

بررسی و مقایسه کارایی نشانگرهای مولکولی مختلف در برآورد فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مختلف بلوط ایرانی استان لرستان (*Quercus brantii* Lindl.)

رضا میردریکوند^{۱*} و کامران سمیعی^۲

۱- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد کنگاور، دانشگاه آزاد اسلامی، کنگاور

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۳)

چکیده

برآورد تنوع ژنتیکی و ارزیابی منابع ژرمپلاسم گیاهی، مهم‌ترین مرحله در جمع‌آوری، مدیریت و استفاده صحیح از ذخایر ژنتیکی محسوب می‌گردد. در همین راستا مقایسه نشانگرهای مختلف در ارزیابی تنوع و ارائه نشانگرهایی با بیشترین کارایی، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت طبیعی بلوط ایرانی جنگل‌های استان لرستان، ۲۰ جمعیت مختلف از مناطق جغرافیایی و اقلیمی مختلف جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA نمونه‌های مورد مطالعه، از سه سیستم نشانگری ISSR، ISJ و SCoT جهت بررسی چندشکلی استفاده شد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس اطلاعات حاصل از باندهای چند شکل به دست آمده از هر ۳ نشانگر به طور جداگانه و همچنین به صورت ترکیب داده‌های سه نشانگر انجام گرفت. نتایج الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) آغازگرهای مورد استفاده، ۹۱ باند چندشکل با میانگین ۷۱ درصد را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد. نشانگر ISSR با ۴۴ باند بیشترین تعداد باند چند شکل را به خود اختصاص داد. نشانگرهای ISSR، ISJ و SCoT ژنوتیپ‌ها را به ترتیب به ۵، ۶ و ۵ گروه تفکیک نمودند و در مجموع ترکیب داده‌های سه نشانگر، ژنوتیپ‌ها به ۵ گروه چند ژنوتیپی و ۳ گروه تک ژنوتیپی تفکیک شدند. نتایج نشان داد که گروه‌بندی به دست آمده از نشانگرهای مختلف تا حدودی با گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس شرایط اقلیمی موجود همخوانی داشت. بیشترین شباهت در گروه‌بندی‌های انجام گرفته، به نشانگر ISJ و ISSR با ۸۹ درصد تعلق داشت. به طور کلی نتایج بیانگر کارایی مناسب نشانگرهای مورد استفاده در برآورد فواصل ژنتیکی بین جمعیت مختلف بلوط بود.

واژگان کلیدی: بلوط ایرانی، تنوع ژنتیکی، زاگرس، نشانگر مولکولی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: mirderikvand@khoiau.ac.ir

جنس بلوط (*Quercus*) یکی از متنوع‌ترین گونه‌های جنگلی نواحی معتدل است. این گیاه بیش از ۵۰۰ گونه خزان‌پذیر و همیشه‌سبز داشته و به خانواده Fagaceae تعلق دارد. گونه‌های مختلف بلوط در نواحی مختلفی از نیمکره شمالی به‌طور گسترده‌ای پراکنده شده و به‌دلیل سازگاری‌های بسیار بالا، در عرض‌های جغرافیایی سرد تا مناطق گرمسیری آسیا و قاره آمریکا یافت می‌شوند (Olfat et al., 2010). جنس بلوط به‌دلیل توانایی بالا در هیبریداسیون، از تنوع بسیار بالای بین و درون‌گونه‌ای برخوردار بوده و جمعیت طبیعی موجود، حاصل هیبریدهای مکرر و ایتروگرسیون هستند. به‌همین دلیل به‌نظر می‌رسد که بیش از ۵۰ درصد اطلاعات ژنتیکی موجود در این جنس ناشی از تبادل اطلاعات ژنتیکی باشد (Conte et al., 2007). تبادلات ژنتیکی سبب شده که صدها گونه، زیرگونه و اکوتیپ مختلف از جنس بلوط به‌وجود آید. این امر سبب شده طبقه‌بندی و برآورد تنوع ژنتیکی در این گیاه با مشکلاتی روبه‌رو باشد (Bruschi et al., 2000; Neophytou et al., 2010).

امروزه تکنیک‌های ژنتیک مولکولی در حال پیشرفت سریع بوده و می‌تواند به‌عنوان ابزاری قوی و کارآمد در برنامه‌های به‌نژادی و تولید گونه‌های مختلف جنگلی مورد استفاده قرار گیرند. یکی از پرکاربردترین ابزارهای مولکولی، نشانگرهای ژنتیکی مبتنی بر DNA بوده که به‌طور گسترده‌ای در شناسایی گونه‌ها، نقشه‌برداری‌های ژنتیکی و صدور گواهی‌نامه‌های بذر گیاهان جنگلی مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این، از این نشانگرها می‌توان در شناسایی ژن یا آلل‌های مرتبط با خصوصیات اقتصادی گیاهان جنگلی نظیر کیفیت چوب استفاده نمود (Grattapaglia et al., 2009). اطلاعات به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی در رابطه با تغییرات ژنتیکی و الگوی پراکنش زیستی گونه‌های جنگلی و مدیریت بهینه منابع جنگلی بسیار موفق بوده و می‌تواند در ثبت، نگهداری و تبادل منابع ژنتیکی جنگلی بسیار مؤثر و کارآمد باشد (Jose-Maldia et al., 2017).

استفاده از نشانگرهای DNA به‌دلیل عدم تأثیرپذیری محیطی و دارا بودن توارث بالا، ابزار قدرتمندی در برآورد تنوع ژنتیکی و آگاهی از خصوصیات ذخایر ژنتیکی محسوب می‌شوند.

اطلاعات به‌دست آمده از این دسته از نشانگرها به‌طور مستقیم براساس تفاوت‌های موجود در ژنوم بوده و معمولاً نسبت به سایر نشانگرها از چندشکلی بالاتری برخوردار هستند. به همین دلیل استفاده از آن‌ها در برآورد فاصله ژنتیکی، بیشترین کاربرد را به خود اختصاص داده است (Ranjan and Aparajita, 2010). نشانگرهای مولکولی با هزینه سنجش کم، سهولت اجرا و کاربرد سریع و آسان ابزاری با ارزش برای ژنتیک جمعیت و برنامه‌های به‌نژادی می‌باشند. اگرچه هر روش مزایا و محدودیت‌های خود را دارد، می‌توان از انتخاب مناسب یک نشانگر و یا ترکیبی از نشانگرهای مختلف به‌راحتی برای غلبه بر این معایب استفاده کرد (Marakli, 2018).

تغییرات محیطی بر اکوسیستم‌های جنگلی تأثیر گذاشته و بر رشد، سلامت و توزیع گونه‌های گیاهی و درختی بسیار مؤثر هستند (Müller and Gailing, 2018). محیط همواره در حال تغییر بوده و تنوع ژنتیکی برای انطباق جمعیت با آن ضروری است. تغییرات محیطی می‌تواند ذخایر ژنتیکی را به سمت دارا بودن برخی از خصوصیات منحصربه‌فرد و متناسب با محیط سوق دهند. تنوع ژنتیکی برای تکامل یک گونه و در نتیجه فراهم نمودن پایه ژنتیکی گسترده‌تر برای تولیدمثل و سازگاری بیشتر ضروری است (Saha, 2018). جنگل‌ها بخش جدایی‌ناپذیری از اکوسیستم‌های طبیعی جهان را شامل می‌شوند. براساس برآوردهای صورت گرفته، این اکوسیستم‌های طبیعی با بیش از ۸۰۰۰۰ گونه مختلف، حدود ۳۱ درصد از کل سطح خشکی زمین را در بر می‌گیرند (Porth and El-Kassaby, 2014). علاوه بر این جنگل‌ها به‌دلیل سطح بالای تنوع زیستی از نظر منابع ژنتیکی، گونه‌ها و زیستگاه، از پیچیده‌ترین اکوسیستم‌های طبیعی به‌حساب می‌آیند. با این حال، تخریب و ناپدید شدن جنگل‌های طبیعی که در سده‌های گذشته رخ داده، سبب خسارات جدی در تنوع زیستی شده است (Geburek and Konrad, 2008).

