



## تنوع ژنتیکی گونه انجیلی (*Parrotia persica* (DC.) C.A. Meyer) در جنگل‌های هیرکانی

مجتبی ایمانی راستابی<sup>۱</sup>، حمید جلیلود<sup>۲\*</sup>، اصغر فلاح<sup>۲</sup> و بهزاد شاهین<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

<sup>۲</sup> استاد، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

<sup>۳</sup> استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰)

### چکیده

انجیلی گونه بومی و مختص جنگل‌های هیرکانی است که از غرب تا شرق جنگل‌های شمال ایران پراکنش دارد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی انجیلی با استفاده از اطلاعات مولکولی جمعیت‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان (سه رویشگاه)، مازندران (چهار رویشگاه) و گلستان (سه رویشگاه) بررسی شد. با کمک نشانگر AFLP، ۸۲۶ باند به‌دست آمد که بیش از ۹۰ درصد آنها چندشکل بودند و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب ۰/۲۴ و ۲۲/۴ محاسبه شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای برمبنای ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA نشان داد که تنوع گسترده‌ای در نمونه‌های جمع‌آوری شده وجود دارد، به طوری که براساس ضریب تشابه جاکارد، دامنه تشابه ژنتیکی از ۰/۲۶ تا ۰/۴۴ متغیر بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که ۲۱ درصد از تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌های انجیلی ناشی از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های سه استان گلستان، مازندران و گیلان است و تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های رویشگاه‌ها، ۷۹ درصد به‌دست آمد. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که براساس تنوع اطلاعات مولکولی تنوع بین جمعیت‌های انجیلی به مراتب از تنوع درون جمعیتی آن کمتر است. به نظر می‌رسد که تنوع موجود بین جمعیت‌های انجیلی بیشتر متأثر از محیط باشد تا ژنتیک. البته برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر پیشنهاد می‌شود که اکوتون‌های مختلف جمعیت انجیلی نیز با نشانگرهای مولکولی بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، حفاظت ژنتیکی، ژنتیک جنگل، نشانگر مولکولی، AFLP.

### مقدمه

ژنوم و ژرم‌پلاسم گونه‌های در حال انقراض مانند انجیلی، شناسایی گونه‌ها و زیرگونه‌های موجود آن است. برای تعیین و برآورد تنوع ژنتیکی گیاهان روش‌های مختلفی مانند بررسی ریخت‌شناسی، مولکولی و زیست‌شیمیایی پروتئین وجود دارد. به‌طور معمول در درختان جنگلی، تغییرات درون‌گونه‌ای زیادی در شاخص‌های ریختی دیده می‌شود که بیشتر به‌علت سیستم دگرگشنی، جریان ژن در بین توده‌ها و سیستم هیبریداسیون طبیعی بین گونه‌ای زیاد است (Bruschi et al., 2003). به دلیل این تفاوت‌ها، بررسی تنوع ژنتیکی برپایه مشخصه‌های ریخت‌شناسی دشوار

انجیلی (*Parrotia persica* (DC.) C.A. Meyer)

گونه‌ای پهن‌برگ، نورپسند، دارای سیستم ریشه‌های سطحی و خزان‌کننده و مختص جنگل‌های شمال ایران است (Mozafarian, 2005). انجیلی به دلایل مختلف مانند قطع بی‌رویه، تخریب رویشگاه و بی‌توجهی ناشی از نداشتن چوب باارزش صنعتی، در معرض خطر فرسایش ژنتیکی قرار گرفته است (Yosefzadeh et al., 2008). حفاظت از درختان بومی و در معرض خطر انقراض بسیار حائز اهمیت است.

اولین گام برای مدیریت اصولی با هدف حفاظت

تنوع ژنتیکی ۳۰ جمعیت ژینکو (*Ginkgo biloba L.*) را در مناطق شرق، غرب، میانی، شمال و جنوب چین با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP بررسی کردند. آنان برای این کار از هشت جفت آغازگر به منظور تکثیر DNA استفاده کردند که در مجموع ۱۷۲۷ باند چندشکل به دست آمد. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که بین جمعیت‌های تحت بررسی تفاوت ژنتیکی بزرگی وجود دارد و ۷۳/۷ درصد از تغییرات ژنتیکی شامل تغییرات درون جمعیتی بودند. پژوهش‌های زیادی در زمینه تنوع ژنتیکی (Brand et al., 2022) و تفکیک گونه و زیرگونه و نقشه‌های ژنتیکی مبتنی بر روش AFLP روی گونه‌های چوبی انجام گرفته است (Yue et al., 2022). به هر حال پژوهش‌های تنوع ژنتیکی در درختان جنگلی به‌ویژه با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP در ایران کمتر صورت گرفته است.

در زمینه تنوع جمعیت انجیلی براساس مشخصه‌های ریخت‌شناسی برگ پژوهش‌هایی انجام گرفته است. در پژوهشی تنوع برگ درخت انجیلی در شیب ارتفاعی در شرق استان مازندران بررسی شد و نتایج نشان داد که برخی مشخصه‌های ریختی برگ در جمعیت‌های مدنظر دارای تنوع هستند (Yosefzadeh et al., 2008). اما با توجه به اهمیت زیست‌شناختی و حفاظت ژنومی انجیلی به‌عنوان یکی از محدود گونه‌های جنگلی مختص ایران، پژوهش‌ها در زمینه تنوع ژنتیکی این گونه چندان زیاد نیست. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ده جمعیت انجیلی در جنگل هیرکانی با کمک نشانگر مولکولی AFLP ارزیابی شد.

## مواد و روش‌ها

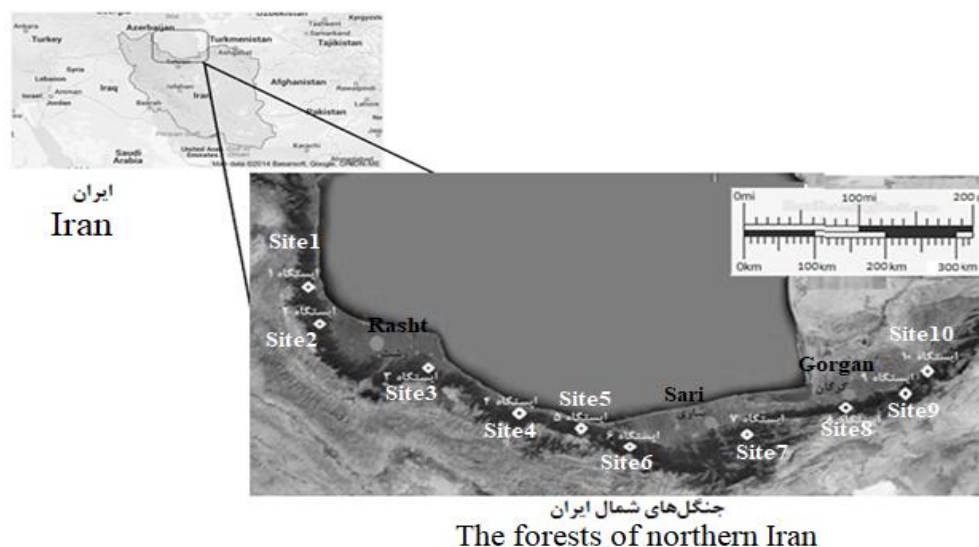
### منطقه پژوهش

درخت انجیلی در سه استان گیلان، مازندران و گلستان به‌صورت توده‌های طبیعی پراکنش یافته است. از این‌رو در پژوهش حاضر سعی شد تا از این سه استان نمونه‌برداری انجام گیرد. در شکل ۱ موقعیت ایستگاه‌های جمع‌آوری نمونه‌ها آورده شده است.

