



بررسی ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) در زاگرس میانی با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهوره ژنومی

عبدالرضا شاماری^۱، علی اشرف مهرابی^{۲*}، عباس ملکی^۳ و علی رستمی^۴

^۱ دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی ایلام، ایلام
^۲ دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام
^۳ استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی ایلام، ایلام
^۴ استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی ایلام، ایلام

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۱۶)

چکیده

تدوین برنامه‌های توسعه و احیای رویشگاه‌های بلوط ایرانی مستلزم بررسی ساختار تنوع ژنتیکی موجود در درون و بین جمعیت‌های این گونه و اطلاع از میزان قرابت و فاصله ژنتیکی آنهاست. همچنین کاهش سطح تنوع به آسیب‌پذیری گونه‌های گیاهی در مواجهه با تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر می‌شود. تنوع ژنتیکی ۱۸۰ پایه بلوط ایرانی (۱۸ جمعیت) از جنگل‌های منطقه زاگرس مرکزی شامل استان‌های کرمانشاه، ایلام و لرستان با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR بررسی شد. در مجموع ۱۵۷ آلل تکثیر شد که از این تعداد ۱۵۶ آلل به‌عنوان الل چندشکل تشخیص داده شدند. تعداد الل‌های تکثیرشده از ۴ تا ۱۷ با میانگین ۱۰/۴۷ متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۰۵۲ در آغازگر UBC895 تا ۰/۴۲۵ برای آغازگر UBC807 متفاوت بود. بیشترین تعداد کل الل‌های تکثیرشده و تعداد الل‌های چندشکل مربوط به آغازگر ISSR16 با ۱۷ الل بود. آغازگر UBC814 نیز با چهار الل کمترین الل تولیدشده را در میان آغازگرهای مورد استفاده داشت. دامنه اندازه قطعات تولیدشده از ۱۵۰ تا ۱۸۰۰ جفت باز بود. ۲۰ درصد از تنوع آشکارشده تنوع بین‌جمعیتی و ۸۰ درصد از آن نیز تنوع درون‌جمعیتی بود که روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مختصات جمعیت‌ها را به‌خوبی از هم تفکیک کرد. کمترین فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌های استان لرستان (۵۹ درصد) و بیشترین میزان آن در استان کرمانشاه مشاهده شد. جمعیت‌های موجود در استان کرمانشاه و لرستان نیز حداکثر فاصله ژنتیکی را از همدیگر داشتند. تجزیه خوشه‌ای، ۱۸ جمعیت مورد بررسی را در سه گروه متمایز قرار داد که بیانگر تمایز بیشتر ژنوتیپ‌های موجود در استان لرستان و کرمانشاه است. تکثیر و چندشکلی مناسب نشانگرهای ISSR مورد استفاده در بلوط ایرانی و همچنین میزان بالا و معنی‌دار تنوع بین جمعیت‌ها (۲۰ درصد)، ظرفیت مطلوب این نشانگرها را در شناسایی الل‌های آگاهی‌بخش مرتبط با صفات فنوتیپی نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه واریانس مولکولی، چندشکلی، فاصله ژنتیکی، نشانگر ISSR.

مقدمه

Quercus brantii Lindl. var. *persica*) از مهم‌ترین گونه‌های درختی منطقه رویشی زاگرس است. گونه‌ای دیپلوئید ($2n=2x=24$) است که ارتفاع آن گاهی به ۲۰ متر هم می‌رسد. در ایران در سطح وسیعی در

جنس بلوط متعلق به خانواده Fagaceae است که متجاوز از ۴۵ گونه دارد. در جنگل‌های زاگرس گونه بلوط ایرانی در بین آنها غالب است. بلوط ایرانی

مخالف هم قرار دارند، تکثیر می‌کند. این تکنیک به طراحی آغازگر نیاز ندارد و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد. این نشانگرها در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشانمندی سازی ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی به‌کار می‌روند (Reddy et al., 2002).

تاکنون مطالعاتی چند در مورد تنوع ژنتیکی بلوط انجام گرفته که به شرح زیر می‌باشند:

Shabanian et al. (2016a) با استفاده از ۲۲ آغازگر ISSR، تمایز ژنتیکی میان هشت جمعیت بلوط ایرانی را در یک ناحیه جغرافیایی محدود (رویشگاه‌های این گونه در حومه شهرستان ایلام) گزارش کردند. در این تحقیق دامنه شاخص چندشکلی (PIC) از ۰/۲ تا ۰/۴۳ و تعداد قطعات تکثیرشده از ۷ تا ۲۰ متغیر بود. میانگین شاخص تنوع ژنی (He) در رویشگاه‌های ارزیابی شده بسیار پایین (۰/۱۴۷) گزارش شد. Shabanian et al. (2016b) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ بلوط ایرانی در بخش شمالی جنگل‌های زاگرس را با استفاده از ده نشانگر SCoT ارزیابی کردند و تعداد قطعات تکثیرشده را از ۸ تا ۱۲ و دامنه اندازه آنها را از ۳۰۰ تا ۲۴۰۰ جفت باز گزارش کردند. در این رویشگاه‌ها، متوسط شاخص هتروژنی و شانون (برای جایگاه‌های نشانگری تکثیرشده) به ترتیب ۰/۱۹۱ و ۰/۲۷۹ بود. Alikhani et al. (2014) تنوع ژنتیکی جوامع بلوط جنگل‌های زاگرس شمالی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، IRAP و ریخت‌شناختی بررسی کردند. در این مطالعه دامنه قطعات تکثیری در هر دو نشانگر مولکولی از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود. تنوع بین جمعیت‌ها با نشانگرهای ISSR، ۲۷ درصد و با نشانگرهای IRAP، ۲۱ درصد گزارش شد. Reisi et al. (2011) با بررسی تنوع ژنتیکی بلوط بلندمازو (*Quercus castanefolia*) براساس فعالیت کمی و کیفی آنزیم پراکسیداز، نشان دادند بیشترین فاصله ژنتیکی بین رویشگاه‌های میان‌بند و بالابند و

جنگل‌های غرب در مساحتی بالغ بر دو میلیون و دویست هکتار انتشار انتشمار دارد (Jazirehi & Ebrahimi Rostaghi, 2003).

تدوین برنامه حفاظت از منابع ژنتیکی بلوط ایرانی و توسعه و احیای جنگل‌ها می‌تواند مهم‌ترین و مؤثرترین اقدام احیایی و حفاظتی رویشگاه‌های این گونه باشد (Ardi et al., 2012). امروزه با گسترش تکنیک‌های مولکولی به‌خصوص استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌توان فرایند اصلاح جمعیت‌های درختان جنگلی را که امری وقت‌گیر و هزینه‌بر است، کوتاه کرد. نشانگرهای مولکولی برای اهداف خاص مانند بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت و شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم و مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده به‌طور وسیعی به‌کار می‌روند (Gupta & Varshney, 1999).

انگشت‌نگاری مولکولی و تهیه شناسنامه ژنتیکی درختان بلوط، اطلاعات جامع و قابل اعتمادی را در زمینه میزان فاصله ژنتیکی جمعیت‌های این گونه و همچنین سطح درون‌زادآوری^۱ و پس‌روی ژنتیکی^۲ (بروز صفات کمی نامطلوب در اثر خلوص ژنتیکی) رویشگاه‌های مختلف فراهم می‌آورد. تاکنون تنوع ژنتیکی در شاه‌بلوط اروپایی با استفاده از نشانگر ISSR و IRAP (Casasoli et al., 2000)، تنوع ژنتیکی *Q. robur* و *Q. petraea* با استفاده از نشانگرهای آیزوزایمی (Kashani et al., 2002) و نشانگرهای AFLP (Mariette et al., 2002)، تنوع ژنتیکی *Q. semiserrata* با استفاده از نشانگرهای ریزم‌هاواره هسته‌ای و کلروپلاستی (Pallad et al., 2008) بررسی شده است.

