

بازنگری گونه‌های جنس ممرز (*Carpinus L.*) در ایران براساس نشانگرهای مولکولی (ITS و trnh-psbA)

ایمان چاپلاق پریدری^۱، غلامعلی جلالی^۲، علی سنبلی*^۳ و مهرداد زرافشار^۴

۱- کارشناس ارشد، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲- دانشیار، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، گروه بیولوژی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران

پست الکترونیک: a-sonboli@sbu.ac.ir

۴- کارشناس ارشد، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳

چکیده

جنس ممرز از عناصر مهم جنگل‌های هیرکانی می‌باشد که در ارتباط با تعداد گونه‌های آن در ایران براساس نشانگرهای ریختی اختلاف نظر وجود دارد. از این رو در این تحقیق سعی در رده‌بندی گونه‌های این جنس براساس نشانگرهای مولکولی شده است. در این راستا از دو آغازگر بسیار پرکاربرد هسته‌ای (nrDNA ITS) و کلروپلاستی (trnH-psbA) استفاده گردید. DNA کل با استفاده از روش CTAB از برگ‌ها استخراج و بعد محصول‌های PCR شده توالی‌یابی، هم‌ردیف‌سازی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از روش‌های بیشترین صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم افزار *PAUP 4.b10 انجام شد. نتایج حاکی از کارایی بیشتر آغازگر nrDNA ITS نسبت به trnH-psbA در تفکیک و شناسایی گونه‌های این جنس بود. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که گونه‌های مختلف این جنس در دو کلاد جداگانه قرار می‌گیرند. به طوری که نمونه‌های هرباریومی ممرز با مبدأ ارسباران که تا به حال با نمونه‌های جنگل‌های حزری یک گونه پنداشته شده بود، کاملاً از یکدیگر تفکیک شده و در کلاد جداگانه قرار گرفتند و احتمالاً گونه جدیدی از ارسباران باشد. گونه کچف نیز با گونه لور یکسان قلمداد گردید. در واقع می‌توان گفت که تعداد گونه‌های جنس ممرز در ایران براساس مارکر ITS سه گونه و شامل ممرزهای هیرکانی، ممرزهای ارسباران و لور می‌باشد و کچف به‌عنوان یک گونه مجزا مورد تأیید قرار نمی‌گیرد. در نهایت پیشنهاد می‌شود که ممرزهای ارسباران مورد توجه گیاه‌شناسان قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: trnH-psbA nrDNA ITS، ممرز، هیرکانی، فیلوژنی.

مقدمه

Coryloideae یکی از دو زیر تیره Betulaceae بوده که

شامل چهار جنس: *Corylus*، *Carpinus*، *Ostrya*

Scopoli و *Ostryopsis Decne* می‌باشد (Winkler،

1904; Cronquist، 1981). دیگر زیر تیره خانواده

جنس ممرز متعلق به تیره فندق Corylaceae است.

تیره فندق گاهی به‌عنوان یکی از زیر تیره‌های تیره

توسکا یا Betulaceae منظور شده است. تیره

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA را بهترین وسیله برای تشخیص گونه‌های درختی می‌دانند (Balasaravanan et al., 2006). در این تحقیق از دو مارکر مولکولی ITS، با بیش از ۱۰ سال استفاده گسترده در مطالعات فیلوژنتیک Baldwin و همکاران (۱۹۹۲) و همچنین مارکر trnH-psbA، با قدرت تفکیکی بسیار بالا حتی در سطح گونه و کاربرد فراوان در مطالعات DNA بارکد، Monde و همکاران (2000)، برای شناسایی و تفکیک گونه‌های ایرانی جنس ممرز استفاده گردید. این تحقیق در نظر داشت تا با کاربرد نشانگرهای بسیار کارآمد مولکولی به دو هدف زیر برسد:

- ۱- تفکیک دقیق گونه‌های جنس ممرز و رفع ابهامات
- ۲- مقایسه مارکرهای هسته‌ای و کلروپلاستی در شناسایی گونه‌های این جنس

مواد و روشها

جهت انجام مطالعات مولکولی از گونه‌های ممرز (*Carpinus betulus*)، کچف (*Carpinus schuschaensis*) و لور (*Carpinus orientalis*) تعداد پنج نمونه (جدول ۱) به همراه نمونه‌های استفاده شده از بانک جهانی ژن (International Nucleotide Sequence Database Collaboration) انتخاب شد و به آزمایشگاه سیستماتیک مولکولی در پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی منتقل شده و مورد آزمایش قرار گرفتند.

