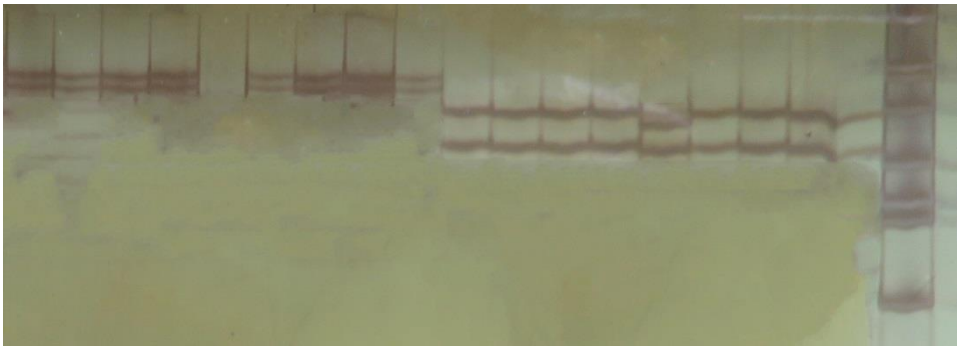
۴) محلول رنگ‌آمیزی روی ژل ریخته و به‌مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گیرد. پس از طی شدن این مدت زمان، محلول به ظرف اصلی خود برگردانده شود.

۵) ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بر روی ژل ریخته و به‌مدت ۲ دقیقه بر روی شیکر قرار گیرد. بعد از اتمام این زمان، آب مقطر دور ریخته شود.

۶) محلول آشکارسازی، پس از اضافه کردن فرمالدئید، به ژل اضافه شود و به‌طور میانگین به‌مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گیرد. مدت زمان این مرحله باید به اندازه‌ای باشد که باندهای موجود بر روی ژل آشکار شوند. البته اگر این زمان بیش از حد طول بکشد، محدوده باندهای ژل بیش از حد سیاه شده و باندها قابل مشاهده نمی‌باشند. بعد از آشکار شدن باندها، محلول آشکارسازی دور ریخته شود.

۷) ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بر روی ژل ریخته و به‌مدت ۲ دقیقه بر روی شیکر با سرعت قبلی قرار گیرد. بعد از اتمام این زمان، آب مقطر دور ریخته شود.

۸) محلول تثبیت را در ظرف حاوی ژل ریخته و به‌مدت حدود یک دقیقه روی شیکر با سرعت حدوداً ۸۵ دور در دقیقه چرخش داده شود. پس از اتمام این مدت زمان، عکسبرداری از ژل انجام شود. نمونه‌ای از تفکیک بین پایه‌های مختلف بر اساس نشانگر SSR در شکل ۲ قابل مشاهده است.



شکل ۲- نمونه‌ای از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۸ درصد قطعات تکثیری

امتیازدهی مولکولی پایه‌ها و تجزیه داده‌ها

الگوی نواری نشانگرهای ریز ماهواره به‌صورت الگوی نشانگرهای همبارز (حروف انگلیسی) امتیازدهی شود. به‌طوریکه برای وجود قطعه مورد نظر، حروف a، b، c و ... در نظر گرفته شود. مشخصات آللی نشانگرهای تکثیر شده و شاخص‌های ژنتیکی با نرم‌افزار GenALEx محاسبه و ماتریس تشابه ضرایب ژاکارد و خوشه‌بندی ۱۸ پایه منتخب با روش UPGMA با نرم‌افزار NTSYS انجام و پس از خوشه‌بندی پایه‌های مختلف، تنوع ژنتیکی بین پایه‌های مختلف بررسی و نتیجه‌گیری گردد.

