



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گنجان

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل

جلد بیست و دوم، شماره چهارم، ۱۳۹۴

<http://jwfst.gau.ac.ir>

بررسی تنوع ژنتیکی و فنوتیپی جمعیت‌های وی‌ول (*Quercus libani*) در جنگل‌های زاگرس شمالی با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و مشخصه‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی

*نقی شعبانیان^۱، محمد شفیع رحمانی^۲، لیلا علیخانی^۳ و هدیه بدخشان^۴

^۱دانشیار، گروه جنگلداری، دانشگاه کردستان، کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، آزمایشگاه بیولوژی جنگل، گروه جنگلداری، دانشگاه کردستان، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه کردستان،
^۲استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کردستان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۰۴

چکیده

سابقه و هدف: تنوع ژنتیکی نقش مهمی در حفظ کارکردهای اکولوژیکی و اقتصادی-اجتماعی و بقای گونه‌های گیاهی ایفا می‌کند. آگاهی از الگوهای طبیعی تغییرپذیری و پایه‌های تکاملی آن از اهمیت کاربردی بالایی در مدیریت پایدار و حفاظت جنگل برخوردار است. بر اساس تئوری‌های ژنتیک جمعیت، از دست رفتن تنوع ژنتیکی یکی از تهدیدات جدی فراروی حیات گونه‌های برخوردار از جمعیت‌های کوچک و مناطق جغرافیایی باریک به‌شمار می‌آید. بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی بستر مناسبی را برای مطالعه الگوهای تنوع ژنتیکی در گونه‌های در معرض تهدید و آشکارسازی جنبه‌های اکولوژیکی و دموگرافیک مدیریت این گونه‌ها به‌منظور اجرای پروژه‌های حفاظت و احیای آن فراهم می‌کند. در میان این نشانگرها، نشانگرهای توالی تکراری ساده (ISSR)، چندشکلی مناطق تکثیر یافته بین رتروترانسپوزونی (IRAP) و چندشکلی نواحی هدف کدون شروع (SCoT) روش‌هایی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، سریع و مقرون به صرفه هستند که با تکرارپذیری بالا جایگاه‌های ژنی را در ژنوم تکثیر می‌کنند. در این مطالعه تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی ۱۰۹

*مسئول مکاتبه: n.shabaniyan@uok.ac.ir

پایه نمونه‌برداری شده از نه جمعیت وی‌ول (*Quercus libani*) در جنگل‌های زاگرس شمالی با استفاده از نشانگر مولکولی چندشکلی نواحی هدف کدون شروع (SCoT) و مشخصه‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی برگ گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه، از نه جمعیت وی‌ول (*Q. libani*) توده‌های مختلف بلوط شهرستان‌های مریوان و بانه، و در هر جمعیت از حداقل ۱۰ پایه (در مجموع ۱۰۹ ژنوتیپ) با فواصل حداقل ۱۰۰ متر از همدیگر نمونه برگ‌های جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی از هر یک از همین پایه‌های نمونه‌برداری شده به صورت تصادفی حداقل ۵۰ برگ جدا و تا انجام اندازه‌گیری‌ها و آزمایشات در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور مطالعه تنوع ریخت‌شناختی، از هشت مشخصه مورفولوژیکی انتخاب شده از توصیف‌کننده‌های تنوع ژنتیکی گونه‌های جنس *Quercus* استفاده و برای اندازه‌گیری مشخصه‌های بیوشیمیایی نیتروژن کل، درصد پروتئین، نشاسته و قندهای کل، پتاسیم، کلسیم منیزیم، و آهن از روش کج‌لدال، اسپکتروفتومتری، جذب اتمی و روش رنگ‌سنجی شعله‌ای استفاده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از CTAB و بر پایه دستورالعمل دوپل و دوپل با کمی تغییرات انجام گرفت. پس از ثبت و نمره‌دهی نوارهای تکثیر شده از ۱۰ آغازگر SCoT، ماتریس صفر و یک حاصل با استفاده از نرم‌افزار POPGENE با بهره‌گیری از ضریب تشابه دایس (با فاصله ژنتیکی نی) تجزیه و دندروگرام روابط ژنتیکی از طریق تجزیه خوشه‌ای بر پایه روش UPGMA ترسیم شد. از نسخه ۶/۵ برنامه GenAlEx آماره‌های تنوع ژنتیکی آشکار شده در سطح نشانگر و همچنین در سطح جمعیت همچون تنوع ژنتیکی نی (h)، شاخص تنوع شانون (I)، درصد نوارهای چندشکل و مقادیر فواصل ژنتیکی برآورد شدند. ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه از طریق تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای برآورد تنوع درون و بین جمعیتی، جریان ژنی، ضریب تمایز جمعیتی (G_{ST}) بیشتر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تجزیه خوشه‌ای مجموع داده‌های فنوتیپی، جمعیت‌های مورد مطالعه را در پنج خوشه اصلی گروه‌بندی کرد. در مجموع، ۱۰ آغازگر SCoT ۱۰۱ نوار را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تکثیر کردند که از این تعداد ۹۲ نوار (۹۰ درصد) چندشکل بودند. تنوع ژنتیکی نی (h) و شاخص تنوع شانون (I) در هر دو سطح گونه و جمعیت بالا بودند (به ترتیب ۰/۲۸۴ و ۰/۲۵۸ در سطح گونه و ۰/۱۹۱ و

۰/۲۷۹ در سطح جمعیت). تنوع بالای فنوتیپی و ژنتیکی نشان داد که جمعیت‌های وی‌ول زاگرس شمالی تنوع بالایی را در خود حفظ کرده‌اند. مقدار G_{ST} برآورد شده (۰/۲۹) نشان داد که بخش عمده تنوع ژنتیکی آشکار شده مربوط به تنوع درون جمعیت‌هاست (۸۷ درصد)، که جریان مطلوب ژنی بین جمعیت‌ها ($N_m = ۲/۳۳$) نیز آن را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای درون‌گونه‌ای و تمایز ژنتیکی نسبتاً پایین بین‌جمعیتی به میزان زیادی ناشی از پخش‌شدگی دانه‌گرد و پیوستگی پراکنش این گونه در مناطق مورد مطالعه است. بر اساس آزمون مانتل همبستگی ماتریس‌های فاصله حاصل از مختصات جغرافیایی و ماتریس تشابه حاصل از نشانگرهای SCoT معنی‌دار نبود، که ویژگی‌های سیستم تلاقی، رانش ژنتیکی و جریان گسترده ژنی معمول در جوامع بلوط را می‌توان عوامل مهم دخیل در این وضعیت دانست.

واژه‌های کلیدی: نشانگر ریخت‌شناختی، تنوع مولکولی، چندشکلی نواحی هدف کدون شروع (SCoT)، بلوط

مقدمه

جنس بلوط (*Quercus L.*)، که به‌لحاظ اقتصادی، اجتماعی و اکولوژیکی یکی از مهم‌ترین جنس‌های گیاهان چوبی است، از پراکنش وسیعی برخوردار و در گستره وسیعی از مناطق معتدله نیمکره شمالی از جمله آمریکای شمالی، اروپا، آسیا و مناطق مدیترانه یافت می‌شود (۱۰ و ۱۱). این جنس بالغ بر ۴۰۰ گونه را که به‌لحاظ فنوتیپی بسیار متنوعند در خود جای داده است (۲۷). بخشی از این تنوع ناشی از تنوع بین‌گونه‌ای بالا در صفات ریختی همچون شکل و اندازه برگ و مشخصه‌های مورفومتریک بذر است، که خود بیانگر متنوع بودن زیستگاه این گونه‌هاست (۱۰ و ۱۳). بلوط‌ها به‌عنوان مهم‌ترین گونه‌های جنگل‌های زاگرس، با تأمین چوب موردنیاز مصارف ساختمانی، سوخت و برخی محصولات غیرچوبی، در پشتیبانی از معیشت زاگرس‌نشینان محلی نقش مهمی دارند (۸). علاوه بر اهمیت اقتصادی، به‌لحاظ اکولوژیکی نیز جنگل‌های بلوط غرب از کارکردهای انکارناپذیری همچون حفاظت از آب و خاک و حفظ و همین‌طور افزایش تنوع زیستی گونه‌های زمینی برخوردارند.