Betulaceae شامل دو جنس *Alnus* و *Betula* است که در این میان جنس *Carpinus* با داشتن حدود ۳۵ گونه بزرگترین جنس Coryloideae می‌باشد (Chen, 1994). (Rehder, 1990) از این جنس در جنگل‌های شمال سه گونه و واریته‌های متعددی گزارش شده است. اگرچه در فلور ایرانیکا اطلاعاتی در مورد رده‌بندی این جنس ارائه شده است ولی هنوز بعضی از ارقام آنها تشخیص داده نشده و به طور کلی نیاز به مطالعات عمیقی می‌باشد. در این خصوص Mobayen (1979) سه گونه ممرز (*Carpinus betulus*)، کچف (*Carpinus schuschaensis*) و لور (*Carpinus orientalis*) را برای جنگل‌های شمال گزارش کرده است، درحالی‌که Ghahreman (2000) گونه کچف (*schuschaensis*) را یک گونه دورگه بین ممرز و لور معرفی کرده است. همچنین Mozaffarian (2005) گونه ممرز با واریته‌های (*Carpinus betulus. var. betulus*) و (*Carpinus betulus. var. parva* Radde-Fomin)، گونه لور با دو زیر گونه *macrocarpa* *Carpinus orientalis* و *Carpinus orientalis* را مورد تأیید قرار می‌دهد و جالب این است که به گونه کچف اشاره ای نکرده است. ولی Sabety (2001) گونه‌های ممرز، کچف، لور و تفر (*Carpinus macrocarpa*) را گزارش نموده است. همان‌طور که مشهود است در ارتباط با تعداد گونه‌های جنس ممرز در ایران اتفاق نظر وجود ندارد و با توجه به اهمیت شناسایی و تفکیک گونه‌های متعلق به یک جنس، برخی محققان خصوصیات ریخت‌شناسی را برای شناسایی گونه‌ها کامل ندانسته و استفاده از

جدول ۱- فهرست و مبدأ گونه‌های مورد استفاده در مطالعات مولکولی

گونه‌ها	منشأ نمونه‌ها	شماره دسترسی در بانک ژن	
		nrDNA ITS	trnH- psbA
<i>Carpinus betulus</i>	آخوند نژاد - ارسباران - ایران (باغ گیاه شناسی نوشهر)	-	-
<i>Carpinus betulus</i>	چاپلاق پریدری - نور - ایران	-	-
<i>Carpinus orientalis</i>	آخوند نژاد - آمل - ایران (باغ گیاه شناسی نوشهر)	-	-
<i>Carpinus orientalis</i>	زارع - کدیر - ایران (باغ گیاه شناسی نوشهر)	-	-
<i>Carpinus schuschaensis</i>	چاپلاق پریدری - کدیر - ایران	-	-
<i>Carpinus caroliniana</i>	آمریکا	AJ783634	AY211430
<i>Carpinus fangiana</i>	چین	AF432034	AY211433
<i>Carpinus cordata</i>	چین	AF432051	AY211442
<i>Carpinus putoensis</i>	چین	AF432051	AY211443
<i>Carpinus tientaiensis</i>	چین	AF432052	AY211444
<i>Carpinus turczaninowii</i>	چین	JF831022	AY211446
<i>Carpinus viminea</i>	چین	AF432058	AY211447
<i>Corylus americana</i>	آمریکا	FJ011735	AY211448
<i>Corylus cornuta</i>	آمریکا	AF297339	AY211450
<i>Corylus chinensis</i>	چین	AF297358	AY211449
<i>Ostrya knowltonii</i>	آمریکا	FJ011755	AY211453
<i>Ostrya rehderiana</i>	چین	FJ011756	AY211454
<i>Alnus japonica</i>	آمریکا	FJ825425	AY211458
<i>Betula occidentalis</i>	آمریکا	AY761125	AY211459
<i>Carpinus betulus</i>	اروپا	AY211429	AY211429
<i>Carpinus sp. Tibet 1942</i>	اروپا	FJ011732	FJ011845
<i>Carpinus orientalis</i>	اروپا	FJ011725	FJ011841
<i>Carpinus monbeigiana</i>	چین	AF432047	AY211439
<i>Carpinus laxiflora</i>	چین	AF432037	AY211434
<i>Ostryopsis nobilis</i>	چین	JF977260	JF977260
<i>Ostryopsis davidiana</i>	چین	JF977246	JN045688

