

بررسی قرابت ژنتیکی توس (*Betula pendula*) ایران با استفاده از نشانگر کلروپلاستی *trnH-psbA*

Genetic affinity of *Betula pendula* from Iran using *trnH-psbA* chloroplast marker

حمید بینا^۱، حامد یوسفزاده^{۱*}، محمد اسماعیل پور^۲، امید اسماعیلزاده^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیاران، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار، دانشگاه تبریز

Bina H¹, Yousefzadeh H^{*1}, Esmaelpoor M², Esmailzadeh O¹

1. MSc Student, Assistant Professors, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat
Modares

2. Assistant Professor, Tabriz University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.yousefzadeh@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

چکیده

توس یکی از قدیمی ترین درختان به جای مانده در جنگل های هیرکانی است و از نظر حفاظت ذخایر ژنتیکی در گروه گیاهان کم گسترده، کم یاب و در معرض خطر انقراض قرار دارد. دورگه ای شدن و پلی پلویدی در جنس توس سبب ایجاد شباهت و اختلاف نظر در شناسایی دقیق تعداد گونه های این جنس در دنیا شد. این تحقیق با بکارگیری نشانگر بین ژنی *trnH-psbA* به بررسی جایگاه رده بندی و قرابت ژنتیکی توس ایران با سایر گونه های توس در دنیا پرداخته است. برای این منظور ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* به روش PCR تکثیر شد. تحلیل مقایسه ای از تعیین توالی محصولات PCR پنج رویشگاه با ۱۷ توالی ثبت شده این ناحیه از دیگر گونه های توس در بانک ژنی صورت گرفت. نتایج درخت فیلوژنی به روش حداکثر شباهت، نشان داد توس ها در سه کلاد A، B و C تقسیم شدند که نمونه های ایران همگی در کلاد A قرار گرفتند. نمونه توس شهرستانک در زیر کلاد Aa و چهار نمونه دیگر توس های مورد مطالعه در ایران واقع در سیاه مرزکوه، سنگده، نوشهر و مارمیشو در زیر کلاد Ab قرار گرفتند. بر اساس روش ABGD گونه های توس موجود در ایران در سه گروه مجزا قرار گرفتند. بر اساس روش K₂P گونه توس موجود در شهرستانک به عنوان اولین گروه مجزا شده در درخت فیلوژنی، بیشترین شباهت را با گونه *B. pendula* داشت. به طور کلی، این تحقیق هم راستا با مطالعه ریخت شناسی، از قرارگیری توس های ایران در زیر جنس *Betula* حمایت می کند.

واژه های کلیدی

DNA بارکدینگ

پلی پلویدی

تنوع هاپلو تیپی

فیلوژنی

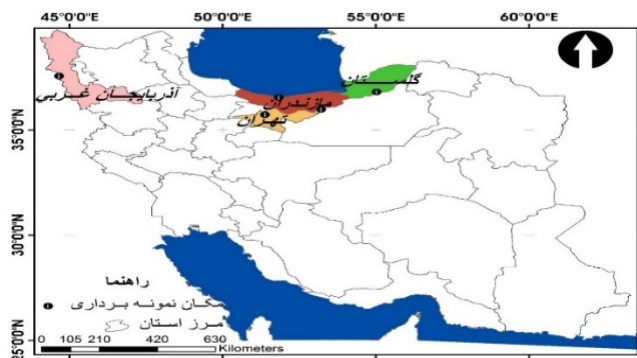
trnH-psbA

مقدمه

درخت توس یکی از گونه‌های سریع‌الرشد، با اندازه متوسط، برگ-ریز و دارای تنه سفید رنگ است که در ارتفاعات بالا و در مرز جنگل ظاهر می‌شود. ارتفاع این درخت ۲۵ متر و گاهی در بهترین رویشگاه‌های آن به ندرت به ۳۰ متر می‌رسد (Vakkari 2009). توس بومی عرض‌های بالای نیمکره شمالی است و در همه قسمت‌های اروپا (با تراکم بیشتر در شمال اروپا) حضور دارد و تا ارمنستان، قفقاز و ایران گسترش می‌یابد. (Sabeti 1976) نشان داد که توس را نباید جزو نباتات ایران ذکر کرد ولی توس یکی از قدیمی‌ترین درختان به جای مانده در جنگل‌های هیرکانی است (Akbarinia et al. 2004). توس در قسمت‌های شمالی اروپا به عنوان یکی از گونه‌های تجاری و مهم محسوب می‌شود. از چوب آن در ساخت تخته‌های چند لایه، تهیه خمیر کاغذ و چوب سوخت استفاده می‌شود. چوب آن بدون رنگ بوده و بین چوب بهاره و تابستانه، درون‌چوب و برون‌چوب هیچ‌گونه تفاوتی از لحاظ رنگ دیده نمی‌شود. به دلیل کوتاه بودن الیاف گونه توس، نیاز است که برای کاغذسازی آن را با خمیر سوزنی‌برگان مخلوط کرد (Vakkari 2009). در ایران در گذشته از عصاره، درخت توس برای معالجه بیماران مبتلا به نفرس استفاده می‌شد (Sabeti 1976). توس در ایران به صورت چند لکه کوچک در ارتفاعات بالای مرز جنگل، شامل ارتفاعات طالقان (۲۷۰۰ متر از سطح دریا) و دره غربی شهرستانک که به جاده چالوس و کرج منتهی می‌شود و در دره تالار حدود فوقانی جنگل، بین زیرآب و شه‌میرزاد گزارش شد. این گونه در آذربایجان غربی هم دیده شده و در آنجا با نام محلی، حاجی بیوک نامیده می‌شود (Sabeti 1976). با توجه به وقوع آسان پدیده دورگه‌ای شدن (Thorsson et al. 2001) در جنس توس، رده‌بندی و شناسایی گونه‌های مختلف جنس آن همیشه مورد اختلاف است (Jarvinen et al. 2004). (Thorsson et al. 2007) با بررسی کاربوتیبی و فیزیولوژیکی دو گونه *Betula pendula* Roth و *B. pubescens* Ehrh اثبات کردند که این دو گونه به راحتی و به تعداد زیاد با یکدیگر تولید دورگه می‌کنند. همچنین دورگه‌های فراوانی از جنس توس در جزایر انگلستان و اسکاتلندیناوی گزارش شده‌است. در واقع به همین دلیل است که از بین ۳۰ تا ۶۰ گونه معرفی شده