خواهد بود؛ بنابراین بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای می‌تواند کاربرد داشته باشد. در چنین مواردی استفاده از نشانگرهای مولکولی برای تفکیک گونه‌ها و شناسایی زیرگونه‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای ضروری است.

نشانگرهای مولکولی از نظر ریختی، خنثی هستند و تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و به همین دلیل می‌توان تعداد زیادی از آنها را به راحتی در کل ژنوم گیاه بررسی کرد. روش نشانگر (Amplified fragment length polymorphism AFLP)، برای آشکارسازی چندشکلی‌های DNA در سراسر ژنوم مناسب است و توان نمایشی نوارهای چندشکلی گوناگون به‌طور همزمان و ظرفیت بررسی تعداد زیاد مکان ژنی را دارد (Vos et al., 1995). پژوهش‌های متعدد بیانگر قدرت تفکیک زیاد نشانگر AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های گیاهی است (Coart et al., 2002). به‌طور کلی AFLP براساس هضم DNA ژنومی و تحت تأثیر قرار گرفتن جایگاه شناسایی آنزیم برشی به‌علت حذف، اضافه و جهش در این جایگاه حاصل می‌آید که نتیجه آن چندشکلی در قطعات حاصل از AFLP است. از جمله دلایل استفاده از این نشانگر تکرارپذیر بودن و نیاز نداشتن به اطلاعات اولیه از ژنوم است.

پژوهش‌ها روی درختان جنگلی با کمک نشانگر مولکولی AFLP نیز انجام گرفته است. Hipp & Weber (2008) از روش AFLP برای تفکیک ژنتیکی دو گونه بلوط *Quercus ellipsoidalis* EJ Hill و *Quercus coccinea* Muenchh. استفاده کردند. نتایج نشان داد که دو گونه از نظر ریختی هم شبیه‌اند، اما نتایج تجزیه داده‌های ژنتیکی حاصل از نشانگر مولکولی نشان داد که از نظر ژنتیکی متمایزند و از هم جدا می‌شوند. Di & Wang (2013) به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار طبیعی گونه‌ای از کاج (*Pinus tabulaeformis* Carr.) در شمال چین با استفاده از نشانگر AFLP پرداختند. با بررسی چندشکلی این گونه، سطح متوسطی از تنوع ژنتیکی بین گونه‌های کاج چینی مشاهده شد. (Tang et al., 2016)



شکل ۱- موقعیت ایستگاه‌های تحت بررسی

Figure 1. The location of the studied stations

استخراج DNA با روش CTAB (Doyle & Doyle, 1990) با کمی تغییر انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد بررسی شد.

آزمایش‌های AFLP براساس پروتکل Vos et al. (1995) با کمی تغییر انجام گرفت. برای انجام واکنش هضم از دو آنزیم برشی *EcoRI* و *Tru91* (با جایگاه برشی مشابه *MseI*) ساخت شرکت Roche در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت شش ساعت استفاده شد. اجزای واکنش هضم در حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر دارای ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۲/۵ واحد از آنزیم *EcoRI* و حجم ۱۰ میکرولیتر دارای ۱۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱۰ واحد از آنزیم *TruII* انجام گرفت.

محصولات PCR به منظور تفکیک آلی قبل از بارگذاری واسرشته شد. برای این منظور ۸ تا ۱۰ میکرولیتر از بافر بارگذاری حاوی فرم‌آمید به ۲۰ میکرولیتر محصول PCR اضافه شد. سپس همه نمونه‌ها شش دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر قرار داده و بلافاصله روی یخ منتقل شدند تا برای بارگذاری روی ژل پلی‌اکریل‌آمید آماده شوند. در نتیجه برای مرحله تکثیر انتخابی نیز از ۱۰ ترکیب آغازگری استفاده شد (جدول ۲).

در مجموع سه ایستگاه در استان گیلان، سه ایستگاه در استان گلستان و چهار ایستگاه در استان مازندران بررسی و در هر ایستگاه مشخصه‌های ارتفاع از سطح دریا، طول و عرض جغرافیایی، قطر و ارتفاع درخت، عرض و طول تاج درخت ثبت شد (جدول ۱). در هر ایستگاه ۱۰ درخت با فاصله ۱۰۰ متر از هم (Merwin et al., 1995) انتخاب و از هر درخت ۲۵ برگ کاملاً بالغ جمع‌آوری شد. همه برگ‌های مربوط به پایه‌های درختی با همدیگر مخلوط شدند و به‌طور تصادفی، سه نمونه (به‌عنوان نماینده ژنوتیپ‌های آن رویشگاه) برای کارهای آزمایشگاه برداشت شد. برای بررسی مولکولی، از هر رویشگاه یک کیسه پلاستیکی برگ سالم و زنده جمع‌آوری و درون فلاسک یخ نگهداری شد تا به آزمایشگاه منتقل شود. در مجموع ده جمعیت (۳۰ ژنوتیپ) از گونه مدنظر در جنگل‌های هیرکانی برای بررسی مولکولی انتخاب شد (جدول ۱).

### شیوه اجرای پژوهش

#### تجزیه و تحلیل مولکولی

همه نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری برای استخراج DNA و آزمایش‌های مولکولی منتقل شد.

درصد با استفاده از بافر TBE 1X با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. وجود اسمیر با اندازه ۱۲۰۰ تا ۱۰۰ جفت باز نشان‌دهنده صحت واکنش هضم، واکنش اتصال سازگارسازها و اجرای صحیح واکنش چرخه زنجیره‌ای پلیمرز است.

واکنش پیش‌انتخابی با استفاده از آغازگرهایی براساس جایگاه برش و توالی سازگارسازها انجام گرفت. به‌منظور اطمینان از اجرای درست مرحله پیش‌انتخابی ۶ میکرولیتر از محلول واکنش این مرحله به همراه ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری روی ژل آگارز ۱/۲

جدول ۱- مشخصات منطقه‌های تحت بررسی

Table 1. Characteristics of the study sites

طول جغرافیایی Longitude عرض جغرافیایی latitude	ارتفاع از سطح دریا Altitude above sea level	ایستگاه Site	استان Province
48° 86' 31" 38° 23' 123"	100	سفیدسنگان Sefidsangan	
48°84'93" 37°94'162"	-7	گیسوم Gisoom	استان گیلان Guilan province
50°06'42" 37°01'536"	450	بلوردکان Blourdekan	
53°42'24" 40°50'705"	137	سرچشمه چالوس Sarcheshmeh Chalous	
51°38'26" 36°60'122"	250	حوضه ۴۶ چلندر نوشهر Watershed Chalandar Nowshahr	
52°09' ۴۴" 36°47'051"	219	چشمه کشیل چمستان Kashpel fountain of Chamestan	استان مازندران Mazandaran province
36°28'14" 52°14'123"	248	دارابکلا Darabkola	
54°95'10" 36°88'035"	100	افراتخته Afratakhteh	
55°02'01" 37°02'268"	320	دلند Daland	استان گلستان
55°01'04" 37°66'751"	250	گالیکش Galikesh	