مواردی که با نماد (-) در ستون شماره بانک ژنی ارائه شده‌اند گونه‌های جدید تجزیه و تحلیل شده در این مطالعه بوده که بعداً در بانک DNA ثبت خواهند شد.

از اتمام کار دستگاه، ژل درون محلول رنگ (Gel Red) به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد سپس ژل رنگ آمیزی شده به مدت ۱۰ دقیقه درون آب مقطر قرار گرفته تا رنگ‌های اضافی شسته شوند. در نهایت ژل برای بررسی و عکس‌برداری روی دستگاه (UVP Transilluminator, UK) UV قرار داده شد. باندهای ۳۰ نانوگرمی فاقد کشیدگی (smear) و باندهای اضافی مناسب برای تعیین توالی هستند. محصولات PCR تک باند قوی و بدون کشیدگی جهت تعیین توالی از طریق شرکت ژن فن‌آوران به کشور کره فرستاده شد. توالی‌های بدست آمده ابتدا با استفاده از نرم افزار Clustal X و بعد به صورت دستی هم‌ردیف سازی شدند. برای تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی nrDNA ITS و trnH-psbA کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نمونه‌ها با استفاده از نرم افزار BioEdit پس از ویرایش به صورت متن درآمد (Hall, 1999) و به همراه توالی‌های به‌دست آمده از بانک ژن به دو صورت دستی و با استفاده از نرم افزار Clustal X هم‌ردیف‌سازی (alignment) شد. ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده با روش بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم‌افزار PAUP* 4.b10 (Swofford, 2002) تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

نتایج نشان داد که طول کل قطعه ITS در گونه‌های ممرز ایران ۶۰۷ تا ۶۰۸ جفت باز می‌باشد که درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده برای هر گونه در جدول ۲ نشان داده شده است. طول سه قطعه ITS1، 5/8S و ITS2 نیز به ترتیب ۲۱۶، ۱۵۹ و ۲۳۳ جفت باز بود که البته طول قطعه ITS2 در تاکسون *C. betulus* متعلق به جمعیت ارسباران دارای یک نوکلئوتید کمتر نسبت به بقیه تاکسونها بود. طول قطعه ITS2

برای استخراج DNA، از روش اصلاح شده CTAB، (Doyle & Doyle, 1987) استفاده شد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر و سنجش جذب در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر غلظت و خلوص DNA کل ارزیابی شد. جذب ۰/۱ در ۲۶۰ نانومتر نمایانگر وجود ۵۰ μg از DNA در هر میلی‌لیتر محلول است. خواندن نسبت جذبی A260/A280 nm می‌تواند نمایانگر خلوص DNA باشد (حداکثر جذب DNA در ۲۶۰ نانومتر و پروتئین در ۲۸۰ نانومتر است). مناسبترین نسبت جذبی بین ۱/۷-۱/۹ می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR= Polymerase Chain Reaction) برای توالی هسته‌ای nrDNA ITS با آغازگرهای ITS4 و ITS5 (White *et al.*, 1990) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای توالی کلروپلاستی (trnH-psbA) با آغازگرهای trnH-psbA (Shaw *et al.*, 2005) انجام شد. برای اطمینان از تکثیر DNA، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه ژل آگارز ۰/۲ گرم پودر آگارز (Biomol-DNA Grade, Germany) را با استفاده از حرارت در ۲۵ میلی‌لیتر بافر TBE حل شد. محلول شفاف حاصل را در سینی مخصوص دستگاه الکتروفورز ریخته و شانه مخصوص روی آن قرار گرفت. بعد از بستن ژل، در مخزن دستگاه که حاوی محلول ۱ درصد TBE است قرار داده شد. از هر نمونه PCR شده ۳ میکرولیتر درون یک چاهک ریخته شد. لازم به ذکر است که مخلوط PCR استفاده شده خود حاوی Loading Buffer می‌باشد و نیاز به اضافه کردن مجدد آن نیست. برای تعیین غلظت DNA تکثیر شده حدود ۲ میکرولیتر DNA Ladder در آخرین چاهک ریخته می‌شود. دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و مدت زمان ۳۰ دقیقه سبب حرکت باندهای DNA در ژل آگارز شد. بعد