یکی از نشانگرهای مورد استفاده در مطالعات تنوع ژنتیکی موجودات زنده و گیاهان، نشانگر ISSR است؛ ISSR نشانگری مبتنی بر PCR است که قطعه DNA موجود و قابل تکثیر بین دو ریزماهواره را که در جهت

¹ Inbreeding

² Genetic depression

میزان قرابت و فاصله ژنتیکی جمعیت‌های بلوط موجود در این منطقه ساختار تنوع درون و بین جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهوره ژنومی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

منطقه پژوهش

در این تحقیق، در منطقه زاگرس مرکزی از استان‌های کرمانشاه، ایلام و لرستان، در هر استان شش رویشگاه و از هر کدام ۱۰ نمونه جمع‌آوری شد (جدول ۱). در مجموع از ۱۸ رویشگاه (شکل ۱) در سه استان، ۱۸۰ پایه درخت بلوط انتخاب شد و از برگ تازه در بهار ۱۳۹۵ نمونه‌برداری شد. از محدوده‌ای به مساحت تقریبی ۲۰ هکتار، ۱۰ پایه نمونه انتخاب شد. از رویشگاه‌های مورد نظر، یک درخت به تصادف به‌عنوان مرکز نمونه‌برداری انتخاب شد و نمونه‌برداری از برگ‌های تازه انجام گرفت. سایر درختان با فاصله ۱۰۰ تا ۲۰۰ متر از همدیگر، به‌صورت منظم (سیستماتیک) نمونه‌برداری شدند. مشخصات جغرافیایی ده درخت نمونه‌برداری شده یادداشت شد. از آنجا که نقطه اول تصادفی است، کلیه نقاط نمونه برداری شده تصادفی محسوب می‌شوند و رعایت فاصله منظم، فقط به منظور پوشش مناسب رویشگاه (جامعه آماری) است (Mirmohammadi, 2014).

شیوه اجرای پژوهش

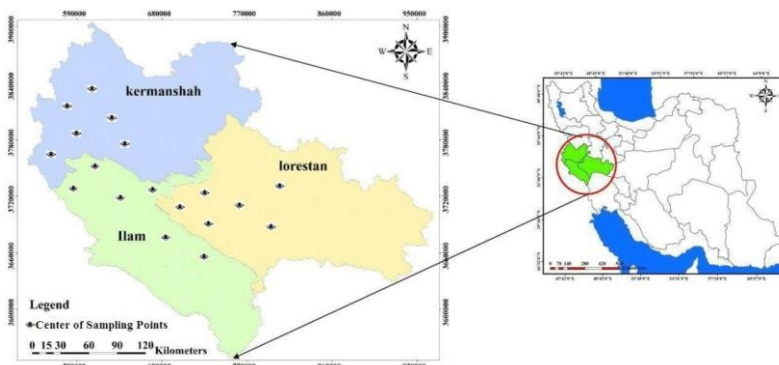
استخراج DNA ژنومی: DNA ژنومی به‌صورت تک‌پایه (درخت) از بافت برگ‌های ترد و تازه براساس دستورالعمل (Doyle & Doyle (1987) با اندکی تغییرات استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA نمونه‌ها روی ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر 1x، TAE² و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی و DNA نمونه‌ها تا حد ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

کمترین فاصله ژنتیکی بین رویشگاه‌های میان‌بند و پایین‌بند دیده شد.

گیاهان دارای گرده‌افشانی باز معمولاً نرخ دگرگرده افشانی بالایی دارند، اما این به معنای توان نامحدود جابه‌جایی گرده نیست. (Manjars & Surk (2006) ارزیابی نه مکان آلوزایمی، الگوهای آمیزشی *Q. velutina* را در جنگل هیکوری ایالت میسوری آمریکا بررسی و حوزه دگرگرده‌افشانی در این گونه را محدود (شعاع ۴۹/۹ متری) و احتمال رانش ژنتیکی^۱ را گزارش کردند. (Berg & Hamrick (1995) نیز ۳۴۰۰ درخت بلوط ترکیه‌ای (*Q. laevis*) موجود در یک پلات ۱۶۰×۱۶۰ متری از یک رویشگاه ۶۰ هکتاری را از لحاظ هموزیگوت شدگی یکسان، در نه مکان آلوزایمی، تعیین ژنوتیپ کردند و با شبیه‌سازی رایانه‌ای، حوزه گرده‌افشانی (مجاورت مؤثر) را در این گونه برای ۴۴۰ پایه مجاور گزارش کردند؛ اما (Ashley et al. (2015) با استفاده از تنوع موجود در هشت نشانگر ریزماهوره، ساختار ژنتیکی جمعیت‌های *Q. lobata* را در دوازده رویشگاه آن در کالیفرنیا ارزیابی کردند و یکی از جمعیت‌های مورد بررسی را کاملاً متمایز از بقیه رویشگاه‌های این گونه یافتند. در این مطالعه شاخص هتروژنی درون رویشگاه‌ها بسیار بالا و میانگین آن در مکان‌های نشانگری مورد بررسی ۰/۷۰۳ گزارش شد.

در درختانی مانند بلوط که سیستم تولیدمثلی دگرگشن دارند، لازم است ساختار تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی بررسی شود و در صورت کاهش سطح تنوع ژنی درون جمعیت‌ها (به‌عنوان ظرفیت سازگاری در مواجهه با شرایط متغیر محیطی)، به اصلاح ساختار ژنتیکی رویشگاه‌ها به‌عنوان راهکاری پایدار توجه شود. با این رویکرد، در این تحقیق تنوع مولکولی درختان بلوط زاگرس در استان‌های کرمانشاه، ایلام و لرستان ارزیابی شد. با هدف تعیین

¹ Genetic drift



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی ۱۸ جمعیت مورد مطالعه از استان‌های واقع در زاگرس میانی

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی رویشگاه‌های مورد بررسی در این تحقیق

ردیف	استان و شهرستان	نام رویشگاه	علامت اختصاری	تعداد نمونه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	موقعیت جغرافیایی		
۱	ایلام - ایوان	سراب	I1	۱۰	۱۵۸۶	۳۴°N	۱۳°E	۶۶
۲	ایلام - ایلام	تجریان	I2	۱۰	۱۰۶۴	۳۴°N	۰۲°E	۶۳
۳	ایلام - شیروان	کلی کلی	I3	۹	۱۲۱۵	۳۴°N	۰۸°E	۴۰
۴	ایلام - چرداول	محمد قلی	I4	۱۰	۹۴۸	۳۳°N	۱۶°E	۵۴
۵	ایلام - آبدانان	دینار کوه	I5	۱۰	۱۲۷۷	۳۳°N	۳۱°E	۵۸
۶	ایلام - بدره	حرانمر	I6	۱۰	۱۲۹۱	۳۳°N	۳۱°E	۸۲
۷	کرمانشاه - گیلان غرب	کل کش	K1	۱۰	۱۳۸۶	۳۴°N	۲۱°E	۴۷
۸	کرمانشاه - سرپل ذهاب	امامیه	K2	۱۰	۱۳۹۰	۳۴°N	۰۶°E	۸۵
۹	کرمانشاه - گیلان غرب	اول ویار	K3	۱۰	۱۳۱۰	۳۴°N	۰۶°E	۳۳
۱۰	کرمانشاه - کرمانشاه	چهار زبر	K4	۱۰	۱۲۱۳	۳۳°N	۲۶°E	۰۶
۱۱	کرمانشاه - دالاهو	سرخه لیژه	K5	۱۰	۹۰۳	۳۳°N	۲۰°E	۶۴
۱۲	کرمانشاه - اسلام آباد غرب	علی آباد	K6	۱۰	۹۴۴	۳۳°N	۴۰°E	۵۷
۱۳	لرستان - کوهدشت	باوینه	L1	۱۰	۱۰۱۲	۳۳°N	۰۵°E	۷۸
۱۴	لرستان - کوهدشت	کمیل مالمیر	L2	۱۰	۱۱۹۱	۳۳°N	۴۸°E	۶۴
۱۵	لرستان - دوره چگنی	بنار کوه	L3	۱۰	۱۲۵۶	۳۳°N	۴۲°E	۴۹
۱۶	لرستان - خرم آباد	شوراب	L4	۱۰	۱۱۵۵	۳۳°N	۴۲°E	۹۱
۱۷	لرستان - پلدختر	چم شهران	L5	۱۱	۱۳۱۸	۳۳°N	۱۹°E	۹۷
۱۸	لرستان - کوهدشت	درب گنبد	L6	۱۰	۹۱۷	۳۳°N	۴۴°E	۸۲
						۳۳°N	۳۹°E	۳۲
						۳۳°N	۰۷°E	۵۷

