ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۴
صفحه ۴۴۶-۴۳۷

بررسی قرابت ژنتیکی توس (*Betula pendula*) ایران با استفاده از نشانگر کلروپلاستی *trn*H-*psb*A

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

حمید بینا[۱]، حامد یوسف‌زاده*[۱]، محمد اسماعیل‌پور[۲]، امید اسماعیل‌زاده[۱]

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

Bina H[1], Yousefzadeh H[*1], Esmaelpoor M[2], Esmailzadeh O[1]

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 قدیمی‌ترین درختان به جای مانده در جنگل‌های هیرکانی است و از نظر حفاظت ذخایر ژنتیکی در گروه گیاهان کم‌گسترده، کم‌یاب و در معرض خطر انقراض قرار دارد. دورگه‌ای شدن و پلی‌پلوییدی در جنس توس سبب ایجاد شباهت و اختلاف نظر در شناسایی دقیق تعدادگونه‌های این جنس در دنیا شد. این تحقیق با بکارگیری نشانگر بین ژنی *trn*H-*psb*A به بررسی جایگاه رده‌بندی و قرابت ژنتیکی توس ایران با سایرگونه‌های توس در دنیا پرداخته است. برای این منظور ناحیه بین‌ژنی *trn*H-*psb*A به روش PCR تکثیر شد. تحلیل مقایسه‌ای از تعیین توالی محصولات PCR پنج رویشگاه با ۱۷ توالی ثبت شده این ناحیه از دیگر گونه‌های توس در بانک ژنی صورت گرفت. نتایج درخت فیلوژنی به روش حداکثرشباهت، نشان داد توس‌ها در سه کلاد A، B و C تقسیم شدند که نمونه‌های ایران همگی در کلاد A قرار گرفتند. نمونه توس شهرستانک در زیرکلاد Aa و چهار نمونه دیگر توس-های مورد مطالعه در ایران واقع در سیاه‌مرزکوه، سنگده، نوشهر و مارمیشو در زیرکلاد Ab قرار گرفتند. بر اساس روش ABGD گونه‌های توس موجود در ایران در سه گروه مجزا قرار گرفتند. بر اساس روش K_2P 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 توس‌های ایران در زیر جنس *Betula* حمایت می‌کند.

واژه‌های کلیدی

DNA بارکدینگ
پلی‌پلوییدی
تنوع هاپلوتیپی
فیلوژنی
***trn*H-*psb*A**

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

مقدمه

درخت توس یکی ازگونه‌های 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 درجنگل‌های 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 نقرس 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 ودر 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 کاریوتیپی 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 اسکاندیناوی 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*، *matK*، *trn*H-*psbA*، *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 Consortium for the Barcode of Life (CBOL) 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 *trn*H-*psb*A می‌باشد

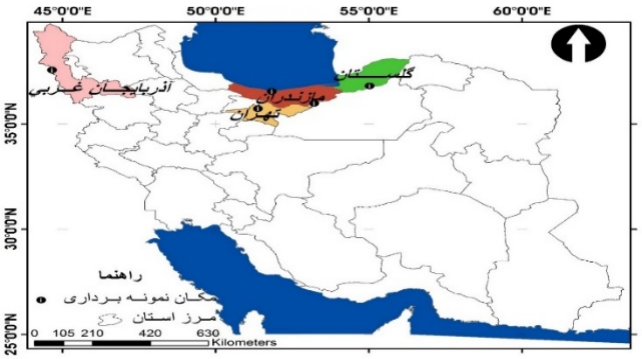
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