در گونه‌های جنس ممرز بزرگتر از دو قطعه دیگر بود و تغییرات نوکلئوتیدی در این قطعه بسیار بیشتر از دیگر قطعات بود. قطعه 5/8S یک قطعه کاملاً محافظت شده می‌باشد که طول آن در همه نمونه‌های مورد بررسی برابر بود. سه نمونه مورد بررسی شامل CS (*C. schuschaensis*) از منطقه کجور، CO1 (*C. orientalis*) از کردکوی و CO3

از کدیر از لحاظ ترکیب نوکلئوتید دارای نسبت تقریباً برابر بود و نسبت A+T نیز در این سه گونه نیز به یک مقدار بود و دو گونه CB4 (*C. betulus*) با مبدأ هیرکانی و CB2 (*C. betulus*) با مبدأ ارسباران نیز دارای درصد نوکلئوتید متفاوت نسبت به هم و سایر نمونه‌های مورد بررسی بودند.

جدول ۲-۲۳ ترکیب و درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده nrDNA ITS در ممرزهای مورد مطالعه

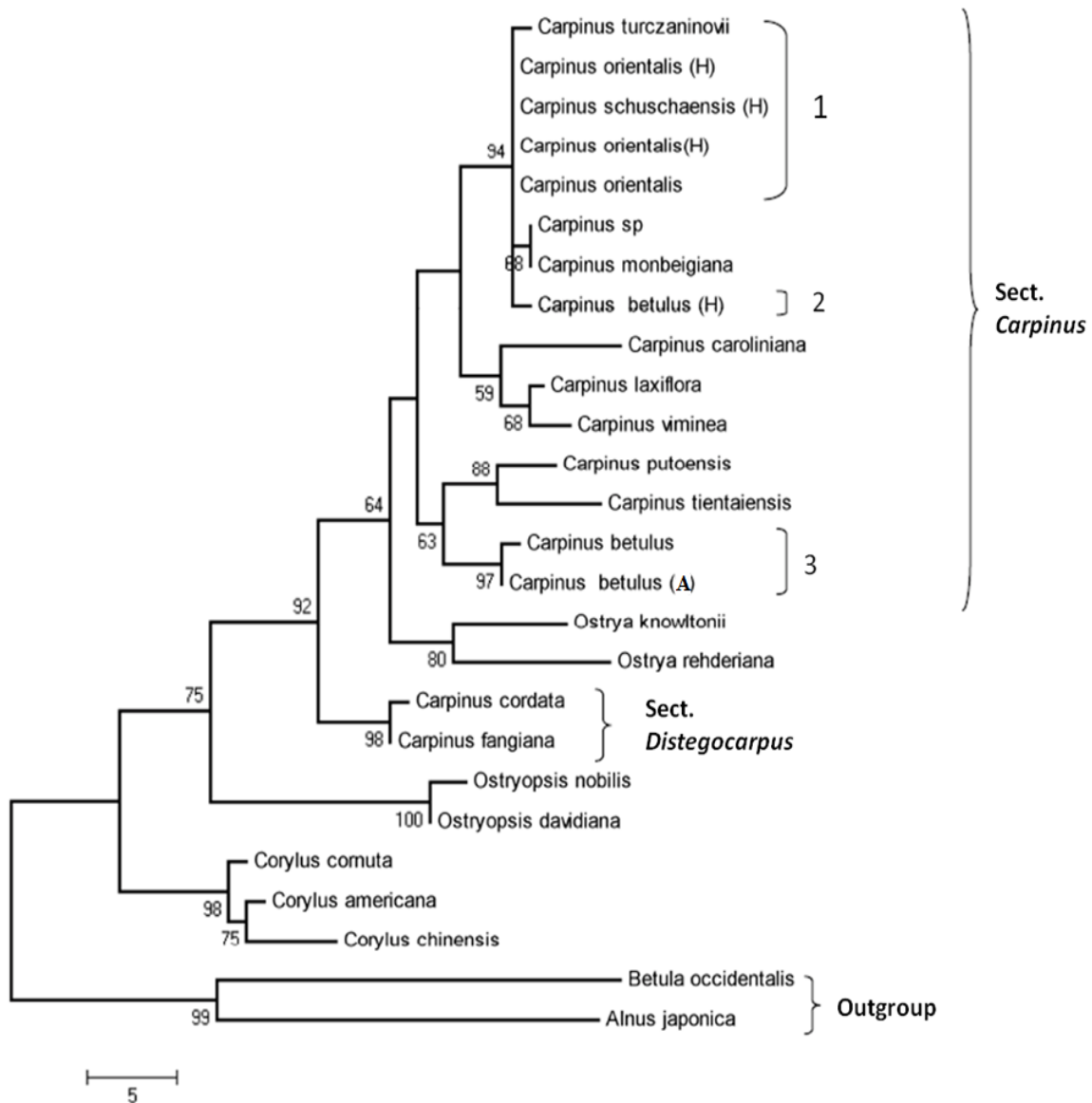
نوکلئوتید	<i>C. schuschaensis</i> Kodir	<i>C. orientalis</i> Kojor	<i>C. orientalis</i> Kordkoy	<i>C. betulus</i> Noor	<i>C. betulus</i> Arasbaran
A	۲۱/۰۵	۲۱/۰۵	۲۱/۰۵	۲۱/۲۲	۲۰/۹۲
C	۳۱/۰۹	۳۱/۰۹	۳۱/۰۹	۳۱/۰۹	۳۱/۱۴
G	۲۸/۱۳	۲۸/۲۹	۲۸/۲۹	۲۷/۹۶	۲۸/۱۷
T	۱۹/۵۷	۱۹/۵۷	۱۹/۵۷	۱۹/۵۷	۱۹/۷۷
G+C	۵۹/۲۱	۵۹/۳۸	۵۹/۳۸	۵۹/۰۵	۵۹/۳۱
A+T	۴۰/۶۳	۴۰/۶۳	۴۰/۶۳	۴۰/۷۹	۴۰/۶۹
طول کل	۶۰۸	۶۰۸	۶۰۸	۶۰۸	۶۰۷