جنگل‌های زاگرس ایران با وسعتی حدود ۵ میلیون هکتار و سهمی حدود ۴۰ درصد از عرصه‌های جنگلی کشور، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند. جنس بلوط دارای فراوان‌ترین گونه‌های درختی در این جنگل‌ها بوده و از

با این حال به نظر می‌رسد به منظور کاهش هزینه‌ها و ارائه نتایج دقیق‌تر، بررسی نشانگرهای مولکولی مختلف و مقایسه کارایی آن‌ها در برآورد تنوع ژنتیکی، ضروری باشد. علاوه بر این، جمعیت بلوط موجود در جنگل‌های زاگرس میانی و استان لرستان به دلیل دارا بودن اقلیم‌های مختلف و تفاوت‌های آب و هوایی گسترده، کمتر مورد توجه و مطالعه قرار گرفته‌اند. مطالعه حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بلوط ایرانی در جنگل‌های لرستان به اجرا درآمد. همچنین کارایی نشانگرهای مختلف نیز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت طبیعی بلوط ایرانی، ۲۰ جمعیت (ژنوتیپ) از رویشگاه‌های مختلف و با شرایط اقلیمی متفاوت جمع‌آوری گردید (جدول ۱). برای نمونه‌برداری از هر جمعیت، تعداد پنج نمونه درخت بلوط ایرانی با فاصله حداقل ۱۰۰ متر انتخاب گردید. نمونه‌برداری در اوایل اردیبهشت ۱۳۹۷ انجام گرفت. پس از جمع‌آوری نمونه‌های برگ و نگهداری بر روی یخ، نمونه‌ها جهت انجام سایر مراحل به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA: به منظور جداسازی DNA ژنوتیپ‌های بلوط مورد مطالعه از ۱ گرم نمونه برگ با استفاده از روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) با اندکی تغییر استفاده شد.

به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از تکنیک ژل-الکتروفورز آگارز و بافر TAE استفاده شد. علاوه بر این با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer, SmartSpect-plus, BioRad, USA) و اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، کمیت و کیفیت نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

راه‌اندازی واکنش‌های PCR: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های بلوط مورد مطالعه، از سه نشانگر مولکولی مختلف استفاده شد. برای این منظور، تعداد ۱۰ آغازگر نشانگر ¹ISSR، ۱۰ آغازگر نشانگر ²SCoT و ۵ آغازگر نیمه تصادفی ³ISJ براساس مطالعات قبلی صورت گرفته انتخاب و مورد

پراکنش بسیار بالایی برخوردار می‌باشد (Erfanifard et al., 2009). گونه‌های بلوط موجود در جنگل‌های زاگرس به دلایل مختلف زیست-محیطی در معرض خطر و نابودی قرار دارند؛ به طوری که در سال‌های اخیر به دلیل شرایط نامساعد آب و هوایی، گرم شدن هوا، خشک‌سالی‌های پی‌پی و همچنین قطع غیرقانونی درختان و تبدیل عرصه‌های جنگلی به مزارع کشاورزی، با سرعت بالایی در حال نابودی هستند (Batos et al., 2003). با توجه به اهمیت گونه‌های بلوط و نقش ارزنده آن‌ها در ساختار جنگل‌های زاگرس، حفاظت از آن‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است که این امر نیازمند داشتن اطلاعات ژنتیکی و آگاهی از الگوهای تغییر ژنتیکی در بین و درون جمعیت طبیعی می‌باشد (Saenz-Romero and Tapia-Olivares, 2003). بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌های جنگلی فعلی برای ارزیابی توانایی زنده ماندن در رویشگاه‌های طبیعی ضروری بوده و می‌تواند در برنامه‌ریزی و مدیریت ذخایر ژنتیکی جنگلی بسیار اثرگذار باشد (Carabeo et al., 2017).

بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) از مهم‌ترین گونه‌های جنگلی منطقه زاگرس می‌باشد. این گیاه دیپلوئید بوده و در مساحتی بیش از ۲ میلیون هکتار از جنگل‌های زاگرس به طور وسیعی پراکنده شده است. امروزه عوامل زیستی و غیرزیستی متعددی سبب شده که جنگل‌های بلوط ایرانی با خطر نابودی مواجه باشند و به نظر می‌رسد که تدوین برنامه حفاظت از منابع ژنتیکی بلوط ایرانی و توسعه و احیای جنگل‌های بلوط، از مهم‌ترین و کاراترین برنامه‌های حفاظت از ژرم‌پلاسم بلوط ایرانی باشد (Ardi et al., 2012). در درختانی مانند بلوط که سیستم تولیدمثل دگرگشن دارند، لازم است ساختار تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های طبیعی بررسی شود و در صورت کاهش سطح تنوع ژنی درون جمعیتی، ساختار ژنتیکی رویشگاه‌ها به عنوان راهکاری پایدار مورد بررسی قرار گیرد (Shamari et al., 2008).

تاکنون مطالعات متعددی به بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنگلی از جمله گونه‌های مختلف بلوط با استفاده از نشانگرهای مولکولی پرداخته شده است (Shi et al., 2017; Shabanian et al., 2016a; Saha, 2018; Ardi et al., 2012).

1- Inter simple sequence repeat
2- Start codon target
3- Intron-exon splice junctions

استفاده قرار گرفت. جهت راه‌اندازی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه ترموسایکلر (Mycycler™-BioRad, USA) و کیت PCR ساخت شرکت سیناژن (ایران، تهران) استفاده شد. شرایط واکنش بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در نظر گرفته شد و برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتری مقدار ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی در نظر گرفته شد. برای اجرای واکنش‌ها از برنامه دمایی براساس دمای اتصال هر آغازگر استفاده شد (جدول ۲).

الکتروفورز و مشاهده فراورده‌های تکثیر شده: پس از طی مراحل تکثیر، محصول PCR بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز

بارگیری و توسط دستگاه الکتروفورز به مدت ۲ ساعت اجرا گردید. به‌منظور برآورد حدود اندازه قطعات تکثیر شده روی ژل، از نشانگر با باندهای استاندارد ۱۰۰bp استفاده شد. مشاهده و عکس‌برداری زیر نور UV به کمک دستگاه ژل‌داک (BioRad, USA) صورت گرفت.

محاسبات آماری: در این تحقیق از سه سیستم نشانگری به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های بلوط ایرانی استفاده گردید. نحوه امتیازدهی برای هر سه نشانگر مشابه بود به‌نحوی که وجود یا عدم وجود باند (چندشکلی) با اعداد ۱ و صفر برای هر ژنوتیپ مشخص شد.