معرفی بهترین نشانگرهای مورد استفاده برای ون

براساس نتایج به‌دست آمده از الکتروفورز عمودی محصولات PCR، از ۱۵ نشانگر SSR مورد استفاده در بررسی قرابت ژنتیکی ۱۸ پایه منتخب ون که از سه ناحیه دهمیان، سنگده و پل سفید جمع‌آوری شده بودند و دارای صفات مطلوب‌تری نسبت به بقیه پایه‌های ون نواحی بودند، در ۱۰ نشانگر SSR تکثیر قطعه انجام شد. در مجموع برای ۱۰ نشانگر SSR، ۵۷ آلل چند شکل در ۱۸ پایه منتخب ون شناسایی گردید، به‌طوریکه نشانگر FE3 با ۱۰ آلل چند شکل، بیشترین و نشانگر FE5 با ۲ آلل چند شکل کمترین تعداد آلل چند شکل را به خود اختصاص دادند. بنابراین، برای مطالعات مولکولی ون این موارد در نظر گرفته شود. به‌طور میانگین ۵/۷ آلل چند شکل برای هر نشانگر SSR شناسایی گردید. نتایج نشان می‌دهد که تمامی آغازگرهای تکثیر شده دارای ۱۰۰ درصد چند شکلی می‌باشند و آغازگر FE5 با داشتن فراوانی ۰/۴۷۲ و ۰/۵۲۷ برای دو آلل تکثیر شده، بیشترین فراوانی آللی را در ۱۸ پایه منتخب ون دارد. شاخص تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در نشانگرهای تکثیر شده بررسی گردید (جدول ۹).

نتایج نشان داد که بیشترین تعداد آلل مؤثر با ۹ آلل، مربوط به نشانگر FE3 و کمترین تعداد آلل مؤثر با ۱/۹۹ آلل مربوط به نشانگر FE5 می‌باشد. همچنین کمترین و بیشترین شاخص شانون نیز در نشانگرهای FE5 و FE3 مشاهده گردید. در این مطالعه کمترین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در نشانگر FE5 و بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده به ترتیب در FE3 و به‌صورت مشترک در FE2، FE9، FE13 و FE15 گزارش شد.

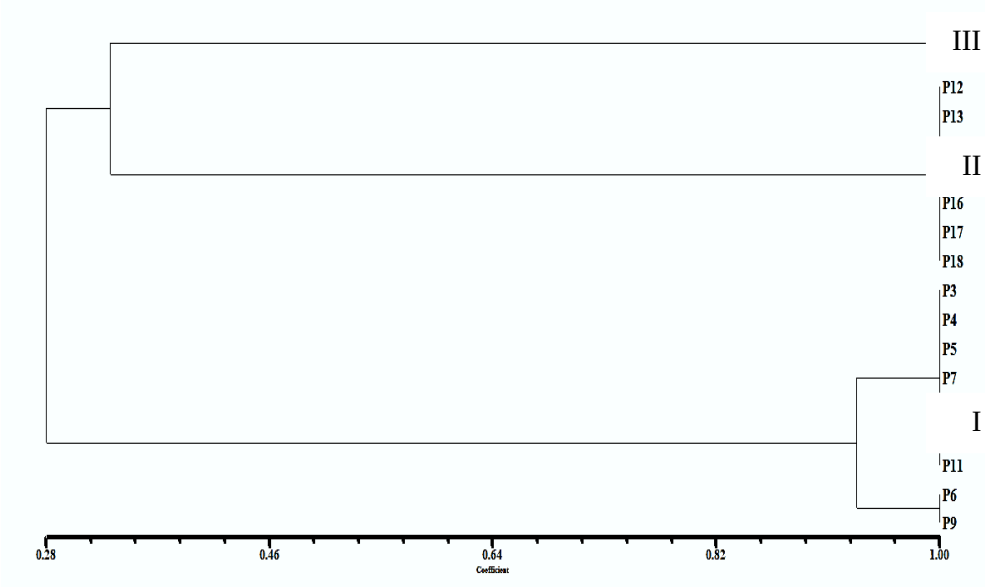
جدول ۹- شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای ارزیابی شده