جدول ۲- ترکیبات آغازگری استفاده شده در مرحله تکثیر انتخابی

Table 2. Primer compounds used in the selective amplification stage

ردیف	جفت آغازگرهای اختصاصی	ردیف	جفت آغازگرهای اختصاصی
Row	A pair of dedicated primers	Row	A pair of dedicated primers
1	Eco -GGA+ Mse -CAA	6	Eco -AGG+ Mse -CTG
2	Eco -GTG+ Mse -CTT	7	Eco -AGC+ Mse -CAT
3	Eco -GTG+ Mse -CAA	8	Eco -AAG+ Mse -CTA
4	Eco -GGA+ Mse -CAT	9	Eco -GGA+ Mse -CTC
5	Eco -GTG+ Mse -CCT	10	Eco-GGA+ Mse -CTT

بوت‌سترپ (Bootstrapping) در نرم‌افزار Winboot استفاده شد (Yap & Nelson, 1996).

میزان اطلاعات چندشکل از فرمول  $PIC = \sum 2f(1-f)/n$  محاسبه شد که  $f$  فراوانی نسبی باندهای مشاهده شده،  $1-f$  فراوانی نسبی باندهای غایب و  $n$  تعداد لوکوس است (Powell et al., 1996). شاخص تنوع نی (Nei, 1973) و شاخص شانون (Shannon, 1948) فراوانی باندها توسط نرم‌افزار Popgen ver 32 محاسبه شد. شاخص نشانگر که بیانگر کارایی نشانگر است، از حاصل ضرب درصد پلی مورفیسم مشاهده شده هر پرایمر در PIC آن پرایمر به دست آمد (Powell et al., 1996).

### نتایج

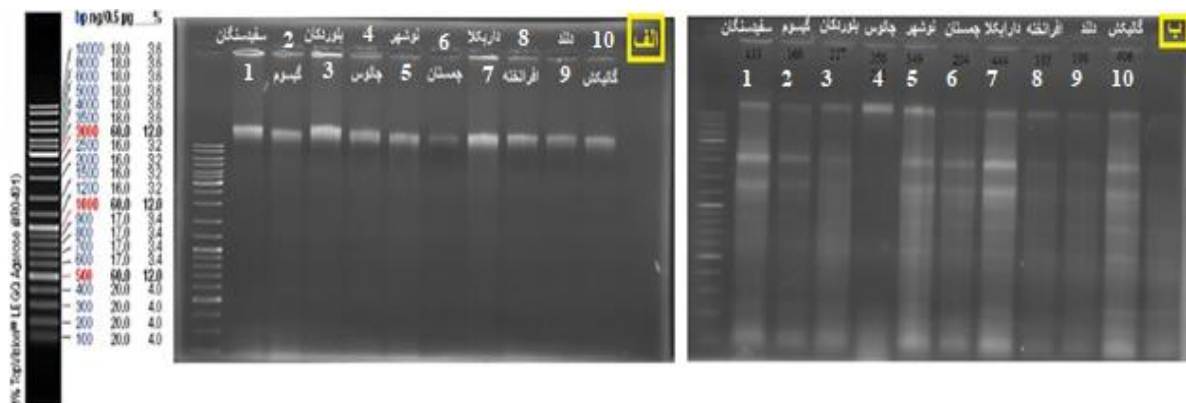
از بین این تعداد ترکیب آغازگری ۱۰ ترکیب با الگوی نواریندی واضح و چندشکلی مطلوب انتخاب شد. به منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش Touch Down PCR، مرحله انتخابی با غلظت‌های مختلف DNA الگو و غلظت‌های مختلف  $MgCl_2$ ،  $dNTP$  و همچنین تک‌پلیمر نیز انجام گرفت. تجزیه مولکولی ۱۰ ژنوتیپ گونه انجیلی با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری که در جدول ۲ ذکر شده روی ژل اکریلامید ۶ درصد واسرشته‌ساز انجام گرفت. شکل ۳ پروفایل ژل اکریلامید یکی از ترکیبات را نشان می‌دهد.

از مجموع ۸۲۶ باند امتیازدهی شده برای نشانگر AFLP ۷۱۰ باند (۸۶ درصد) چندشکل بودند. میانگین باندهای امتیازدهی شده برای هر ترکیب آغازگری حدود ۸۲/۶ و میانگین باندهای چندشکل ۷۱ بود.

در این تحقیق از روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌کننده ۶ درصد استفاده شد. دستگاه Sequi-Gen GT, BIO-RAD, USA جداسازی قطعات تکثیری به کار رفت. قطر ژل استفاده شده ۰/۴ میلی‌متر و ابعاد آن  $38 \times 30$  سانتی‌متر با حجم ۵۵ میلی‌لیتر بود. برای ظهور نوارها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. به منظور امتیازدهی ژل، با استفاده از اسکنر (GS-800<sup>TM</sup>, Calibrated, Densitometer, BIO-RAD, USA) اقدام به اسکن ژل (بعد از خشک شدن ژل) شد.

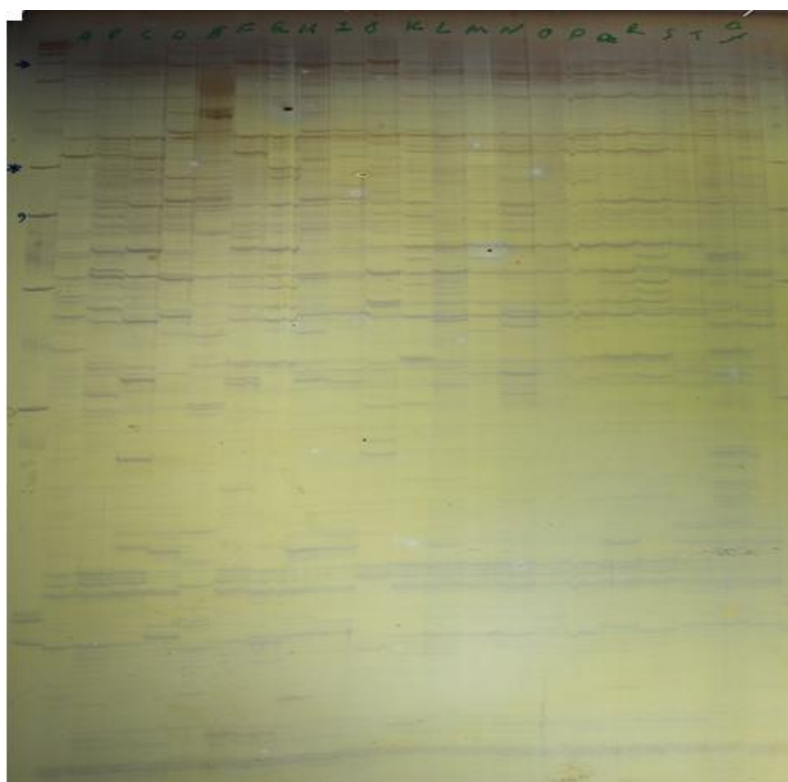
### روش تحلیل

ژنوتیپ‌ها برای تجزیه آماری براساس وجود و نبود باند با استفاده از نرم‌افزار Total Lab TL120ver 2008 امتیازدهی شدند. برای به دست آوردن ماتریس تشابه، آزمون کوفنتیک و رسم نمودار خوشه‌ای از نرم‌افزار NTYSY ver2.02 استفاده شد. از آزمون کوفنتیک با به کارگیری سه ضریب تشابه جاکارد، دایس و اتصال ساده و سه الگوریتم خوشه‌بندی همبستگی کامل (Complete linkage)، همبستگی ساده (Single linkage) و اتصال متوسط (UPGMA) برای به دست آوردن مناسب‌ترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی استفاده شد. در این پژوهش از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم اتصال متوسط استفاده شد. تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی PCoA و انتخاب تعداد مطلوب خوشه از این تجزیه با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 انجام گرفت. همچنین برای اطمینان از صحت خوشه‌بندی از روش