جدول ۱- نام و محل جمع‌آوری ژنوتیپ‌های بلوط ایرانی مورد مطالعه

Table 1. Name and location of collected Iranian oak genotypes used in study

شماره	نام محل جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	شماره	نام محل جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)
Number	Collecting place name	Altitude (m)	Number	Collecting place name	Altitude (m)
1	رومشکان Romeshkan	1090	11	دیناروند Dinarvand	1228
2	درب‌گنبد Darb-Gonbad	1072	12	تجره Tajareh	1319
3	کونانی Konani	1016	13	ریگ سفید Rig-Sefid	1859
4	کوه‌دشت Kohdasht	1668	14	الشتار Alashtar	1633
5	معمولان Mamolalan	886	15	فیروزآباد Firoozabad	1784
6	پلدختر Poldokhtar	669	16	کاکارضا Kakareza	1601
7	ویسیان Veysian	1017	17	رباط Robat	1448
8	دوره Doreh	1125	18	بیشه Bishseh	1207
9	کوماس Kumas	1219	19	دورود Doroud	1530
10	شورآب Shorab	1110	20	ازنا Azna	1596

جدول ۲- چرخه دمایی و زمانی مورد نیاز برای اجرای واکنش‌های PCR با استفاده از آغازگرهای مختلف.

Table 2. Temperature and time cycles required for PCR reactions using different primers.

مرحله واکنش Reaction stage	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	مدت‌زمان (دقیقه) Duration (minutes)
واسرشته‌سازی اولیه Initial denaturation	94	5
واسرشته‌سازی Denaturation	94	1
اتصال آغازگرها Annealing	50-55	۳۵ سیکل 35 Cycle
تکثیر Extension	94	1
بسط نهایی Final extension	72	10

دادند (جدول ۳).

میانگین تولید قطعات چند شکل توسط این آغازگرها بین ۵۰ تا ۸۶ درصد بود. آغازگرهای IT₁₀₋₆ و IT₁₅₋₃₅ با ۶ و ۴ باند چند شکل به ترتیب بیشترین و کمترین درصد چندشکلی را به خود اختصاص دادند. در رابطه با نشانگر ISSR، بیشترین فراوانی چندشکلی به آغازگر ISSR₁₇ با ۹۰ درصد تعلق داشت و آغازگر ISSR₁₂₅ دارای کمترین تعداد باند چند شکل (۷۰ درصد) بود. فراوانی چندشکلی این آغازگر ۷۰ درصد بود. در بین سه گروه نشانگری مورد استفاده در این مطالعه، آغازگرهای نشانگر SCoT نسبت به آغازگرهای دو نشانگر ISSR و ISJ از چندشکلی کمتری برخوردار بودند به طوری که بیشترین درصد چندشکلی به آغازگر SCoT₃₅ با ۷۵ درصد تعلق داشت (جدول ۳).

اندازه قطعات تکثیر شده توسط نشانگرهای مختلف نیز متفاوت بود. در مجموع قطعات تکثیر شده دامنه‌ای بین ۵۰۰ تا ۱۷۵۰ جفت‌باز داشتند. آغازگرهای نشانگر ISSR قطعاتی تولید نمودند که کمتر از ۱۳۰۰ جفت‌باز طول داشتند در صورتی که میانگین قطعات تولید شده توسط آغازگرهای نشانگر SCoT بیشتر از دو نشانگر دیگر بود (جدول ۳ و شکل ۱).

براساس نتایج به دست آمده بین ژنوتیپ‌های بلوط مورد مطالعه، تنوع ژنتیکی اندکی مشاهده شد به طوری که میانگین شباهت به دست آمده با استفاده از نشانگرهای مورد مطالعه بیشتر از ۷۵ درصد بود. بیشترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها (با میانگین ۸۲ درصد) با استفاده از نشانگر SCoT به دست آمد.

در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی و درختان میوه، از ضرایب تشابه مختلف استفاده می‌شود با این حال ضریب تشابه جاکارد در بسیاری از مقالات به منظور تعیین ضرایب تشابه مورد استفاده قرار گرفته و کارایی آن تایید شده است (Gheitarani et al., 2020; Aziznia et al., 2020). به همین دلیل برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های هر تکنیک، از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA استفاده شد. تعیین تشابه ژنتیکی و رسم دندروگرام (تجزیه خوشه‌ای) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-pc.2.2 (Rohlf, 1997) صورت گرفت و نهایتاً گروه‌بندی صورت گرفته توسط آزمون‌های آماری نظیر ضریب کوفتیک و تجزیه هم‌هانگ اصلی (PCOA) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی کارایی نشانگرها در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از آزمون مانتل استفاده شد.

نتایج و بحث

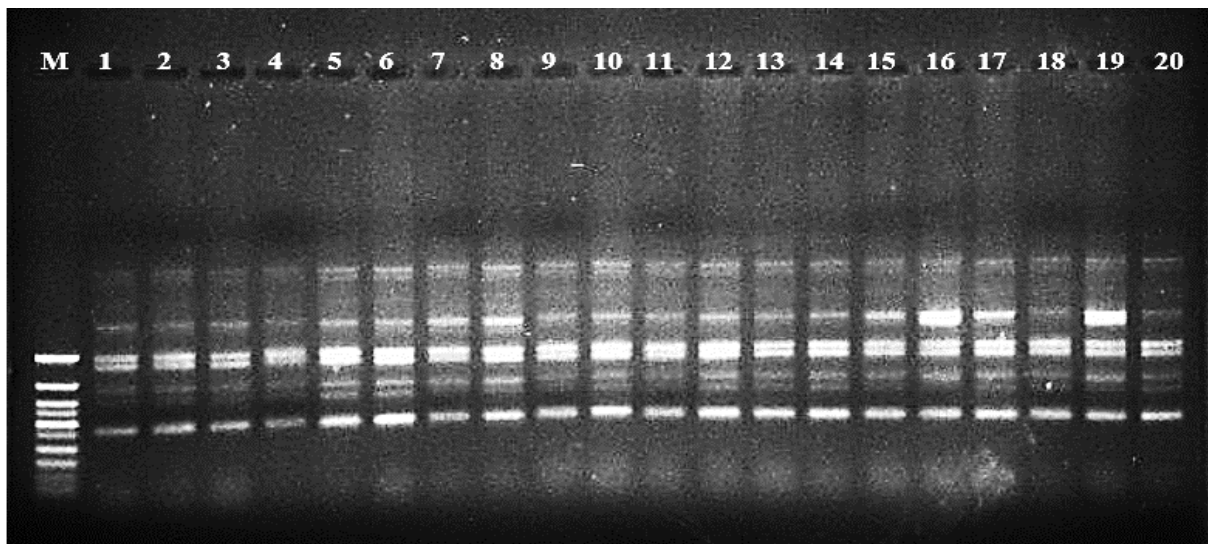
براساس نتایج به دست آمده از ژل الکتروفورز و مقادیر جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، کیفیت DNA استخراجی جهت انجام واکنش‌های PCR مناسب بود؛ ضمن اینکه نمونه‌های استخراج شده دارای ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر بودند. براساس نتایج به دست آمده از الکتروفورز محصول واکنش‌های اجرا شده توسط آغازگرهای مختلف مشخص گردید که از مجموع آغازگرهای مورد استفاده ۵ آغازگر ISSR، ۵ آغازگر SCoT و ۳ آغازگر نشانگر ISJ بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، چندشکلی تکرارپذیر نشان