رنگ آمیزی ژل از محلول اتیدیوم بروماید استفاده شد. برای تعیین اندازه قطعات تکثیری از سایز مارکر bp ۱۰۰ استفاده شد (شکل ۲).

روش تحلیل

امتیازدهی باندها بر مبنای کد صفر (نبود باند) و یک (وجود باند) در نرم افزار Excel صورت گرفت. میزان اطلاعات چندشکل (PIC) از رابطه $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$ محاسبه شد که در آن Pij بیانگر فراوانی الیل نام از نشانگر ژام است (Anderson et al., 1993; Powell et al., 1996). ضرایب عدم تشابه بین ژنوتیپها از نرم افزار DARwin 5.0 محاسبه شد. آزمون مانتل برای محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک و تعیین بهترین الگوریتم ترسیم درخت ژنتیکی و ماتریس عدم تشابه با استفاده از نرم افزار XLSTAT 2013 انجام گرفت. تجزیه واریانس مولکولی و پارامترهای ژنتیکی جمعیتها با استفاده از نرم افزار GenALEx 6.42 محاسبه شد. از نرم افزار MEGA3.1 برای تجزیه خوشه‌ای و محاسبه فاصله ژنتیکی درون جمعیتها استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، آغازگرهای ISSR آزمایش شد و ۱۵ آغازگر (جدول ۲) که چندشکلی داشتند، انتخاب شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی، دو میکرولیتر بافر 10X، ۱/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی مولار، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs ۱ میلی مولار، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد) و در نهایت با ۱۲/۸ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) با برنامه زمانی چهار دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ چرخه اولیه به صورت تاج داون و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد، دمای توصیه شده برای هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه (به منظور اتصال آغازگرها) و دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط انجام گرفت و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت هفت دقیقه انجام پذیرفت. قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد در بافر 1x TAE تفکیک و به منظور

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده و اندازه و محتوای چندشکلی قطعات تکثیر شده حاصل از آنها

شماره آغازگر	نام آغازگر	توالی	دمای اتصال (°C)	تعداد الیل	دامنه قطعات تکثیری	محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)
1	ISSR 08	5' GAGAGAGAGAGAGAT 3'	50	14	300 - 1600	0.379
2	ISSR 16	5' GAGAGAGAGAGAGAG 3'	50	17	300 - 1400	0.210
3	ISSR 17	5' CACACACACACACAG 3'	52	10	400 - 2000	0.294
4	ISSR 155	5' TGT GTGTGT GTG TGT GGG 3'	56	11	300 - 1500	0.288
5	ISSR 165	5' AGGAGAGAGAGAGAGCC 3'	56	14	250 - 1400	0.401
6	UBC 807	5' AGAGAGAGAGAGAGAGT 3'	50	11	300 - 1600	0.425
7	UBC 809	5' AGAGAGAGAGAGAGAGG 3'	52	9	200 - 1000	0.326
8	UBC 810	5' GAGAGAGAGAGAGAGAT 3'	50	13	350 - 1400	0.360
9	UBC 814	5' CTC TCT CTCTCTCTA 3'	50	4	350 - 1500	0.246
10	UBC 835	5' AGAGAGAGAGAGAGACYC 3'	55	10	300 - 1600	0.224
11	UBC 836	5' AGAGAGAGAGAGAGACYA 3'	53	11	250 - 2000	0.259
12	UBC 840	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYT 3'	53	8	250 - 1700	0.121
13	UBC 841	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYC 3'	55	7	250 - 1500	0.274
14	UBC 842	5' GAGAGAGAGAGAGAGAYG 3'	55	9	150 - 1800	0.305
15	UBC 895	5' AGAGTTGGTAGCTCTTGATC3'	56	11	390 - 1600	0.052

