

ارزیابی تنوع ژنتیکی بلوط ایرانی در استان چهارمحال و بختیاری با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی AFLP

شهلا مشایخی^۱، بهروز شیران^{۲*}، حسن جهانبازی^۳، سعداله هوشمند^۴، علی سلطانی^۴ و کریم سرخه^۵

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه شهرکرد، ایران

^۲ دانشیار دانشگاه شهرکرد، ایران

^۳ عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، ایران

^۴ استادیار دانشگاه شهرکرد، ایران

^۵ دانشجوی دکترای اصلاح نباتات، دانشگاه شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۲۲، تاریخ تصویب: ۸۸/۱۲/۱۲)

چکیده

در این ارزیابی، تنوع ژنتیکی بلوط‌های ایرانی در هشت جمعیت متعلق به رویشگاه‌های متفاوت از جنگل‌های استان چهارمحال و بختیاری با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی AFLP ارزیابی شد. ۵۵ درخت بلوط ایرانی متعلق به ۸ رویشگاه واقع در نقاط مختلف استان گزینش و از هر کدام تعدادی برگ تازه برای انجام ارزیابی‌های مولکولی جمع‌آوری شد. ۱۳ ترکیب آغازگری AFLP بهره‌گیری شده، در کل ۳۹۸ نوار ایجاد کردند که از بین آنها ۳۷۱ نوار (۹۲/۱ درصد)، چندشکل بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، ۰/۷۰ بود. ضریب تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های مورد ارزیابی از ۰/۳۲ تا ۰/۷۴ متغیر بود. گروه‌بندی نمونه‌ها بر پایه ضریب همانندی جاکارد و روش UPGMA، انجام شد. تجزیه واریانس مولکولی با و بدون گروه‌بندی ناحیه‌ای، انجام شد. بیشتر تنوع مشاهده شده مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها بود. پایین بودن واریانس بین جمعیت‌ها نشان‌دهنده این است که افراد جمعیت‌های مختلف از لحاظ ژنتیکی به هم نزدیک می‌باشند. درصد واریانس بین گروه‌ها ۰/۵۸٪ بود که نشان‌دهنده ناپیچ بودن تمایز بین جمعیت‌ها در محدوده جغرافیایی با فاصله ۱۰۰ کیلومتر، می‌باشد. در تجزیه تنوع ژنی بین و درون جمعیت‌های بلوط ایرانی نیز، بیشتر تنوع ژنی مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها بود. در کل پژوهش انجام‌شده نشان‌دهنده وجود سطح بالای تنوع ژنتیکی در درون جمعیت بلوط‌های ایرانی رویشگاه‌های مختلف در استان چهارمحال و بختیاری است.

واژه‌های کلیدی: بلوط ایرانی، تنوع ژنتیکی، AFLP

مقدمه

Kashani, 2003; ShuXia et al., 2005; Coelho Mariette et al., 2006; Hipp & Weber, 2008) et al., (2002) تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌های *Q. robur* و *petraea* را با روش AFLP و نشانگرهای ریزماهورهای مقایسه کردند و نتیجه گرفتند که تمایز ژنتیکی در هنگام بهره‌گیری از مارکرهای AFLP در مقایسه با ریزماهورها به‌طور عموم بالاتر است. Coart et al., (2002) تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌های *Q. petraea* و *Q. robur* را با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی AFLP مورد ارزیابی قرار دادند. در پژوهشی از AFLP برای تعیین تمایز و تنوع مولکولی در بین بلوط‌های قرمز کالیفرنیا بهره‌گیری شد. در این بررسی بیشترین قدرت تمایز AFLP مربوط به *Q. kelloggii* بود و در سه گونه دیگر قابلیت تشخیص، ضعیف بود (Dodd and Kashani, 2003). ShuXia et al., (2005) تنوع جمعیت‌های ۱۱۵ بلوط متعلق به هشت جمعیت *Q. senescens* را با بهره‌گیری از نشانگر AFLP ارزیابی کردند و تمایز جمعیتی بسیار واضحی را گزارش نمودند. Coelho et al., (2006) تنوع ژنتیکی دو گونه بلوط *Q. ilex* و *Q. suber* را با بهره‌گیری از نشانگر AFLP ارزیابی نمودند. در این بررسی از پنج ترکیب آغازگری بهره‌گیری شد و بیشترین میزان تفاوت‌های ژنتیکی در درون جمعیت‌ها به دست آمد. (Hipp & Weber, 2008) AFLP برای جداسازی ژنتیکی *Q. ellipsoidalis* و *Q. coccinea* بهره‌گیری کردند. این دو گونه از نظر مورفولوژی شبیه هم می‌باشند و قابل تشخیص نیستند اما نتیجه تجزیه داده‌های بدست آمده از AFLP نشان داد که از نظر ژنتیکی متمایز هستند و از هم جدا می‌شوند. با وجود اهمیت زیست‌شناختی و اقتصادی بلوط ایرانی در استان چهارمحال و بختیاری، بررسی خاصی در زمینه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها مشاهده نگردید.

این پژوهش به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های بلوط ایرانی با شرایط رویشگاهی متفاوت در استان چهارمحال و بختیاری با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی AFLP، در فاصله زمانی فروردین ۱۳۸۶ تا

استان چهارمحال و بختیاری با گستره ۱۶۵۳۲ کیلومتر مربع بین ۳۱ درجه و ۹ دقیقه تا ۳۲ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی و ۴۹ درجه و ۲۸ دقیقه تا ۵۱ درجه و ۲۵ دقیقه طول شرقی قرار دارد. این منطقه دارای یک درصد از کل گستره ایران زمین می‌باشد و در بستر سلسله جبال زاگرس واقع شده است. جنگل‌های این استان به صورت نوار باریکی به طول ۱۲۱ کیلومتر از شمال غرب تا جنوب غرب آن امتداد پیدا کرده و گونه گیاهی غالب در آنها، برودار یا بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindle.) است (Jahanbazy et al., 2002). ارزیابی تفاوت‌های ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های گونه‌های گیاهی دانش ما را درباره فرآیندهای زمینه ساز تنوع ژنتیکی افزایش می‌دهد و داده‌های مهمی را برای برنامه‌های اصلاحی و سازمان دادن برنامه‌ها برای دستیابی به منابع ژنتیکی فراهم می‌نماید (Bruschi et al., 2003). به‌طور معمول در درختان جنگلی و بویژه بلوط، مقادیر بالایی از تغییرات درون گونه‌ای در شاخص‌های ریختی دیده می‌شود که به‌طور عمده به علت سیستم آمیزشی دگرگشتی، جریان ژن بالا در بین توده‌ها و هیبریداسیون طبیعی بین گونه‌ای می‌باشد (Bruschi et al., 2003; Bacilieri et al., 1996; Spellenberg, 1995). به علت این تفاوت‌ها، تشخیص گونه‌ها و زیرگونه‌های بلوط بر پایه علائم فنوتیپی کاری دشوار می‌باشد، بنابراین بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای بلوط‌ها ضروری است.