1- Principal coordinate analysis

جدول ۳- توالی آغازگرها و مشخصات قطعات تکثیر شده توسط نشانگرهای مختلف

Table 3. Sequences of primers and characteristics of amplified fragments using different markers

نام	توالی	تعداد قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چندشکلی	درصد چندشکلی	اندازه قطعات (جفت باز)
Primer name	Primer Sequences (5'-3')	No. of amplified fragments	No. of polymorphic fragments	Percentage of polymorphism	Size of fragments (bp)
آغازگر	آغازگر (۳-۵)	شده	چندشکل		
ISSR ₁₅	ACACACACACACACTG	13	10	77%	700-1300
ISSR ₁₆₅	AGAGAGAGAGAGAGGCC	11	8	73%	850-1300
ISSR ₁₂₅	ACACACACACACACCA	10	7	70%	500-1250
UBC ₈₉₅	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	12	9	75%	700-1300
ISSR ₁₇	CACACACACACACAG	11	10	90%	950-1350
SCoT ₁₃	ACGACATGGCGACCATCG	9	6	67%	800-1600
SCoT ₃₃	CCATGGCTACCACCGCAG	7	4	57%	700-900
SCoT ₃₅	CATGGCTACCACCGGCC	8	6	75%	500-1400
SCoT ₂₂	AACCATGGCTACCACCAC	10	6	60%	900-1750
SCoT ₃₀	CCATGGCTACCACCGGCG	9	6	67%	500-1400
IT ₁₅₋₃₅	CGAAGCCCAGGTAAG	8	4	50%	800-1750
IT ₁₀₋₁	ACGTCCAGAC	11	9	82%	700-1300
IT ₁₀₋₆	ACGTCCATCC	7	6	86%	600-1200



شکل ۱- الگوی بانندی به دست آمده با استفاده از تکثیر قطعات توسط آغازگر SCoT₃₀ در ژنوتیپ‌های بلوط مورد مطالعه. اعداد بیانگر شماره جمعیت و M نشانگر با باند مشخص 100 bp می‌باشد.

Figure 1. The banding pattern obtained with the use of amplification by SCoT₃₀ primers in oak genotypes. Numbers represent the number of genotypes and M represents a distinct band is 100 bp.

از نظر دامنه ضرایب تشابه اختلاف‌هایی مشاهده شد، با این وجود میانگین ضرایب تشابه برای هر سه نشانگر، مشابه بود (جدول ۴). پس از تعیین ضرایب تشابه جاکارد برای هر نشانگر، تجزیه خوشه‌ای و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس ضرایب به دست آمده اجرا گردید. برای هر سه نشانگر روش مشابهی به کار برده شد. به منظور دستیابی به گروه‌بندی

نتایج نشان دادند که برخی از جمعیت‌ها (رومشکان، کونانی و درب گنبد) توسط نشانگر ISJ کاملاً شبیه به هم بوده و ضرایب تشابه بین آن‌ها ۱۰۰ درصد بود. ضرایب تشابه به دست آمده با استفاده از ترکیب داده‌های سه نشانگر نشان داد که بیشترین و کمترین ضریب تشابه ۶۶ و ۹۳ درصد بود و میانگین ضرایب تشابه نیز ۷۶ درصد به دست آمد. اگرچه بین نشانگرهای مختلف مورد مطالعه

کوهدشت و شورآب هر یک به تنهایی تشکیل یک گروه دادند. گروه‌بندی به‌دست آمده با الگوی پراکنش جغرافیایی مشابهت بسیار بالایی نشان داد به طوری که ژنوتیپ‌های اقلیم‌های سردسیر نظیر الشتر و فیروزآباد و ژنوتیپ‌های مناطق گرمسیر در گروه‌های یکسان و مجزایی قرار گرفتند (شکل ۲).

براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای و قطع دندروگرام حاصل از نشانگر SCoT در ضریب تشابه ۸۵ درصد، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۵ گروه قرار گرفتند ضمن اینکه ۴ ژنوتیپ کونانی، کوهدشت، دیناروند و شورآب به‌طور منفرد تشکیل گروه‌های مجزایی دادند. نتایج به‌دست آمده توسط نشانگر SCoT نیز همانند دو نشانگر دیگر، همبستگی بالای گروه‌ها را با الگوی پراکنش جغرافیایی و اقلیمی را نشان داد به طوری که ژنوتیپ‌هایی که از مکان‌های جغرافیایی با شرایط اقلیمی مشابه جمع‌آوری شده بودند در گروه‌های یکسانی قرار گرفتند. علاوه بر این ژنوتیپ‌های گروه‌های تشکیل شده از نظر فاصله جغرافیایی از پراکنش کمتری برخوردار بودند (شکل ۲).

به‌طور کلی نتایج گروه‌بندی نشانگرهای مختلف دارای شباهت‌های بسیار زیادی بودند. در هر سه سیستم نشانگری ژنوتیپ‌هایی که از مناطق جغرافیایی با شرایط آب و هوایی و اقلیمی مشابهی جمع‌آوری شده بودند در گروه‌ها و زیرگروه‌های مشابهی قرار گرفتند.

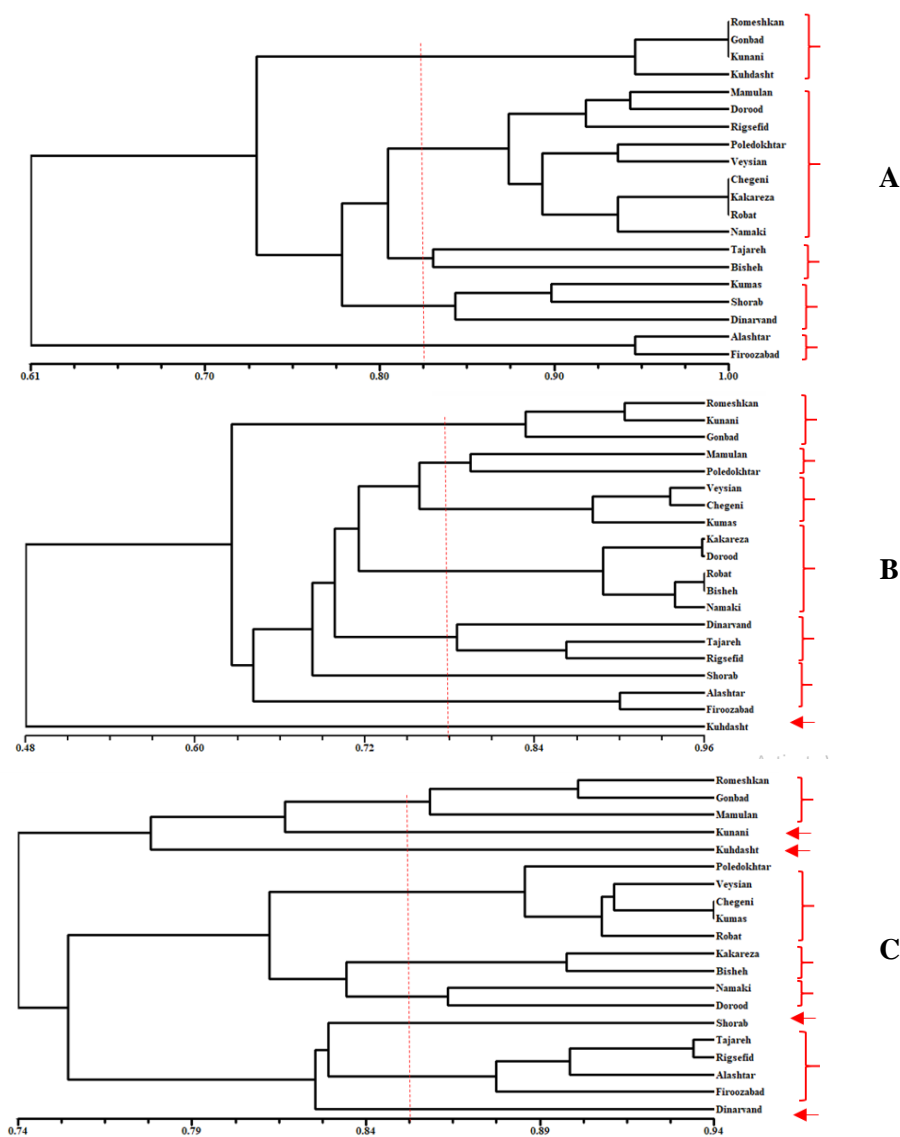
دقیق‌تر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، از ترکیب داده‌های هر ۳ نشانگر استفاده شد. پس از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و ترسیم دندروگرام مربوطه، دندروگرام‌های به‌دست آمده در میانگین ضرایب تشابه به‌دست آمده در مرحله قبل قطع شد و گروه‌های تشکیل شده براساس ژنوتیپ‌های هر گروه مورد بررسی قرار گرفتند. بر همین اساس دندروگرام نشانگرهای ISSR، JSJ و SCoT به‌ترتیب در ضرایب تشابه ۸۳، ۷۵ و ۸۵ درصد قطع شد (شکل ۲). برای قطع دندروگرام حاصل از ترکیب سه نشانگر نیز از قطع دندروگرام در میانگین ضرایب تشابه یعنی ضریب تشابه ۸۱ درصد استفاده شد (شکل ۳).