از این جنس، برخی از آنها هنوز مورد پذیرش قرار نگرفته‌اند (Brown et al. 1982). مشابه با سایر نقاط دنیا در ایران در تعداد گونه‌های توس موجود ابهام وجود دارد. (Browicz 1972, 1982) اعتقاد دارد که در ایران فقط یک گونه از توس (*B. pendula*) با پراکنش اندک حضور دارد. (Zare et al 2010) نشان داد که علاوه بر گونه *B. pendula* گونه *B. litwinowii* Doluch نیز در ایران رویش داشته از این نظر، تعداد گونه‌های جنس توس در ایران به دو گونه ارتقاء یافت. البته با توجه به گزارش حضور دو گونه از جنس توس در ایران، امکان حضور پایه‌های دورگ در رویشگاه-های آن در شمال و شمال غرب ایران نیز می‌تواند محتمل باشد. از طرف دیگر در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی برای جنس‌هایی که شناسایی آنها از طریق ریختی مشکل است در کنار مطالعه صفات ریختی، تکنیک DNA بارکدینگ به وفور مورد استفاده قرار گرفته‌است. در این تکنیک بخش کوچکی از ژنوم گیاه توالی‌یابی شده و برای شناسایی و تعیین ارتباط بین گونه‌های مختلف یک جنس استفاده شد. در حیوانات ژن میتوکندریایی *Cytochrome Oxidase I (COI)* به عنوان بارکد پیشنهاد می‌شود زیرا این ناحیه برای تعیین و تفکیک حیوانات در سطح گونه کارایی بسیار بالایی دارد و در جامعه جهانی نیز پذیرفته شده‌است. ولی در گیاهان وضعیت پیچیده‌تر از حیوانات بوده و نواحی مختلفی از DNA هسته‌ای (ITS, ITS2) و کلروپلاستی (*Rbcl*, *trnH-psbA*, *matK*, *rpoC1* و *rpoB*) به عنوان بارکد پیشنهاد شدند (Pang et al. 2012). اما تاکنون از بین هیچ یک از این نواحی معرفی شده، ناحیه‌ای یافت نشده که همه مشخصات یک بارکد DNA را در بین تمام گیاهان داشته باشد (Pang et al. 2012). عدم قدرت تفکیک هر یک از این نواحی در برخی از گونه‌ها و عدم وجود یک آغازگر عمومی برای تکثیر هر یک از این نواحی از جمله دلایلی می‌باشند که موجب شده تا به امروز دانشمندان نتوانند یک ناحیه ژنی استاندارد به عنوان بارکد برای همه گیاهان معرفی کنند. گروه (CBOL) Consortium for the Barcode of Life هنوز در حال بررسی هفت ناحیه پیشنهادی برای معرفی یک ناحیه به عنوان بارکد برای گیاهان هستند (Pang et al. 2012). امروزه از بین نواحی مطرح شده، یکی از نواحی که بیشتر از سایرین مورد توجه است ناحیه ژنی *trnH-psbA* می‌باشد

1.25 U dNTP، 0.5 mM از هر آغازگر، 20 ng از DNA الگو و 1.25 U از آنزیم پلیمرز *Pfu* بود. شرایط دمایی واکنش شامل یک چرخه در دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۲ چرخه به ترتیب در دمای 94°C به مدت ۶۰ ثانیه، 56°C به مدت ۴۵ ثانیه، 72°C به مدت ۹۰ ثانیه و سپس 72°C به مدت ۴۲۰ ثانیه بود. در نهایت نمونه‌ها به منظور توالی‌یابی ناحیه *trnH-psbA* به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد.