انسان از هزاران سال پیش در حال تخریب و تغییر اکوسیستم‌های جنگلی بوده است، زیرا جوامع انسانی همواره به گونه‌های جنگلی به‌عنوان منابعی ارزان برای تأمین غذا، سوخت و چوب می‌نگریسته، و آن‌ها را برای فعالیت‌های کشاورزی، چرای دام و تأمین زیستگاه قطع کرده است (۳۲). چنین تخریب و تغییری را می‌توان به‌وضوح در اکوسیستم جنگلی زاگرس مشاهده کرد؛ به‌طوری‌که سیمای امروزی این جنگل‌ها شباهت بسیار کمی با سیمای آن در سال‌های نه‌چندان دور داشته (۲۱) و به‌نظر می‌رسد این اکوسیستم به‌لحاظ کارکردهای اکولوژیکی نیز کم‌وبیش به همین اندازه دستخوش تغییرات نامطلوبی شده است. تغییر در اندازه جوامع و توده‌های درختان جنگلی به‌مانند آنچه که در زاگرس شمالی به‌خصوص در دو دهه اخیر اتفاق افتاده است، فرایندهای ژنتیکی تعیین‌کننده تنوع ژنتیکی داخل و بین جوامع از جمله سیستم تلاقی، جریان ژنی و انتخاب را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱ و ۳۲).

اندازه‌گیری سطح تنوع ژنتیکی درون و میان جمعیت‌ها اولین مرحله مهم در ارزیابی پویایی ژنتیکی یک گونه است (۲۹). در دسترس بودن نشانگرهای مولکولی جهت مطالعه و پی‌بردن به تنوع ژنتیکی در لوکوس‌های ژنی، ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح ژن‌ها را ممکن کرده است. در چند سال اخیر نشانگرهای جدیدی همچون چندشکلی نواحی هدف کدون شروع (SCoT) (۶) ابداع و در ارزیابی پتانسیل سازگاری و پویایی ژنی گونه‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (۳ و ۱۷). در چندشکلی SCoT، نشانگر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از تک‌آغازگرهایی که برای اتصال به ردیف‌های نوکلئوتیدی حفاظت شده طرفین رمز شروع (ATG) طراحی شده‌اند، تکثیر می‌شود. علاوه بر تکرارپذیری بالا، این نشانگر به‌لحاظ این‌که در آن از آغازگرهای تکی پیشرو یا پسرو استفاده می‌شود، به نشانگرهای ISSR شبیه است. در نشانگر SCoT هر نشانگر بخش متفاوتی از ژنوم را در سطح ژن هدف قرار می‌دهد (کارایی بالا) و افزون بر این برای طراحی آغازگر نیازی به اطلاع از ردیف نوکلئوتیدی ژنوم نیست (۶).

اخیراً با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی AFLP تنوع ژنتیکی هشت جمعیت از جمعیت‌های مختلف بلوط ایرانی (*Q. brantii*) زاگرس میانی (استان چهارمحل و بختیاری) با هدف شناسایی مراکز تنوع ژنتیکی این‌گونه بررسی شده است. نویسندگان این گزارش معتقدند که جمعیت‌های مختلف بلوط ایرانی این استان تنوع ژنتیکی بالایی را در خود حفظ کرده‌اند و وجود احتمالی زیرگونه‌ها و یا حتی گونه‌های دیگری در توده‌های این گونه را یکی از دلایل وجود چنین تنوع بالای ژنتیکی در

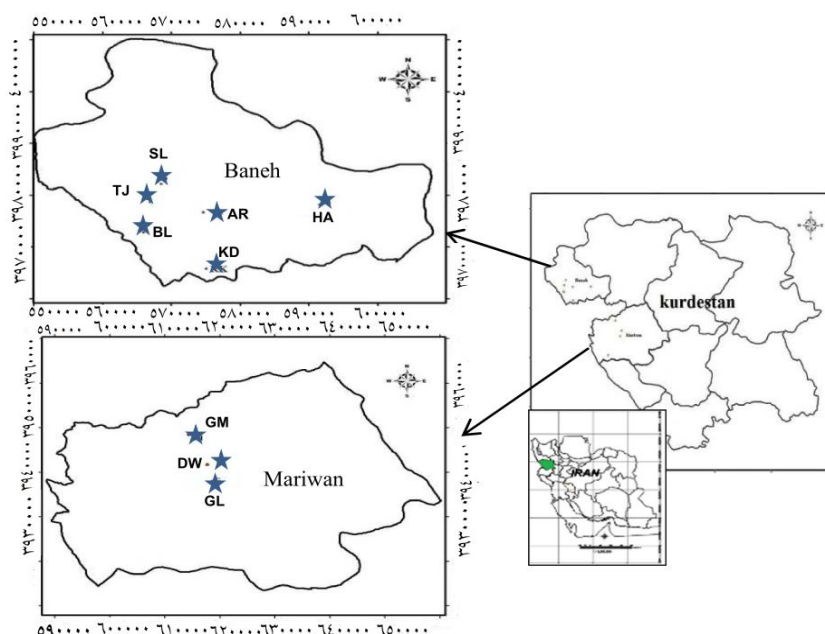
رویشگاه‌های مورد مطالعه می‌دانند (۱۵). با هدفی مشابه، در مطالعه تنوع ژنتیکی ۵۲ ژنوتیپ از جمعیت‌های واقع در طبقات مختلف ارتفاعی بلوط ایرانی (*Q. brantii*) در استان کهگیلویه و بویراحمد با استفاده از نشانگرهای ریزماهورای (SSR)، گزارش شده است که جمعیت‌های طبقات ارتفاعی میان‌بند نسبت به جوامع طبقات ارتفاعی بالا‌بند و پایین‌بند به‌لحاظ ژنتیکی متنوع‌تر و بدین ترتیب برای حفاظت ژنتیکی باارزش‌ترند. علاوه بر این، یافته‌های نویسندگان این گزارش نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های پایین‌بند فاصله ژنتیکی زیادی با دیگر ژنوتیپ‌ها دارند (۳۳). در گزارشی دیگر از ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف *Q. subpyrenaica* (گونه‌ای هیبرید) با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و اکوفیزیولوژیکی، نویسندگان بر این باورند که پایه‌های هیبرید از تنوع ریخت‌شناختی و اکوفیزیولوژیکی بالاتری نسبت به پایه‌های والدینی خود برخوردارند (۱۰). در بررسی تنوع ژنتیکی پروونانس‌های مختلف *Q. serrate* بر اساس مشخصه‌های ریختی و بیوشیمیایی بذر، گزارش شده است که بذر پروونانس‌های شمالی منطقه مورد مطالعه در مقایسه با پروونانس‌های جنوبی به‌طور معنی‌داری سنگین‌تر، طویل‌تر، و قطورترند. همچنین در گزارش یاد شده آمده است که پروونانس‌های مورد مطالعه به‌لحاظ مشخصه‌های بیوشیمیایی بذر نیز از تنوع بین‌جمعیتی معنی‌داری با هم برخوردارند. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفومتریک و بیوشیمیایی انجام گرفته در این مطالعه، پروونانس‌های شمالی را در خوشه اصلی اول و پروونانس‌های جنوبی را در خوشه اصلی دوم تفکیک کرده است (۲۶).

در رابطه با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی وی‌ول (*Q. libani*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی، ریخت‌شناختی و یا بیوشیمیایی تاکنون هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است. این مطالعه برای اولین بار به بررسی تنوع درون- و بین‌جمعیتی جمعیت‌هایی از این گونه مهم جنگل‌های زاگرس شمالی با استفاده از نشانگر مولکولی نوین SCoT و مشخصه‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی برگ پرداخته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، مطالعات ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی: برای انجام این مطالعه، از توده‌های مختلف بلوط شهرستان‌های مریوان و بانه، نه جمعیت وی‌ول (*Q. libani*) با حداقل ۱۰ کیلومتر فاصله از هم انتخاب شدند (شکل ۱). از هر جمعیت حداقل ۱۰ پایه (در مجموع ۱۰۹ ژنوتیپ) با فواصل حداقل

۱۰۰ متر از همدیگر (به‌منظور اجتناب از نمونه‌گیری از ژنوتیپ‌های مشابه) به‌صورت جنگل‌گردشی گزینش (جدول ۱)، و در اردیبهشت سال ۱۳۹۱ از این پایه‌ها نمونه‌های برگ‌ی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های یاد شده تا زمان استخراج DNA و انجام مطالعات مولکولی در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مهر ماه ۱۳۹۱ از هر یک از همین پایه‌های نمونه‌برداری شده که موقعیت مکانی آن‌ها با سیستم موقعیت‌یاب جهانی ثبت شده بود، به‌صورت تصادفی حداقل ۵۰ برگ برای بررسی‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی جدا و تا انجام اندازه‌گیری‌ها و آزمایشات در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل ۱- نقشه موقعیت نه جمعیت طبیعی *Q. libani* مورد مطالعه در جنگل‌های زاگرس شمالی.