نتایج

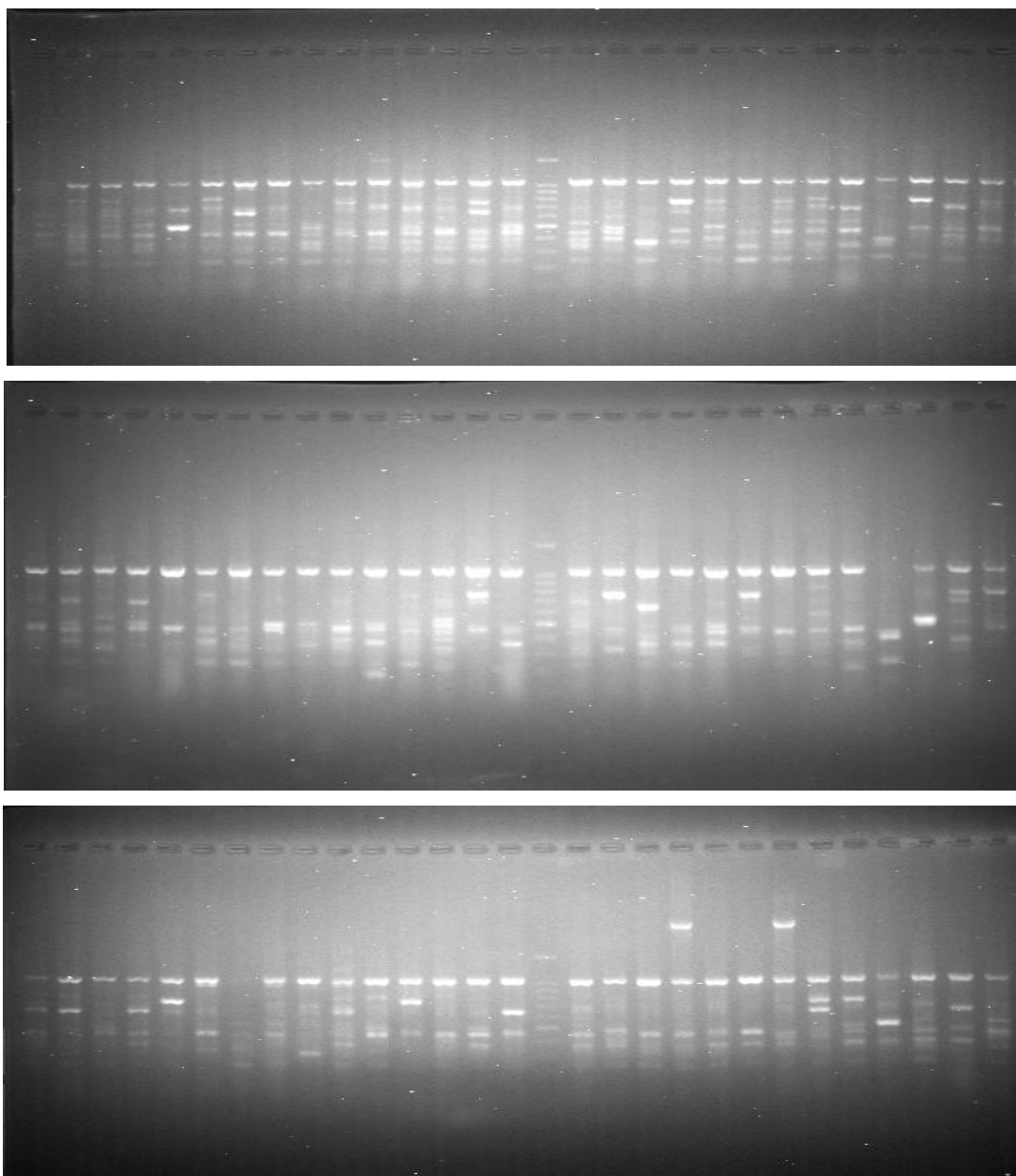
شاخص‌های ژنتیکی

شاخص تنوع ژنی، شاخص شانون و میزان چندشکلی در لوکوس‌های تکثیرشده، برای هر جمعیت جداگانه بررسی شد (جدول ۳). نتایج نشان می‌دهد که بیشترین میزان شاخص شانون (I) و شاخص هتروژنی (He) مربوط به جمعیت امامیه-کرمانشاه و کمترین مقدار این شاخص‌ها مربوط به جمعیت چهارزبر-کرمانشاه است. میانگین شاخص شانون (I) برای همه جمعیت‌ها ۰/۲۸۴ و میانگین شاخص هتروژنی جمعیت‌ها، ۰/۱۹۵ بود. بیشترین تعداد الل مؤثر مربوط به جمعیت امامیه و کمترین

تعداد الل مؤثر مربوط به جمعیت چهارزبر بود. متوسط درصد چندشکلی در مکان‌های ژنومی تکثیرشده، ۶۰/۴۰ درصد بود. بیشترین درصد شکلی در جمعیت امامیه-کرمانشاه ۶۸/۱۵ درصد و کمترین مقدار آن نیز مربوط به جمعیت سرخه لیژه-کرمانشاه ۴۵/۸۶ درصد بود. محتوای اطلاعات چندشکل، به تفکیک برای هر نشانگر محاسبه شد (جدول ۲). بیشترین شاخص محتوای چندشکلی (PIC) با مقدار ۰/۴۲۵ مربوط به آغازگر UBC807 و کمترین میزان با مقدار ۰/۰۵۲ در آغازگر UBC895 مشاهده شد. میانگین محتوای چندشکلی برای آغازگرها، ۰/۲۷۷ بود.

جدول ۳- شاخص‌های تنوع درون جمعیت‌های ارزیابی شده

جمعیت	تعداد نمونه	تعداد الل مؤثر	شاخص شانون	شاخص هتروژنی	درصد الل‌های چند شکل
	N	Ne	I	He	
K1	۱۰	۰/۰۳۰ ± ۱/۳۲	۰/۰۲۲ ± ۰/۲۸۶	۰/۰۱۷ ± ۰/۲۰۰	۵۷/۹۶
K2	۱۰	۰/۰۲۹ ± ۱/۳۵	۰/۰۲۱ ± ۰/۳۱۹	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۱۹	۶۸/۱۵
K3	۱۰	۰/۰۲۸ ± ۱/۳۱	۰/۰۲۲ ± ۰/۲۹۱	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۰۰	۶۲/۴۲
K4	۱۰	۰/۰۲۵ ± ۱/۲۱	۰/۰۲۰ ± ۰/۲۰۳	۰/۰۱۴ ± ۰/۱۳۶	۴۷/۱۳
K5	۱۰	۰/۰۲۷ ± ۱/۲۴	۰/۰۲۱ ± ۰/۲۲۱	۰/۰۱۶ ± ۰/۱۵۲	۴۵/۸۶
K6	۱۰	۰/۰۲۷ ± ۱/۲۶	۰/۰۲۲ ± ۰/۲۴۰	۰/۰۱۶ ± ۰/۱۶۵	۵۰/۳۲
I1	۱۰	۰/۰۲۹ ± ۱/۳۴	۰/۰۲۲ ± ۰/۳۰۸	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۱۱	۶۵/۶۱
I2	۱۰	۰/۰۲۸ ± ۱/۳۱	۰/۰۲۱ ± ۰/۲۹۱	۰/۰۱۶ ± ۰/۱۹۹	۶۳/۰۶
I3	۱۰	۰/۰۲۸ ± ۱/۳۳	۰/۰۲۱ ± ۰/۳۱۱	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۱۲	۶۵/۱۵
I4	۱۰	۰/۰۲۹ ± ۱/۳۴	۰/۰۲۲ ± ۰/۳۱۳	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۱۶	۶۴/۹۷
I5	۱۰	۰/۰۳۰ ± ۱/۳۴	۰/۰۲۲ ± ۰/۳۰۱	۰/۰۱۷ ± ۰/۲۰۸	۶۳/۶۹
I6	۱۰	۰/۰۲۷ ± ۱/۲۹	۰/۰۲۱ ± ۰/۲۸۰	۰/۰۱۵ ± ۰/۱۹۰	۶۲/۴۲
L1	۱۰	۰/۰۲۸ ± ۱/۳۳	۰/۰۲۱ ± ۰/۳۰۹	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۱۲	۶۶/۲۴
L2	۱۰	۰/۰۲۸ ± ۱/۳۲	۰/۰۲۱ ± ۰/۲۹۶	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۰۲	۶۴/۹۷
L3	۱۰	۰/۰۲۸ ± ۱/۳۲	۰/۰۲۱ ± ۰/۳۰۰	۰/۰۱۶ ± ۰/۲۰۶	۶۳/۰۶
L4	۱۰	۰/۰۲۶ ± ۱/۳۰	۰/۰۲۱ ± ۰/۲۸۵	۰/۰۱۵ ± ۰/۱۹۴	۶۱/۷۵
L5	۱۰	۰/۰۲۹ ± ۱/۳۰	۰/۰۲۲ ± ۰/۲۷۱	۰/۰۱۶ ± ۰/۱۸۸	۵۵/۴۱
L6	۱۰	۰/۰۳۰ ± ۱/۳۲	۰/۰۲۳ ± ۰/۲۸۵	۰/۰۱۷ ± ۰/۲۰۰	۵۵/۰۵
کل	۱۸۰	۰/۰۰۷ ± ۱/۳۱	۰/۰۰۵ ± ۰/۲۸۴	۰/۰۰۴ ± ۰/۱۹۵	۶۱/۱



شکل ۲- قطعات حاصل از تکثیر آغازگر UBC836 در برخی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، آشکارسازی شده با الکتروفورز ژل آگاروز ۲٪ (سایز مارکر ۱۰۰bp در قسمت میانی ژل‌ها قابل تمایز است).

استفاده از کمیت‌های عددی اندازه‌گیری و گزارش می‌شود. در این تحقیق ماتریس فاصله ژنتیکی براساس شاخص دایس محاسبه و در جدول ۴ تنظیم شد. کمترین فاصله ژنتیکی بین مناطق بنارکوه و شوراب (۰/۰۱۳) در استان لرستان و بیشترین فاصله ژنتیکی بین چهارزبر کرمانشاه و منطقه محمدقلی در

محاسبه فاصله ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های بلوط ایرانی مورد بررسی براساس نشانگر ISSR

فاصله ژنتیکی بین دو موجود به منزله تفاوت توجیه پذیر بین آن دو موجود با استفاده از تنوع اللی است. به عبارت دیگر، فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت یا گونه‌هاست که با

لرستان و بیشترین میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۰۸۲ مربوط به جمعیت کرمانشاه بود. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها نیز دامنه‌ای از ۰/۰۵۹ تا ۰/۰۸۰ داشت که کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های لرستان و ایلام و بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های لرستان و کرمانشاه مشاهده شد (جدول ۴).