شکل ۱- نقشه نمونه‌برداری از رویشگاه‌های توس ایران در این مطالعه

جدول ۱- اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های نمونه‌برداری توس در ایران

نام جمعیت	استان	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
سیاه‌مرزکوه	گلستان	۲۳۴۴	۵۵°۰۱'	۳۶°۳۸'
بندبن	مازندران	۲۵۷۹	۵۳°۱۳'	۳۵°۵۹'
نوشهر (باغ گیاه‌شناسی)	مازندران	۲	۵۱°۴۸'	۳۶°۶۵'
شهرستانک	البرز	۲۴۰۴	۵۱°۲۳'	۳۵°۴۴'
مارمیشو	آذربایجان غربی	۱۷۴۱	۴۴°۳۵'	۳۷°۳۴'

تحلیل‌های فیلوژنتیک

پس از دریافت توالی‌ها، تمامی موقعیت‌ها به صورت چشمی و توسط نرم‌افزار Chromas v 2.1.1 بررسی و ویرایش شدند. با استفاده از آزمون Blast در NCBI تعلق توالی‌ها به جنس توس مورد بررسی و تایید قرار گرفت. جهت انجام تحلیل‌های فیلوژنتیکی توالی ناحیه *trnH-psbA* گونه‌های متعلق به زیرجنس-های مختلف توس ثبت شده در NCBI اخذ شد. با استفاده از نرم‌افزار Mega.6 بهترین مدل برای رسم درختان فیلوژنی انتخاب شد. در گام بعدی توالی‌های بدست آمده به روش Muscle

(Kress et al. 2005; Hollingsworth et al. 2011; Akbarzadeh et al. 2013; Yousefzadeh et al. 2013). دلیل استفاده گسترده از این ناحیه آن است که الف) این ناحیه در بین سایر نواحی ژنی کلروپلاستی متغیرترین ناحیه است؛ ب) این ناحیه در همه گیاهان عالی وجود داشته و به دلیل طول نسبتاً کوتاهی که دارد، در اکثر موارد به راحتی تکثیر می‌شود؛ ج) آغازگرهای منتشر شده برای تکثیر این ناحیه عمومی هستند (Abbe 1935) و در بین همه گونه‌های بازدانگان، عموماً از یک آغازگر برای تکثیر این ناحیه استفاده می‌شود. ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* یک ناحیه کوتاه است (تقریباً ۴۵۰ bp) و در بین تمام گیاهان عالی تغییر پذیری نسبتاً خوبی دارد (Shaw et al. 2007). علی‌رغم انجام مطالعات گسترده در زمینه شناسایی جنس‌های مختلف گیاهی با استفاده از ناحیه *trnH-psbA* تاکنون مطالعاتی مبنی بر مطالعه روابط فیلوژنتیکی جنس توس بر اساس این ناحیه در دنیا گزارش نشده است. تحقیق حاضر در نظر دارد تا با استفاده از ناحیه ژنی کلروپلاستی *trnH-psbA* به بررسی قرابت و ارتباط ژنتیکی توس‌های ایران با دیگر توس‌های دنیا و همچنین ارتباط بین زیرجنس‌های مختلف توس را بپردازد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق ابتدا چهار رویشگاه توس در ایران؛ شهرستانک (استان البرز)، سنگده (استان مازندران- ساری)، سیاه‌مرزکوه (استان گلستان)، مارمیشو (استان آذربایجان غربی- ارومیه) به همراه یک نمونه باغ گیاه‌شناسی نوشهر انتخاب شدند (شکل ۱ و جدول ۱). پس از نمونه‌برداری، استخراج DNA ژنومی از برگ توس با استفاده از روش Porebski et al. (1979) که با اعمال برخی از تغییرات در آزمایشگاه مقادیر بهینه ترکیب مواد برای استخراج DNA با کیفیت از برگ توس به دست آمد (Esmailpour 2014). تکثیر ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* با استفاده از توالی‌های آغازگر گزارش شده توسط et al. (1990) White صورت گرفت. غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل 20 mM Tris، 10 mM KCL، 0.1% Triton X100، 10 mM HCl (pH 8.8 at 25°C)، 0.8 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، 0.1 mg/ml BSA، 2 mM MgSO_4

Betulaster, *Betulenta*, *Neurobetula* قرار گرفتند. سایر توس- های ایران شامل نمونه‌های نوشهر، سیاه‌مرزکوه، مارمیشو و بندبن در زیرکلاذ دوم (Ab) قرار گرفتند، از ویژگی‌های اختصاصی این زیرکلاذ می‌توان به دارا بودن نوکلئوتید T در جایگاه ۷۱ اشاره کرد. در کلاذ B گونه‌های *B. Papyrifera* Marshall، *B. glandulosa* Michx.، *B. lenta* L.، *allegheniensis* Bitt زیرجنس‌های *Betula*، *Betulenta* و *Chamaebetula* قرار گرفتند. در کلاذ C فقط گونه *B. utilis* D. Don که تتراپلوئید بوده و از زیر جنس *Neurobetula* قرار گرفت.