روش AFLP در سال ۱۹۹۵ توسط Vos و همکاران ارائه شد و اساس آن تکثیر انتخابی برخی قطعه‌های برش‌یافته ژنومی با استفاده از PCR می‌باشد (Vos et al., 1995). ثابت شده است که AFLP یک نشانگر قوی برای ارزیابی تنوع و تفاوت‌های ژنتیکی در بین جمعیت‌های گیاهی می‌باشد (Coelho et al., 2006; Coart et al., 2002; Mariette et al., 2002). تاکنون چندین بررسی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بلوط با بهره‌گیری از روش AFLP انجام شده است (Coart et al., 2002; Dodd and al., 2002; Mariette et al., 2002).

بلوط ایرانی متعلق به ۸ منطقه جنگلی با شرایط رویشگاهی متفاوت استان چهارمحال و بختیاری شامل قلعه مدرسه، دره گرم شهنسوار، گردنه چهارطاق، تنگ کلوره و ارمند واقع در شهرستان لردگان، برهمرده و پل کتولا واقع در شهرستان اردل، گردنه چری، مورز، جاده مورز به چمن گلی، شیخ عالی و کیارس واقع در دهستان بازفت از شهرستان کوهرنگ و ذخیره گاه جنگلی شمس آباد بروجن در فروردین و اردیبهشت ۱۳۸۶ انجام شد. در جدول ۱ و شکل ۱ موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های مورد ارزیابی، مشخص شده است.

اردیبهشت ماه ۱۳۸۷ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد انجام شد.

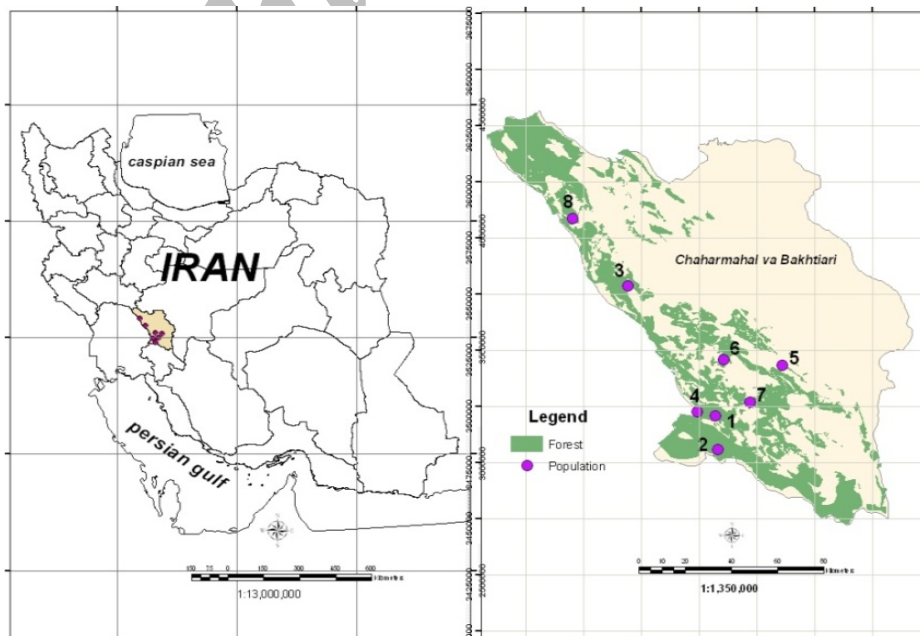
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

برای جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی در آغاز ارزیابی کاملی در زمینه شکل‌ها و تیپ‌های مختلف بلوط در جنگل‌های استان صورت گرفت و نمونه‌های درختی بر پایه تفاوت‌های مورفولوژیکی گزینش شدند. نمونه‌برداری از ۵۵ درخت

جدول ۱- مکان‌های جمع‌آوری نمونه‌های بلوط ایرانی

تعداد	نمونه‌های جمع‌آوری شده	منطقه جمع‌آوری	جمعیت
۵	Q1 - Q5	شهنسوار	۱
۱۹	Q6-Q7-Q8 Q24 - Q39	جاده قلعه مدرسه	۲
۵	Q10 - Q14	گردنه چری	۳
۵	Q49 - Q53	پل کتولا	۴
۴	Q9, Q54- - Q56	اردل و شمس‌آباد	۵
۴	Q45 - Q48	بره مرده	۶
۴	Q40 - Q43	ارمند	۷
۹	Q15 - Q23	دره بازفت و شیخ عالی	۸



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی مناطق جمع‌آوری نمونه‌های بلوط ایرانی در استان چهارمحال و بختیاری

عنوان ورودی برای تجزیه‌های آماری، مورد بهره‌گیری قرار گرفت. توان جداسازی هر یک از نشانگرهای AFLP با ارزیابی میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و مقادیر PIC برای هر جفت آغازگر بر پایه رابطه $PIC=1-\sum p_i^2$ (Powell et al., 1996) محاسبه شد. در این رابطه p_i برابر با فراوانی نوار i ام است. شاخص نشانگر بر اساس تعداد نوارهای چندشکل در هر ترکیب آغازگر محاسبه شد. در مورد نشانگر AFLP هر واحد سنجش معادل یک ترکیب آغازگر است. برای تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1998) بهره‌گیری شد. ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه و آزمون منتل (Mantel, 1967) برای ارزیابی همبستگی بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی بر پایه ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده انجام شد. در نهایت دندروگرام بدست آمده از گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA تهیه شد. در این بررسی گروه‌بندی به روش بوت استرپ نیز با بهره‌گیری از نرم‌افزار Treecon Ver.1.03 (Van de Peer & Wachter, 1994) انجام شد. این روش یکی از روش‌های نمونه‌برداری مجدد می‌باشد که کاربرد زیادی در سیستم‌های نشانگرهای مولکولی برای تحلیل تنوع ژنتیکی دارد. روش بوت استرپ به طور مؤثر برای برآورد معنی‌دار بودن آماری شاخه‌های درونی یک دندروگرام بهره‌گیری می‌شود (Felsenstein, 1985). اگر شاخه‌های درونی دندروگرام دارای بیش از ۷۰ درصد بوت استرپ باشند، می‌توان نتیجه گرفت که چنین گروه‌بندی به احتمال ۹۵٪ درست می‌باشد (Hillis & Bull, 1993). سلسله مراتب تنوع ژنی شامل تنوع ژنی کل (Ht)، تنوع ژنی درون جمعیت‌ها (Hw) و تنوع بین جمعیت‌ها (Hb) می‌باشد. به منظور برآورد مشخصه‌های ژنتیک جمعیت می‌توان نسبت‌های ژنوتیپی را با بهره‌گیری از معادله هاردی-وینبرگ محاسبه کرد یا ضریب خویشاوندی (Fis) را از دیگر بررسی‌های انجام شده برای محاسبه فراوانی آلی با بهره‌گیری از نشانگرهای هم‌بارز به دست آورد (Vekemans et al., 2002). تجزیه تنوع ژنی بین و درون جمعیت‌های بلوط ایرانی با بهره‌گیری از