چرداول ایلام مشاهده شد. برای آگاهی از میزان قرابت ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی، فاصله ژنتیکی آنها براساس تابع شاخص دایس، محاسبه شد. میانگین فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها دامنه‌ای از ۰/۰۵۶ تا ۰/۰۸۲ داشت که کمترین میانگین فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها ۰/۰۵۶ مربوط به جمعیت

جدول ۴- فاصله ژنتیکی ۱۸ جمعیت مورد بررسی با استفاده از ال‌های تکثیرشده در ۱۵ مکان نشانگری

K5	K4	I6	I5	L6	L5	L4	L3	L2	L1	I4	I3	I2	I1	K3	K2	K1	
																۰/۰۲۶	
															۰/۰۴۷	۰/۰۷۳	
														۰/۰۴۲	۰/۰۴۹	۰/۰۵۶	
													۰/۰۲۸	۰/۰۸۴	۰/۰۶۷	۰/۰۷۹	
												۰/۰۴۳	۰/۰۶۰	۰/۰۸۹	۰/۰۶۳	۰/۰۵۹	
											۰/۰۷۳	۰/۰۶۵	۰/۰۶۲	۰/۰۶۳	۰/۰۴۹	۰/۰۶۶	
										۰/۰۲۳	۰/۰۸۶	۰/۰۶۵	۰/۰۴۸	۰/۰۴۷	۰/۰۵۵	۰/۰۶۹	
									۰/۰۴۳	۰/۰۶۶	۰/۰۸۵	۰/۰۸۹	۰/۰۴۳	۰/۰۳۹	۰/۰۶۲	۰/۰۷۹	
								۰/۰۶۰	۰/۰۶۶	۰/۰۷۴	۰/۰۴۸	۰/۰۴۸	۰/۰۳۴	۰/۰۸۵	۰/۰۷۳	۰/۰۷۴	
							۰/۰۱۳	۰/۰۸۱	۰/۰۷۳	۰/۰۸۴	۰/۰۴۷	۰/۰۳۵	۰/۰۴۵	۰/۱۰۲	۰/۰۸۲	۰/۰۸۰	
						۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۸۳	۰/۰۶۱	۰/۰۷۷	۰/۰۵۷	۰/۰۵۶	۰/۰۶۱	۰/۰۷۵	۰/۰۸۵	۰/۰۸۵	
				۰/۰۶۹	۰/۰۷۰	۰/۰۵۸	۰/۰۵۸	۰/۰۴۳	۰/۰۶۰	۰/۰۸۷	۰/۰۶۸	۰/۰۵۰	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۰/۰۵۸	۰/۰۵۶	
			۰/۰۲۰	۰/۰۶۲	۰/۰۶۶	۰/۰۵۲	۰/۰۴۴	۰/۰۴۵	۰/۰۷۷	۰/۰۸۶	۰/۰۸۰	۰/۰۲۲	۰/۰۵۲	۰/۰۶۲	۰/۰۶۲	۰/۰۶۲	
		۰/۰۲۷	۰/۰۴۶	۰/۰۶۶	۰/۰۷۴	۰/۰۶۹	۰/۰۷۹	۰/۰۷۱	۰/۰۹۱	۰/۰۷۸	۰/۰۹۴	۰/۰۶۷	۰/۰۸۸	۰/۰۸۰	۰/۰۶۶	۰/۰۶۶	
	۰/۰۷۵	۰/۰۷۴	۰/۰۸۱	۰/۰۷۹	۰/۰۷۷	۰/۰۸۸	۰/۱۱۴	۰/۱۲۲	۰/۱۳۶	۰/۰۹۷	۰/۰۹۳	۰/۰۸۲	۰/۱۰۱	۰/۱۰۲	۰/۰۹۶	K4	
	۰/۰۲۲	۰/۰۷۳	۰/۰۷۲	۰/۰۸۵	۰/۰۷۱	۰/۰۶۳	۰/۰۷۳	۰/۱۱۴	۰/۱۰۴	۰/۱۲۵	۰/۰۹۱	۰/۰۸۱	۰/۰۷۴	۰/۱۱۰	۰/۱۱۸	۰/۱۱۳	K5
۰/۰۳۴	۰/۰۵۹	۰/۰۶۸	۰/۰۶۵	۰/۰۷۶	۰/۰۸۳	۰/۱۰۰	۰/۰۸۴	۰/۱۱۱	۰/۱۰۵	۰/۱۱۹	۰/۰۹۸	۰/۱۰۶	۰/۰۹۲	۰/۰۹۸	۰/۱۱۸	۰/۱۰۹	K6

جدول ۵- متوسط فواصل ژنتیکی درون و بین مناطق مختلف (رویشگاه‌های) مورد مطالعه

استان	متوسط فاصله درون جمعیت‌ها	متوسط فاصله بین جمعیت‌ها
کرمانشاه	۰/۰۸۲	-
ایلام	۰/۰۶۵	۰/۰۷۸
لرستان	۰/۰۵۶	۰/۰۸۰

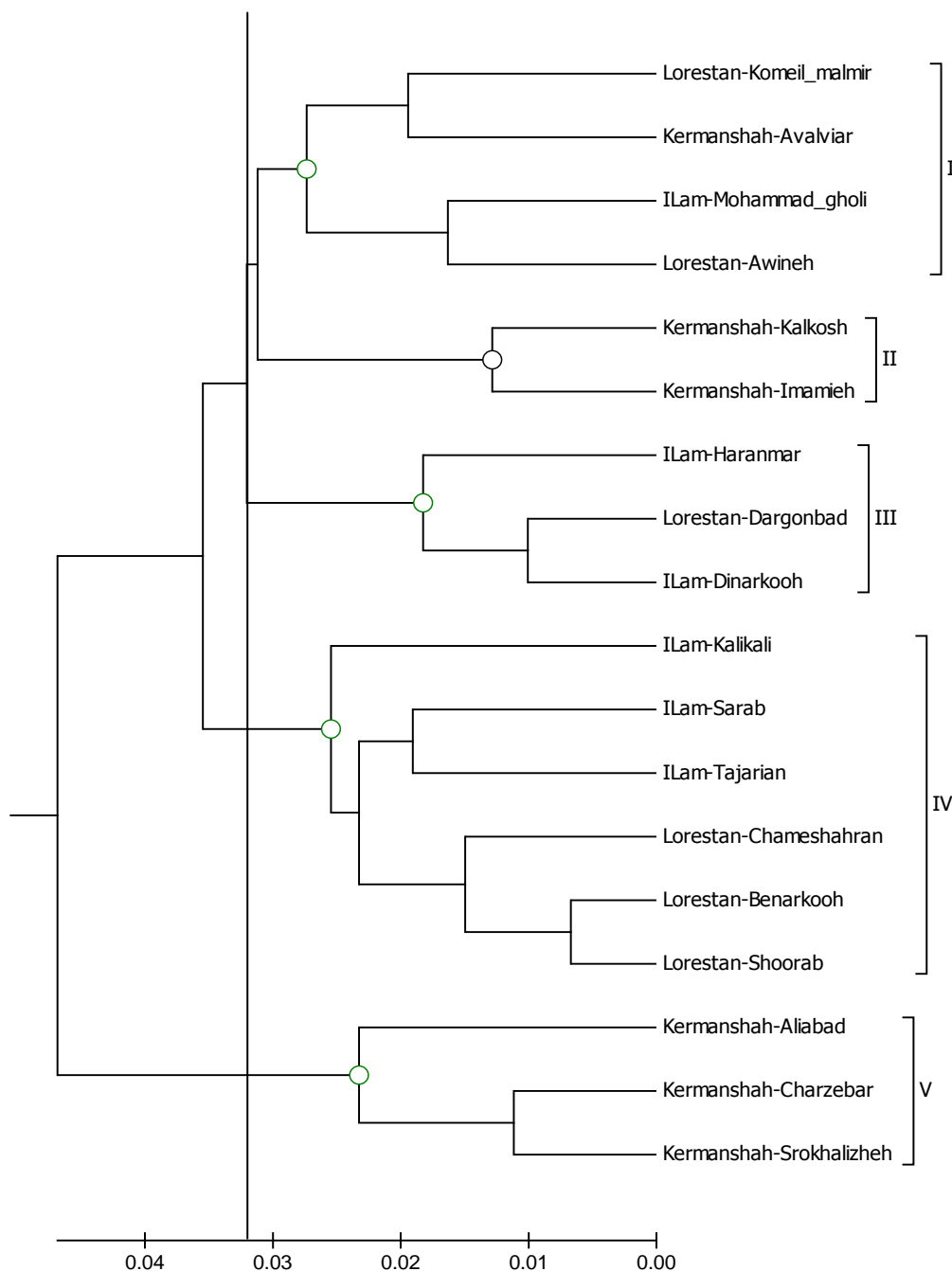
شد (شکل ۳). با استفاده از آزمون مانتل ضریب کوفنتیک محاسبه شد و مقدار آن ($r=0/788$) نشان از کارایی این روش داشت (شکل ۴). در نقطه‌ای که تنوع درون گروهی کمتر از تنوع بین گروهی بود، خط

تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌ها

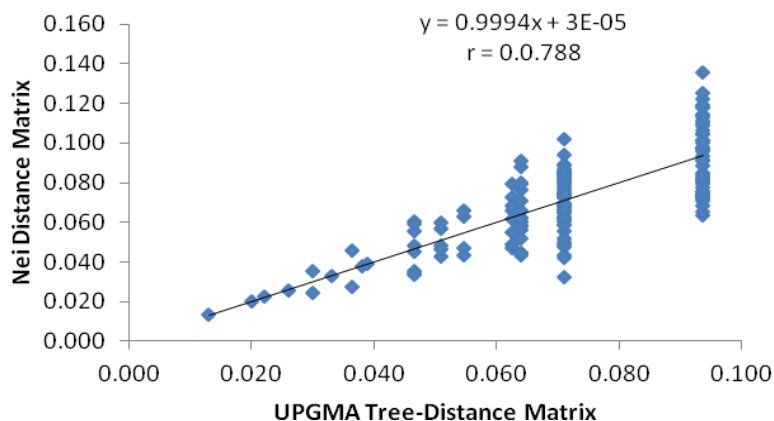
دندروگرام روابط ژنتیکی ۱۸ جمعیت ارزیابی شده از سه منطقه جغرافیایی زاگرس مرکزی با استفاده از الگوریتم UPGMA روی ماتریس فاصله دایس ترسیم

سوم شامل حرانمر (ایلام)، درب گنبد (لرستان)، دینارکوه (ایلام)؛ گروه چهارم شامل جمعیت کلی کلی (ایلام)، سراب (ایلام)، تجریان (ایلام)، چم شهران (لرستان)، بنارکوه (لرستان)، شوراب (لرستان)؛ و گروه پنجم شامل جمعیت علی‌آباد (کرمانشاه)، چهار زبر (کرمانشاه)، سرخه لیژه (کرمانشاه) بود (شکل ۳).

برش ایجاد شد. بر این اساس ژنوتیپ‌های بلوط ایرانی در منطقه زاگرس مرکزی شامل سه استان کرمانشاه، ایلام و لرستان در پنج گروه قرار گرفتند. گروه یک شامل کمیل مالمیر (لرستان)، اولویار (کرمانشاه)، محمدقلی (ایلام)، باوینه (لرستان)؛ گروه دوم شامل جمعیت کل کش (کرمانشاه)، امامی (کرمانشاه)؛ گروه



شکل ۳- گروه‌بندی ۱۸ جمعیت ارزیابی شده از سه منطقه جغرافیایی زاگرس مرکزی با استفاده از الگوریتم UPGMA (پنج گروه به وسیله خط برش متمایز شده است)

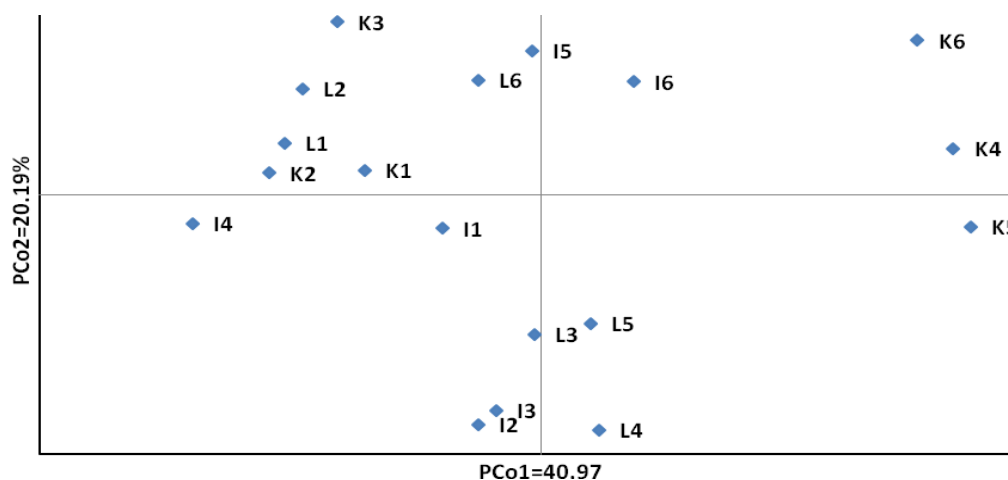


شکل ۴- ارزیابی کارایی الگوریتم UPGMA در ترسیم دندروگرام با آزمون مانتل و محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک

موجود را توضیح دادند که در مجموع ۷۲/۹۱ درصد از واریانس با این سه مؤلفه بیان شد.

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)

تجزیه به مختصات اصلی برای ۱۸ جمعیت مورد بررسی، انجام گرفت. سه مؤلفه اول استخراج شده به ترتیب ۴۰/۹۷، ۲۰/۱۹ و ۱۱/۷۵ درصد از واریانس



شکل ۵- تجزیه به مختصات اصلی و ترسیم بای پلات ۱۸ جمعیت ارزیابی شده

جمعیت‌ها دارند. براساس نتایج جدول‌های ۴ و ۵ بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های بلوط کرمانشاه و لرستان وجود داشت. همچنین جمعیت‌های لرستان و ایلام قرابت ژنتیکی بیشتری دارند که این نتایج در پراکنش دوبعدی آنها در شکل ۵ نیز مشخص است.

همچنان که ملاحظه می‌شود، پراکنش دوبعدی جمعیت‌ها بر روی دیاگرام تطابق بسیار زیادی با تجزیه کلاستر دارد (شکل ۳). بای پلات حاصل نشان می‌دهد که جمعیت‌های چهارزر، سرخه لیژه و علی‌آباد در استان کرمانشاه با وجود تنوع محدود درون جمعیتی که دارند، فاصله ژنتیکی کافی با سایر

تجزیه واریانس مولکولی

برای درک بهتر تنوع بین ۱۸۰ ژنوتیپ مورد بررسی، واریانس مولکولی ۱۵۷ ال تکثیرشده از ۱۵ جایگاه نشانگری به دو بخش درون جمعیتی و بین ۱۸ جمعیت تفکیک شد. نتایج نشان داد از کل واریانس مولکولی موجود (۲۲/۷۵۹)، ۲۰ درصد از آن (۴/۵۳۵) تنوع الی مشاهده شده مختص به جمعیت‌های مختلف است و ۸۰ درصد از آن (۱۸/۲۲۴) در جمعیت‌ها مشترک است. آماره فی محاسبه شده ($\Phi_{PT} = 0.199$) که همان نسبت واریانس بین جمعیتی به کل واریانس مولکولی است، در سطح یک درصد معنی دار بود ($P < 0.01$).