در این تحقیق تجزیه و تحلیل گپ‌های بارکدی ناحیه *trnH-psbA* توس‌ها با در نظر گرفتن حداکثر واگرایی درون کلاذی (P) بین ۰/۱ تا ۰/۰۰۱ : ۱/۵ X، Nb = ۲۰ (توزیع فاصله‌ها) و به روش K2P انجام شد (Puillandre et al. 2012). بر این اساس توس‌ها در ۵ کلاذ مختلف قرار گرفتند. نمونه شهرستانک به همراه گونه- های *B. pendula*، *B. platyphylla*، *B. schmidtii*، *B. insignis*، *B. alnoides*، *B. davurica*، *B. occidentalis*، *B. glandulosa* و *B. papyrifera* در کلاذ اول قرار گرفتند. نمونه‌های سیاه‌مرزکوه و مارمیشو در کلاذ دوم قرار گرفتند. نمونه بندبن و نوشهر هر یک به تنهایی در کلاذ سوم و چهارم قرار گرفتند. در کلاذ پنجم گونه‌های *B. lenta*، *B. utilis*، *B. glandulosa* و *B. papyrifera* قرار گرفتند. گونه *B. utilis* به تنهایی در کلاذ ششم قرار گرفت.

جنس توس متعلق به خانواده *Betulaceae* و در راسته *Fagales* قرار می‌گیرد. این خانواده شامل دو زیر خانواده *Betulaceae* و *Betuloidae* است. زیرخانواده *Betulaceae* شامل دو جنس توسکا و توس است. از اختصاصات زیر خانواده توس، پلی- پلوئیدی، دورگه‌ای شدن و شباهت ریختی بین گونه‌های مختلف آن است (Brown et al. 1982; Jarvinen et al. 2004). به همین دلیل جنس توس دارای مشکلات رده‌بندی بسیار زیادی بوده و در خصوص تعداد گونه‌های آن اختلاف نظر است (Brown et al. 1982). تاکنون مطالعه‌های متعددی جهت رده‌بندی گونه‌های متعلق به جنس توس بر اساس صفات ریختی انجام شد (Regel 1993; Winkler 1904; De Jong 1865). یکی از جامع‌ترین بازنگری‌ها در این مورد توسط Winkler (1904) صورت گرفت.

نرم‌افزار Mega.6 هم‌ردیف شدند. درخت فیلوژنی بر اساس روش‌های نزدیکترین همسایه^۱ حداکثر پارسیمونی^۲، حداکثر درست‌نمایی^۳ با استفاده از نرم‌افزار Mega.6 و درخت فیلوژنی Bayesian inference با استفاده از نرم‌افزار Mr Bayes 3.2 رسم شد. فاصله ژنتیکی به روش K2P با استفاده از نرم‌افزار Mega.6 محاسبه شد. جهت انجام روش ABGD از ابزار اینترنتی و آنلاین www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd استفاده شد.

نتایج و بحث

طول ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* در گونه‌های توس ثبت شده در NCBI از ۳۵۰ تا ۳۵۳ جفت باز متغیر بود، در حالی که طول این قطعه برای توس‌های ایران بدون تغییر و ۳۵۳ نوکلئوتید است. نتایج ردیف‌خوانی نشان داد که از بین ۳۵۳ جایگاه بررسی شده در توس‌های ایران، تنها سه جایگاه متغیر و از نوع انحصاری بود. جایگاه انحصاری اول در موقعیت ۵۳ مربوط به جمعیت نوشهر، جایگاه انحصاری دوم در موقعیت ۶۸ مربوط به جمعیت بندبن و جایگاه انحصاری سوم در موقعیت ۷۱ مربوط به جمعیت سیاه‌مرزکوه، مارمیشو، بندبن و نوشهر بود (جدول ۲). همچنین بررسی فاصله ژنتیکی گونه‌ها به روش K₂P فاصله ژنتیکی گونه شهرستانک از *B. pendula* صفر بود، اما فاصله ژنتیکی جمعیت نوشهر و بندبن با گونه *B. pendula* به میزان ۰/۰۰۳ است (جدول ۳).

از آنجا که رسم درخت فیلوژنی بر اساس سه روش حداکثر درست‌نمایی، حداکثر پارسیمونی و نزدیکترین همسایه شبیه به هم بود، نتایج روش حداکثر درست‌نمایی ارائه شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که جنس توس تک‌نیا^۴ است. توس‌های ایران در یک کلاذ و دو زیرکلاذ متفاوت قرار گرفتند، به گونه‌ای که در زیرکلاذ اول (Aa) نمونه شهرستانک ایران به همراه گونه‌های *B. pendula*، *B. insignis* Franch، *B. platyphylla* Sukaczew، *B. davurica*، *B. alnoides* Buch. Ham، *B. occidentalis* Hook و *B. schmidtii* Regel، Pall متعلق به زیرجنس‌های *Betula*.