شکل ۲- الف) نمونه DNA استخراج شده روی ژل آگارز. ب) نمونه محصول واکنش چرخه زنجیره‌ای پلیمرز مرحله پیش‌انتخابی روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. ۱- سفیدسنگان، ۲- گیسوم، ۳- بلوردکان، ۴- سرچشمه چالوس، ۵- حوضه ۴۶ چلندر نوشهر، ۶- چشمه کشپل چمستان، ۷- دارابکلا، ۸- افراخته، ۹- دلند، ۱۰- گالیکش.

Figure 2. A- DNA sample extracted on agarose gel. B- The product sample of the polymerase chain reaction of the pre-selection step on 1.2% agarose gel. 1- Sefidsangan, 2- Gisoom, 3- Blourdekan, 4- Sarcheshme Chalus, 5- Watershed Chalandar Nowshahr, 6- Kashpel fountain of Chamestan, 7- Darabkala, 8- Afratakhteh, 9- Deland, 10- Galiksh



شکل ۳- پروفایل ژل اکریلامید مربوط به ترکیب آغازگری E-GTG+ M-CTT  
Figure 3. Acrylamide gel profile of E-GTG+ M-CTT starting compound

جدول ۳- نتایج بررسی ۱۰ ژنوتیپ گیاه انجیلی با استفاده از نشانگر AFLP

Table 3. The results of examining 10 genotypes of evangelical plant using aflp markers

شاخص تنوع	شاخص	شاخص	محتوای اطلاعات	درصد چندشکلی	تعداد باندهای	تعداد کل	جفت آغازگر اختصاصی
Shannon diversity index	پراکندگی نی	نشانگر	چندشکل	Polymorphic percentage	چندشکل	باند	Dedicated primer pair
	Nei dispersion index	Indicator index	Polymorphic information content		The number of polymorphic bands	Total number of bands	
0.31±0.017	0.19±0.014	17.8	0.20	89	38	43	E-AGG+ M-CTG
0.35±0.021	0.18±0.016	19.14	0.22	87	69	70	E-AGC+ M-CAT
0.30±0.019	0.17±0.017	19.11	0.21	91	65	71	E-AAG+ M-CTA
0.23±0.018	0.16±0.012	15.5	0.18	86	59	69	E-GGA+ M-CTC
0.43±0.019	0.23±0.012	24.44	0.26	94	97	103	E-GGA+ M-CTT
0.40±0.022	0.27±0.015	27.6	0.31	89	90	101	E-GGA+ M-CAA
0.41±0.019	0.27±0.015	24.03	0.27	89	87	101	E-GTG+ M-CTT
0.34±0.016	0.20±0.011	21.6	0.23	94	76	100	E-GTG+ M-CAA
0.39±0.018	0.25±0.014	22.5	0.25	90	60	80	E-GGA+ M-CAT
0.37±0.016	0.24±0.014	24.2	0.26	93	69	88	E-GTG+ M-CCT
		-	-	-	710	826	
		21.6	0.24	90.2	71	82.6	

کمترین تنوع را حاصل کردند. میانگین شاخص نشانگر AFLP در این تحقیق ۲۲/۲۵ و بیشترین و کمترین مقدار آن به ترتیب مربوط به ترکیب آغازگرهای E-GGA+ M-CTC و GGA+ M-CTT با ۲۵/۴۱ و ۱۷/۱۴ بود (جدول ۳).

آزمون مقایسه میانگین نشان داد که ۲۱ درصد از تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌های انجیلی بررسی شده به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های سه استان گلستان، مازندران و گیلان و ۷۹ درصد به تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های رویشگاه‌ها مربوط می‌شود. این تفاوت ژنتیکی بین جوامع براساس تجزیه مولکولی نیز معنی‌دار بود (جدول ۴).

ضرایب کوفنتیک حاصل از الگوریتم‌ها با ضرایب تشابه نشان داد که ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA با بیشترین ضریب ارزش (۰/۸۷) برای تجزیه‌های آماری بعدی استفاده شد (جدول ۵).

بیشترین تعداد باند متعلق به ترکیب آغازگر E-GGA+ M-CTT و کمترین تعداد باند مربوط به ترکیب آغازگر E-AGG+ M-CTG بود. بیشترین درصد چندشکلی متعلق به ترکیب آغازگرهای E-GTG+ M-CAA و E-GGA+ M-CTT با ۹۴ درصد و کمترین درصد چندشکلی مربوط به ترکیب آغازگری E-GGA+ M-CTC با ۸۶ درصد باند چندشکلی بود. متوسط مقدار PIC در این بررسی ۰/۲۵ بود و بیشترین مقدار PIC را ترکیب آغازگری E-GGA+ M-CAA با ۰/۳۱ و کمترین مقدار را ترکیب آغازگری E-GGA+ M-CAA با ۰/۲ نشان دادند. براساس شاخص تنوع نی بیشترین تنوع مربوط به ترکیب آغازگری E-GGA+ M-CAA و کمترین تنوع مربوط به ترکیب آغازگری E-GGA+ M-CTC بود. براساس شاخص شانون نیز ترکیب آغازگری E-GGA+ M-CTT و E-GGA+ M-CTC، به ترتیب، بیشترین و

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی در جمعیت‌های انجیلی با استفاده از آغازگرهای نشانگر AFLP

Table 4. Analysis of molecular variance in evangelical populations using AFLP marker primers

درصد واریانس	آماره F و معنی‌داری	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییرات
Percentage of Variance	F and Significant	Mean of Square	Sum of Square	Df	S.O. V
21%	2.35**	45.375	408.375	9	بین جمعیت
79%		19.256	192.66	10	داخل جمعیت
			601.035	19	کل

\*\* معنی‌دار در سطح یک درصد (P<0.05).

\*\* Significant at the one percent level (P<0.05).