Kress et al. 2005; Hollingsworthe 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 نسبتا 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 *trn*H-*psb*A یک ناحیه کوتاه است (تقریبا ۴۵۰ bp) و در بین تمام گیاهان عالی تغییر پذیری نسبتا خوبی دارد (Shaw et al. 2007). علی‌رغم انجام مطالعات گسترده در زمینه شناسایی جنس‌های مختلف گیاهی با استفاده از ناحیه *trn*H-*psb*A تاکنون مطالعه‌ای 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 *trn*H-*psb*A 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 جدول۱). 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 (Esmaeilpour 2014). تکثیر ناحیه بین ژنی *trn*H-*psb*A با استفاده از توالی‌های آغازگر گزارش شده توسط Taberlet et al. (1990) و White صورت گرفت. غلظت نهایی مواد تشکیل دهنده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل 10 mM KCL، 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25ºC)، 0.1%Triton X100, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$، 0.1 mg/ml BSA, 2 mM $MgSO_4$، 0.8 mM dNTP، 0.5 mM از هر آغازگر، 20 ng از DNA الگو و 1.25 U از آنزیم پلیمراز *Pfu* بود. شرایط دمایی واکنش شامل یک چرخه در دمای ˚C ۹۴ به مدت ۳۶۰ ثانیه، ۳۲ چرخه به ترتیب در دمای ˚C ۹۴ به مدت ۶۰ ثانیه، ˚C ۵۶ به مدت ۴۵ ثانیه، ˚C ۷۲ به مدت ۹۰ ثانیه و سپس ˚C ۷۲ به مدت ۴۲۰ ثانیه بود. در نهایت نمونه‌ها به منظور توالی‌یابی ناحیه *trn*H-*psb*A به شرکت Bioneer کره‌جنوبی ارسال شد.



شکل۱- نقشه نمونه‌برداری از رویشگاه‌های توس ایران در این مطالعه

جدول ۱- اطلاعات مربوط به رویشگاه‌های نمونه‌برداری توس در ایران

نام جمعیت	استان	ارتفاع ازسطح 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 *trn*H-*psb*A 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 در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

نرم‌افزار Mega.6 هم‌ردیف شدند. درخت فیلوژنی بر اساس روش‌های نزدیکترین همسایه[1] حداکثر پارسیمونی[2]، حداکثر درست‌نمایی[3] 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 wwwabi.snv.jussieu.fr/ public/abgd استفاده شد.

نتایج و بحث

طول ناحیه بین‌ژنی *trn*H-*psb*A 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 K_2P 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 (شکل۲). نتایج نشان داد که جنس توس تک‌نیا[4] است. توس‌های ایران در یک کلاد و دو زیرکلاد متفاوت قرار گرفتند، به گونه‌ای که در زیرکلاد اول (Aa) نمونه شهرستانک ایران به همراه گونه‌های *B. pendula*، *B. insignis* Franch، *B. platyphylla* Sukaczev، *B. occidentalis* Hook، *B. alnoides* Buch. Ham، *B. davurica* Pall، *B. Schmidtii* Regel متعلق به زیرجنس‌های *Betula*، *Betulenta*، *Betulaster*، *Neurobetula* قرار گرفتند. سایر توس‌های ایران شامل نمونه‌های نوشهر، سیاه‌مرزکوه، مارمیشو و بندبن در زیرکلاد دوم (Ab) قرار گرفتند، از ویژگی‌های اختصاصی این زیرکلاد می‌توان به دارا بودن نوکلئوتید T در جایگاه ۷۱ اشاره کرد. در کلاد B گونه‌های *B. Papyrifera* Marshall، *B. allegheniensis* Bitt، *B. lenta* L.، *B. glandulosa* Michx. از زیرجنس‌های *Betula*، *Betulenta* و *Chamaebetula* قرار گرفتند. در کلاد C فقط گونه *B. utilis* D.Don که تتراپلوییید بوده و از زیر جنس *Neurobetula* قرار گرفت.