¹ Neighbor joining

² Maximum parsimony

³ Maximum likelihood

⁴ Monophyly

جدول ۲- مشخصات توالی‌های نوکلئوتیدی *trnH-psbA* توس‌های ایران و سایر توس‌های مورد مطالعه

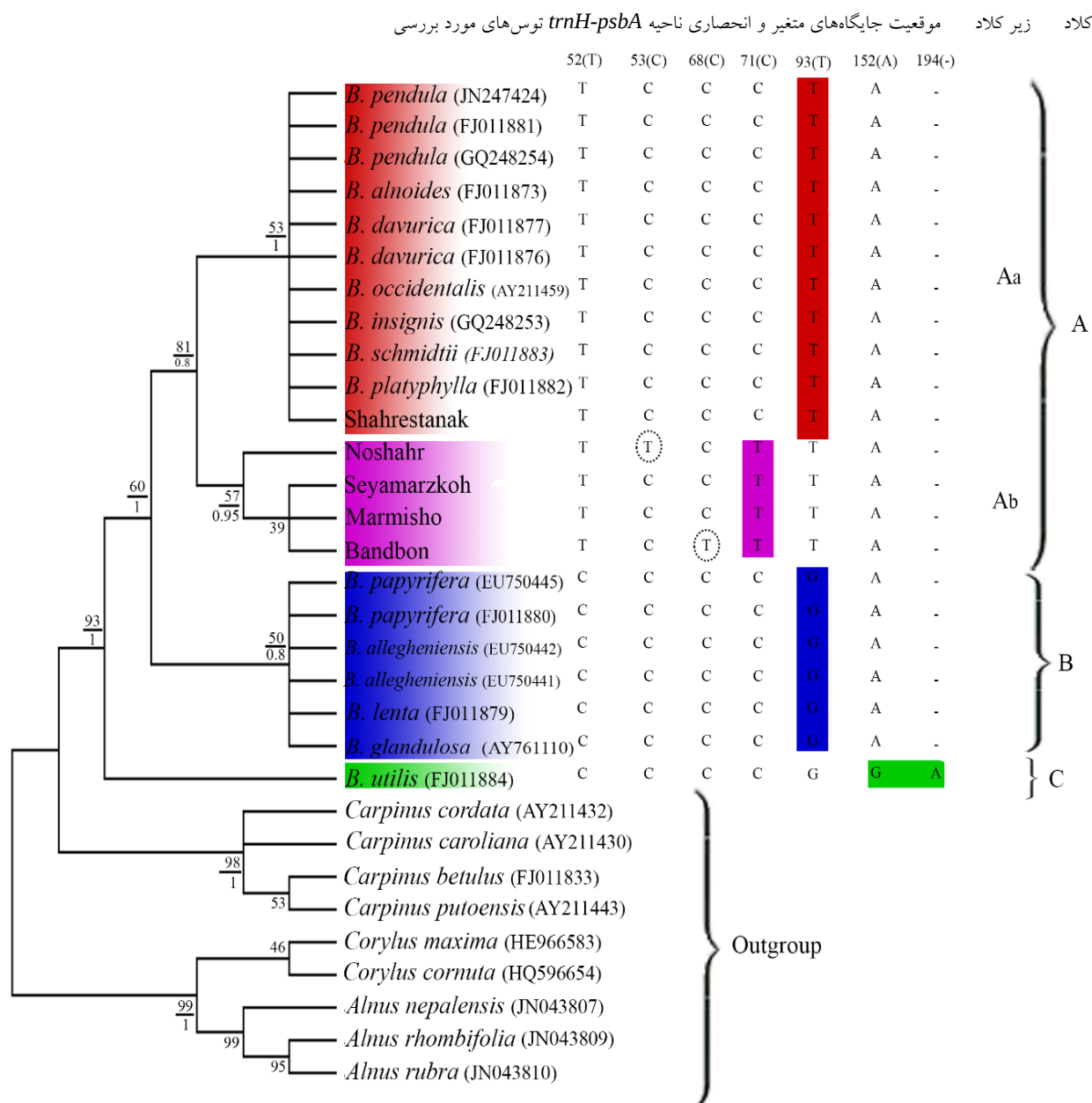
مشخصه	توس‌های ایران	سایر توس‌ها
A (%)	۴۲/۸	۴۲/۷
C (%)	۱۵/۵	۱۶
G(%)	۱۰/۸	۱۰/۸
U(%)	۳۰/۹	۳۵/۵
طول (جفت باز)	۳۵۳	۳۵۰-۳۵۳
جایگاه محافظت شده	۳۵۰	۳۵۰
جایگاه متغیر	۳	۴
جایگاه پارسیمونی	-	۳

بیان کرد که بین دو زیرجنس *Neurobetula* و *Betula* رابطه نزدیکی وجود دارد. در همین راستا Keinanen et al. (1999) مطالعاتی که بر روی شیمی تاکسونومی توس‌ها انجام دادند؛ به این نتیجه رسیدند که گونه‌های متعلق به زیرجنس *Neurobetula* از اجداد زیرجنس *Betula* هستند. در کلاد دوم گونه‌های *B. glandulosa* (زیرجنس *Betula*)، *papyrifera* (زیرجنس *Chamaebetula*) به همراه گونه‌های متعلق به زیرجنس *Betulenta* در یک گروه قرار گرفتند، قرارگیری گونه‌های متعلق به زیرجنس *Betula* در دو گروه متفاوت بر اساس ناحیه *trnH-psbA* پارافیل بودن این زیرجنس را در راستای نظر Li et al. (2004) تایید می‌کند. با قرارگیری *B. utilis* (رنگ پوست سفید) از زیرجنس *Neurobetula* به تنهایی در یک کلاد، نظر DeJong (1993) مبتنی بر هتروزیگوتی بالای این زیرجنس و همچنین نتیجه Li et al. (2004) مبتنی بر پارافیل بودن *Neurobetula* زیرجنس تایید می‌شود. گونه *B. schmidtii* به لحاظ خصوصیات خاصی که دارد (رنگ سیاه پوست، کند رشد بودن، چوب سخت و سنگین) همواره مورد توجه محققین رده‌بندی جنس توس بوده‌است (Ashburner 1980).