Figure 1. Map showing the collection sites of nine natural populations of *Q. libani* in the north Zagros forests.

به‌منظور مطالعه تنوع ریخت‌شناختی، هشت مشخصه مورفولوژیکی انتخاب شده از توصیف‌کننده‌های تنوع ژنتیکی گونه‌های جنس *Quercus* (۴) انتخاب و اندازه‌گیری شد (جدول ۲). برای اندازه‌گیری مشخصه‌های بیوشیمیایی ابتدا برگ‌های جمع‌آوری شده از هر پایه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک و پس از آسیاب کردن، از آن‌ها نمونه ترکیبی برای آن پایه در

نقی شعبانیان و همکاران

چهار تکرار تهیه شد. اندازه‌گیری نیتروژن کل و درصد پروتئین بر پایه روش کجلدال (۲)، و اندازه‌گیری نشاسته و قندهای کل بر اساس روش یوشیدا و همکاران (۱۹۷۶) انجام شدند. از روش مبتنی بر جذب اتمی (مدل AA-7000G, SHIMADZU) (۹) برای اندازه‌گیری جداگانه پتاسیم، کلسیم و منیزیم، و از روش رنگ‌سنجی شعله‌ای (BWB) (۹) برای اندازه‌گیری آهن استفاده شد.

جدول ۱- جمعیت‌های *Q. libani* و تعداد پایه‌های نمونه‌برداری شده از آن‌ها.

Table 1. Locations and sample size of studied natural populations of *Q. libani*.

تعداد پایه Sample size	عرض جغرافیایی (N) Latitude	طول جغرافیایی (E) Longitude	ارتفاع (متر) Altitude	موقعیت نمونه‌برداری Sampling location	جمعیت Population
10	35° 34'31"	46° 17'49"	1380	شهرستان مریوان، روستای گمارلنگ	GL
12	35° 36'31"	46° 18'33"	1400	شهرستان مریوان، دویسه	DW
15	35° 40'28"	46° 15'45"	1500	شهرستان مریوان، قامیشه	GM
13	35° 50'32"	45° 48'46"	1360	شهرستان بانه، کنده‌سوره	KD
14	35° 51'34"	45° 64'49"	1370	شهرستان بانه، بلکه	BL
12	35° 56'34"	46° 00'49"	1600	شهرستان بانه، هه‌واره‌خول	HA
10	35° 55'33"	45° 44'47"	1800	شهرستان بانه، آرم‌ده	AR
13	35° 56'36"	45° 46'48"	1410	شهرستان بانه، تاژان	TJ
10	35° 58'35"	45° 48'49"	1350	شهرستان بانه، سالوک	SL
109	کل (Total)				

استخراج DNA و تجزیه مولکولی: استخراج DNA ژنومی با استفاده از CTAB و بر پایه دستورالعمل دوپل و دوپل (۱۹۸۷) با کمی تغییرات انجام گرفت (۷). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده از طریق جذب بر روی طول موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه بیوفتومتر (BioPhotometer, Eppendorf) و ژل آگارز ۰/۸ درصد (با در نظر گرفتن قطر و شفافیت نوار) تأیید شد. نمونه‌های DNA تا زمان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه از ۱۰ آغازگر SCoT (جدول ۵) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های هدف استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر که شامل ۵ میکرولیتر

بافر واکنش (مستریکیت؛ سیناژن)، ۵ میکرومول آغازگر، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۴۰-۲۰ نانوگرم و ۲ میکرولیتر آب دیونیزه بود، با استفاده از سیستم ترمالسایکلر (Bio-RAD) C-1000 در برنامه زیر انجام گرفت: یک چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰-۵۶ درجه سانتی‌گراد (جدول ۵) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۴۵، ۴۵ و ۹۰ ثانیه، و در پایان مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. به منظور جلوگیری از تبخیر مایعات واکنش، پس از افزودن اجزای واکنش، ۴ میکرولیتر روغن معدنی نیز به میکروتیوب واکنش اضافه شد. نوارهای تکثیر شده در محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید ۰/۱ درصد آشکارسازی شدند (Gel Doc™ XR, Bio-Rad).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نرمال بودن و همگنی واریانس داده‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون کلمینگروف-اسمیرنوف کنترل شد. تفاوت بین جمعیت‌ها به لحاظ مشخصه‌های فنوتیپی ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی برگ از طریق محاسبه شاخص‌های آماری تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها و ضرایب تغییرات با استفاده از نسخه ۹/۱ نرم‌افزار SAS ارزیابی شد (SAS Institute Inc. Cary, NC). از روش وارد (۲۸) بر مبنای فاصله اقلیدسی برای تجزیه خوشه‌ای و گروه‌بندی جمعیت‌ها استفاده شد.

در ثبت نوارهای تکثیر شده از آغازگرها، فقط نوارهایی که به طور واضح و شفاف آشکار شده بودند، نمره‌دهی شدند. در نشانگرهای غالب همچون SCoT (۶) هر نوار نمایانگر فنوتیپ یک لوکوس دوآلی است (۳۰). الگوهای چندشکل نواربندی پروفایل SCoT هر نمونه به صورت ۱ (حضور نوار) و صفر (عدم حضور نوار) و بر اساس مقایسه اندازه‌ای با خط‌کش‌های ژنی استاندارد نمره‌دهی شدند (Image Lab Software v. 4.0; Bio-Rad) و سپس ماتریس صفر و یک حاصل با استفاده از نسخه ۱/۳۱ نرم‌افزار POPGENE با بهره‌گیری از ضریب تشابه دایس (با فاصله ژنتیکی نی) محاسبه شد. دندروگرام روابط ژنتیکی از طریق تجزیه خوشه‌ای بر پایه روش UPGMA ترسیم شد. از نسخه ۶/۵ برنامه GenAIEx (۱۸) آماره‌های تنوع ژنتیکی آشکار شده شامل تعداد نوار تکثیرشده (TB)، تعداد نوار چندشکل (PB) و درصد چندشکلی (PL%) محاسبه شدند. همچنین تنوع ژنتیکی در سطح جمعیت نیز با برآورد پارامترهای تعداد آل‌های مشاهده شده (N_a)، درصد نوارهای چندشکل (PPB%)، تعداد آل‌های مؤثر (N_e)، تنوع ژنی نی (h)، شاخص اطلاعات شانون (I) و تعداد لوکوس‌های چندشکل (N_p) ارزیابی شد. ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه از طریق برآورد جریان ژنی و ضریب تمایز جمعیتی (G_{ST}) بیشتر مورد بررسی قرار

گرفت. فواصل ناریب ژنتیکی نی (نی، ۱۹۷۸) برای تمامی جفت جمعیت‌ها محاسبه و از آن برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده گردید (UPGMA). برای پی‌بردن به وجود یا عدم وجود همبستگی ماتریس فواصل ژنتیکی با ماتریس فواصل جغرافیایی از آزمون مانتل استفاده شد (۱۴).

نتایج

تنوع مشخصه‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی: نتایج تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای ۱۵ مشخصه مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داد که جمعیت‌های *Q. libani* به‌لحاظ این مشخصه‌ها تنوع بین‌جمعیتی و درون‌جمعیتی بالایی دارند. در میان مشخصه‌های ریخت‌شناختی، صفت طول دم‌برگ (PL) با حداقل ۵/۰۰ (گمارلنگ) و حداکثر ۱۵/۶۰ (کنده‌سوره) میلی‌متر بیشترین تفاوت را در میان جمعیت‌ها نشان داد (جدول ۲). همچنین صفت کلسیم (Ca) با دامنه ۶۹/۵۹ (هواره‌خول) تا ۲۱۴/۵۹ (گمارلنگ) میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ در مقایسه با سایر صفات بیوشیمیایی از تنوع بیشتری در میان جمعیت‌ها برخوردار بود (جدول ۲). در بیشتر مشخصه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی ضریب تغییرات (تنوع درون‌جمعیتی) بالا بود. در میان صفات مورفولوژیکی بیشترین ضریب تغییرات (CV) در صفت‌حداکثر عمق سینوس (SD) (۲۳/۷۰ درصد در هواره‌خول) مشاهده شد (جدول ۲). در صفات بیوشیمیایی بیشترین ضریب تغییرات در صفت آهن (Fe) (هواره‌خول؛ ۲۰/۶۴ درصد) ثبت شد (جدول ۳).