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA و انگشت‌نگاری AFLP

در این پژوهش استخراج DNA از ۱۰۰-۱۶۰ میلی‌گرم برگ تازه بلوط با بهره‌گیری از کیت شرکت کیاژن (Dneasy mini Kit) و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام گرفت. نمونه‌های DNA در دمای 4°C نگهداری شدند. غلظت DNA استخراج شده توسط بیوفتومتر (اپندرف) اندازه‌گیری شد. کیفیت DNA با الکتروفورز ژل آگاروز مورد ارزیابی قرار گرفت. روش AFLP بر پایه روش Vos et al., (1995) با تغییر جزئی انجام شد. برش DNA ژنومی توسط ترکیب دو آنزیم *PstI* یا *EcoRI* با توالی برش شش بازی و *TruII* با توالی برش چهار بازی برای برش DNA ژنومی انجام شد. واکنش برش در دمای 37°C و به مدت شش ساعت انجام پذیرفت. اجزای واکنش برش در حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر دارای ۳۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، $1 \times$ بافر Tungo و $2/5$ واحد از هر کدام آنزیم‌های *PstI* یا *EcoRI* و آنزیم *TruII* تنظیم شد. این آنزیم‌ها و کلیه آغازگرها، آدپتورها و بافرهای مورد بهره‌گیری در واکنش‌های AFLP از شرکت Fermentas تهیه شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر مدل Mastercycler – gradient شرکت اپندورف و برنامه PCR برای تکثیر پیش انتخابی و انتخابی بر پایه روش (Sorkheh et al., 2007) انجام شد. برای افزایش وضوح نوارها و شفاف‌تر شدن زمینه ژل، دی‌متیل سولفوکساید با غلظت ۱۰ درصد در حضور بافر سولفات آمونیوم به اجزای واکنش تکثیر انتخابی اضافه شد.

تجزیه‌های آماری

در ارزیابی نشانگر AFLP پس از ثبت اطلاعات ژل به دست آمده، برای هر جفت آغازگر امتیازدهی شد. هر نوار چندشکل به عنوان یک نشانگر در نظر گرفته شد و الگوی نواری به صورت حضور نوار (۱) و عدم حضور نوار (۰) امتیازبندی شد. با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel متغیرهای مربوط به هر آغازگر (نوارها) در ردیف‌ها و نام ژنوتیپ‌ها در ستون‌ها قرار گرفت. ماتریس صفر و یک بدست آمده به

تعداد نوار مربوط به جفت آغازگر E-ACA+ T-GCT با ۴۵ نوار چندشکل و کمترین تعداد نوار مربوط به جفت آغازگر P-ACG+T-GCA با ۱۳ نوار چند شکل بود. میانگین درصد چندشکلی برابر با ۹۲/۱ درصد و میانگین تعداد نوارهای چندشکل به ازای هر واحد سنجش برابر با ۲۸/۵ بود. در مورد نشانگر AFLP هر واحد سنجش معادل یک ترکیب آغازگر است. بیشترین و کمترین میزان PIC، به ترتیب ۰/۸۶ و ۰/۴۷ و مربوط به جفت آغازگرهای P-ACG+T-GCA و P-AAC+T-GTC و میانگین PIC ۰/۷ بود. بالا بودن میزان PIC نشان‌دهنده سطح بالای تمایز می‌باشد. شاخص نشانگر بر پایه تعداد نوارهای چندشکل در هر ترکیب آغازگری محاسبه شد که از ۲۶/۳ تا ۸۶ متغیر بود. بیشترین میزان شاخص نشانگر ۸۶ و مربوط به ترکیب آغازگری P-AAC+T-GTC بود که نشان‌دهنده توان جداسازی بالای این ترکیب در مقایسه با دیگر ترکیب‌های آغازگر می‌باشد.

نرم‌افزار Aflpsurv V.1.0 (Vekemans, 2001) انجام شد. در این روش فراوانی آلی بر پایه فراوانی‌های مشاهده شده نوارها در مکان‌های AFLP با بهره‌گیری از روش بیزی برای گونه‌های دیپلوئید (Zhivotovsky, 1999) محاسبه می‌شود. این فراوانی‌های آلی به عنوان ورودی برای تجزیه تنوع ژنی بین و درون جمعیت‌ها با بهره‌گیری از روش Lynch & Milligan (1994) بهره‌گیری شد. تقسیم‌بندی سلسله مراتب واریانس مولکولی (AMOVA)، بین و درون جمعیت‌های مورد بررسی، (Excoffier et al., 1992) انجام شد. در تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی، سه ضریب Φ (همانند ضریب F رایت)، شامل Φ_{st} ، Φ_{sc} ، Φ_{ct} به ترتیب همبستگی بین نشانگرهای AFLP بدست آمده از بین گروه‌ها، بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها را نشان می‌دهد. بر اساس مدل Wright (1951) می‌توان از میزان Φ_{st} برای برآورد تعداد افراد مهاجر با بهره‌گیری از معادله Crow & Aoki (1984) بهره‌گیری نمود.
$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{\Phi_{st}} - 1\right)}{4\alpha}$$