جدول ۵- ضرایب کوفنتیک حاصل از الگوریتم‌ها با ضرایب تشابه

Table 5. Cophenetic coefficients resulting from algorithms with similarity coefficients

	الگوریتم UPGMA UPGMA Algorithm	الگوریتم اتصال ساده Simple Linkage algorithm	الگوریتم اتصال کامل Complete Linkage Algorithm
ضریب تشابه تطابق Matching similarity coefficient	0.77	0.52	0.74
ضریب تشابه جاکارد Jaccard similarity coefficient	0.87	0.74	0.86
ضریب تشابه دایس Dice similarity coefficient	0.86	0.73	0.85

سپس انتخاب تعداد خوشه مطلوب با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی AMOVA انجام گرفت و نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های انجیلی با حدود اعتماد نزدیک به ۶۰ درصد به چهار گروه اول شامل گیسوم؛ دوم شامل بلوردکان و سفیدسنگان؛ سوم شامل چالوس، سیسنگان، نوشهر و چشمه کشیل چمستان و چهارم شامل دلند، گالیکش، دارابکلا و افراخته تعلق داشت.

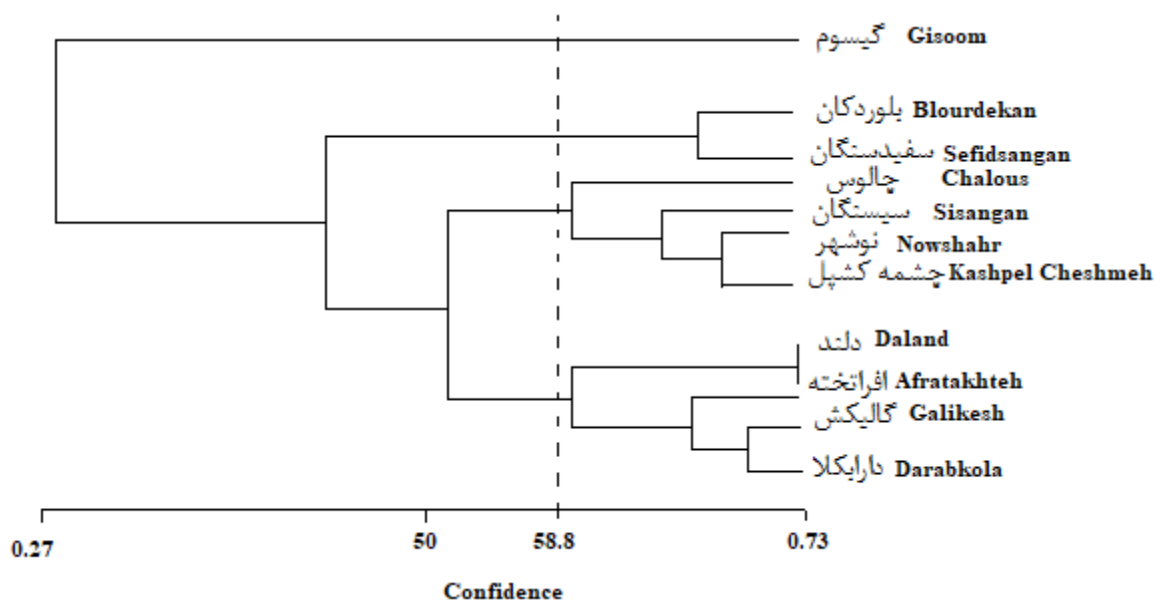
براساس ماتریس ضریب تشابه جاکارد (جدول ۶) در دامنه ۰/۴۴ تا ۰/۱۲ با متوسط ۰/۲۸ متغیر بود. بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۴۴) بین ژنوتیپ‌های داربکلای مازندران و افراخته گران و کمترین شباهت (۰/۲۶) بین ژنوتیپ‌های چشمه کشیل و سفیدسنگان گیلان دیده شد. براساس اطلاعات مذکور دندروگرام مربوط به داده‌های حاصل از نشانگر AFLP رسم شد (شکل ۴).

جدول ۶- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد براساس داده‌های حاصل از نشانگر AFLP

Table 6. The matrix of Jaccard similarity coefficients based on the data obtained from the AFLP marker

دلند Daland	افراخته Afratakhteh	دارابکلا Darabkala	چمستان Kashpel fountain of Chamestan	نوشهر Watershed Chalandar Nowshahr	چالوس Sarchesheme Chalus,	بلوردکان Blourdekan	گیسوم Gisoom	سفیدسنگان Sefidsangan
								گیسوم Gisoom 0.32
							0.39	بلوردکان Blourdekan 0.30
						0.42	0.39	چالوس Sarchesheme Chalus 0.29
					0.38	0.34	0.27	نوشهر Watershed Chalandar Nowshahr 0.31
				0.37	0.30	0.30	0.32	چمستان Kashpel fountain of Chamestan 0.26
			0.38	0.38	0.28	0.28	0.27	دارابکلا Darabkala 0.30
		0.44	0.35	0.31	0.31	0.32	0.27	افراخته Afratakhteh 0.31
	0.30	0.26	0.24	0.29	0.29	0.32	0.37	دلند Daland 0.36
0.36	0.36	0.32	0.32	0.29	0.29	0.32	0.30	گالیکش Galiksh 0.31





شکل ۴- دندروگرام حاصل از گروه‌بندی ۱۰ جمعیت انجیلی از طریق الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نشانگر AFLP

Figure 4. Dendrogram resulting from the grouping of 10 evangelical populations through UPGMA algorithm and Jaccard similarity coefficient using AFLP marker

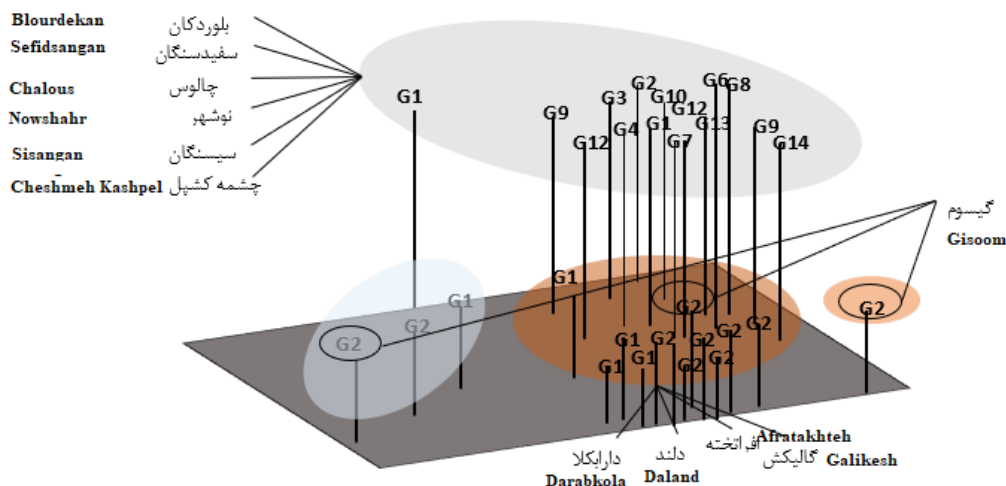
۵۸/۷ درصد واریانس کل را توجیه می‌کنند که سهم مؤلفه اول ۳۵/۸ درصد، سهم مؤلفه دوم ۱۶/۵ درصد و سهم مؤلفه سوم ۶/۴ درصد از تغییرات کل است. در شکل ۵ نمایش سه‌بعدی پراکنش افراد نشان داده شده است. به این ترتیب نمونه‌های گرفته‌شده از شرق و غرب جنگل‌های شمال به‌طور مستقل از هم نشان داده شده است.