با هدف تعیین عوامل اصلی دخیل در تمایز ژنوتیپ‌ها و کاستن از تعداد پارامترهای مؤثر، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام گرفت. این تجزیه نشان داد که دو مؤلفه اصلی اول عامل ۵۲/۲ درصد از تنوع به‌وجود آمده در جمعیت‌ها بودند (جدول ۴). مؤلفه اصلی اول که برگرفته از ۲ صفت اصلی طول دم‌برگ و تعداد دندان‌ها در سمت راست برگ است، عامل ۳۲/۵۰ درصد واریانس بود. همچنین مقدار منیزیم در مؤلفه اصلی دوم ۱۹/۶ درصد واریانس کل را نشان داد.

بر اساس تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر داده‌های فنوتیپی، جمعیت‌های مورد مطالعه در پنج شاخه گروه‌بندی شدند. در گروه اول جمعیت‌های سالوک، کنده‌سوره، و گمارلنگ قرار گرفتند. جمعیت تاژان به تنهایی در خوشه دوم قرار گرفت. در خوشه سوم این دندروگرام جمعیت‌های آرمده و قامیشه، و در خوشه چهارم جمعیت‌های دویسه و بلکه همگروه شدند. در خوشه پنجم جمعیت هواره‌خول به تنهایی از بقیه جمعیت‌ها متمایز شد (شکل ۲).

جدول ۲- آماره‌های کمی اندازه‌گیری شده در میان جمعیت‌های *Q. libani*

Table 2. Descriptive statistics among nine *Q. libani* populations.

SL	TJ	AR	HA	BL	KD	GM	DW	GL	صفت* (Trait*)
83-101.7	88.3-134.3	85.3-109.3	84.7-105.7	89-154.3	75.3-99.7	71-99	69.3-99.7	90-94	BL/ب-ک**
93.00 ^b	103.3 ^{ab}	100.8 ^{ab}	92.7 ^b	121.0 ^a	88.0 ^b	85.0 ^b	74.0 ^b	92.0 ^b	میانگین (mean)
2.50	2.70	2.76	1.8	2.51	2.12	2.74	2.58	1.26	CV (%)
7-8	8.7-21.7	10.7-14	8-23.3	7.3-10.7	13.7-18.7	7-10	8.7-11	4-6	PL/ب-ک
7.56 ^b	13.6 ^a	12.5 ^{ab}	15.3 ^a	9.2 ^b	15.6 ^a	8.6 ^b	11.0 ^{ab}	5.0 ^c	میانگین (Mean)
7.1	11.06	7.8	9.69	7.61	5.7	7.15	6.17	13.64	CV (%)
3.7-5.7	2.7-3.7	2.7-3	2-3.7	2.7-11.7	2-2	2-7	3.3-4	5-5	LW/ب-ک
4.70 ^b	3.3 ^{bc}	2.9 ^{bc}	3.0 ^{bc}	6.6 ^a	2.0 ^c	4.0 ^b	3.7 ^b	5.0 ^{ab}	میانگین (Mean)
16.06	11.23	10.9	16.6	19.03	0.0	19.84	10.1	0.0	CV (%)
2-4.3	2-8.3	2.7-3.3	3-4	3.3-9.3	2-6.7	2-4.7	3-4	5-6	AL/ب-ک
3.20 ^b	3.9 ^b	3.0 ^b	3.3 ^b	6.4 ^a	3.4 ^b	3.2 ^b	3.3 ^b	5.6 ^{ab}	میانگین (Mean)
25.4	24.3	13.7	12.5	16.18	25.3	19.03	13.23	8.56	CV (%)
2.3-3	3-7	2.7-3.3	2.7-8	2.3-9.3	2.7-4	2.5	2-4.4	3-4	SD/ب-ک
2.60 ^b	5.3 ^{ab}	3.1 ^b	4.0 ^b	6.0 ^a	3.4 ^b	3.3 ^b	3.0 ^b	3.6 ^b	میانگین (Mean)
17.02	15.06	14.4	23.7	15.94	13.15	19.03	19.39	10.12	CV (%)
12-15	18.7-24	15.3-16	12-22	14-26.3	12.7-18.7	12.19	12.3-17	12-13	MD/ب-ک
13.5 ^{bc}	21.6 ^a	15.7 ^b	15.9 ^b	20.1 ^a	15.3 ^b	15.6 ^b	13.8 ^b	12.3 ^{bc}	میانگین (Mean)
6.62	4.03	3.05	7.7	6.63	5.8	7.47	6.19	4.41	CV (%)
27.3-31.3	37.3-43.7	27.7-30	25.7-44.3	28-60.7	23.7-37.7	26.40	25.7-34.7	23.7-24.3	BW/ب-ک
29.3 ^b	39.9 ^b	29.0 ^b	31.8 ^b	45.6 ^a	29.5 ^b	31.5 ^b	28.6 ^b	24.1 ^{bc}	میانگین (Mean)
3.66	2.68	2.84	5.41	4.77	4.5	5.09	4.26	1.85	CV (%)

*BL: طول پهنک (میلی‌متر)؛ PL: طول دم‌برگ (میلی‌متر)؛ LW: پهنای دندان انتهای (میلی‌متر)؛ AL: طول دندان انتهایی

(میلی‌متر)؛ SD: حداکثر عمق سینوس (میلی‌متر)؛ MD: فاصله رگ‌برگ اصلی تا نوک بزرگترین دندان (میلی‌متر)؛ BW:

پهنای پهنک در پهن‌ترین نقطه آن (میلی‌متر)

** بیشینه - کمینه.

جدول ۳- مشخصه‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده میان نه جمعیت *Q. libani*

Table 3. Biochemical properties among nine *Q. libani* populations.

SL	TJ	AR	HA	BL	KD	GM	DW	GL	صفت* (Trait*)
5.0-6.0	4.0-8.0	3.0-6.0	5.0-6.0	0.4-1.0	3.0-8.0	3.0-8.0	2.0-8.0	6.0-6.0	TN/ب-ک**
5.7 ^a	5.4 ^a	5.1 ^a	5.0 ^a	6.7 ^a	5.1 ^a	4.3 ^a	5.8 ^a	6.0 ^a	میانگین (Mean)
10.19	15.41	20.00	8.10	15.46	16.75	14.98	17.24	0.0	CV (%)
61.7-64.1	54.7-87.1	68.1-77.4	60.1-79.2	65.4-81.9	64.8-95.2	60.6-76.2	56.4-72.4	69.3-74.5	TC/ب-ک
63.1 ^b	72.7 ^a	74.0 ^a	69.9 ^{ab}	72.3 ^a	72.7 ^a	66.3 ^{ab}	63.3 ^b	72.1 ^a	میانگین
1.32	2.92	2.32	2.49	2.24	2.99	2.54	2.33	1.77	CV (%)
31.0-38.0	25.0-50.0	19.0-37.0	31.0-38.0	25.0-65.0	19.0-50.0	18.0-38.0	13.0-50.0	38.0-38.0	Pr/ب-ک
35.7 ^{ab}	33.1 ^b	31.6 ^b	35.0 ^{ab}	38.1 ^a	32.1 ^b	27.4 ^b	35.1 ^{ab}	38.0 ^a	میانگین (Mean)
4.88	6.16	7.94	3.40	6.18	6.66	6.00	6.81	0.0	CV (%)
127.9-243	37.5-192.0	120.2-185.7	21.9-755.2	151.7-240.7	127.8-192.0	149.0-198.3	161.5-212.0	188.7-199.2	K/ب-ک
186.8 ^b	115.6 ^d	158.0 ^c	234.4 ^a	204.1 ^{ab}	174.4 ^{bc}	166.3 ^{bc}	195.5 ^b	193.9 ^b	میانگین (Mean)
3.08	3.97	2.80	4.42	2.02	1.82	1.74	1.45	0.89	CV (%)
21.2-33.3	15.7-40.7	18.5-38.4	4.1-35.2	24.1-50.0	25.8-40.2	13.4-34.8	26.2-31.4	7.0-35.2	Mg/ب-ک
29.2 ^a	27.6 ^{ab}	26.1 ^{ab}	21.1 ^b	31.8 ^a	29.4 ^a	20.8 ^b	28.3 ^{ab}	24.3 ^b	میانگین (Mean)
6.81	6.72	9.15	9.75	6.42	5.16	8.88	3.07	12.13	CV (%)
82.4-316.6	63.8-645.8	45.3-209.4	17.8-123.0	43.9-270.9	97.1-490.4	36.5-133.8	28.8-182.3	133.2-233.3	Ca/ب-ک
171.0 ^b	178.3 ^b	116.0 ^c	69.5 ^d	138.9 ^c	180.7 ^b	77.4 ^d	123.7 ^c	214.5 ^a	میانگین (Mean)
4.84	5.13	6.01	5.86	4.22	4.3	5.0	4.1	3.5	CV (%)
11.1-16.8	5.8-16.4	11.8-15.6	1.3-11.6	7.7-29.7	9.9-29.1	4.7-13.9	6.5-10.4	11.1-20.7	Fe/ب-ک
13.9 ^{ab}	10.5 ^b	13.5 ^{ab}	6.0 ^{cd}	14.1 ^a	14.3 ^a	7.8 ^c	8.3 ^c	15.3 ^a	میانگین (Mean)
9.2	11.6	7.8	20.6	13.0	12.1	15.4	9.2	10.9	CV (%)