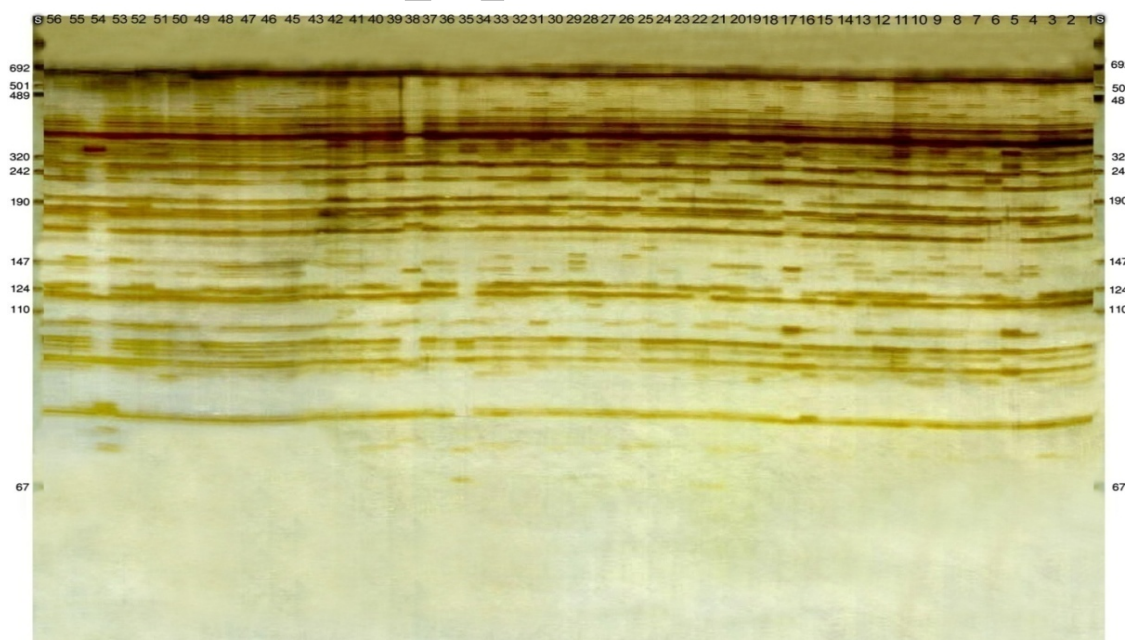
$$\alpha = \left(\frac{n}{n-1}\right)^2$$
 (n = تعداد کل جمعیت‌ها)

بحث و نتیجه‌گیری

سیزده ترکیب آغازگری AFLP شامل شش ترکیب آغازگری *TruII-EcoRI* و هفت ترکیب آغازگری *TruII-PstI* برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای نمونه‌های مورد بررسی به کار برده شد. این ترکیب‌های آغازگری چندشکلی مناسبی تولید کردند و تکرارپذیری بالایی داشتند. نوارهای بدست آمده از ترکیب‌های آغازگری *TruII-EcoRI* در سرتاسر ژل توزیع یکنواخت‌تری نسبت به نوارهای بدست آمده از ترکیب‌های آغازگری *TruII-PstI* داشتند. شکل ۲ الگوی چندشکلی بدست آمده از ترکیب آغازگرهای E-ACC+T-GGG را نشان می‌دهد. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکل برای هر جفت آغازگر، به همراه نوع آغازگرها و تعداد نوارهای چندشکل در جدول ۲ نشان داده شده است. در مجموع ۳۹۸ نوار ایجاد شد که از بین آنها ۳۷۱ نوار، چندشکل بودند. بیشترین

جدول ۲- تعداد نوارها، درصد چندشکلی، محتوای داده‌های چندشکلی و شاخص نشانگر برای ترکیب‌های آغازگری مورد بررسی

شاخص نشانگر	(PIC)	در صد چند شکلی	تعداد نوار چند شکل	تعداد کل نوارها	جفت آغازگر اختصاصی
۵۵/۴	۰/۶۷	۸۲/۷	۲۴	۲۹	P-ACC +T-GCT
۶۰	۰/۶	۱۰۰	۱۷	۱۷	P-ACG+T-GAC
۲۶/۳	۰/۴۷	۵۶	۱۳	۲۳	P-ACG+T-GCA
۷۷	۰/۷۷	۱۰۰	۴۲	۴۲	P-ACG+T-GCT
۶۵/۲۵	۰/۷۵	۸۷	۲۷	۳۱	P-ACG+T-GTC
۸۲	۰/۸۲	۱۰۰	۲۰	۲۰	P-ACC+T-GTC
۸۶	۰/۸۶	۱۰۰	۲۳	۲۳	P-AAC+T-GTC
۷۱/۲۵	۰/۷۵	۹۵	۲۰	۲۱	E-ACC+T-GCA
۴۸/۵	۰/۵۷	۸۵	۱۷	۲۰	E-ACC+T-GGG
۶۶/۶	۰/۶۸	۹۸	۴۵	۴۶	E-ACA+T-GCT
۷۶	۰/۷۶	۱۰۰	۳۶	۳۶	E-ACC+T-GCT
۷۰/۷	۰/۷۶	۹۳	۴۲	۴۵	E-ACC+T-GAC
۶۲	۰/۶۲	۱۰۰	۴۵	۴۵	E-ACA+T-GAC
۶۵/۱۴	۰/۷	۹۲/۱	۲۸/۵	۳۰/۶۱	میانگین
P = <i>Pst</i> I primer + 3, E = <i>Eco</i> RI primer + 3, T = <i>Tru</i> I primer + 3					