وی این جنس را به دو بخش اصلی *Eubetula* و *Betulaster* تقسیم کرد. بخش *Eubetula* خود به سه زیر بخش *Costatae*، *Nanae* و *Albae* تقسیم می‌شود. هر یک از این زیر بخش‌ها در سالیان بعد توسط سایر محققین به عنوان زیرجنس‌های فرعی در نظر گرفته شد (Furrow 1990). بخش *Costatae* توسط Natho (1976) و DeJong (1993) به دو زیرجنس *Betulenta* و *Neurobetula* تقسیم شد. بر اساس تقسیم‌بندی DeJong (1993) توس‌هایی که در پوست خود دارای متیل-سالیسیلات هستند (به همراه گل آذین صاف) در زیر جنس *Betulenta* و سایر گونه‌های باقی‌مانده از بخش *Costatae* به همراه گونه *B. davurica* در زیرجنس *Neurobetula* قرار می‌گیرد. در مورد زیرجنس *Neurobetula* DeJong (1993) معتقد بود که دارای هتروزیگوتی بسیار زیادی می‌باشد. نتایج حاصل از تقسیم‌بندی توس‌ها با استفاده از نشانگر *trnH-psbA* در این تحقیق، به طور کامل از تقسیم‌بندی‌های ریختی جنس توس شامل: Regel (1865)، De Jong (1993) و Winkler (1904) حمایت نکرد. با توجه به نتایج حاصل از تقسیم‌بندی ناحیه *trnH-psbA* که زیر جنس‌های *Neurobetula*، *Betulenta*، *Betulaster* و *Betula* (توس‌های سفید) در یک گروه قرار می‌گیرند، می‌توان

جدول ۳- فاصله ژنتیکی بین توس های مورد مطالعه بر اساس ناحیه *trnH-psbA* و به روش K_2P

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
۱) Shahrestanak																					
۲) Seyamarzkoh	۰/۰۰۳																				
۳) Marmisho	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰																			
۴) Bandbon	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳																		
۵) Noshahr	۰/۰۰۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶																	
۶) FJ011881	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶																
۷) GQ248254	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰															
۸) JN247424	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰														
۹) EU750445	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹													
۱۰) FJ011876	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹												
۱۱) FJ011877	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰											
۱۲) FJ011880	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹										
۱۳) EU750442	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰									
۱۴) FJ011879	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰								
۱۵) EU750441	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰							
۱۶) FJ011884	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۱۷	۰/۰۱۷	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۳	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳						
۱۷) FJ011883	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲					
۱۸) FJ011882	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰				
۱۹) FJ011878	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۱۴	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹			
۲۰) FJ011873	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹		
۲۱) AY211459	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	
۲۲) GQ248253	۰/۰۰۰	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰



شکل ۲- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ترکیب دو ناحیه *trnH-psbA* به روش حداکثر شباهت مدل (Tumara3 parameter + Gamma Distributed) با پشته‌توانه تکرار ۱۰۰۰ در هریک از کلادها عدد بالا ضریب حمایت به روش ML و عدد پایینی ضریب حمایت به روش BI است. کد دسترسی به توالی هر یک از گونه‌ها در NCBI مقابل گونه نوشته شده است: Outgroup ها از گونه‌های متعلق به سه جنس مختلف خانواده *Betulaceae* انتخاب شدند.

فرضیه حمایت نمی‌کند، ولی از قرارگیری این گونه در زیرجنس *Betula* پشتیبانی می‌کند (شکل ۲). بر اساس ناحیه *trnH-psbA* توس‌های ایران در دو زیرکلاذ خواری نسبت به همدیگر قرار گرفتند. در این بین نمونه شهرستانک در زیرکلاذ Aa قرار گرفت،

این گونه بر اساس مطالعات شیمی تاکسونومی در زیرجنس *Betula* قرار گرفت (Keinanen et al. 1999). در مطالعه Nakai (1915) پیشنهاد شد که این گونه به تنهایی در زیرجنس *Asperae* قرار می‌گیرد. تقسیم‌بندی ناحیه *trnH-psbA* از این

دیگر گونه معرفی شده از توس بر اساس صفات مورفولوژیکی برای فلور ایران- وجود نداشت، امکان تایید مولکولی حضور این گونه در فلور ایران وجود نداشت.