*TN: نیتروژن کل (درصد); TC: قندهای محلول کل (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک); Pr: پروتئین کل (درصد); K: پتاسیم

(میلی‌گرم بر گرم); Mg: منیزیم (میلی‌گرم بر گرم); Ca: کلسیم (میلی‌گرم بر گرم); Fe: آهن (میلی‌گرم بر گرم).

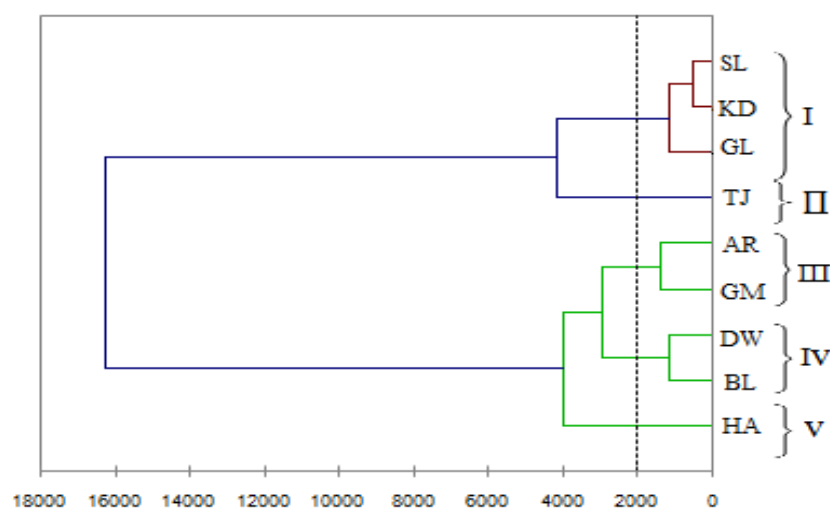
**بیشینه - کمینه.

جدول ۴- مقادیر ویژه دو مولفه اصلی به دست آمده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه.

Table 4. Eigenvalues of the 2 principal component axes from PCA analysis of the genotypes studied.

CU	درصد	Fe	Ca	Mg	K	Pr	TC	TN	LR	BW	MD	SD	AL	LW	PL	BL	PC
32.5	32.5	-0.40	-0.26	-0.09	0.16	-0.01	-0.21	-0.01	0.27	-0.31	-0.14	-0.37	-0.36	-0.36	0.23	0.15	#1
52.2	19.6	0.18	0.20	0.47	-0.03	-0.07	-0.33	-0.07	-0.07	-0.31	-0.33	-0.27	-0.14	0.29	-0.38	0.16	#2

PC. مولفه اصلی؛ CU: درصد تجمعی.



شکل ۲- دندروگرام وارد (۱۹۶۳) جمعیت‌های *Q. libani* بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برگ.
Figure 2. Ward Dendrogram (1963) for *Q. libani* populations based on morphological and biochemical data.

تجزیه نشانگرهای مولکولی: آنالیز نشانگرهای SCoT تکثیر یافته مشخصی را برای هر یک از ۱۰ آغازگر مورد استفاده نشان داد. این نشانگرها در مجموع ۱۰۱ نوار تکثیر کردند که از این تعداد ۹۲ نوار چندشکل بودند (جدول ۵). تعداد نوار تکثیر شده با میانگین ۱۰/۱ نوار بسته به آغازگر متفاوت بود، به طوری که کمینه تعداد نوارهای تکثیر شده در آغازگرهای SCoT14، SCoT22، و SCoT27 هر یک با ۸ نوار و بیشینه این کارکرد در آغازگر SCoT9 با ۱۲ نوار مشاهده شد. میانگین درصد چندشکلی آغازگرها در ژنوم ژنوتیپ‌ها ۹۰/۸۵ درصد برآورد شد. از میان آغازگرها بیشترین تعداد نوار چندشکل در آغازگرهای SCoT5، SCoT6، SCoT30، و SCoT35 (۱۱ نوار از ۱۱ نوار تکثیر شده)

نقی شعبانیان و همکاران

ثبت شد. در مقابل، کمترین تعداد نوار چندشکل از آغازگر SCoT27 (۶ نوار از ۸ نوار تکثیر شده) مشاهده شد (جدول ۵). همچنین اندازه نوارهای تکثیر شده در میان آغازگرهای مورد استفاده متفاوت بود (از ۳۰۰ تا ۲۴۰۰ جفت باز؛ جدول ۵).

جدول ۵- توالی، دمای اتصال (AT) و پارامترهای تنوع ژنی آغازگرها [تعداد کل نوار تکثیر شده (TB)، تعداد نوار چندشکل (PB)، درصد چندشکلی (PL) و دامنه اندازه نوارهای تکثیر شده (FSR)].

Table 5. Primer sequences, annealing temperature (AT) and genetic diversity parameters {the total number of amplified bands (TB), number of polymorphic bands (PB), percentage of polymorphism (PL) and size range of amplified bands (FSR)}.

FSR (bp)	PL (%)	PB	TB	AT (°C)	توالی (5'→3') Sequence	آغازگر Primer
600-2200	100	11	11	53.3	CAACAATGGCTACCACGA	SCoT5
500-2400	100	11	11	52.0	CAACAATGGCTACCACGC	SCoT6
1100-2200	83.33	10	12	50.7	CAACAATGGCTACCAGCA	SCoT9
450-2400	72.72	8	11	56.3	ACGACATGGCGACCAACG	SCoT12
300-1800	87.5	7	8	53.8	ACGACATGGCGACCACGC	SCoT14
300-1600	100	8	8	53.9	AACCATGGCTACCACCAC	SCoT22
800-2000	90	9	10	53.9	ACCATGGCTACCACCGGG	SCoT25
300-2100	75	6	8	59.4	ACCATGGCTACCACCGTG	SCoT27
650-1850	100	11	11	52.0	CCATGGCTACCACCGGCG	SCoT30
500-2050	100	11	11	56.3	CATGGCTACCACCGGCC	SCoT35
-	-	92	101	-	-	کل (Total)
-	90.85	9.2	10.1	-	-	میانگین (Mean)

جدول ۶- پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Q. libani* این مطالعه بر اساس نشانگرهای SCoT

Table 6. Genetic diversity parameters of the *Q. libani* populations analyzed in this study.

N_p	I	h	N_e	PPB (%)	N_a	جمعیت (Population)
40.59	0.212	0.142	1.246	72.72	1.405	GL
62.38	0.295	0.194	1.327	87.00	1.623	DW
54.46	0.311	0.211	1.369	80.90	1.546	GM
42.57	0.221	0.146	1.243	72.72	1.425	KD
60.40	0.318	0.213	1.366	82.00	1.604	BL
55.45	0.272	0.180	1.310	75.42	1.554	HA
48.51	0.264	0.177	1.304	71.81	1.485	AR
62.38	0.366	0.250	1.442	80.05	1.623	TJ
50.50	0.251	0.166	1.286	71.81	1.505	SL
53.03	0.279	0.191	1.321	69.44	1.328	میانگین در سطح جمعیت (Mean at pop. level)
-	0.431	0.284	1.476	90.85	1.910	میانگین در سطح گونه (Mean at sp. level)

N_e : تعداد آلل مشاهده شده، PPB: درصد نوارهای چندشکل، N_e : تعداد آلل مؤثر، h : تنوع ژنی، I: شاخص اطلاعات شانون و N_p : تعداد لوکوس‌های چندشکل.