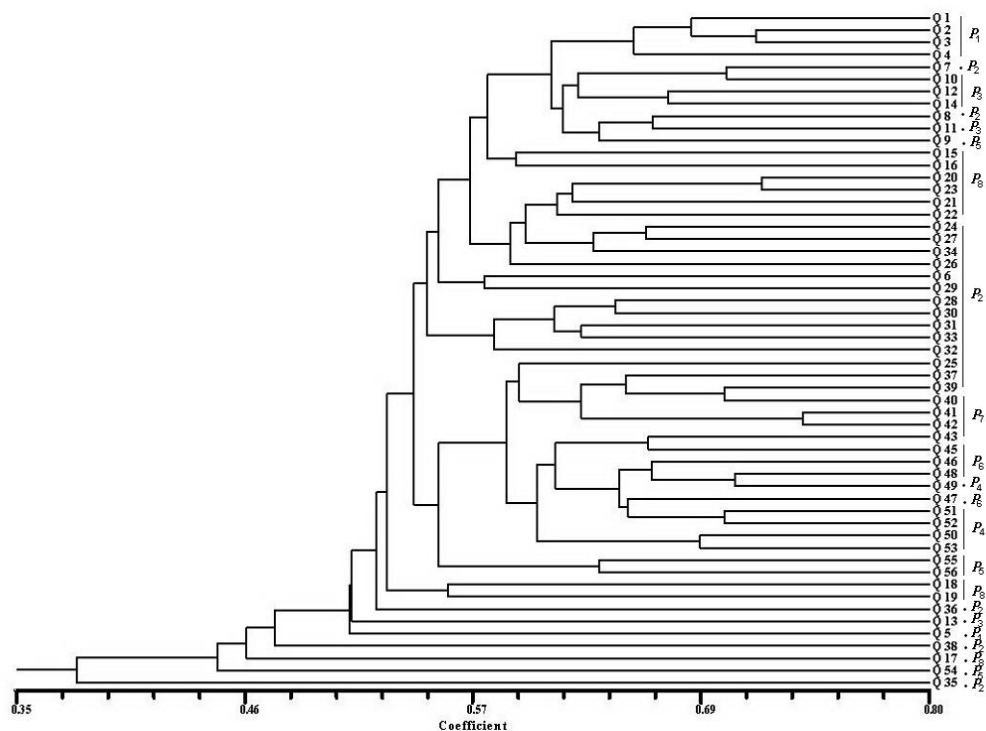


شکل ۲- الگوی الکتروفورز بدست آمده از ترکیب آغازگری E-ACC+ T-GGG

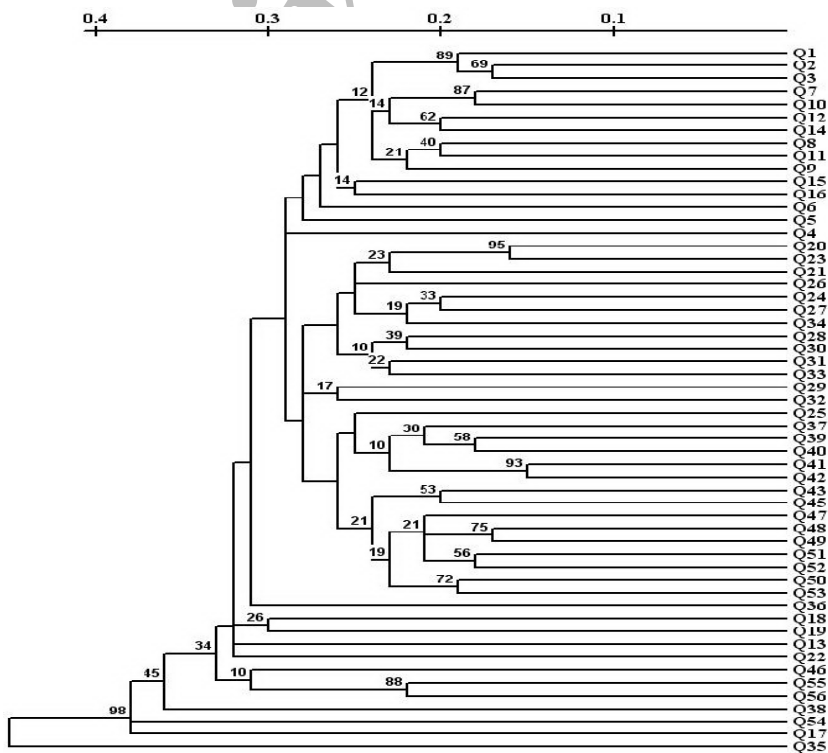
بازفت)، ۳۸ از جمعیت ۲ (قلعه مدرسه) و ۱۳ از جمعیت ۳ (گردنه چری)، به صورت جداگانه در ضریب‌های تشابه مختلف جداسازی شدند. همانندی این حالت در پژوهشی دیده شد که Dodd and Kashani انجام دادند، در آزمایش مذکور که ۲۵ نمونه منفرد در دسته‌های مربوط به جمعیت خود قرار نگرفتند و به صورت منفرد در ضریب‌های تشابه متفاوتی جدا شدند. (Dodd and Kashani, 2003). در مجموع با توجه به دندروگرام متعلق به مجموعه نمونه‌های مورد بررسی مشخص می‌شود که یکنواختی کمی در شکل زیرگروه‌ها و کل کلاستر وجود دارد و تنوع بالای موجود در مجموعه منابع ژنتیکی (ژرمپلاسم) بلوط برودار را می‌توان با بهره‌گیری از این نمونه‌ها به سادگی تشخیص داد.

در این پژوهش گروه‌بندی به روش بوت‌استراپ با بهره‌گیری از نرم‌افزار Treecon ver. 1.03 انجام شد. شکل ۴ گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی بلوط را بر پایه ضریب فاصله‌نی و به روش بوت‌استراپ، نشان می‌دهد. اعداد روی دندروگرام، پایداری گروه‌های برآورد شده به روش بوت‌استراپ را نشان می‌دهند. این شکل نشان می‌دهد که قسمت عمده شباهت و تفاوت‌های به دست آمده بر پایه تجزیه خوشه‌ای در نمونه‌های مورد بررسی، با دقت مناسبی توسط روش بوت‌استراپ تأیید شده است. به عنوان مثال با این روش، تفاوت زیاد نمونه ۳۵ از دیگر نمونه‌ها و شباهت نمونه‌های ۴۱ و ۴۲ به میزان بیش از ۹۵ درصد تأیید می‌شود.

برای تجزیه خوشه‌ای در آغاز آزمون منتل (Mantel, 1967) برای ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده بر پایه روش خوشه‌بندی UPGMA انجام شد. بر پایه نتایج به دست آمده، ضریب تشابه جاکارد دارای آماره t منتل برابر با $۸/۵۴$ و بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک ($۰/۸۵$) بود که نشان‌دهنده برازش خوب و همبستگی بالا (Mohammadi & Prasanna, 2003) بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی بر پایه ضریب تشابه جاکارد می‌باشد. برای تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار ver NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1998) بهره‌گیری شد. بر پایه ماتریس تشابه، ضریب تشابه ژنتیکی بین $۰/۳۲$ و $۰/۷۴$ متغیر بود. بیشترین همسانی ژنتیکی بین دو نمونه ۴۱ و ۴۲ با ضریب تشابه ژنتیکی $۰/۷۴$ بود که هر دو متعلق به جمعیت ۷ می‌باشند و از منطقه ارمنند جمع‌آوری شده‌اند. کمترین شباهت بین دو نمونه ۴ متعلق به جمعیت ۱ (شاهسوار) و ۳۵ از جمعیت ۲ (قلعه مدرسه) با ضریب تشابه $۰/۳۲$ بود. دندروگرام بدست آمده از گروه بندی نمونه‌ها بر پایه ضریب جاکارد و روش UPGMA، در شکل ۳ آورده شده است. بر پایه این دندروگرام به جز ۷ نمونه که به صورت جداگانه و غیر مرتبط با دیگر نمونه‌های جمعیت مربوطه جداسازی شدند، نمونه‌های هر جمعیت در ضرایب شباهت مختلف، در گروه‌ها یا زیر گروه‌های یکسان یا نزدیک به هم قرار گرفتند. در چند مورد از این زیرگروه‌ها، یک یا دو نمونه از جمعیت‌های متفاوت نیز واقع شدند. در توجیه تمایز این نمونه‌ها موارد زیر قابل یادآوری است: Emtahany et al., (2006) احتمال وجود زیرگونه‌ها و یا حتی گونه‌های دیگری در توده‌های جنگلی برودار را مطرح کرده‌اند و می‌توان یکی از دلایل تنوع ژنتیکی به دست آمده در این بررسی را تعلق نمونه‌ها به زیرگونه‌های متفاوت دانست. از دیگر دلایل این تنوع، هیبرید بودن بعضی از نمونه‌ها می‌باشد. در واقع یکی از دلایل عمده تنوع زیاد درون گونه‌ای بلوط‌ها، هیبریداسیون طبیعی بین گونه‌ای است (Bacilieri et al., 1996). در این بررسی بعضی از افراد از جمله نمونه ۳۵ از جمعیت ۲ (قلعه مدرسه)، ۵۴ از جمعیت ۵ (اردل)، ۱۷ از جمعیت ۸ (دره