از دوازده نمونه توالی‌یابی شده، ۵ نمونه شامل دو نمونه ممرز (CB2 و CB4)، یک نمونه کچف (CS) و دو نمونه لور (CO1 و CO3) دارای توالی‌های مناسب برای انجام مطالعات مولکولی بودند که همراه با ۱۲ نمونه از جنس *Carpinus*، ۲ نمونه از جنس *Ostrya*، ۲ نمونه از جنس *Ostryopsis* و ۳ نمونه از جنس *Corylus* به‌عنوان درون گروه و دو گونه *Alnus japonica* و *Betula occidentalis* به‌عنوان برون گروه با توجه به مطالعات قبلی (Yoo & Wen, 2002) انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل حداکثر صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) با وزن‌دهی یکسان و حذف صفات فاقد اطلاعات ۵۰۰۰۰ درخت ایجاد کرد که یکی از این کوتاهترین درخت‌ها با ارزش حدود اطمینان کلادها در شکل ۱ نشان داده شده

است. درخت ITS نشان می‌دهد که جنس *Carpinus* پیراتبار (Paraphyletic) بوده و در دو بخش تقسیم می‌شود. بخش *Carpinus* sect. *Carpinus* تک تبار و شامل گونه‌هایی از شرق آسیا، اروپا و شمال و شرق آمریکا می‌باشد. و بخش دیگر *Carpinus* sect. (*Distegocarpus*) که شامل دو گونه *C. cordata* و *C. fangiana* می‌باشد در کلادی جداگانه قرار می‌گیرد و خواهر کلاد *Ostrya* - *Carpinus* sect. *Carpinus* می‌باشد، جنس *Ostrya* نیز خواهر جنس *Carpinus* sect. (*Carpinus*) می‌باشد. جنس دیگر زیر خانواده *Ostryopsis*، *Coryloideae*، خواهر کلاد *Ostrya* - *Carpinus* است و در آخر نیز *Corylus* خواهر کلاد *Ostryopsis* - *Carpinus* - *Ostrya* می‌باشد. حال به

متعلق به مناطق کردکوی و کدیر، نمونه کچف مربوط به منطقه کجور و گونه‌ی *C. turczaninovii* مستخرج از بانک ژن قرار گرفتند و بیانگر این است که با این گونه دارای ارتباط بسیار نزدیک می‌باشند.