مقادیر تکنیک بوت استرایپینگ درون خوشه اعدادی بین ۱۰۰ تا ۸۶ و محل برش ۶۳ بود که نشان‌دهنده قرارگیری مناسب ژنوتیپ‌ها درون خوشه‌ها و برش مناسب دندروگرام است. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه‌شده توسط هر مؤلفه و واریانس تجمعی سه مؤلفه اول در جدول ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که سه مؤلفه اول در مجموع

جدول ۷- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مربوط به نشانگر AFLP

Table 7. Breakdown into main components related to aflp marker

واریانس نسبی (درصد) Relative Variance (%)	واریانس تجمعی (درصد) Cumulative Variance (%)	مقادیر ویژه Eigenvalues	تعداد مؤلفه Number of components
35.8	35.8	8.3	مؤلفه اول The first component
16.5	52.3	2.1	مؤلفه دوم The second component
6.4	58.7	1.5	مؤلفه سوم The third component



شکل ۵- نمایش سه بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم داده‌های نشانگر AFLP  
Figure 5. 3D representation of decomposition into main components based on the first and second components of AFLP marker data

و مناسب بودن روش‌های مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی است. دلیل این موضوع تأثیر نپذیرفتن DNA از شرایط محیطی و تأثیرپذیری زیاد صفات ریخت‌شناسی از محیط است.

در این تحقیق از نشانگر مولکولی AFLP به منظور بررسی تنوع ژنتیکی درخت انجیلی موجود در جنگل‌های شمال کشور استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی بین انجیلی رویشگاه‌های تحت بررسی دارای تفاوت معنی‌دار است که حدود ۲۱ درصد واریانس مولکولی این تنوع مربوط به تنوع بین جمعیت و ۷۹ درصد واریانس مولکولی مربوط به تنوع درون رویشگاه‌هاست. به عبارت دیگر بین پایه‌های انجیلی در یک رویشگاه تنوع ژنتیکی وجود دارد، اما بین جمعیت‌ها تنوع کمی وجود دارد. این یافته نشان می‌دهد که در جمعیت‌های انجیلی جریان ژنی قوی وجود دارد که همین جریان ژنی قوی سهم واریانس بین جمعیتی را نسبت به واریانس درون جمعیتی کاهش داده است. این نتیجه پیش از این برای گونه بلندمازو نیز گزارش شده بود (Reisi et al., 2011). جریان ژنی بین جمعیتی و درون جمعیتی، نوعی قابلیت تکامل محسوب می‌شود که ساختار و تنوع ژنتیکی را در بُعد مکانی و زمانی تعیین می‌کند. در گونه‌هایی که با باد گرده‌افشانی

## بحث

کیفیت DNA در بررسی‌های مولکولی با نشانگر AFLP اهمیت زیادی دارد. این کار در درختان جنگلی به علت داشتن مواد ثانویه (تانن‌ها و پلی‌ساکاریدها) نیازمند دقت کافی در طی مراحل استخراج DNA است. در پژوهشی درباره بلوط ایرانی به دلیل داشتن مواد ثانویه، استفاده از برگ‌های تازه رویشی برای استخراج DNA با کیفیت مناسب توصیه شده است (Mashayekh et al., 2010). در همه نمونه‌ها نسبت میزان جذب نور طول موج ۲۶۰ نانومتر به میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۳۷ تا ۱/۹۶ بود که نشان‌دهنده مناسب بودن استخراج، کیفیت و کمیت مناسب DNA است. مشکل اصلی در استخراج DNA درخت انجیلی رنگی شدن (زرد، سبز و زرد) پلت DNA استخراجی این گیاه به دلیل وجود ترکیبات فنولی زیاد بود که استفاده از PVP (Bharmauria et al., 2009) و ۱۰ درصد این مشکل را برطرف کرد. نتایج نشانگر مولکولی AFLP درصد کم تنوع بین رویشگاه‌ها را نشان داد. پژوهش‌های فراوان دیگر در زمینه درختان جنگلی (Bruschi et al., 2003; Mashayekh et al., 2010) بیانگر کارایی اندک و ناتوانی صفات ریخت‌شناسی در شناسایی گونه‌ها و حتی تشخیص تنوع درون جمعیتی

این آغازگرهاست. درصد چندشکلی به دست آمده در این تحقیق با پژوهش (Tang et al., 2016; Xu et al., 2017; Mashayekh et al., 2010) مطابقت دارد. به عبارتی زیاد بودن مقدار محتوای چندشکلی بیانگر تنوع ژنتیکی بیشتر در جمعیت‌هاست (Saito et al., 2002). سطح چندشکلی به طور مستقیم به روابط ژنتیکی بین افراد وابسته است (Venkateswarlu et al., 2006). به طور کلی درصد باندهای چندشکل ملاک تعیین مقدار تنوع ژنتیکی و فرسایش تنوع ژنتیکی است که به طور معمول سازگاری کمی با هر تغییر محیطی نشان می‌دهد (Powell et al., 1996).

میزان PC حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول نشانگر AFLP ۵۸/۷ درصد واریانس کل را توجیه می‌کند. به عبارت دیگر این نشانگر در طول ژنوم یکنواخت نیست (Osmani & Siosemardeh, 2009). دلیل توزیع غیریکنواخت در نشانگر AFLP به سازوکارهای ایجاد چندشکلی مانند موتاسیون و حذف و اضافه شدن قطعات در ایجاد چندشکلی نسبت داده شده است (Greg, 1998). برخلاف صفات کمی که در بیشتر موارد به ویژه در مواردی که صفات تحت بررسی دارای همبستگی قوی باشند، دو یا سه مؤلفه اول بیش از ۹۰ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند، در داده‌های مربوط به نشانگرهای مبتنی بر DNA به طور معمول چند مؤلفه اول درصد خیلی زیاد از تنوع را توجیه نمی‌کنند (Mohammadi & Prasanna, 2003). در بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نشانگرهای مبنی بر DNA، بهترین حالت آن است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در ژنوم داشته باشند و از تمام ژنوم نمونه برداری کنند. بنابراین اگر نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شوند و همبستگی آنها کم باشد، تعداد مؤلفه بیشتری برای توجیه کل تغییرات لازم است. در این پژوهش نیز توجیه بخش کمتری از تنوع کل توسط چند مؤلفه اول و توزیع

می‌شوند، جریان ژنی تا مسافت‌های طولانی تری انتقال می‌یابد و تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها را کاهش می‌دهد (Govindaraju, 1989). در پژوهش‌های مختلف، تنوع ژنتیکی درون جمعیتی درختان جنگلی را بیشتر از تنوع بین جمعیتی گزارش داده‌اند (Tang et al., 2016; Mashayekh et al., 2010; Shabanian et al., 2016). گونه‌های دگرگشن (مانند انجیلی) از تنوع ژنتیکی درون جمعیتی زیاد و تنوع بین جمعیتی کمی برخوردارند (Rusanen et al., 2003). البته در پژوهش‌های مختلف نیز تنوع ژنتیکی زیاد بین جمعیت‌های درختی گزارش شده است (Hipp & Weber, 2008).