با قطع دندروگرام نشانگر JSJ، جمعیت‌های مورد مطالعه تشکیل ۵ گروه مجزا دادند. گروه دوم با ۹ ژنوتیپ، بزرگ‌ترین گروه را تشکیل داد. گروه ۳ با دو ژنوتیپ تجربه و بیشه و گروه پنجم نیز با دو ژنوتیپ الشتر و فیروزآباد، کوچک‌ترین گروه‌ها را تشکیل دادند. گروه اول را ژنوتیپ‌های منطقه اقلیمی گرم و جنوب غرب استان لرستان را شامل شد. در این گروه ۳ ژنوتیپ رومشکان، درب گنبد و کونانی با ۱۰۰ درصد شباهت، بیشترین تشابه ژنتیکی را به خود اختصاص دادند که به همراه ژنوتیپ کوهدشت در یک گروه قرار گرفتند. (شکل ۲).

گروه‌بندی با استفاده از نشانگر ISSR نشان داد که قطع دندروگرام در ضریب تشابه ۷۸ درصد، جمعیت‌های بلوط ایرانی را در ۶ گروه مجزا قرار داد و دو ژنوتیپ

جدول ۴- میانگین، حداقل و حداکثر ضرایب تشابه جاکارد به‌دست آمده بین جمعیت‌های بلوط مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای مختلف
Table 4. Average, minimum and maximum Jaccard similarity coefficients obtained among collected oak population using different markers

نشانگر Marker	میانگین ضریب تشابه The average coefficient of similarity	کمترین ضریب تشابه The lowest coefficient of similarity	بیشترین ضریب تشابه The highest coefficient of similarity
ISJ	75%	61%	100%
ISSR	78%	48%	96%
SCoT	82%	74%	94%
ترکیب نشانگرها Combination of markers	76%	66%	93%



ضریب تشابه (Similarity coefficient)

شکل ۲- نتایج تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های بلوط مورد مطالعه توسط نشانگرهای مختلف

Figure 2. Cluster analysis results of the collected oak population obtained from different markers.

حروف A, B و C به ترتیب بیانگر دندروگرام حاصل از نشانگرهای ISJ, ISSR و SCoT می‌باشند. در هر بخش محل برش دندروگرام توسط نقطه چین عمودی نمایش داده شده است. در محور افقی اعداد بیانگر ضرایب تشابه جاکارد می‌باشند.

The letters A, B, and C represent the dendrogram of the ISJ, ISSR, and SCoT markers, respectively. In each section, the dendrogram cut-off location is represented by the vertical dots. On the horizontal axis, the numbers represent Jaccard similarity coefficients.

ژنوتیپ‌های بلوط مورد مطالعه تشکیل پنج گروه دادند و ۳ ژنوتیپ کوهدشت، شورآب معمولان به‌طور جداگانه در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. دو ژنوتیپ کوهدشت و شورآب در دو نشانگر ISSR و SCoT نیز نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در فاصله بیشتری قرار گرفتند (شکل ۳). تجزیه هم‌هنگ اصلی داده‌های حاصل از گروه‌بندی نشانگرهای ISJ, ISSR, SCoT و ترکیب سه نشانگر نشان

به‌منظور برآورد دقیق‌تر و استفاده از اطلاعات سه سیستم نشانگری، داده‌های حاصل از سه نشانگر مورد مطالعه، ترکیب و دندروگرام حاصله رسم گردید. میانگین ضریب تشابه به‌دست آمده در این روش ۷۶ درصد برآورد شد که تفاوت چندانی با میانگین ضرایب تشابه سایر نشانگرها نداشت (جدول ۴). دندروگرام ترکیب سه نشانگر در ضریب تشابه ۸۱ درصد برش داده شد که براساس آن

بود. علاوه بر این، مقدار به‌دست آمده برای گروه‌بندی حاصل از ترکیب سه نشانگر حدود ۰/۹۱ بود. با مقایسه ضرایب به‌دست آمده مشخص شد که ترکیب سه نشانگر سبب افزایش کارایی گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شده است. پس از تأیید کارایی نشانگرهای مورد مطالعه، گروه‌بندی به‌دست آمده توسط نشانگرهای مختلف و ترکیب آن‌ها توسط آزمون مانتل مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که گروه‌بندی به‌دست آمده براساس نشانگر ISJ و ترکیب ۳ نشانگر از بیشترین شباهت برخوردار بودند. با مقایسه هر جفت از گروه‌بندی‌های صورت گرفته، مشخص شد که گروه‌های تشکیل شده در هر ۳ نشانگر و ترکیب نشانگرها از شباهت بسیار بالایی برخوردار بوده و بین تمامی جفت مقایسات بیش از ۷۵ درصد شباهت وجود داشت (جدول ۶).

داد که در هر سه نشانگر، ۵ مؤلفه اول بیش از ۷۰ درصد واریانس بین جمعیت‌های بلوط را توجیه می‌کنند. ضمن اینکه این مقدار در رابطه با ترکیب داده‌های هر سه نشانگر ۶۶ درصد بود (جدول ۵).