سپاسگزاری

از داوران محترم مقاله به دلیل پیشنهادهای متعدد و سازنده سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Abbe EC (1935) Studies in the phylogeny of the *Betulaceae*. Floral and inflorescence anatomy and morphology. Botanical Gazette 1-67.
- Akbarinia M, Hossainy M, Ejtehady H (2004) Study on vegetation structure floristic composition and chrology of silver birch communities at Sangedeh, forest of Hyrcanian region. Journal of Pajouhesh and Sazandgi 64: 84-96 (In Farsi).
- Akbarzadeh RF, Hosseinzadeh Colagar A, Yosefzadeh H (2013) Taxonomic status and genetic variation of the genus *Castanea* (*Fagaceae*) in Iran based on *psbA* and *trnH-psbA*. Rostaniha Journal 14: 229-237 (In Farsi).
- Avise JC, Reeb CA, Saunders NC (1987) Geographic population structure and species differences in mitochondrial DNA of mouthbrooding marine catfishes (*Ariidae*) and demersal spawning toadfishes (*Batrachoididae*). Evolution 41: 991-1002.
- Ashburner K (1980) *Betula*-a survey. Plantsman 2: 31-53.
- Bina H, Yousefzadeh H, Esmailpour M, Esmailzadeh O (2015) Molecular identification of the genus *Betula* based on ITS sequence data and its Secondary structure in Iran. Rangeland and Breeding and Genetic Research 22: 168-180.
- Brown IR, Kennedy D, Williams DA (1982) The occurrence of natural hybrids between *Betula pendula* Roth. and *B. pubescens* Ehrh. Watsonia 14.
- Browicz K (1972) *Betulaceae*. Flora Iranica 96.
- Browicz K, Zielinski J (1982) Chorology of trees and shrubs in south-west Asia and adjacent regions (Vol. 1). Polish Scientific Publ.
- De Jong P (1992) An introduction to *Betula* its morphology evolution classification and distribution with a survey of recent work. Paper presented at the Proceedings of the IDS *Betula* Symposium 2:4.
- De Lange J (2008) The genus *Betula* L (*Betulaceae*) Vegetative key to the species in Western European cultivation. Ghent University Botanical Garden 8pp.
- Esmailpour M (2014) Diversity morphology and Molecular tree birch in the forest hyrcanian. University of Guilan, Iran.
- Ezard THG, Travis JMJ (2006) The impact of habitat loss and fragmentation on genetic drift and fixation time. Oikos 114: 367-375.

اما سایر توس‌های ایران (نمونه‌های بندبن، سیاه‌مرزکوه، مارمیشو و نوشهر) نسبت به زیرکلاد Aa در یک زیرکلاده خواهری قرار گرفتند، یکی از علل قرارگیری چهار نمونه توس ایران در یک کلاد خواهری Ab نسبت به Aa داشتن نوکلئوتید T در جایگاه ۷۷ است در صورتی که نمونه شهرستانک در این جایگاه دارای نوکلئوتید C است. بر اساس مطالعات ریختی (حاشیه برگ-ها، طول میوه، وجود کرک بر روی دم‌برگ و برگ)، توس‌های ایران در زیر جنس *Betula* قرار گرفتند (Zare et al. 2010). این تحقیق هم‌راستا با مطالعه ریخت‌شناسی، از قرارگیری توس‌های ایران در زیر جنس *Betula* حمایت می‌کند. جمعیت شهرستانک نسبت به دیگر توس‌های ایران در زیرکلادی جداگانه قرار گرفت. در راستای همین تحقیق ساختار ثانویه ITS2 نمونه شهرستانک متفاوت از دیگر توس‌های ایران توسط Bina et al. (2015) گزارش شد. قطعه قطعه شدن رویشگاه سبب کوچکتر شدن اندازه جمعیت و کاهش تنوع ژنتیکی و در نهایت رانش ژنتیکی می‌شود. بر اساس تحقیق حاضر نمی‌توان از وقوع فرسایش ژنتیکی در جمعیت‌های توس ایران اظهار نظر کرد، اما ضمن محتمل دانستن آن، لزوم انجام تحقیقی جدید با رویکرد تعیین سطح تنوع ژنتیکی و زیست‌جغرافیایی توس‌های ایران ضروری به نظر می‌رسد. در هر حال، از آنجا که گونه‌های آلباین و با پراکنش لکه‌ای (مانند توس) آسیب‌پذیری بیشتری نسبت به تغییر شرایط محیطی و تخریب رویشگاه دارند، حتی روند کنونی تخریب و قطع تبادل ژنی سبب همسان شدن ژن‌ها و کاهش پتانسیل تکاملی می‌شود که در نهایت تداوم حیات چنین گونه‌هایی را تهدید می‌کند (Avise et al. 1987; Saccheri et al. 1998; Reed and Frankham 2003). روش ABGD برای تعیین و تشخیص گروه‌های ملکولی از درخت فیلوژنی استفاده نمی‌کند بلکه با تعیین و تشخیص گپ‌های موجود اقدام به تشخیص گروه‌های ملکولی می‌کند (Prevot et al. 2013) و علت قرارگیری هر یک از نمونه‌های نوشهر و بندبن به تنهایی در کلادی جداگانه وجود فاصله بارکد T به ترتیب در جایگاه‌های ۵۳ و ۶۸ برای هر یک از این نمونه‌ها است. از آنجا که در بانک‌های اطلاعات ژن هیچ توالی نوکلئوتیدی از ناحیه ژنی *trnH-psbA* گونه *B. litwinowii*-

- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 34: 487-515.
- Furrow J (1990) The genera of *Betulaceae* in the southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum. 71: 1-67.
- Garfi G, Mercati F, Fontana I, Collesano G, Pasta S, Vendramin G, Carimi F (2013) Habitat features and genetic integrity of wild grapevine *Vitis vinifera* L. subsp. *Sylvestris* (CC Gmel.) Hegi populations. A case study from Sicily. Flora-Morphology Distribution Functional Ecology of Plants 208: 538-548.
- Guo W, Jeong J, Kim Z, Wang R, Kim E, Kim S (2011) Genetic diversity of *Lilium tsingtauense* in China and Korea revealed by ISSR markers and morphological characters. Biochemical Systematics and Ecology 39: 352-360.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using a plant DNA barcode. PloS ONE 65: e19254.
- Jarvinen P, Palme A, Morales LO, Lannenpaa M, Keinanen M, Sopanen T, Lascoux M (2004) Phylogenetic relationships of *Betula* species (*Betulaceae*) based on nuclear ADH and chloroplast matK sequences. American Journal of Botany 91: 1834-1845.
- Johansson M, Primmer CR, Merila J (2007) Does habitat fragmentation reduce fitness and adaptability? A case study of the common frog (*Rana temporaria*). Molecular Ecology 16: 2693-2700.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 102: 8369-8374.
- Li RQ, Chen ZD, Lu AM, Soltis DE, Soltis PS, Manos PS (2004) Phylogenetic relationships in *Fagales* based on DNA sequences from three genomes. International Journal of Plant Sciences 165: 311-324.
- Lopes AV, Girao LC, Santos BA, Peres CA, Tabarelli M (2009) Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. Biological Conservation 142: 1154-1165.
- Masters BC, Fan V, Ross HA (2011) Species delimitation—a geneious plugin for the exploration of species boundaries. Molecular Ecology Resources 11: 154-157.
- Natho G (1976) Zur Frucht morphologie und Gliederung der Gattung *Betula* L. Gleditschia 4: 9-21
- Neal JM, Hardner CM, Gross CL (2010) Population demography and fecundity do not decline with habitat fragmentation in the rainforest tree *Macadamia integrifolia* (*Proteaceae*). Biological Conservation 143: 2591-2600.
- Pang X, Luo H, Sun C (2012) Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants. Plant Biology 14: 839-844.
- Porebski S, Bailey L, Baum R (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15: 8-15.
- Prevot V, Jordaens K, Sonet G, Backeljau T (2013) Exploring species level taxonomy and species delimitation methods in the facultatively self-fertilizing land snail genus *rumina* (Gastropoda: Pulmonata). Plos One 8: e60736.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. Molecular Ecology 21: 1864-1877.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation Biology 17: 230-237.
- Regel E, Trautvetter ER (1865) Bemerkungen über die gattungen *Betula* und *Alnus* nebst beschreibung einiger neuer Arten: Soc. Nat.
- Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD (2010) Species identification of *Alnus* (*Betulaceae*) using nrDNA and cpDNA genetic markers. Molecular Ecology Resources 10: 594-605.
- RosasF, Quesada M, Lobo JA, Sork VL (2011) Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis* (*Meliaceae*). Biological Conservation 144: 3082-3088.
- Sabeti H (1976) Forests, trees and shrubs of Iran. Agriculture and Natural Resources Research organization Publications, Iran (In Farsi).
- Sang T, Crawford D, Stuessy T (1997) Chloroplast DNA phylogeny reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). American Journal of Botany 84: 1120-1120.
- Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature 392: 491-494.
- Shaw RJ, LamiaK A, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Cantley LC (2005) The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science 310: 1642-1646.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare. American Journal of Botany 94: 275-288.
- Srivathsan A, Meier R (2012) On the inappropriate use of Kimura 2 parameter (K2P) divergences in the DNA barcoding literature. Cladistics 28: 190-194.
- Thorsson Th, Salmela E, Anamthawat JK (2001) Morphological cytogenetic and molecular evidence for introgressive hybridization in birch. Journal of Heredity 92: 404-408.
- ThorssonTh, Palsson S, Sigurgeirsson A, Anamthawat JK (2007) Morphological variation among *Betulanana* (diploid) *B. pubescens* (tetraploid) and their triploid hybrids in Iceland. Annals of Botany 99: 1183-1193.
- Vakkari P (2009) EUFOR GEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of silver birch (*Betula pendula*). Bioversity International Rome Italy 6.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols A Guide to Methods and Applications 18: 315-322.

Winkler H (1904) *Betulaceae*. Das Pflanzenreich, iv (Engler, A.): 61.
Yousefzadeh H, Hosseinzadeh Colagar A, Akbarzadeh F, Nicholas PT (2014) Taxonomic status and genetic differentiation of Hyrcanian *Castanea* based on noncoding

chloroplast DNA sequences data. Tree Genetics and Genomes 10: 1611-1629.

Zare H, Akbarinia M, Hosseini SM, Ejtehadi H, Amini ET (2010) A new record of *Betula litwinowii* (*Betulaceae*) and a review of the geographical distribution of the genus *Betula* L. in Iran. Iranian Journal of Botany 16: 237-241.