اطلاعات به دست آمده نشان داد که نشانگر AFLP دارای میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۲۵ و میانگین شاخص نشانگر (MI) ۲۲/۲۵ بود. شاخص نشانگر یکی از شاخص‌ها در قدرت تفکیک یک نشانگر است. مقدار زیاد شاخص نشانگر AFLP به دلیل تعداد زیاد باند چند شکل آن است (Mars et al., 2008). اطلاعات به دست آمده میانگین درصد باند چندشکل، ۹۰/۲۱ درصد را نشان داد. محتوای اطلاعات چندشکلی با در نظر گرفتن تعداد آلل‌های هر جایگاه ژنی و فراوانی نسبی آنها در ژنوتیپ‌های تحت بررسی، محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها را نشان می‌دهد. در انتخاب نوع نشانگر، برای بدست آوردن چندشکلی کافی، نوع رابطه خویشاوندی و نوع مواد مطالعه اهمیت زیادی دارند. در کل هرچه نمونه‌ها به هم نزدیک‌تر باشند، نشانگرهای با قدرت بیشتر در تشخیص چندشکلی لازم خواهد بود (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). با توجه به اینکه مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی از صفر تا ۱ متغیر است و هرچه این عدد بزرگ‌تر باشد فراوانی چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت تحت بررسی بیشتر است (Fabriki Ourang et al., 2009)، در این پژوهش محتوای چندشکلی آغازگرهای استفاده شده عدد بزرگی بود (۹۰/۲۱) که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی زیاد

می‌توان به خصوصیات دگرگشتی آنها وابسته دانست (Bacilieri et al., 1996). یکی دیگر از دلایل مهم وجود تنوع را می‌توان قدرت تفکیک زیاد نشانگر AFLP دانست. تنوع حاصل از نشانگر AFLP به صورت کاملاً متجانسی در بین جمعیت‌ها توزیع نمی‌شود (Coart et al., 2002) که ممکن است نمونه‌های مورد بررسی هیبرید باشند. هیبریداسیون طبیعی بین گونه‌ای برای درختان جنگلی وجود دارد (Bacilieri et al., 1996). در پژوهشی روی گونه‌های درختی بلوط دلیل تنوع زیاد مشاهده شده بین گونه‌ای را هیبریداسیون طبیعی بین پایه‌های درختی این گونه بیان کردند (Dodd & Kashani, 2003). پژوهش‌های مختلف نیز نشان داده‌اند که از جمعیت‌های تحت بررسی ممکن است بعضی از نمونه‌های منفرد در دسته‌های مربوط به جمعیت خود قرار نگیرند و به صورت مجزا در ضریب‌های تشابه متفاوت از همدیگر تفکیک شوند (Dodd & Kashani, 2003).

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ژنوتیپ‌های انجیلی با حدود اعتماد نزدیک به ۶۰ درصد به چهار گروه تقسیم می‌شوند؛ گروه اول شامل گیسوم؛ گروه دوم شامل بلوردکان و سفیدسنگان؛ گروه سوم شامل چالوس، سی‌سنگان، نوشهر و چشمه کشیل چمستان؛ و گروه چهارم شامل دلند، گالیکش، دارابکلا و افراخته. این تقسیم تا حدی نشان داد که رویشگاه‌های هر استان به‌طور تقریبی در کلاسترهای خوهری هم قرار دارند. البته رویشگاه دارابکلا از استان مازندران در خوشه رویشگاه‌های گلستان قرار گرفت. رویشگاه جنگلی دارابکلا در شرق استان مازندران قرار دارد، اما به رویشگاه‌های گلستان نزدیک‌تر از دیگر رویشگاه‌های خود استان مازندران است. همچنین رویشگاه گیسوم از استان گیلان در خوشه‌ای جداگانه و متمایز از دیگر رویشگاه‌های استان گیلان قرار گرفت. پیشنهاد می‌شود که همه گونه‌های اندمیک جنگل‌های ایران با کمک نشانگرهای مولکولی قوی مقایسه شوند.

واریانس بین مؤلفه‌ها حاکی از توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم است.

براساس محاسبات ضریب همبستگی کوفنتیک با استفاده از آزمون مانتل مشخص شد که ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA سازگارترین الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب تشابه ( $r = 0.87$ ) هستند. ضریب همبستگی کوفنتیک نشان داد که چقدر از اطلاعات اولیه یا ماتریس ورودی توانسته است به دندروگرام منتقل شود که در واقع همبستگی بین ماتریس ورودی و خروجی را نشان می‌دهد. به عبارت دیگر این ضریب نشان می‌دهد که دندروگرام و ماتریس تشابه تا چه حد مشابه‌اند. هرچه عدد  $r$  به دست آمده بزرگ‌تر باشد، دندروگرام و ماتریس تشابه انطباق بیشتری خواهند داشت (Mohammadi & Prasanna, 2003). در گزارشی درباره تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی به این نتیجه رسیدند که UPGMA نتایج معتبری را در انطباق بر روابط شجره مواد ژنتیکی فراهم می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). با توجه به نتایج به دست آمده دندروگرام حاصل از گروه‌بندی ۱۰ جمعیت انجیلی از طریق الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از نشانگر AFLP، نمونه‌های جمع‌آوری شده شرق و غرب جنگل‌های شمال را در خوشه‌های مجزا از هم قرار گرفت. متوسط میزان تشابه جاکارد ۰/۲۸ بود که بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۴۴) بین ژنوتیپ‌های داربکلای مازندران و افراخته گرگان و کمترین شباهت (۰/۲۶) بین ژنوتیپ‌های چشمه کشیل چمستان مازندران و سفیدسنگان گیلان دیده شد. میانگین میزان تشابه نشان‌دهنده شباهت کم و تنوع زیاد بین نمونه‌هاست.

با توجه به اینکه تاکنون پژوهش ژنتیکی خاصی روی پایه‌های انجیلی انجام نگرفته است، نمی‌توان دلیل کاملاً مشخصی را برای تمایز تعدادی از جمعیت‌های انجیلی بیان کرد، اما تنوع بسیار وسیع مشاهده شده ممکن است به دلایلی مانند روش تولید مثل درخت انجیلی (دگرگشتی) باشد. دلیل تنوع ژنتیکی درختان جنگلی را