به‌منظور بررسی صحت گروه‌بندی و ترسیم فواصل فضایی بین ژنوتیپ‌ها، گروه‌بندی ژنوتیپ‌های براساس ۲ و ۳ مؤلفه اصلی صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که گروه‌بندی به‌دست آمده، با فواصل ژنتیکی در تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت به‌طوری که ژنوتیپ‌هایی که در گروه‌های مشابهی قرار گرفته بودند، در فاصله فضایی کمتری نسبت به هم قرار داشتند (شکل ۳).

در مرحله بعد، ضرایب کوفنتیک هر سیستم نشانگری برآورد شد. نتایج نشان داد که ضرایب کوفنتیک نشانگرهای ISJ، ISSR و SCoT به‌ترتیب برابر با ۰/۹۴، ۰/۸۴ و ۰/۸۷

جدول ۵- نتایج تجزیه هم‌هانگ اصلی و تعیین مقادیر ویژه و واریانس توجیه شده توسط هر یک از مؤلفه‌ها در نشانگرهای مختلف

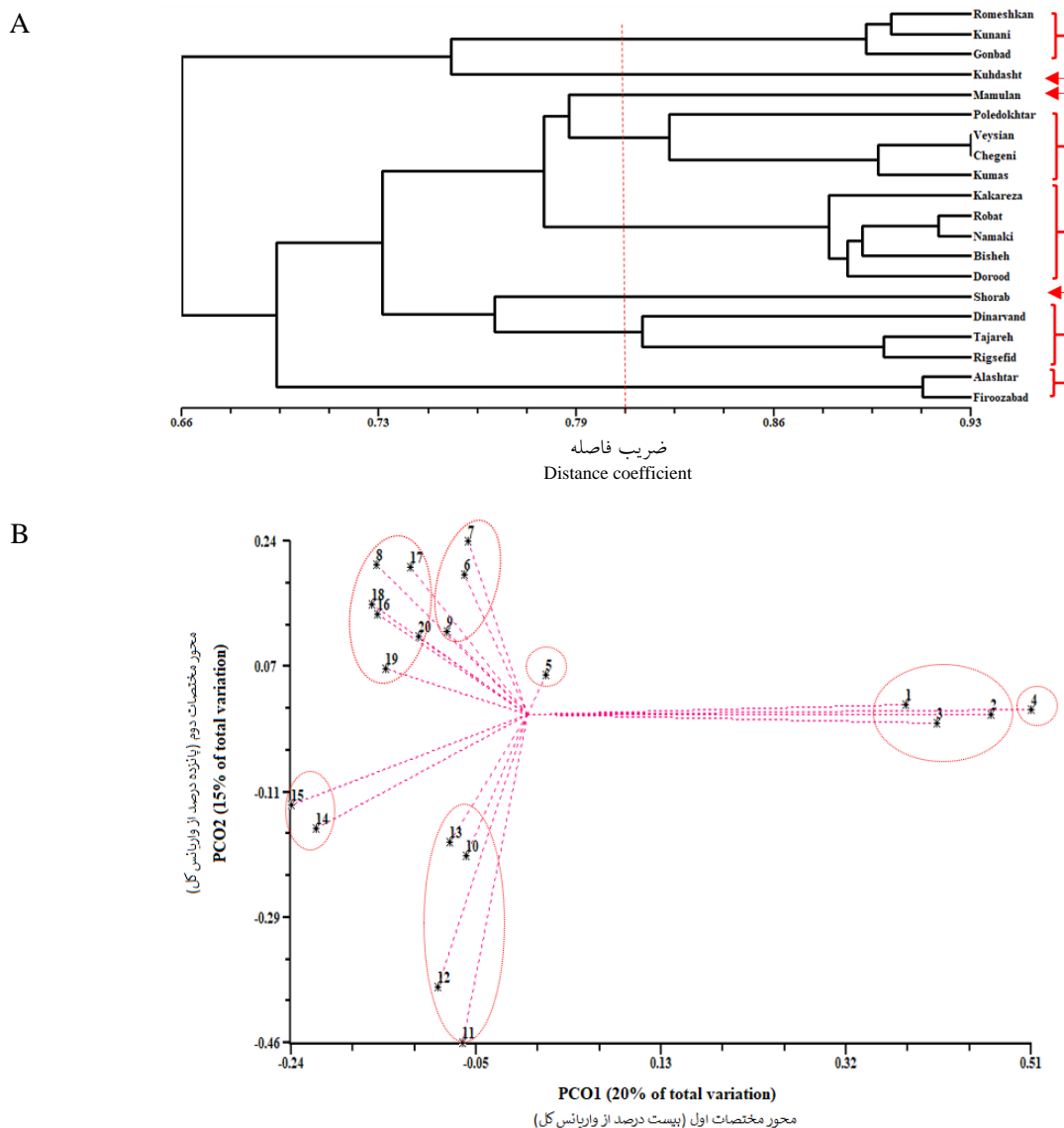
Table 5. Principal coordinate analysis results and determination of eigenvalues and justified variance by each component in different markers

مؤلفه اصلی Main component	نشانگر ISJ ISJ marker		نشانگر ISSR ISSR marker		نشانگر SCoT SCoT marker		ترکیب سه نشانگر Combination of three markers	
	مقادیر ویژه Eigen values	واریانس توجیه شده Justified variance	مقادیر ویژه Eigen values	واریانس توجیه شده Justified variance	مقادیر ویژه Eigen values	واریانس توجیه شده Justified variance	مقادیر ویژه Eigen Values	واریانس توجیه شده Justified variance
	1	1.32	30%	1.31	21%	1.02	24%	1.05
2	1.12	22%	0.99	16%	0.78	18%	0.75	15%
3	0.58	13%	0.82	13%	0.53	12%	0.67	13%
4	0.46	11%	0.74	12%	0.38	9%	0.60	12%
5	0.25	6%	0.52	8%	0.35	8%	0.34	7%
واریانس تجمعی Cumulative variance	82%		71%		71%		66%	

جدول ۶- نتایج آزمون مانتل و ضرایب به‌دست آمده برای نشانگرهای مختلف

Table 6. Mantel test results and coefficients obtained for different markers

نشانگر Marker	نشانگر ISJ ISJ marker	نشانگر ISSR ISSR marker	نشانگر SCoT SCoT marker	ترکیب سه نشانگر Combination of three markers
ISJ	1.00			
ISSR	0.89	1.00		
SCoT	0.76	0.85	1.00	
ترکیب سه نشانگر (Combination of markers)	0.98	0.89	0.81	1.00



شکل ۳- نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه هماهنگ اصلی جمعیت‌های بلوط مورد مطالعه با استفاده از ترکیب داده‌های هر سه نشانگر. Figure 3: Cluster analysis results and principal coordinate analysis of collected oak genotypes using combined data of all three markers.

A: dendrogram derived from cluster analysis; B: principal coordinate analysis and two-dimensional graph based on the two components with the most justified variance.