بحث

در این تحقیق تلاش شد تا تنوع ژنتیکی بین پایه‌های مختلف بلوط ایرانی واقع در رویشگاه‌های مختلف زاگرس مرکزی و نیز تفاوت‌های ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی شود تا بتوان از این اطلاعات برای حفاظت ژنتیکی و مدیریت بهتر جنگل‌های بلوط استفاده کرد. در ابتدا میزان تکثیر و محتوای چندشکلی مکان‌های نشانگری بررسی و نتایج گزارش شد. در مطالعات دیگر نیز قابلیت نشانگرهای ژنومی تصادفی و نیمه تصادفی تشریح شده است. (Farkhari et al., 2007) با استفاده از ۱۴ آغازگر تصادفی RAPD، متوسط درصد چندشکلی (۶۹ درصد) را بیشتر از متوسط درصد چندشکلی نشانگرهای ISSR مورد استفاده در تحقیق حاضر (۶۱/۱ درصد) گزارش کردند. (Shabanian et al., 2016b) نیز در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ویول (*Quercus libani*) تعداد ۶ تا ۱۲ ال و میانگین ۱۰/۱ ال را برای نشانگر نیمه تصادفی SCOT به دست آوردند. در اینجا نیز بیشترین تعداد کل ال‌های تکثیرشده و تعداد ال‌های

چندشکل مربوط به آغازگر ISSR16 با ۱۷ ال و آغازگر UBC814 با ۴ ال کمترین ال تولیدشده را در میان آغازگرهای مورد استفاده داشت. میانگین ال‌های تولیدشده ۱۰/۴۷ باند برای هر آغازگر بود. دامنه اندازه قطعات تولیدشده از ۱۵۰ تا ۱۸۰۰ جفت باز بود (جدول ۱).

بیشترین شاخص محتوای چندشکلی (PIC) با مقدار ۰/۴۲۵ مربوط به آغازگر UBC807 و کمترین میزان با مقدار ۰/۰۵۲ در آغازگر UBC895 مشاهده شد. میانگین محتوای چندشکلی برای آغازگرها، ۰/۲۷۷ بود که نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق است. در نتایج (Alikhani et al., 2014) بیشترین شاخص چندشکلی (PIC) به میزان ۰/۴۳ در آغازگر nISSR1 گزارش شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد، اما کمترین میزان شاخص چندشکلی را متفاوت و برای آغازگر UBC811 برابر ۰/۲ گزارش کرده‌اند.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی این مطالعه، بیانگر بیشتر بودن تنوع ژنتیکی درون (۸۰ درصد) نسبت به تنوع بین جمعیت‌ها (۲۰ درصد) است که این نتیجه با نتایج گزارش شده توسط دیگر محققان مبنی بر بیشتر بودن تنوع ژنتیکی درون جمعیتی نسبت به تنوع ژنتیکی بین جمعیتی مطابقت دارد. (Hamrick et al., 1996; Shabanian et al., 2016a). (Alikhani et al., 2014) نیز مقادیر بالایی از تنوع بین جمعیتی را در جوامع بلوط جنگل‌های زاگرس شمالی را با استفاده از نشانگرهای ISSR (۲۷ درصد) و IRAP (۲۱ درصد) نشان داده‌اند. توپوگرافی ویژه موجود در مناطق زاگرس و وجود عوارض جغرافیایی متعدد می‌تواند جریان ژنی و حوزه دگرگرفته‌افشانی و مجاورت مؤثر ژنوتیپ‌ها در جوامع بلوط غرب کشور را محدود کند و سبب تمایز ژنتیکی و افزایش میزان تنوع بین جمعیت‌ها شود. در مطالعات پیشین، محدودیت جریان ژنی در سایر گونه‌های بلوط گزارش

متفاوت قرار گرفت. قرارگیری نمونه‌های کرمانشاه در هر پنج گروه ژنتیکی، نشان از تنوع بالاتر این گونه در رویشگاه‌های این استان و احتمال پراکنش آن از این مناطق به سایر نواحی زاگرس میانی دارد. در توجیه و تمایز این نمونه موارد زیر قابل یادآوری است که Shabanian et al. (2016b) نیز قرارگیری برخی ژنوتیپ‌های بلوط را به صورت جداگانه و غیرمرتبط در گروه‌های متفاوت گزارش کردند. (Zeng et al. (2011) احتمال وجود زیرگونه‌ها یا حتی گونه‌های دیگری در توده‌های جنگلی بلوط را مطرح کرده‌اند که با این استدلال می‌توان یکی از دلایل تنوع ژنتیکی به دست آمده در این بررسی را تعلق نمونه غیرمرتبط به زیرگونه‌های متفاوت دانست. همچنین Barbara et al. (2012) از دیگر دلایل این تنوع، هیبرید بودن بعضی از نمونه‌ها را ذکر کرده‌اند. در واقع از دلایل عمده تنوع زیاد درون گونه‌ای بلوط، دورگ‌گیری طبیعی بین گونه‌ای است.

دندروگرام به دست آمده از این آغازگر مولکولی (ISSR) نشان داد که این نشانگر به میزان تقریباً مناسبی در متمایز کردن جمعیت‌ها براساس منشأ جغرافیایی سودمند بوده است، به گونه‌ای که جمعیت‌های متعلق به یک منطقه به جز در چند مورد استثنايي در یک خوشه قرار گرفته‌اند.

با توجه به نتایج این تحقیق نشانگرهای ISSR در گونه بلوط ایرانی به خوبی تکثیر شدند و سطح بالایی از چندشکلی را درون و بین جمعیت‌های مورد ارزیابی نشان دادند. از رویشگاه‌های ارزیابی شده در زاگرس میانی، ژنوتیپ‌های موجود در استان کرمانشاه فاصله ژنتیکی بالایی با همدیگر و سایر ژنوتیپ‌های ارزیابی شده از دو استان لرستان و ایلام داشتند. ۲۰ درصد از تنوع آشکار شده تنوع بین جمعیتی بود که از لحاظ ژنتیکی به مفهوم ال‌های متمایزکننده جمعیت‌های مختلف از همدیگر است. این تنوع قابلیت استفاده برای ردیابی نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات فنوتیپی را دارد. بالا بودن میزان

شده است (Berg & Hamrick, 1995).

۲۰ درصد از ال‌های تکثیر شده که سهم معنی‌داری از واریانس مولکولی ارزیابی شده است، متمایزکننده ژنتیکی رویشگاه‌های مختلف از یکدیگرند که می‌توان در صورت گوناگونی فنوتیپ این رویشگاه‌ها از لحاظ صفات کمی و کیفی مختلف در آینده به مطالعه و تشخیص ال‌های آگاهی بخش از میان این تنوع الی پرداخت. این سهم از واریانس مولکولی افتراقی، بیانگر کارایی نشانگرهای مورد استفاده در شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش با صفات مختلف متمایزکننده این جمعیت‌ها است. همچنین از ۱۵۷ ال تکثیری توسط ۱۵ جایگاه نشانگری در ۱۸۰ ژنوتیپ ارزیابی شده، ۱۵۶ مورد (۹۹/۱۷ درصد) حداقل بین دو ژنوتیپ متفاوت بودند که به نتایج Shabanian et al. (2016a) با ۱۰۰ درصد چندشکلی و (Ardi et al. (2012) با ۹۶ درصد چندشکلی در گونه بلوط نزدیک بود.