## References

- Bacilieri, R., Ducouso, A., Petit, R.J., & Kremer, A. (1996). Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks. *Evolution*, 50, 900-908. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb03898.x>
- Bharmauria, V., Narang, N., Verma, V., & Sharma, S. (2009). Genetic variation and polymorphism in the Himalayan nettle plant *Urtica dioica* based on RAPD marker. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(3), 166-170.
- Brand, M.H., Obae, S.G., Mahoney, J.D., & Connolly, B.A. (2022). Ploidy, genetic diversity and speciation of the genus *Aronia*. *Scientia Horticulturae*, 291, 110604. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110604>
- Bruschi, P., Venderamin, G.G., Bussotti, F., & Grossoni, P. (2003). Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus Petraea*. *Annals of Botany*, 91, 707-716. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg075>
- Coart, E., Lamote, V., De loose, M., Bochstaele, E., Lootens, P., & Roldon-Ruiz, I. (2002). AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species in Flemish populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 431-439. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0920-6>
- Di, X.Y., & Wang, M. (2013). Genetic diversity and structure of natural *Pinus tabulaeformis* populations in North China using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical Systematics and Ecology*, 51, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.09.013>
- Dodd, R.S., & Kashani, N. (2003). Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section *Lobatae*). *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 884-892. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1290-4>
- Doyle, J.J., & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18)
- Fabriki Ourang, S., Shams-Bakhsh, M., Jalali Javaran, M., & Ahmadi, J. (2009). Analysis of Genetic Diversity of Iranian Melons (*Cucumis melo* L.) Using ISSR Markers. *Iranian Journal of Biology*, 22(2), 271-281. (In Persian)
- Greg, A. (1998). An AFLP based genome map of wheat (*triticum aestivum*). *Plant and Animal genomevi conference*, 18-22.
- Govindaraju, D.R. (1989). Estimates of gene flow in forest trees. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37, 345-357. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1989.tb01910.x>
- Hipp, A.L., & Weber, J.A. (2008). Taxonomy of Hill's Oak (*Quercus ellipsoidal*: Fagaceae). Evidence from AFLP Data. *Systematic Botany*, 33(1), 148-158. <https://doi.org/10.1600/036364408783887320>
- Mars, M., Chatti, K., Saddoud, O., Salhi Hannachi, A., Trifi, M., & Marrakchi, M. (2008). Fig cultivation and genetic resources in Tunisia, an overview. *Acta Horticulturae*, 798, 27-32.
- Mashayekh, Sh., Shiran, B., Jahanbaz, H., Houshman, S., Soltani, A., & Sorkheh, K. (2010). Study of genetic variation of *quercus brantii* in Chaharmahal va Bakhtiary province using AFLP molecular markers. *Journal of Forest and Wood Products (JFWP)*, *Iranian Journal of Natural Resource*, 63(1), 77-90. (In Persian)
- Merwin, L.M., Jeanne, A.M., & Robert, D.W. (1995). Provenance and progeny variation in growth and frost tolerance of *Casuarina Cunninghamiana* in California, USA. *Forest Ecology and Management*, 79, 161-171. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(95\)03612-1](https://doi.org/10.1016/0378-1127(95)03612-1)
- Mohammadi, S.A., & Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235>

- Mozafarian, V. (2005). *Trees and Shrubs of Iran*. Farhang Moaser Publishers, Tehran. (In Persian)
- Naghavi, M., Ghareyazie, B., & Hosseini Salekdeh, Gh. (2009). *Molecular Markers*. University of Tehran Prees. (In Persian)
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 70(12), 3321-3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Osmani, Zh., & Siosemardeh, A. (2009). Evaluation of genetic diversity of Sardari wheat ecotypes using AFLP molecular marker. *Modern Genetics journal*, 4(2), 39-48. (In Persian)
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 2(3), 225-238. <https://doi.org/10.1007/BF00564200>
- Reisi, Sh., Jalali, S.Gh., & Espahbodi K. (2011). An investigation of genetic variation of (*Quercus. castaneafolia* C.A. Mey) in Neka and Noor Forest of Mazandaran using peroxidases activities. *Taxonomy and Biosystematics*, 3(6), 11-22. (In Persian)
- Rusanen, M., Vakkari, P., & Blom, A. (2003). Genetic structure of *Acer platanoides* and *Betula pendula* in northern Europe. *Canadian Journal of Forest Research*, 33, 1110-1115. <https://doi.org/10.1139/x03-025>
- Saito, Y., Shiraishi, S., Tanimoto, T., Yin, L., Watanabe, S., & Ide, Y. (2002). Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis. *New Forest*, 23, 97-103. <https://doi.org/10.1023/A:1015605928414>
- Shabanian, N., Havas, A., & Mehrabi, A.A. (2016). Genetic differentiation in Persian oak (*Quercus brantii*) populations using genomic inter-microsatellite markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24(1), 66-78. (In Persian)
- Shannon, C.W., & Weaver, W. (1948). The mathematical theory of communication. The Mathematical Theory of Communication. *University of Illinois Press, Urbana IL*, 3-91.
- Tang, H., Xing, Sh., Li, J., Wang, X., Sun, L., Du, Sh., & Liu, X. (2016). Genetic diversity of *Ginkgo biloba* half-sib families based on AFLP technology. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.06.009>
- Venkateswarlu, M., Urs, S.R., Nath, B.S., Shashidhar, H.E., Maheswaran, M., Veeraiah, T.M., & Sabitha, M.G. (2006). A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) Using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy. *Tree Genetics & Genomes*, 3(1), 15-24. <https://doi.org/10.1007/s11295-006-0048-y>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijmans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Xu, J.J., Zhangb, L.Y., Zhaoa B., & Shena, H.F. (2017). Assessment of genetic diversity among six populations of *Rhododendron triflorum* in Tibet using ISSR and AFLP markers. *South African Journal of Botany*, 108, 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.023>
- Yap, I.V., & Nelson, R.J. (1996). Winboot, a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrogram. *International Rice Research Institute, Manila*, 1-22.
- Yosefzadeh, H., Akbarian, M.R., & Akbarinia, M. (2008). Variation in leaf morphology of *parrotia persica* along an elevational gradient in eastern mazandaran province (n. Iran). *Rostaniha*, 9(2), 178-189. (In Persian)
- Yue, Y.I.N., Wei, A.N., Zhao, J.H., Li, Y.L., Fan, Y.F., Chen, J.H., & Zhan, X.Q. (2022). Constructing the wolfberry (*Lycium* spp.) genetic linkage map using AFLP and SSR markers. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(1), 131-138. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63610-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63610-9)



*Research Article*

## Genetic diversity of *Parrotia persica* (DC) C.A. Meyer in Hyrcanian forests

M. Imani rastabi<sup>1</sup>, H. Jalilvand<sup>2\*</sup>, A. Fallah<sup>2</sup>, and B. Shahin Kaleybar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ph.D. graduate, Dept. of Sciences and Forest Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I. R. Iran

<sup>2</sup>Prof., Dept. of Sciences and Forest Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, I. R. Iran

<sup>3</sup>Assistant prof., Tabarestan Agricultural Genetics and Biotechnology Research Institute, I. R. Iran

(Received: 2022 February 27; Accepted: 2023 January 10)

### Abstract

*Parrotia persica*, a native species of the Hyrcanian forests, is distributed from the west to the east of the forests of northern Iran. This study investigated the genetic diversity of *Parrotia persica* using molecular information from populations collected from three habitats in Gilan, four habitats in Mazandaran, and three habitats in Golestan. Using the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) marker, 826 bands were obtained, with more than 90% of the bands being polymorphic. The mean content of polymorphic information (PIC) and marker index (MI) were calculated to be 0.24 and 22.4, respectively. Cluster analysis based on the Jaccard similarity coefficient and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) algorithm revealed a wide variety in the collected samples. Based on the Jaccard similarity coefficient, the range of genetic similarity varied from 0.26 to 0.44. The results of the molecular analysis of variance (AMOVA) showed that 21% of the total genetic diversity in *Parrotia persica* populations was due to genetic diversity between the populations of the three provinces of Golestan, Mazandaran, and Guilan. Genetic diversity within the populations of the habitats accounted for 79%. It can be concluded that there is no difference between the populations based on the diversity of molecular information, but there is diversity within the populations. The diversity among the evangelical populations seems to be more influenced by the environment than genetically. However, for a more accurate conclusion, it is suggested that different ecotones of the population be examined with molecular markers.

**Keywords:** Polymorphism, genetic protection, forest genetic, molecular marker, AFLP.