آغازگر	تعداد آلل (Na)	تعداد آلل مؤثر (Ne)	شاخص شانون (I)	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)
FE1	5	4.2	1.509	0.778	0.767
FE2	8	6.6	1.963	1.000	0.849
FE3	10	9.0	2.248	0.778	0.889
FE4	9	7.4	2.084	0.944	0.866
FE5	2	1.9	0.692	0.389	0.498
FE9	3	2.9	1.096	1.000	0.665
FE10	7	6.0	1.881	0.722	0.835
FE13	4	3.6	1.335	1.000	0.725
FE14	5	4.2	1.509	0.778	0.767
FE15	4	3.6	1.335	1.000	0.725
میانگین	5	4.996	1.565	0.839	0.759

خوشه‌بندی ژنتیکی پایه‌ها

پس از محاسبه و تشکیل ماتریس ضرایب تشابه، خوشه‌بندی ۱۸ پایه منتخب ون با روش UPGMA انجام شد و نتایج آن در شکل ۲ آورده شده است. با در نظر گرفتن ضریب تشابه ۰/۸۰، ۳ کلاد اصلی تشکیل شده است. به‌طوری‌که در کلاد I، پایه‌های P9، P6، P3، P5، P4، P7، P8، P10، و P11 قرار گرفته‌اند. همچنین در کلاد II پایه‌های P12-P18 و در نهایت در کلاد III پایه‌های P1 و P2 قرار گرفتند.

براساس نتایج به‌دست آمده و برای تشکیل باغ بذر از پایه‌های P5، P6، P9، P2، P7، P12 و P13 و در نهایت P1 استفاده شود.



شکل ۲- خوشه‌بندی پایه‌های منتخب ون با روش UPGMA

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به مطالب ذکر شده در دستورالعمل حاضر، می‌توان موارد زیر را برای نتیجه‌گیری کلی در نظر گرفت.

- ✓ استفاده از ژل پلی‌آکریلامید به‌جای ژل آگارز
- ✓ توانایی نشانگرهای مورد استفاده در تفکیک پایه‌ها
- ✓ وجود چندشکلی متوسط برای نشانگرهای مورد استفاده در پایه‌های منتخب
- ✓ وجود تفاوت ژنتیکی در بین پایه‌های منتخب ون

منابع

قمری‌زارع، ع.، اسپهبدی، ک.، مهرابی، ع.ا.، ۱۴۰۲. باغ بذر و محاوط بذرگیری گونه‌های جنگلی، راهبردی مؤثر در حفاظت ژنتیکی، احیا و توسعه جنگل‌های مقاوم به تغییر اقلیم، مجله طبیعت، ۸ (۲): ۱۳-۷.

میرزایی‌ندوشن، ح.، ۱۳۹۴. باغ بذر درختان جنگلی. دانشگاه تهران، تهران، ۲۷۸ صفحه.

Beck, P., Caudullo, G., Tinner, W., & de Rigo, D. (2016) *Fraxinus excelsior* in Europe: distribution, habitat, usage and threats.

Dobrowolska D., Hein S., Oosterbaan A., Wagner S., Clark J., Skovsgaard J.P. (2011)0 A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. Forestry, 84(2), 133–148.

Espahbodi K.; Mehrabi A.A.; Ghamarizareh A. (2021) Policy for the development of seed orchards of forest tree and shrub species in Iran. Journal of Iran Nature, 6 (5), 7-17. (In Persian).

Fraxigen. (2005) Ash Species in Europe: Biological Characteristics and Practical Guidelines for Sustainable Use. University of Oxford, Oxford. 128 p

Mohammadi Y., Gheytaranpour-Sehrigh Sh. (2022) Principles of identification and introduction of seed production areas of Arasbaran Juniper (*Juniperus foetidissima*) Journal of Iran Nature 2022, 7(1), 59-64. (In Persian)

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, USA, 81(24): 8014-8018