در این تحقیق تجزیه و تحلیل گپ‌های بارکدی ناحیه *trn*H-*psb*A توس‌ها با در نظر گرفتن حداکثر واگرایی درون کلادی (P) بین ۰/۱ تا ۰/۰۰۱ : X ۱/۵، Nb =۲۰ (توزیع فاصله‌ها) و به روش K2P انجام شد (Puillandre et al. 2012). بر این اساس توس‌ها در ۵ کلاد مختلف قرار گرفتند. نمونه شهرستانک به همراه گونه‌های *B. pendula*، *B. platyphylla*، *B. schmidtii*، *B. davurica*، *B. alnoides*، *B. occidentalis*، *B. insignis* در کلاد اول قرار گرفتند. نمونه‌های سیاه‌مرزکوه و مارمیشو در کلاد دوم قرار گرفتند. نمونه بندبن و نوشهر هر یک به تنهایی در کلاد سوم و چهارم قرار گرفتند. در کلاد پنجم گونه‌های *B. lenta*، *B. alleghaniensis*، *B. papyrifera* و *B. glandulosa* قرار گرفتند. گونه *B. utilis* به تنهایی در کلاد 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، پلی‌پلوییدی، دورگه‌ای شدن و شباهت ریختی بین گونه‌های مختلف آن است (Brownet al. 1982; Jarvinen et al. 2004). به همین دلیل جنس توس دارای مشکلات رده‌بندی بسیار زیادی بوده و در خصوص تعداد گونه‌های آن اختلاف نظراست (Brown et al. 1982). تاکنون مطالعه‌های متعددی جهت رده‌بندی گونه‌های متعلق به جنس توس بر اساس صفات ریختی انجام شد (Regel 1865; Winkler 1904; De Jong 1993). یکی از جامع‌ترین بازنگری‌ها در این مورد توسط Winkler (1904) صورت گرفت.

[1] Neighbor joining
[2] Maximum parsimony
[3] Maximum likelihood
[4] Monophyly

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

جدول ۲- مشخصات توالی‌های نوکلئوتیدی *trn*H-*psb*A 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

وی این جنس را به دو بخش اصلی *Betulaster* و *Eubetula* 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 زیرجنس-های فرعی در نظر گرفته شد (Furlow 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 می-گیرد. در مورد زیرجنس *Neurobetula*، DeJong (1993) معتقد بود که دارای هتروزیگوتی بسیار زیادی می‌باشد. نتایج حاصل از تقسیم‌بندی توس‌ها با استفاده از نشانگر *trn*H-*psb*A 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 *trn*H-*psb*A که زیر جنس‌های *Neurobetula*، *Betulenta*، *Betulaster* و *Betula* (توس‌های سفید) در یک گروه قرار می‌گیرند، می‌توان بیان کرد که بین دو زیرجنس *Neurobetula* و *Betula* رابطه نزدیکی وجود دارد. در همین راستا Keinanen et al. (1999) با مطالعه‌ای 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. papyrifera* (زیرجنس *Betula*)، *B. glandulosa* (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 *trn*H-*psb*A 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).