ذخایر ژنتیکی می‌باشد. سبزه آغازگر استفاده شده در تحقیق حاضر از سه گروه نشانگری مختلف توانستند بین ۲۰ جمعیت مختلف بلوط ایرانی مجموعاً ۹۱ باند چند شکل تولید نمایند به طوری که میانگین چندشکلی حدود ۷۱ درصد بود. عالیخانی و همکاران (Alikhani *et al.*, 2014) با مقایسه نشانگرهای مختلف در برآورد تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف بلوط ایرانی، تنوع ژنتیکی کمتر از ۴۰ درصد مشاهده کردند که نتایج مطالعه

در سال‌های اخیر به دلیل آسیب‌های فراوان زیستی و غیرزیستی وارد شده به جنگل‌های بلوط زاگرس، شناسایی و معرفی ژرم پلاسما جهت حفاظت از آن‌ها بسیار ضروری است. مطالعات گذشته نشان داده با وجود تخریب‌های گسترده در جنگل‌های بلوط زاگرس، تنوع ژنتیکی و فنوتیپی بزرگی در این منطقه قابل مشاهده است (Shabanian *et al*, 2015b). تعیین تنوع ژنتیکی و فواصل بین ژنوتیپ‌های مختلف اولین قدم در امر حفاظت از

قرار گرفتن در اقلیم‌ها و شرایط آب و هوایی مختلف، تحت انتخاب طبیعی قرار گرفته و وجود فواصل جغرافیایی نسبتاً زیاد، سبب شده از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشند. با این وجود شعبانیان و همکاران (Shabanian *et al.*, 2015a) در مطالعه دیگری که به بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بلوط جنگل‌های زاگرس شمالی پرداختند، از نشانگر SCoT استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای درون‌گونه‌ای و تمایز ژنتیکی نسبتاً پایین بین جمعیتی به میزان زیادی ناشی از سیستم گرده‌افشانی درخت بلوط، رانش ژنتیکی و پیوستگی پراکنش این گونه در مناطق مورد مطالعه است.

گروه‌بندی تشکیل شده براساس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR نسبت به دو نشانگر ISJ و SCoT توانست که گروه‌بندی بهتری براساس فواصل جغرافیایی بین ژنوتیپ‌های بلوط نشان دهد (شکل ۲). اگرچه تعداد آغازگرهای استفاده شده توسط نشانگر ISJ کمتر از دو نشانگر دیگر بود، با این وجود گروه‌بندی به‌دست آمده توسط ترکیب سه سیستم نشانگری نشان داد که گروه‌های تشکیل شده توسط نشانگر ISJ شباهت بیشتری با گروه‌های تشکیل شده توسط ترکیب نشانگرها داشت به‌طوری که ضریب ماننل این دو گروه‌بندی (۹۸ درصد) بیش از سایر مقایسات بود (جدول ۶).

استفاده از نشانگرهای مختلف و ترکیب داده‌های حاصل از آن‌ها جهت برآورد تنوع ژنتیکی گونه‌های جنگلی از جمله بلوط به‌دلیل برخورداری از سیستم تلاقی گسترده و بین‌گونه‌ای حائز اهمیت است (Porth and El-Kassaby, 2014). استفاده از سیستم‌های نشانگری مختلف برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گیاهی به‌دلیل پوشش مناطق مختلفی از ژنوم می‌تواند در درک صحیح‌تر تفاوت‌ها بین ژنوتیپ‌ها مؤثر باشد و گروه‌بندی دقیق‌تری را نشان دهد. با این وجود معرفی یک نشانگر کارا برای کاهش هزینه‌های آزمایش و زمان مورد نیاز برای ارائه نتایج بسیار ضروری است (Marakli, 2018). نتایج مطالعه حاضر به‌طور کلی نشان داد که استفاده از نشانگرهای مولکولی

حاضر بیانگر تنوع بالاتر بین ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده است. قطعات تولید شده دامنه‌ای بین ۵۵۰ تا ۱۷۵۰ جفت‌باز داشتند و اندازه قطعات تولید شده توسط آغازگرهای مختلف از یک سیستم نشانگری از تنوع نسبتاً بالایی برخوردار بودند؛ ضمن اینکه تنوع اندازه قطعات تولید شده در بین نشانگرهای مختلف نیز قابل توجه بود.

هر سه سیستم نشانگری توانستند جمعیت‌های بلوط مورد مطالعه را در گروه‌های مختلفی گروه‌بندی نمایند که در تمامی موارد، گروه‌های تشکیل شده با فاصله جغرافیایی و نوع اقلیم رشد، همخوانی داشت. به‌طوری که جمعیت‌هایی که از یک منطقه اقلیمی مشابه جمع‌آوری شده بودند در گروه مشابهی قرار گرفتند. با این وجود برخی از ژنوتیپ‌ها به تنهایی تشکیل گروه‌های مجزایی دادند. جوز-مالدیا و همکاران (Jose-Maldia *et al.*, 2017) نیز در مطالعه خود بیان نمودند که تنوع‌های مشاهده شده براساس نشانگرهای ژنتیکی با فواصل جغرافیایی مطابقت دارند و از این طریق می‌توان ژنوتیپ‌های مناسب با ژرم‌پلاسم مختلف را برای مناطق اقلیمی مشابه معرفی نمود. با این روش می‌توان به گسترش ژرم‌پلاسم کمک نمود و از بروز آسیب‌پذیری ژنتیکی نیز جلوگیری کرد. در رابطه با ترکیب اطلاعات سه نشانگر، گروه‌بندی صورت گرفته نتایج مشابهی با هر سه نشانگر نشان داد. نتایج به‌طور کلی بیانگر گروه‌بندی صحیح ژنوتیپ‌ها براساس سه سیستم نشانگری و ترکیب آن‌ها بود و ترسیم فواصل فضایی و گروه‌بندی براساس مؤلفه‌های اصلی که سبب تنوع بین ژنوتیپ‌ها شده بود نیز نشان داد که ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار گرفته بودند در فاصله کمتری از هم قرار داشتند.

وجود عوارض جغرافیایی متعدد و مختلف در جنگل‌های زاگرس و توپوگرافی متنوع آن، سبب شده است جریان‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف محدود شده و سبب افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت مختلف بلوط ایرانی در این منطقه گردد (Shamari *et al.*, 2008). جنگل‌های زاگرس میانی موجود در استان لرستان به‌دلیل

ژرم پلاسما گونه جنگلی بلوط ایرانی بهره برد. به منظور درک صحیح تر و ارائه نتایج دقیق تر، می توان نمونه های بیشتری از ژنوتیپ های بلوط ایرانی را از مناطق مختلف زاگرس جمع آوری و مورد مطالعه قرار داد. علاوه بر این برآورد تنوع ژنتیکی بین جمعیتی نیز می تواند به ارزیابی میزان تعاملات درون جمعیتی و تعیین سهم اقلیم در کاهش یا افزایش میزان تنوع ژنتیکی کمک نماید.