در جدول ۶ جزئیات تعداد آلل مشاهده شده (N_a)، درصد نوارهای چندشکل (PPB)، تعداد آلل مؤثر (N_e)، تنوع ژنی نی (h)، شاخص اطلاعات شانون (I) و تعداد لوکوس‌های چندشکل (N_p) برآورد شده از نشانگرهای مختلف در جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. همان‌طور که در این جدول آمده است، بیشترین تنوع ژنتیکی در جمعیت تاژان ($h = 0/250$) و کمترین آن در جمعیت سالوک ($h = 0/166$) وجود دارد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) مبتنی بر آماره‌های تنوع ژنی نی و شانون، ضریب تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها (G_{ST}) را $0/29$ برآورد کرد. همچنین براساس نتایج به‌دست آمده از این تجزیه، ۸۷ درصد از تنوع ژنتیکی کل در درون جمعیت‌ها وجود دارد (جدول ۷). این یافته با جریان نسبتاً بالای ژنی بین جمعیت‌ها بیشتر تأیید شد ($N_m = 2/33$).

جدول ۷- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های *Q. libani*

Table 7. Analysis of molecular variance (AMOVA) of intra/inter *Q. libani* populations.

N_m	G_{ST}	P	نسبت واریانس (درصد) (Variance ratio (%))	اجزای واریانس (Variance components)	MS	SS	df	منبع تغییرات (Source of variation)
2.33	0.29	0.01	27	3.92	75.95**	643.601	8	بین جمعیت‌ها (Among populations)
-	-	-	73	10.52	10.51	1051.51	100	درون جمعیت‌ها (Within populations)
-	-	-	100	14.44	-	1514.752	108	کل (Total)

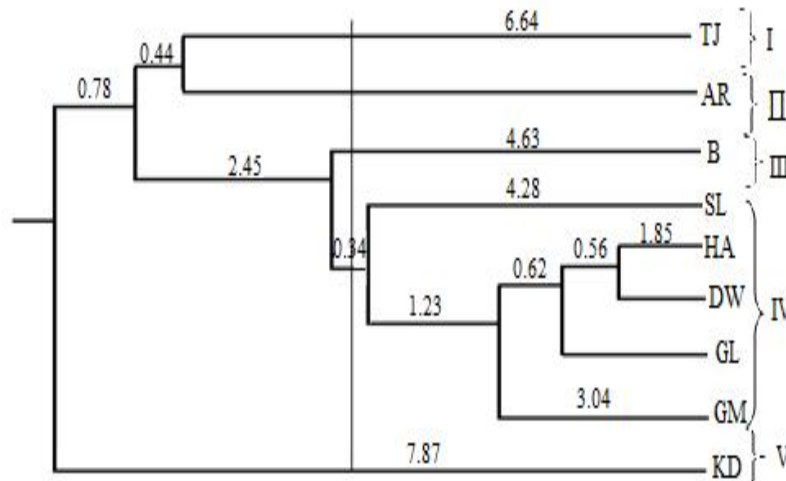
df : درجه آزادی؛ SS: مجموع مربعات؛ MS: میانگین مربعات؛ G_{ST} : ضریب تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها؛ N_m : جریان ژنی.

جدول ۸- مقادیر تشابه ناریب ژنتیکی نی (۱۹۷۸) (داده‌های بالای محور قطری) و فواصل ژنتیکی (داده‌های پایین

محور قطری) میان جمعیت‌های *Q. libani*

Table 8. Nei's (1978) unbiased genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among *Q. libani* populations.

میانگین (Mean)	KD	GM	GL	DW	HA	SL	BL	AR	TJ	جمعیت (Population)
0.899	0.788	0.843	0.820	0.908	0.862	0.856	0.897	0.876	----	TJ
	0.866	0.868	0.852	0.887	0.876	0.868	0.897	----	0.133	AR
	0.855	0.920	0.887	0.919	0.916	0.916	----	0.109	0.129	BL
	0.847	0.899	0.912	0.918	0.943	----	0.088	0.141	0.155	SL
	0.866	0.944	0.961	0.964	----	0.059	0.087	0.132	0.149	HA
	0.837	0.934	0.944	----	0.037	0.086	0.085	0.119	0.097	DW
	0.856	0.944	----	0.057	0.040	0.092	0.120	0.160	0.199	GL
	0.923	----	0.057	0.068	0.058	0.106	0.083	0.142	0.170	GM
	----	0.080	0.155	0.177	0.144	0.167	0.157	0.144	0.238	KD
									0.107	میانگین (Mean)



شکل ۳- دندروگرام UPGMA جمعیت‌های *Q. libani* بر اساس فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۸) مبتنی بر نشانگرهای SCoT

Figure 3. UPGMA dendrogram for *Q. libani* populations based on Nei's (1978) genetic distance from SCoT markers.

فواصل ناریب ژنتیکی نی (۱۹۷۸) میان جمعیت‌ها براساس ۱۰۱ نشانگر نمره‌دهی شده محاسبه شد (جدول ۸). مقادیر برآورد شده فواصل ژنتیکی از ۰/۰۳۷ (بین جمعیت‌های هه‌واره‌خول و دویسه) تا ۰/۲۳۸ (بین جمعیت‌های کنده‌سوره و تاژان) متفاوت بود (جدول ۸). بر همین اساس، تجزیه خوشه‌ای (UPGMA) مبتنی بر داده‌های SCoT به‌منظور آشکارسازی بیشتر روابط ژنتیکی بین جمعیت‌ها انجام گرفت. با استفاده از این روش، نه جمعیت این مطالعه در پنج گروه اصلی خوشه‌بندی شدند (شکل ۳). در گروه اول جمعیت تاژان که به‌لحاظ ژنتیکی از فاصله ژنتیکی بالایی با بقیه جمعیت‌ها برخوردار بود، به تنهایی قرار گرفت. جمعیت‌های آرموده و بلکه هر یک به تنهایی در خوشه‌های دوم و سوم از بقیه جمعیت‌ها جدا شدند. گروه چهارم این دندروگرام به دو زیرگروه تفکیک شد که در زیرگروه اول آن جمعیت سالوک به تنهایی و در زیرگروه دوم جمعیت‌های هه‌واره‌خول، دویسه، گمارلنگ، و قامیشه همگروه شدند. جمعیت کنده‌سوره نیز از بقیه جمعیت‌ها جدا شد و به تنهایی در گروه پنجم قرار گرفت. دوری و نزدیکی جمعیت‌ها در دندروگرام به‌دست آمده تا حدودی با دوری و نزدیکی جغرافیایی آن‌ها همخوانی داشت. با وجود این، آزمون مانتل همبستگی معنی‌داری را بین فواصل ژنتیکی جمعیت‌ها و فواصل جغرافیایی آن‌ها نشان نداد ($F=0/111$ ، $P>0/05$).

بحث

در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۰۹ ژنوتیپ نمونه‌برداری شده از نه جمعیت طبیعی وی‌ول واقع در مناطق مختلف جنگل‌های زاگرس شمالی با بهره‌گیری از انگشت‌نگاری DNA مبتنی بر نشانگر SCoT و مجموع مشخصه‌های ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی برگ بررسی شد. براساس ویژگی‌های فنوتیپی (ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی)، بالا بودن تفاوت بین حداکثر و حداقل مقادیر به‌دست آمده در جمعیت‌های مورد مطالعه و همچنین بالا بودن مقادیر ضریب تغییرات به‌ترتیب نشان از تنوع ژنتیکی بالای بین و درون جمعیت‌ها به لحاظ صفات اندازه‌گیری شده بخصوص در صفات طول دم‌برگ (PL) و کلسیم (Ca) دارد. در مقابل بر اساس این نتایج، بروز صفاتی همچون درصد نیتروژن کل (TN) و پروتئین کل (Pr) که مقادیر ضریب تغییرات پایینی داشتند، در جمعیت‌های مختلف از ثبات ژنتیکی برخوردار بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که آغازگرهای انتخاب شده برای اتصال به مناطق مختلف هدف در ژنوم ژنوتیپ‌ها، به‌طور موفقیت‌آمیزی DNA ژنومی پایه‌های نمونه‌برداری شده را تکثیر کردند. به‌طور میانگین از هر یک از ۱۰ آغازگر مورد استفاده ۱۰/۱ نوار با میانگین ۹/۲ نوار چندشکل تکثیر شد، که این تعداد بیشتر از میانگین تعداد نوار تکثیر شده از هر آغازگر در گزارش پاک‌سرشت و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی تنوع ژنتیکی *Cicer arietinum* با استفاده از نشانگرهای SCoT و کمتر از میانگین نوار تکثیر شده از نشانگرهای AFLP در *Q. brantii* است (۲۲).