بررسی جایگاه گونه‌های مورد بررسی از ایران در درخت ITS می‌پردازیم. ممرزهای ایران در دو کلاد مختلف با درصد ضریب حدود اطمینان بالا قرار می‌گیرند. کلاد اول به سه گروه تقسیم می‌شود. در گروه اول آن دو نمونه لور



شکل ۱- درخت پارسیمونی مرکزی مطلق ۵۰۰۰۰ تا کوتاهترین درخت حاصل از تجزیه و تحلیل توالی ناحیه ITS nrDNA با بوت استرپ بالای ۵۰ درصد
 (علامت (H) نمونه‌های با مبدأ هیرکانی، (A) نمونه‌هایی با مبدأ ارسباران (A) و بقیه نمونه‌ها از بانک ژن گرفته شده است).

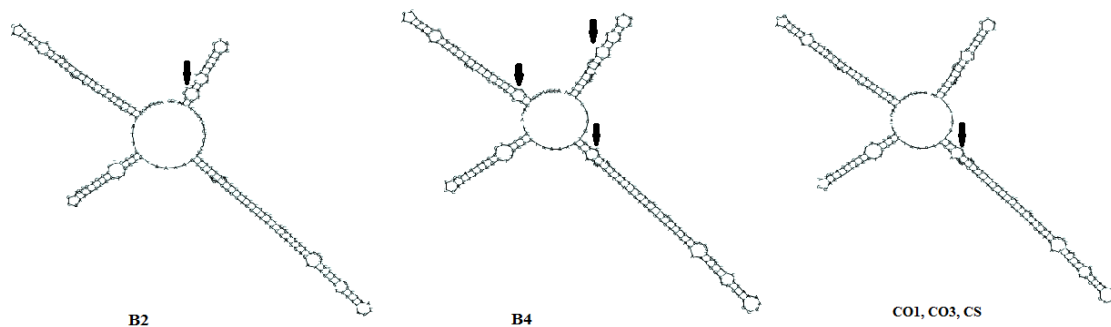
شد این قطعه در جنس ممرز نسبت به ITS1 دارای تغییرات بیشتر می‌باشد. در این قسمت به تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه این قطعه در گونه‌های مختلف جنس ممرز در ایران می‌پردازیم. در کل سه نوع ساختار متفاوت در بین نمونه‌های مورد بررسی شناسایی گردید که مشخصات آنها در شکل ۲ آورده شده است. ساختار ثانویه ITS2 دارای چهار هلیکس با اندازه‌های مختلف می‌باشد که توسط یک هسته مرکزی از هم جدا می‌شوند. هلیکس III بزرگ‌تر از سایر هلیکسها و IV نیز متغیرترین می‌باشد. هلیکس II از نظر اندازه و ساختار در کلیه نمونه‌های مورد بررسی تقریباً مشابه و ثابت است (جدول ۳).

گروه دوم شامل یک نمونه نامشخص از جنس ممرز و گونه *C. monbeigiana* بود و در گروه بعدی نمونه ممرز متعلق به پارک جنگلی نور به تنهایی قرار گرفت. نمونه دیگر مورد بررسی در این تحقیق که متعلق به منطقه ارسباران می‌باشد، در یک کلاد کاملاً جداگانه به همراه گونه‌های *C. tiantaiensis* و *C. betulus*، *C. putoensis* برگرفته از بانک ژن قرار گرفته است. توپولوژی عمومی درخت حاصل از روش ML (Maximum likelihood) نیز مشابه روش MP می‌باشد.