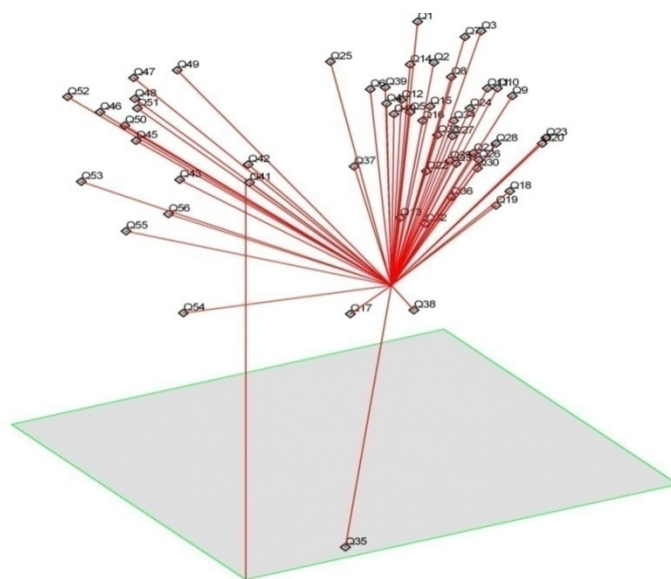
شکل ۳- دندروگرام بدست آمده از گروه بندی ۵۵ نمونه بلوط ایرانی با بهره گیری از الگوریتم $P_1 - P_8$. UPGMA. جمعیت های مربوط به پایه های بلوط را مشخص می کند.



شکل ۴- گروه بندی نمونه های مورد بررسی بر پایه ضریب نی به روش بوت استرپ

نمودار سه بعدی پراکنش افراد در پیرامون مؤلفه‌های اصلی ابتدایی نشان داده شده است. در این نمودار دیده می‌شود که پراکندگی افراد در پیرامون سه مؤلفه اول بیشتر است. چگونگی تجمع یا پراکندگی افراد در این نمودار، نشان‌دهنده مجموعه‌ای از افراد است که از نظر ژنتیکی مشابه یا متفاوت هستند (Mohammadi and Prasanna, 2003).

در این بررسی، تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر پایه ماتریس شباهت جاکارد و با بهره‌گیری از نرم‌افزار NTSYS 2.02 (Rohlf, 1998) انجام گرفت که بر پایه آن نخستین مؤلفه که بزرگ‌ترین مؤلفه به‌شمار می‌رود، ۶/۹۲ درصد از تنوع کل را توجیه نموده است. ۳۵/۴۳ درصد از تغییرات با ۱۰ مؤلفه اول و ۷۳/۶۳ درصد تغییرات توسط ۳۰ مؤلفه اول توجیه می‌شود. در شکل ۵



شکل ۵- نمایش سه بعدی تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر پایه ضریب تشابه جاکارد

می‌گیریم که تمایز جمعیت‌ها در محدوده جغرافیایی به فاصله ۱۰۰ کیلومتر، بسیار ناچیز می‌باشد. درصد واریانس بین جمعیت‌ها ۱۱/۶۱ درصد و درون جمعیت‌ها ۸۷/۸۱ درصد می‌باشد. درصد پایین تمایز بین جمعیت‌ها نشان می‌دهد که نمونه‌های مربوط به ۸ جمعیت مورد بررسی از تنوع بالایی برخوردارند و از نظر متنوع بودن نمونه‌های موجود در جمعیت، تفاوت زیادی بین جمعیت‌های این مناطق وجود ندارد. در تجزیه واریانس مولکولی بدون احتساب گروه‌بندی ناحیه‌ای نیز بیشتر تنوع دیده شده مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده آن است که تنوع درون جمعیت‌ها از تنوع بین جمعیت‌ها بیشتر است که این نتیجه در چندین بررسی پیشین نیز گزارش شده است و تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های گونه‌های ویژه بلوط بیشتر از تنوع بین

تجزیه واریانس مولکولی به روش AMOVA (Excoffier et al., 1992) با بهره‌گیری از نرم‌افزار Arlequin ver 2.000 (Schneider et al., 2001) و بر پایه داده‌های نشانگر AFLP در دو حالت انجام شد. در حالت اول همه جمعیت‌ها بدون گروه‌بندی بر پایه منطقه جغرافیایی ارزیابی شدند و در حالت دوم دو ناحیه بر پایه فاصله جغرافیایی جمعیت‌ها مشخص شد که جمعیت‌های ۳ و ۸ (بازفت و گردنه‌چری) در یک گروه و دیگر جمعیت‌ها در گروه دوم قرار گرفتند. بیشترین فاصله بین جمعیت‌ها در این بررسی حدود ۱۰۰ کیلومتر می‌باشد. نتایج بدست آمده در جدول ۳ آورده شده است. در تجزیه واریانس مولکولی با احتساب گروه‌بندی ناحیه‌ای، درصد واریانس بین گروه‌ها ۰/۵۸ درصد بود که از نظر آماری معنی‌دار نیست (P value= ۰/۳۳). با توجه به این مورد نتیجه

(al., 2006; Mariette et al., 2002

Bruschi, 2003; Coelho et) جمعیت‌ها بوده است

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی داده‌های AFLP به دست آمده از ۵۵ نمونه بلوط ایرانی جمع‌آوری شده از ۸ جمعیت با و بدون گروه‌بندی ناحیه‌ای

P value	Φ value	درصد واریانس	واریانس اجزا	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییر
بدون گروه‌بندی ناحیه‌ای						
<۰/۰۰۱	Fst = ۰/۱۱۹	۱۱/۹۲	۵/۹۲۹	۵۷۱/۹۰۹	۷	بین جمعیت‌ها
<۰/۰۰۱		۸۸/۰۸	۴۳/۸۱۳	۲۰۵۹/۲۳۷	۴۷	درون جمعیت‌ها
		۱۰۰	۴۹/۷۴۲	۲۶۳۱/۱۴۵	۵۴	کل
دو گروه شامل گروه ۱ (جمعیت بازفت و گردنه چری) و گروه ۲ (دیگر جمعیت‌ها)						
۰/۳۳	Fct = ۰/۰۰۶	۰/۵۸	۰/۲۸۹	۹۹/۰۶۵	۱	بین گروه‌ها
<۰/۰۰۱	Fsc = ۰/۱۱۷	۱۱/۶۱	۵/۷۹۵	۴۷۲/۸۴۴	۶	بین جمعیت‌های درون گروه‌ها
<۰/۰۰۱	Fst = ۰/۱۲۲	۸۷/۸۱	۴۳/۸۱۳	۲۰۵۹/۲۳۶	۴۷	درون جمعیت‌ها
		۱۰۰	۴۹/۸۹۷	۲۶۳۱/۱۴۵	۵۴	کل

تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها می‌شود (Alfonso-Corado et al., 2004)، که این مورد درباره این بررسی نیز صدق می‌کند. در این بررسی تجزیه تنوع ژنی بین و درون جمعیت‌های بلوط ایرانی با بهره‌گیری از نرم‌افزار Aflpsurv V.1.0 (Vekmans, 2001) انجام شد. تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد فراوانی‌های آللی بلوط ایرانی گزارش نشده است، لذا میزان میانگین Fis (۰/۱۵) گزارش شده است که در دیگر جمعیت‌های بلوط و در بررسی‌های پیشین (Coelho et al., 2006) محاسبه شده است، در نظر گرفته شد. تجزیه با Fis صفر و ۰/۱ و ۰/۲ تکرار شد. نتایج این تجزیه و تحلیل در جدول ۴ خلاصه شده است. همان‌گونه که در این جدول دیده می‌شود، بیشتر تنوع ژنی مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها می‌باشد و نسبت تنوع درون جمعیت‌ها به تنوع کل (Hw/Ht) برابر ۰/۹۱ است. نسبت کمی از تفاوت‌های ژنتیکی مربوط به تفاوت بین جمعیت‌ها می‌باشد، اگر چه این میزان تفاوت نیز معنی‌دار ($Fst = ۰/۰۷۳۳$ و $P < ۰/۰۰۰۱$) است. همانند این نتیجه در بررسی‌های مختلفی به دست آمده است. در بررسی

در بلوط‌ها به علت ویژگی دگر گرده افشانی، گل‌ها تمایل به دریافت مقادیر زیادی گرده از دیگر پایه‌های بلوط دارند و گرده افشانی با باد انجام می‌شود. بنابراین گرده‌ها فاصله زیادی را طی می‌کنند که باعث یک جریان ژنی گسترده می‌گردد. پراکنش گرده‌ها با باد در مسافت‌های طولانی و انتقال جام با حیوانات توجیه‌کننده سطح پایین تمایز بین جمعیت‌ها می‌باشد (Alfonso-Corado et al., 2004). در این بررسی تجزیه مولکولی لوکوس به لوکوس انجام شد و میزان میانگین ۰/۱۲ برای Φst به دست آمد که از آن برای محاسبه شمار افراد مهاجر ($Nm = \text{Number of migrants}$) بر پایه معادله Crow and Aoki بهره‌گیری شد. در صورتی که میزان Nm بیشتر از ۱ باشد، میزان تبادل ژنی بین جمعیت‌ها برای جلوگیری از رانده‌شدگی ژنتیکی و تمایز بین جمعیت‌ها کفایت می‌کند (Wright, 1951; Slatkin, 1994). میزان Nm در این بررسی، ۱/۴ به دست آمد که با سطح پایین تمایز بین جمعیت‌ها همخوانی دارد. از سوی دیگر اضافه نمودن ژن‌های جدید به جمعیت‌ها توسط جریان ژنی بین جمعیت‌ها باعث ایجاد

پژوهش انجام شده وجود سطح بالای تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌های بلوط ایرانی در استان چهارمحال و بختیاری را ثابت نمود. تنوع ژنتیکی قابل توجه بلوط ایرانی، کم بودن تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها و توزیع گسترده این گونه در جنگل‌های زاگرس نکات بسیار مهمی هستند که باید در برنامه‌های احیا و نگهداری جنگل‌ها در نظر گرفته شوند. این برنامه‌ها باید مجموعه‌های بذر را برای احیای جنگل‌ها و تهیه ذخایر ژرم‌پلاس، فراهم کنند.

سیاسگزاری

با قدردانی بسیار از سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استانداری استان چهارمحال و بختیاری که هزینه مالی این پژوهش را تأمین نمود.

(Coart et al., 2002)، نسبت Hw/Ht ۰/۹۷ بوده است. (Kremer et al., 1991) تجزیه تنوع ژنی را با بهره‌گیری از نشانگر ایزوزایم انجام داد و ۹۱ درصد تنوع ژنی را مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها گزارش نمود. مشخص شده‌است که در گونه‌های جنگلی دگرگشن تنوع درون جمعیت‌ها بیش از تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد (Coart et al., 2002). تمایز کم بین جمعیت‌های بلوط وابسته به ویژگی دگرگشنی گونه‌ها و مکانیسم انتشار گرده است که منجر به افزایش جریان ژنی و افزایش تجانس آلل‌ها در بین جمعیت‌ها می‌شود (Coelho et al., 2006). در این بررسی نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس مولکولی و تجزیه تنوع ژنی، یکسان و در هر دو مورد تنوع درون جمعیت‌ها بسیار بیشتر از تنوع بین جمعیت‌های بلوط ایرانی است.

جدول ۴- نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های برودار با بهره‌گیری از نشانگرهای AFLP

P-value	Upper 99% Fst	Lower 99% Fst	Fst	SE (Hb)	Hb	SE (Hw)	Hw	Ht	Fis	n	جمعیت
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۸۲	۰	۰/۰۷۳۳	۰/۰۰۳۰۲۱	۰/۰۲۰۳	۰/۰۱۱۵۰۷	۰/۲۵۶۲	۰/۲۷۶۴	۰	۸	بلوط ایرانی
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۱۷	۰	۰/۰۸۷۹	۰/۰۰۳۱۹۴	۰/۰۲۳۵	۰/۰۱۰۵۹۳	۰/۲۴۴۱	۰/۲۶۷۶	۰/۱	۸	
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۲۳	۰	۰/۰۸۹۲	۰/۰۰۳۳۹۸	۰/۰۲۳۹	۰/۰۱۰۹۷۳	۰/۲۴۴۹	۰/۲۶۷۸	۰/۱۵	۸	
<۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۵۶	۰	۰/۰۹۲۵	۰/۰۰۳۴۵۶	۰/۰۲۴۸	۰/۰۱۱۱۰۴	۰/۲۴۳۰	۰/۲۶۷۸	۰/۲	۸	

همه محاسبات با بهره‌گیری از برنامه Aflp surv 1 (Vekemans, ۲۰۰۱) انجام شده است. Ht = تنوع کل، Hw = میانگین تنوع درون جمعیت‌ها، Hb = میانگین تنوع بین جمعیت‌ها، Fst = تفاوت بین جمعیت‌ها، Lower 99% و Upper 99% مقادیر Fst که بیانگر نبود تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها در توزیع تصادفی ۹۹ درصد بر پایه ۱۰۰۰ جای‌گذاری تصادفی هستند.