براساس ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA ژنوتیپ‌های بلوط ایرانی در منطقه زاگرس مرکزی به پنج گروه تقسیم شدند. نمونه‌های گروه یک شامل کمیل مال میر (لرستان)، اولویار (کرمانشاه)، محمدقلی (ایلام)، باوینه (لرستان)؛ گروه دوم شامل جمعیت کل کش (کرمانشاه)، امامیه (کرمانشاه)؛ گروه سوم شامل حرانمر (ایلام)، درب گنبد (لرستان)، دینارکوه (ایلام)؛ گروه چهارم شامل جمعیت کلی کلی (ایلام)، سراب (ایلام)، تجریان (ایلام)، چم شهران (لرستان)، بنارکوه (لرستان)، شوراب (لرستان)؛ و گروه پنجم شامل جمعیت علی‌آباد (کرمانشاه)، چهارزیر (کرمانشاه)، سرخه لیژه (کرمانشاه) بود. از این اطلاعات می‌توان برای ارتقای سطح تنوع ژنتیکی با راهبرد تهیه جمعیت‌های ترکیبی (سنتتیک) بهره گرفت که در واقع روش اصلی به‌نژادی جمعیت‌های گیاهان درختی دگرگشن است.

مطابق دندروگرام به دست آمده نمونه اول ویار (کرمانشاه) به صورت جداگانه و غیرمرتبط در گروه‌های

گونه بلوط ایرانی در این تحقیق بود و می‌توان از این آغازگر در بررسی تنوع ژنتیکی درخت بلوط در مناطق دیگر استفاده کرد.

شاخص اطلاعات چندشکل، شاخص نشانگری و تعداد قطعات تکثیرشده چندشکل برای آغازگرهای UBC807، ISSR165 و ISSR08 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز جمعیت‌های مورد مطالعه

References

- Alikhani, L., Shafie Rahmani, M., Shabaniyan, N., Badakhshan, H., & Khub, A.Kh. (2014). Genetic variability and structure of *Quercus brantii* assessed by ISSR, IRAP and SCoT marker. *Gene* 552, 176–183.
- Anderson, J., Churchill, A., Autrique, G., Tanksley, J. E., & Sorrells, M. E. (1993). Optimization parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36, 181-186.
- Ardi, M., Rahmani, F., & Siami, A. (2012). Genetic variation among Iranian oaks (*Quercus* spp.) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(45), 10291-10296.
- Ashley, M.V., Abraham, S.T., Backs, J.R., & Koenig, W.D. (2015). Landscape genetics and population structure in Valley Oak (*Quercus lobata* Nee). *American Journal of Botany*, 102 (12), 2124–2131.
- Berg, E.E., & Hamrick, J.E. (1995). Fine-scale genetic structure of a Turkey oak forest. *Evolution*, 49(1), 110-120.
- Casasoli, M., Mattioni, C., Cherubini, M., & Villani, F. (2000). A genetic linkage map of European chestnut, *Castanea sativa* Mill, based on RAPD, ISSR and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 1190-1199.
- Doyle, J.I., & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2), 12, 13-15.
- Farkhari, M., Naghavi, M.R., Pyghambari, S.A., & Sabokdast, M. (2007). Genetic variation of Jointed Goatgrass *Aegilops cylindrica* Host, from Iran, using RAPD-PCR and SDS-PAGE of Seed Proteins. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 2868-2873.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C., & Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant Breeding*, 118, 369-390.
- Jazirehi, M.H., & Ebrahimi Rostaghi, M. (2003). *Silviculture in Zagros*. University of Tehran Press. 560p.
- Manjarrés, F., Idol, J., & Sork, V.L. (2006). Mating patterns of black oak *Quercus velutina* (Fagaceae) in a Missouri oak-hickory forest, *Journal of Heredity*, 97(5):451-5.
- Mariette, S., Cottrell, J., Csaikl, U.M., & Goikoechea, P. (2002). Mariette, S., Cottrell, J., Csaikl, U. M., Goikoechea, P., Konig, A., Lowe, A. J., & Burg, K. (2002). Comparison of levels of genetic diversity detected with AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. stands. *Silvae Genetica*, 51(2-3), 72-79.
- Mirmohammadi Meybodi, S.A.M. (2014). *Research method in biological sciences with emphasis on agriculture*. Isfahan Industrial Jahade Daneshgahi, 285pp.
- Pallad, G., Ueno, S., & Yoshimaru, H.M. (2008). Genetic diversity and differentiation of *Quercus semiserrata* Roxb in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecology and Management*, 255, 1067-1077.

- Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vaged, J., Tingey, S., & Rafalsky, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
- Reddy, M.P., Sarla, N., & Siddiq, E.A. (2002). Inter- simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
- 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 Mazandarn using peroxides activities. *Taxonomy and Biosystematics*, 6(3), 13-18.
- Shabanian, N., Havasi, A., & Mehrabi, A.A. (2016a). 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.
- Shabanian, N., Rahmani, M.Sh., Alikhani, L., & Badakhshan, H. (2016b). Genotypic and phenotypic diversity of Lebanon oak (*Quercus libani*) populations in north Zagros forests revealed by molecular SCoT marker, and morphological and biochemical properties. *Journal of Wood & Forest Science and Technology*, 22 (4), 13-29.
- Zeng, YF., Liao, WJ., Petit, RJ., & Zhang, DY. (2011). Geographic variation in the structure of oak hybrid zones provides insights into the dynamics of speciation, *20* (23), 4995-5011.



Structure of genetic diversity in central Zagros populations of Persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) using genomic ISSR markers

A. Shamari¹, A.A. Mehrabi^{2*}, A. Maleki³, and A. Rostami⁴

¹Ph.D Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Azad University of Ilam, Ilam, I. R. Iran

²Associate Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Ilam, Ilam, I. R. Iran

³Assistant Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Azad University of Ilam, Ilam, I. R. Iran

⁴Assistant Prof., School of Agriculture, Azad University of Ilam, Ilam, I. R. Iran

(Received: 24 May 2017, Accepted: 8 October 2017)

Abstract

Any restoration and improvement programs for Persian oak stands require assessment of the structure of genetic variation within and among the natural populations and realize the genetic distance patterns. Vulnerability against biotic and abiotic stresses is the consequence of the reduction in genetic diversity. Genetic variation is crucial for natural populations of organisms to evolve in response to changing environmental variables. Low level of diversity in the gene pool of plant species may lead to increased risk of extinction in the face to abiotic and biotic environmental stresses. Genetic diversity of 180 Persian oak trees from central Zagros region including Kermanshah, Ilam and Lorestan provinces was investigated. Fifteen ISSR loci amplified and 157 alleles produced which 99.17 percent (156 alleles) were polymorph. Allele number per locus was in a range from 4 (UBC814) to 17 (ISSR16) with average 10.47; polymorphism information content was different from 0.052 (UBC895) to 0.425 (UBC807). Amplified fragments were in a range from 150bp to 1800bp. AMOVA shows 20 percent of variation among and 80 percent of variation within populations. The minimum genetic distance was manifested in Lorestan populations and the maximum distance was in Kermanshah. Results showed the higher levels of differentiation among Kermanshah and Lorestan genotypes. Heterogeneity of evaluated loci in populations in Kermanshah was more than others in Lorestan and Ilam. Cluster analysis led to grouping of genotypes in five distinct clusters. Amplification and suitable polymorphism of ISSR markers in Persian oak and also a high level of molecular variance between populations are promising for the capacity of this molecular marker system to detect the informative alleles for phenotypic traits.

Key words: AMOVA, Genetic distance, ISSR markers, Polymorphism.