ITS2 یک قطعه بسیار پر کاربرد در مطالعات شناسایی و رده‌بندی گونه‌های گیاهی می‌باشد و همان‌طور که اشاره

جدول ۳- اندازه و تعداد نوکلئوتید هلیکس در ساختار ثانویه ITS2

IV	III	II	I	تاگزون
۱۸	۶۶	۲۲	۴۴	CB2
۲۴	۶۴	۲۴	۴۰	CB4
۲۶	۶۴	۲۴	۴۲	CO1, CO3, CS



شکل ۲- تنوع ساختار ثانویه ITS2 در نمونه‌های جنس ممرز مورد مطالعه

و درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده نسبت به دو گونه دیگر از شباهت بیشتری به یکدیگر برخوردار می‌باشند. ۲۱ نمونه شامل ۱۱ گونه *Carpinus*، سه گونه از جنس

اندازه و مشخصات قطعه *trnH-psbA* و ترکیب نوکلئوتیدی آن در گونه‌های مورد بررسی در جدول ۴ آمده است. سه نمونه CO1 و CO3، CS از لحاظ ترکیب

متفاوت می‌باشد یکی از این تفاوت‌ها در ارتباط با جایگاه‌های *Ostryopsis*، *Corylus* و *Carpinus* (sect. *Distegocarpus*) می‌باشد. نمونه‌های مورد بررسی از ایران به علت اختلافات کم جایگزینی نوکلئوتیدی روابط بین آنها به خوبی حل نشده است و همگی در درون یک کلاد و جدا از بقیه گونه‌ها قرار می‌گیرند و دارای رابطه‌ای نزدیک با دو گونه *C. orientalis* و *C. betulus* با مبدأ اروپا و مستخرج از بانک ژن می‌باشند.

Ostrya، دو نمونه *Ostryopsis*، چهار نمونه از جنس *Corylus* به همراه دو برون گروه *Alnus japonica* و *Betula occidentalis* با توجه به مطالعات قبلی (Yoo & Wen, 2002) انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل بیشترین صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) با وزن یکسان و حذف صفات بی اطلاعات ۵۰۰۰۰ درخت ایجاد شد که یکی از این کوتاهترین درخت‌ها با ارزش حدود اطمینان کلادها در شکل ۴-۲۵ نشان داده شده است. درخت به دست آمده با درخت حاصل از ITS