مبتنی بر DNA می تواند ژنوتیپ های جمعیت مختلف بلوط ایرانی را به خوبی از همدیگر متمایز سازند. گروه بندی به خوبی بیانگر تفاوت های محل رویش و شرایط اقلیمی منطقه جمع آوری نمونه ها بود و گروه بندی اقلیمی با گروه بندی براساس فواصل ژنتیکی کاملاً مطابقت داشت. از اطلاعات به دست آمده از این پژوهش می توان برای مدیریت صحیح تر برنامه های حفاظت

References

- Alikhani, L., Shafie Rahmani, M. Shabanian, N., Badakhshan, H. and Khub, A.K.** (2014). Genetic variability and structure of *Quercus brantii* assessed by iSSR, IRAP and SCoT marker. *Gene*, **552**: 176–183.
- Ardi, M., Rahmani, F. and 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.
- Aziznia, B., Badakhshan, H., Javadi, T. and Zamani, S.** (2020). Assessment of diversity in barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) based on beta-glucan content and ISSR markers. *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 97-110 (In Persian).
- Batos, B., Jovanovic, D.S. and Milkovic, D.** (2014). Spatial and temporal variability of flowering in the Oak (*Quercus robur* L.). *Izvorni Znanstveni Clinic*, **7**: 371-379.
- Bruschi, P., Vendramini, G.G., Bussotti, F. and Grossoni, P.** (2000). Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in northern and central Italy. *Annals of Botany*, **85**: 325-333.
- Carabeo, M., Simeone, M.C., Cherubini, M., Mattia, C., Chiochini, F., Bertini, L., Caruso, C., Mantia, T.L., Villani, F. and Mattioni, C.** (2017). Estimating the genetic diversity and structure of *Quercus trojana* Webb populations in Italy by SSRs: implications for management and conservation. *Canadian Journal of Forest Researches*, **47**: 331-339.
- Conte, L., Cott, C. and Cristofolini, G.** (2007) Molecular evidence for hybrid origin of *Quercus crenata* Lam. (Fagaceae) from *Q. cerris* L. and *Q. suber* L. *Plant Biosystems*, **141**: 181-193.
- Doyle, J.J. and Doyle J.L.** (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**: 13-15.
- Erfanifard, Y., Fegghi, J., Zobeiri, M. and Namiranian, M.** (2009). Spatial pattern analysis in Persian oak (*Quercus brantii* var. *persica*) forests on B & W aerial photographs. *Environmental Monitoring Assessment*, **150**: 251-259.
- Geburek, T. and Konrad, H.** (2008). Why the conservation of forest genetic resources has not worked? *Conserved Biology*, **22(2)**: 267-274.
- Gheitarani, B., Erfani-Moghadam, J. and Fazeli, A.** (2020). Evaluation of genetic diversity among some common Fig using RAPD and ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **6(2)**: 43-54 (In Persian).
- Grattapaglia, D., Plomion, C. Kirst, M. and Sederoff, R.R.** (2009) Genomics of growth traits in forest trees. *Current Opinion Plant Biology*, **12**: 148-156.
- Jose-Maldia, L.S. Matsumoto, A., Ueno, S., Kanazashi, A., Kanno, M., Namikawa, K., Yoshimaru, H. and Tsumura, Y.** (2017). Geographic patterns of genetic variation in nuclear and chloroplast genomes of two related oaks (*Quercus aliena* and *Q. serrata*) in Japan: implications for seed and seedling transfer. *Tree Genetics and Genomes*, **13**: 121.
- Marakli, S.** (2018). A brief review of molecular markers to analysis medicinally important plants. *Journal of Life Sciences and Biotechnology*, **1(1)**: 29-36.
- Müller, M. and Gailing, O.** (2018). Characterization of 20 new EST-SSR markers for northern red oak (*Quercus rubra* L.) and their transferability to *Fagus sylvatica* L. and six oak species of section *Lobatae* and *Quercus*. *Annals of Forestry Research*, **61(2)**: 211-222.
- Neophytou, C., Aravanopoulos, F.A., Fink, S. and Dounavi, A.** (2010). Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two inter fertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.

- and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forestry Ecology Management*, **259**: 20262035.
- Olfat, A.M. and Pourtahmasi, K.** (2010). Anatomical Characters in tree oak species (*Q. libani*, *Q. brantii* and *Q. insectaria*) from Iranian Zagros mountains. *Australian Journal of Basic Applied Science*, **4(8)**: 3230-3237.
- Porth, I. and El-Kassaby, Y.A.** (2014). Assessment of the genetic diversity in forest tree populations using molecular markers. *Diversity*, **6**: 283-295.
- Ranjan, R.G. and Aparajita, S.** (2010). Phylogenetic study of twelve species of *Phyllanthus* originated from India through molecular for conservation. *American Journal of Plant Science*, **1**: 32-37.
- Rohlf, F.J.** (1998). *NTSYSpc Version 2.02. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistics Inc., Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Saenz-Romero, C. and Tapia-Olivares, B.L.** (2003). *Pinus oocarpa* isoenzymatic variation along an altitudinal gradient in Michoacan, Mexico. *Silvae Genet*, **52**: 237-240.
- Saha, R.** (2018). Genetic diversity in *Quercus leucotrichophora* populations through RAPD markers. *Environment and Biotechnology*, **11(1)**: 97-101.
- Shabaniyan, N., Havasi, A. and 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.
- Shabaniyan, T., Alikhani, L. and Rahmani, M.S.** (2015a). Genetic and phenotypic diversity of Iranian oak populations in declining forests of northern Zagros using biochemical characteristics and molecular marker SCoT. *Journal of Genetic Research and Breeding of Range and Forest Plants*, **23(1)**: 13-39 (In Persian).
- Shabaniyan, T., Alikhani, L., Rahmani, M. and Badakhshan, S.** (2015b). Evaluation of genetic and phenotypic diversity of *Quercus libani* populations in declining forests of northern Zagros using SCoT molecular marker and morphological and biochemical characteristics. *Journal of Wood and Forest Science and Technology Research*, **22(4)**: 55-77 (In Persian).
- Shamari, A., Mehrabi, A.A., Maleki, A. and Rostami, A.** (2008). Study of genetic diversity structure of Iranian oak (*Quercus brantii* Lindl.) Populations in the middle Zagros using genomic microsatellite markers. *Iranian Journal of Forestry*, **9(4)**: 511-525 (In Persian).
- Shi, X., Wen, Q., Cao, M., Guo, X. and Xu, L.** (2017). Genetic diversity and structure of natural *Quercus variabilis* population in China as revealed by microsatellites markers. *Forests*, **8**: 495.

Evaluation and Comparison of the Efficiency of Different Molecular Markers in Estimating Genetic Distance of Different Persian Oak (*Quercus brantii* Lindl.) Populations in Lorestan Province, Iran

Reza Mir Drikvand^{1,*} and Kamran Samiei²

1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Kangavar Branch, Islamic Azad University, Kangavar, Iran

(Received: January 4, 2020 – Accepted: September 3, 2020)

Abstract

Estimation of genetic diversity and evaluation of plant germplasm is the most important step in collection and management of plant genetic resources. Also, comparison of different DNA-based genetic markers in diversity evaluation and then advising the most efficient markers is very important. In order to investigate genetic variation among Persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) populations of Lorestan province (Iran), 20 genotypes were collected from different geographical and climatic regions. After DNA extraction, polymerase chain reactions (PCR) were used for study of polymorphism using three markers including ISJ, ISSR and SCoT. Genotyping was performed using the polymorphic bands obtained from all three markers separately, and also by combining the data of three markers. PCR results of the primers showed 91 polymorphic bands with an average of 71% per locus. The ISSR marker with 44 bands had the most polymorphic bands. Genotypes were discriminated by ISJ, ISSR and SCoT markers in 5, 6 and 5 groups, respectively, and using the combined data of three markers, genotypes were classified in 5 groups (each group included more than one genotype) and 3 group (each group included one genotype). The results showed that the obtained clustering by different markers were nearly consistent with clustering of genotypes based on the climatic origin of genotypes. The most similarity between the groupings was between ISJ and ISSR markers with 89%. Overall, the results indicated the usefulness of markers used to estimate genetic distances between different oak communities.

Keywords: Persian oak, Genetic diversity, Zagros, Molecular markers

* Corresponding Author, E-mail: mirderikvand@khoiau.ac.ir