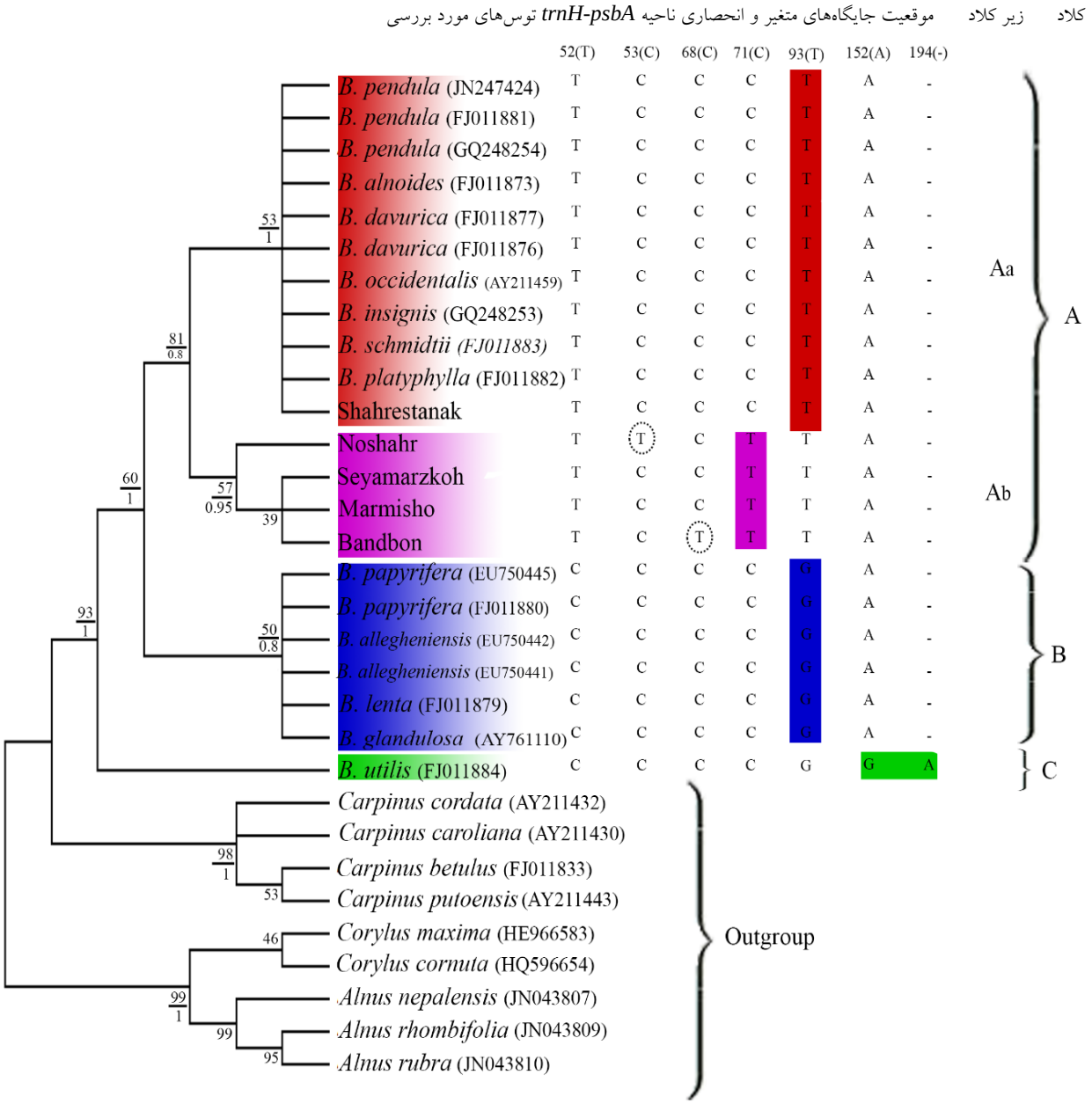
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

جدول ۳- فاصله ژنتیکی بین توس‌های مورد مطالعه بر اساس ناحیه *trn*H-*psb*A 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]



شکل۲-درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ترکیب دو ناحیه *trnH-psbA* به روش حداکثر شباهت مدل (Tumara3 parameter + Gamma Distributed) با پشتوانه 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 شده‌است: Outgroupها از گونه‌های متعلق به سه جنس مختلف خانواده *Betulaceae* انتخاب شدند.

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 فرضیه حمایت نمی‌کند، ولی از قرارگیری این گونه در زیرجنس *Betula* پشتیبانی می‌کند (شکل ۲). بر اساس ناحیه trn*H*-psb*A* توس‌های ایران در دو زیرکلاد خواهری نسبت به همدیگر قرار گرفتند. در این بین نمونه شهرستانک در زیرکلاد Aa قرار گرفت،

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

اما سایر توس‌های ایران (نمونه‌های بندبن، سیاه‌مرزکوه، مارمیشو و نوشهر) نسبت به زیرکلاد Aa در یک زیرکلاده خواهری Abقرار 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 جمیت 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 آلپاین و با پراکنش لکه‌ای (مانند توس) آسیب پذیری 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 گروه-های 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 نمونه-های 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 *trn*H-*psb*A گونه *B. litwinowii*– 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 statusand genetic variation of the genus *Castanea* (*Fagaceae*) in Iran based on *psb*A and *trn*H-*psb*A. 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, Esmaeilpour M, Esmaelzadeh 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.

Esmaeilpour M (2014) Diversity morphologicy and Molecular tree birch in the forest hyrcanian. Unversity 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics 34: 487-515.
Furlow J (1990) The genera of *Betulaceae* in the southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum. 71: 1-67.
Garfì 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 Fruchtmorphologie 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 uber 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 angiospermsthe 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 evidencefor 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 triploidhybrids 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.3.14.4]