سیستم‌های نشانگری مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی مورد استفاده در این مطالعه هر سه به خوبی جمعیت‌های مورد مطالعه را از هم متمایز کردند. بر اساس نشانگرهای ریخت‌شناختی و بیوشیمیایی جمعیت‌های مورد مطالعه در ۵ شاخه گروه‌بندی شدند (شکل ۲). والرو و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه تنوع جمعیتی پروونانس‌های مختلف *Q. ilex* در اسپانیا با بهره‌گیری از مشخصه‌های مورفومتریک و ترکیبات شیمیایی بذر تنوع بین پروونانس‌ها را به لحاظ تمامی صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار گزارش کردند (۲۶). ارزیابی تنوع ژنتیکی نه تنها برای شناسایی پایه‌ها و مدیریت ذخایر ژنتیکی گونه‌ها سودمند است، بلکه یافته‌های این مطالعات را می‌توان برای پایه‌ریزی استراتژی‌های مدیریتی حفاظت ژنی به‌کار گرفت (۲۹). از سیستم‌های نشانگری مختلفی همچون نشانگرهای مورفولوژیکی (۲۲ و ۲۶)، بیوشیمیایی (۲۶) و نشانگرهای مبتنی بر DNA مانند ISSR (۱۲)، AFLP (۲۲)، و SSR (۱۲) برای مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های بلوط استفاده شده است؛ به

عقیده نویسندگان این مطالعات، این نشانگرها از قابلیت بالایی در آشکارسازی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی بلوطها برخوردارند. قبلاً کارآمدی نشانگرهای SCoT برای انگشت‌نگاری ژنتیکی و ارزیابی تنوع ژنتیکی نشان داده شده است (۶ و ۱۷). در این مطالعه نیز انگشت‌نگاری SCoT نه جمعیت این مطالعه تنوع ژنتیکی بالایی را در سطح جمعیت (۶۹/۴۴ درصد) آشکار کردند. در مطالعات تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی، بهره‌گیری از ترکیب ارزیابی‌های ریخت‌شناختی همراه با نشانگرهای مولکولی نتایج قابل اعتمادتری از تنوع ژنتیکی به دست می‌دهد (۲۵). در این مطالعه، ارزیابی انگشت‌نگاری SCoT ژنوتیپ‌ها تنوع ژنتیکی بالایی را در سطح گونه آشکار کرد (۹۰/۸۵ درصد). یافته‌های این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها کمتر از این تنوع در سطح گونه است؛ با وجود این، هنوز تنوع ژنتیکی بالایی در درون جمعیت‌ها وجود دارد. این وضعیت را می‌توان به خاطر متفاوت بودن اندازه جوامع و اثرات رانش ژنتیکی ناشی از دخالت‌های گسترده انسانی در گزینش ژنوتیپ‌ها دانست (۱).

ساختار ژنتیکی جمعیت‌های یک گونه انعکاسی از برهم‌کنش‌های پیشینه تکاملی آن در درازمدت، جهش، نوترکیبی، رانش ژنتیکی، سیستم تلاقی، جریان ژنی و گزینش مصنوعی است (۲۰ و ۲۳). با توجه به مقدار G_{ST} برآورد شده از پروفایل SCoT این مطالعه (۰/۲۹)، مقدار زیادی از تنوع ژنتیکی در *Q. libani* در درون جمعیت‌ها وجود دارد (۸۷ درصد)، با استفاده از آغازگرهای ISSR مقدار G_{ST} میان جمعیت‌های *Pinus nigra* ۰/۲۳۳ گزارش شده است (۱۹). مقدار پایین G_{ST} این مطالعه به مانند دیگر گونه‌های دگرگشن، ناشی از دگرگشتی این گونه و خودناسازگاری‌های اکثر ژنوتیپ‌های آن است.

مقادیر N_m بیشتر از ۱ نشان دهنده عدم تمایز ژنتیکی معنی‌دار بین جمعیت‌ها است (۲۳). یافته‌های این مطالعه با جریان ژنی ملایم ($N_m = ۲/۳۳$) میان جمعیت‌های *Q. libani* نشان داد که تنوع ژنتیکی بالای حفظ شده در درون جمعیت‌ها نسبت به رانش ژنتیکی آسیب‌پذیر نیست. نحوه پخش شدگی دانه گرده و بذر، که تعیین‌کننده جریان ژنی میان جمعیت‌ها هستند، ممکن است در پایین بودن تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها نقش داشته باشند. در بلوط‌ها گل‌ها به کمک باد گرده‌افشانی می‌شوند (۵) و با توجه به بادخیز بودن مناطق جمع‌آوری نمونه‌های این گونه، همواره پخش شدن دانه گرده در مسافت‌های طولانی در فصل گرده‌افشانی انتظار می‌رود. افزون بر این، پراکنش پیوسته این گونه در مناطق مورد

مطالعه خود جریان ژنی را تسهیل می‌کند. با وجود این، جریان ژنی از طریق پخش‌شدگی بذر به دلیل سنگین بودن آن و عدم جابجایی ژنوم این گونه توسط احشام به‌ندرت اتفاق می‌افتد. در هر برنامه حفاظت از ذخایر ژنتیکی گونه‌های گیاهی هدف اصلی بایستی بر حفظ بیشترین مقدار ممکن تنوع ژنتیکی گونه هدف متمرکز شود. مهمترین تهدید فراروی جمعیت‌های بلوط زاگرس شمالی از جمله *Q. libani* فعالیت‌های انسانی است. جمع‌آوری بذر در فصل بذردهی، ورود دام به داخل جنگل و به دنبال آن عدم استقرار نهال‌های کوچک و جنگل‌زدایی، زیستگاه‌های طبیعی و اندازه جمعیت‌های این گونه‌ها را به‌طور مشهود کاهش داده است. به‌منظور حفاظت از ذخایر ژنتیکی ارزشمند *Q. libani*، اقدامات حفاظت در محل به‌عنوان مؤثرترین و اقتصادی‌ترین رویکرد توصیه می‌شود. به‌دلیل برخورداری از بیشترین تنوع ژنتیکی در مقایسه با دیگر جمعیت‌های این مطالعه، براساس یافته‌های این مطالعه بایستی جمعیت "تازان" در اولویت بالای حفاظت از ذخایر ژنتیکی این گونه قرار گیرد. علاوه بر این، از رویکرد حفاظت خارج از محل نیز بایستی به‌عنوان رویکردی مکمل برای حفاظت در محل بهره‌گرفت. این رویکرد، جمع‌آوری و تبادل بذر بین جمعیت‌های مختلف و به‌دنبال آن افزایش تنوع ژنتیکی در هر منطقه و حفاظت از ژرم‌پلاسم‌های نادر را از طریق زادآوری طبیعی ممکن می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از سرکار خانم مونا نصری به‌خاطر کمک در جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی صمیمانه سپاسگزاری کنند.

منابع

1. Adams, W.T., and Burczyk, J. 2000. Magnitude and implications of gene flow in gene conservation reserves. In: Forest Conservation Genetics: Principles and Practices, Young, A., Boshier, D., and Boyle, T. (eds), CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia, Pp: 215–224.
2. Baker, W., and Thompson, T. 1992. Determination of total nitrogen in plant samples by Kjeldahl. In: Plank CO (Ed): Plant analysis reference procedures for the southern region of the United States. Southern Cooperative Series Bulletin. Athens, 13–16.

3. Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Kumar, S., and Tandon, P. 2013. Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. *Gene*, 529(1): 21–26.
4. Bruschi, P., Vendramin, G.G., Bussotti, F., and Grossoni, P. 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany*, 91: 707-16.
5. Chung, M.Y., Nason, J., Chung, M.G., Kim, K., Park, C., Sun, B., and Pak, J. 2002. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 89: 1229–1236.
6. Collard, B.C.Y., and Mackill, D.J. 2009. Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27: 86–93.
7. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America*, 19: 11-15.
8. Ghazanfari, H., Namiranian, M., Sobhani, H., and Marvi Mohajer, M.R. 2004. Traditional forest management and its application to encourage public participation for sustainable forest management in the northern Zagros mountain of Kurdistan province, Iran. *Scandinavian Journal of forest science*, 19: 65–71.
9. Hanlon, E.A. 1992. Determination of potassium, calcium and magnesium in plants by Atomic Absorption Techniques. In: Plank CO (Ed). *Plant analysis reference procedures for the southern region of the United States*. Southern Cooperative Series Bulletin, Athens, Pp: 30–33.
10. Himrane, H., Camarero, J.J., and Gil-Pelegrín, E. 2004. Morphological and ecophysiological variation of the hybrid oak *Quercus subpyrenaica* (*Q. faginea* × *Q. pubescens*). *Trees*, 18: 566–575.
11. Kremer, A., Abbott, A.G., Carlson, J.E., Manos, P.S., Plomion, C., Sisco, P., Staton, M.E., Ueno, S., and Vendramin, G.G. 2012. Genomics of Fagaceae. *Trees Genetics and Genomes*, 8: 583–610.
12. Lopez-Aljorna, A., Bueno, M.A., Aguinalalde, I., and Martin, J.P. 2007. Fingerprinting and genetic variability in cork oak (*Quercus suber* L.) elite trees using ISSR and SSR markers. *Annals of Forest Science*, 64: 773–779.
13. Manos, P.S., Zhou, Z.K., and Cannon, C.H. 2001. Systematics of Fagaceae: phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Science*, 162: 1361–1379.
14. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209–220.
15. Mashayekhi, Sh., Shiran, B., Jahanbazi, H., Houshmand, S.A., Soltani, A., and 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), 63: 77–90. (In Persian)
16. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583–590.
17. Pakseresht, F., Talebi, R., and Karami, E. 2013. Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19: 563–574.
18. Peakall, R., and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288–295.
19. Rubio-Moraga, A., Candel-Perez, D., Lucas-Borja, M.E., Tiscar, P.A., Viñepla, B., Linares, J.C., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O. 2012. Genetic diversity of *Pinus nigra* Arn. populations in southern Spain and northern Morocco revealed by inter-simple sequence repeat profiles. International Journal of Molecular Science, 13(5): 5645–5658.
20. Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T., and Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology, 7: 465–474.
21. Shakeri, Z., Marvi Mohajer, M.R., Namiranin, M., and Etemad, V. 2009. Comparison of seedling and coppice regeneration in pruned and undisturbed oak forests of Northern Zagros (Case study: Baneh, Kurdistan province. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 17: 72-84. (In Persian)
22. Shiran, B., Mashayekhi, S., Jahanbazi, H., Soltani, A., and Bruschi, P. 2011. Morphological and molecular diversity among populations of *Quercus brantii* Lindl. in western forest of Iran. Plant Biosystems, 145: 452-460.
23. Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology and Systematics, 16: 393–430.
24. Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 236(4803): 787–792.
25. Sorkheh, K., Shiran, B., Gradzeil, T.M., Epperson, P., Martinez-Gómez, P., and Asadi, E. 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. Euphytica, 156: 327–344.
26. Valero, G.J., Jorrín-Novo, J., Gómez, C., Ariza, D., García-Olmo, J., and Navarro-Cerrillo, R.M. 2012. Population variability based on the morphometry and chemical composition of the acorn in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.). European Journal of Forest Research, 131: 893-904.

27. Vieitez, A.M., Corredoira, E., Teresa Martinez, M., Carmen, S.J.M., Sanchez, C., Valladares, S., Vidal, N., and Ballester., A. 2012. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *European Journal of Forest Research*, 131: 519–539.
28. Ward, J. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58: 236-244.
29. White, T.L., Adams, W.T., and Neale, D.B. 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing, Cambridge, Massachusetts, USA.
30. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531–6535.
31. Yoshida, S., Forno, D., Cock, J., and Gomez, K. 1976. Determination of sugar and starch in plant tissue. In: Yoshida S, ed. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. Philippines: The International Rice Research Institute, 46–49.
32. Young, A.G., and Boyle, T.J. 2000. Forest fragmentation. In: Young, A, Boshier, D., and Boyle, T. (eds.) *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Publishing, Victoria, Australia, Pp: 123-134.
33. Zolfaghari, R., Akbarinia, M., Mardi, M., and Ghanati, F. 2009. Genetic diversity in Persian oak (*Quercus branti* Lindl) from Kohkiluye and Boyerahmad using SSR. *Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 16: 172–181. (In Persian)



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 22 (4), 2016
<http://jwfst.gau.ac.ir>

Genotypic and phenotypic diversity of Lebanon oak (*Quercus libani*) populations in north Zagros forests revealed by molecular SCoT marker, and morphological and biochemical properties

***N. Shabanian¹, M. Shafie Rahmani², L. Alikhani³ and H. Badakhshan⁴**

¹Associate Prof., Dept. of Forestry, University of Kurdistan, ²M.Sc. Graduated in Plant Biotechnology, Forest Biology Laboratory, Dept., of Forestry, University of Kurdistan,

³M.Sc. Graduated in Silviculture and Forest Ecology, University of Kurdistan, ⁴Assistant Prof., Dept., of Plant Breeding, University of Kurdistan

Received: ; Accepted:

Abstract

Background and objectives: Genetic diversity plays an important role in the maintenance of ecological and socio-economic functions and survival of plant species. Information on the natural patterns of genetic variability and their evolutionary bases are of essential practical keys for sustainable forest management and conservation. According to population genetic theories, waste of genetic diversity is a great threat to endangered species with narrow geographic distribution or growing in small populations. Molecular tools can be noteworthy means to study the natural genetic diversity patterns in threatened species and to reveal demographic and ecological aspects in species management in order to plan long-term conservation or restoration projects. Among them, the inter-simple sequence repeat (ISSR), Inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), and start codon targeted (SCoT) marker are quick and cost-effective techniques based on polymerase chain reaction (PCR) that with a high repeatability amplify the target sequences of multiple loci in the genome. In this study, the genotypic and phenotypic diversity of 109 individuals from nine populations of Lebanon oak (*Quercus libani*) of north-Zagros forests has been reported using start codon targeted (SCoT) molecular marker, and leaf morphological and biochemical characteristics.

Materials and Methods: This study was carried out with 109 individuals from nine populations of Lebanon oak (*Q. libani*) distributed throughout the oak forests of Marivan and Baneh. In order to decrease the likelihood of genotypic similarity, leaf samples were collected from the trees with at least 100 m distance within populations. The samples were then stored at -20°C (for DNA extraction) or at 4°C

*Corresponding author: n.shabanian@uok.ac.ir

(for morphological and biochemical examinations). Morphological tests were performed using eight descriptive developed for *Quercus* genus. Biochemical analysis of total nitrogen, starch, total carbohydrate, potassium, calcium, magnesium and ferrous were conducted based on Kjeldal, spectrophotometry, atomic absorption and flame photometry methods. Genomic DNA was extracted from leaf material following the method described by Doyle and Doyle with a minor modification. After visualizing and scoring the amplified bands from 10 primers, the 1 and 0 matrices were analyzed using PopGene software and the dendrogram was constructed through the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) using the Dice similarity index. Marker and population genetic parameters such as Nei's genetic diversity (h), Shannon diversity index (I), the percentage of polymorphic bands (PPB), and measures of genetic distance were estimated. The genetic structure of the studied populations was further investigated by analysis of molecular variation (AMOVA) to estimate variation among and within populations based on marker patterns, gene flow, and genetic differentiation index.

Results: Cluster analysis of all phenotypic data grouped the studied populations into five main clusters. Totally, ten SCoT primers produced 101 amplification products, of which 92 fragments (90%) were polymorphic. Nei's gene diversity (h) and Shannon's diversity index (I) were relatively high at the both species ($h = 0.284$, $I = 0.258$) and population ($h = 0.191$, $I = 0.279$) levels. High phenotypic and genetic diversity demonstrated that Lebanon oak populations in north Zagros forests maintained a high level of variation. The estimated G_{ST} (0.29) showed that the most revealed genetic diversity resided within populations (87%), which was identified with the moderate gene flow level ($N_m = 2.33$).

Conclusion: The relatively high intra-population genetic diversity and low inter-population genetic differentiation was largely attributed to long distance dispersal of pollen, and continuous distribution of populations. Mantel test indicated no significant correlation between genetic and geographic distances among populations. Breeding systems characteristics, genetic drift and extensive gene flow are probably important factors for explaining this differentiation.

Keywords: Morphological marker, Cluster analysis, Molecular diversity, Start codon targeted (SCoT), Oak