منابع

- Alfonso-Corado, C., Esteban-Jimenez, R., Clark-Tapia, R., Pinero, D., Campos, J., and Mendosa, A. 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae). *Evolutionary Ecology*. 18:585-599.
- Bacilieri, R., Ducouso, A., Petit, R.J., and Kremer, A. 1996. Mating system and asymmetric hybridization in a mixed stand of European oaks. *Evolution*. 50:900-908.
- Bruschi, P., Venderamin, G.G., Bussotti, F., and Grossoni, P. 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus Petraea*. *Annals of Botany*. 91:707-716.
- Coart, E., Lamote, V., De loose, M., Bochstaele, E., Lootens, P., and Roldon-Ruiz, I. 2002. AFLP markers demonstrate local genetic differentiation between two indigenous oak species in Flemish populations. *Theoretical and Applied Genetics*. 105:431-439.
- Coelho, A.C., Lima, M.B., Neves, D., and Cravador, A. 2006. Genetic Diversity of two evergreen Oaks [*Quercus suber* (L.) and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.)] in Portugal using AFLP Markers. *Silvae Genetica*. 55. 3:105-118.
- Crow, J.F., and Aoki, K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 81:6073-6077.
- Dodd, R.S., and Kashani, N. 2003. Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section *Lobatae*). *Theoretical and Applied Genetics*. 107:884-892.
- Emtahany, M.H., Hakimi Maibody, M.H., Pourshafeia Zangeneh, H., 2006. Study on diversity of woody species and Galls in Northern Zagrosian forest. *Forest and Rangeland*. Vol. 71: 60-68
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479-491.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:789-791.
- Hillis, D.M., and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42:182-192.
- Hipp, A.L., and Weber, J.A. 2008. Taxonomy of Hill's Oak (*Quercus ellipsoidalis*: Fagaceae): Evidence from AFLP Data. *Systematic Botany*. 33. 1:148-158.
- Jahanbazy, H., Jalili A., Talebi, M., 2002. Investigation of forest ecosystems in Chaharmahal va Bakhtiari province. Research report, Research Center of Agricultural and Natural Resources of Chaharmahal va Bakhtiari, Shahrekord, Iran.
- Kremer, A., Petit, R.J., Zanetto, A., Fougère, V., Ducouso, A., Wagner, D., Chauvin, C. (1991). Nuclear and organelle gene diversity in *Quercus robur* and *Quercus petraea*. In: Genetic variation in European populations of forest trees Müller-Starck G, Ziehe M (eds) Sauerländers Verlag, Frankfurt am Main, pp 141-166.
- Lynch, M., and Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3:91-99.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27:209-220.

- Mariette, S., Cottrell, J., Csaikl, U.M., Goikoechea, P.A., Lowe, J., Andam, B.C., Barreneche, T., Streiff, R., Burg, K., Tabbener, H., and Kremer, A. 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*. 51:72–79.
- Mohammadi, S.A., and Prasanna, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*. 43:1235-1248.
- Muller, U.G., and Wolfenbager, L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*. 14:389-393.
- Powell, W., Machray, G.C., and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*. 1:215-222.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter software, Setauket. New York.
- Schneider, S., Roessli, D., and Excoffier, L. 2001. Arlequin: A software for population genetics data analysis, ver 2.000. Genetics and Biometry Lab. Dept of Anthropology and Ecology. University of Geneva. Geneva.
- ShuXia, W., YunQian, H., and ZheKun, Z. 2005. AFLP analysis of genetic variation and structure of natural populations of *Quercus senescens*. *Acta Botanica Yunnanica*. 27. 1:49-58.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. *In: Real L. (ed.) Ecological Genetics*. Princeton University press. 3-17.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T.M., Epperson, B.K., Martinez-Gomez, P., and Asadi. E. 2007. Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its relationships with agronomic traits. *Euphytica*. 156:327-344.
- Spellenberg, R. 1995. On the hybrid nature of *Quercus basaseachicensis* (Fagaceae, sect *Quercus*). *Sida*. 16:427–437.
- Van de Peer, Y., and De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: as software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications In The Biosciences*. 19:569-570.
- Vekemans, X. 2001. AFLPsurv V.1.0. A software for genetic diversity analysis with AFLP population data, distributed by the author, xvekema@ulb.ac.be, Université Libre de Bruxelles.
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M. and Roldán-Ruiz, I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*. 11:139–151.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M.D., Theovan, L., Hornes, M., Frijers, A., pot, J., Pleman, J., Kalper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*. 23:4407-4414.
- WenYing, L., WanChun, G., and ShiLiang, Z. 2003. AFLP analysis on genetic diversity of *Quercus mongolica* populations. *Scientia Silvae Sinicae*. 39. 5:29-36.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.
- Zhivotovsky, L.A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*. 8:907–913.

Study of Genetic Variation of *Quercus brantii* in Chaharmahal va Bakhtiary Province using AFLP Molecular Markers

Sh. Mashayekhi¹, B. Shiran^{*2}, H. Jahanbazi³, S. Houshmand⁴, A. Soltani⁴ and K. Sorkheh⁵

¹MSc. Graduate, Shahrkord University, Shahrkord, I.R. Iran

² Associate Professor, Shahrkord University, Shahrkord, I.R. Iran

³ Scientific Member, Agriculture and Natural Resources Research Center of Chaharmahal va Bakhtiary, Shahrkord, I.R. Iran

⁴ Assistant Professor, Shahrkord University, Shahrkord, I.R. Iran

⁵ Ph.D. Student, Shahrkord University, Shahrkord, I.R. Iran

(Received: 12 May 2009, Accepted: 03 March 2010)

Abstract

The genetic variation of *Quercus brantii* populations in Chaharmahal va Bakhtiary province was evaluated using AFLP molecular markers. Fifty-five trees of *Q. brantii* belonging to eight populations distributed in different regions of Chaharmahal va Bakhtiary province, were sampled. Young leaves were collected from each tree and used for molecular analysis. Thirteen selective primer pairs were produced a total of 398 AFLP fragments, out of which 371 (92.1%), were polymorphic. The mean of Polymorphism Information Content was 0.7. The coefficients of genetic similarity vary from 0.32 to 0.74. Similarity matrices were submitted to cluster analysis by UPGMA method. AFLP diversity among and within populations have been analyzed for eight populations of *Q. brantii* with and without regional structure. Analysis of molecular variance showed that most genetic variation was comprised within populations. A small proportion of the total variation was assigned to differences among populations denoting little differentiation of populations in this study. 0.58% of the genetic variance was attributed to differences among regions denoting little differentiation of populations over a range of 100 km. The vast majority of variation present in the dataset was attributed to the within population level. Finally, we found a high level of genetic diversity within *Quercus brantii* populations in Chaharmahal va Bakhtiary province.

Keywords: *Quercus brantii*, Genetic diversity, AFLP, Iran