جدول ۴- درصد و ترکیب نوکلئوتید قطعه trnH-psbA در ممرزهای مطالعه شده

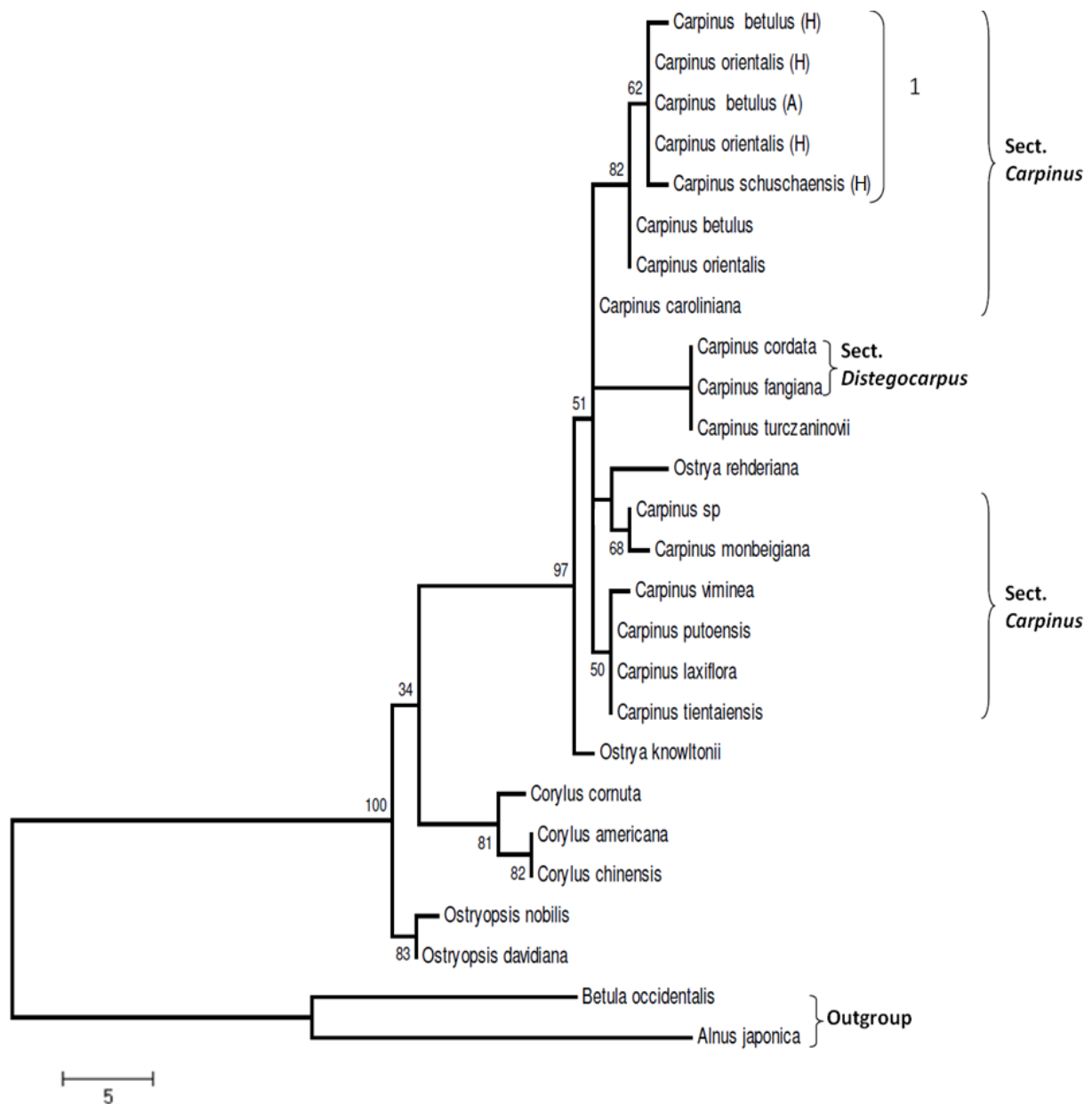
نوکلئوتید	<i>C. schuschaensis</i> Kodir	<i>C. orientalis</i> Kojor	<i>C. orientalis</i> Kordkoy	<i>C. betulus</i> Noor	<i>C. betulus</i> Arasbaran
A	۲۸/۲۳	۲۸/۸۸	۲۸/۸۸	۲۹/۱۰	۲۸/۷۳
C	۱۲/۰۴	۱۱/۶۰	۱۱/۶۰	۱۱/۶۰	۱۱/۶۲
G	۱۶/۸۵	۱۶/۶۳	۱۶/۶۳	۱۶/۴۱	۱۶/۶۷
T	۴۲/۸۹	۴۲/۸۹	۴۲/۸۹	۴۲/۸۹	۴۲/۹۸
G+C	۲۸/۸۸	۲۸/۲۳	۲۸/۲۳	۲۸/۰۱	۲۸/۲۹
A+T	۷۱/۱۲	۷۱/۷۷	۷۱/۷۷	۷۱/۹۹	۷۱/۷۱
طول قطعه	۴۵۷	۴۵۷	۴۵۷	۴۵۷	۴۵۶

از جمله *Carpinus* توسط محققان مختلفی مانند Chen و همکاران (1999)، Yoo و Wen (2002) و Sun و همکاران (2011) مورد تأیید قرار گرفته است، در این تحقیق نیز این نشانگر مورد استفاده قرار گرفت.

تغییر در ترکیب توالی نوکلئوتیدی در بین گونه‌های مختلف متفاوت است (Harris & Crandall, 2000) که هم راستا با این یافته *C. betulus* از ارسباران و *C. betulus* با مبدأ هیرکانی دارای ترکیب نوکلئوتیدی متفاوت نسبت به هم و نسبت به سه گونه *C. orientalis* از کردکوی و *C. orientalis* از کدیر و همچنین *C. schuschaensis* از کجور می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

راهکار مناسب در ارتباط با رده‌بندی گونه‌هایی که دارای شباهت‌های ریختی فراوان می‌باشند مانند گونه‌های جنس ممرز (Chapolagh Paridari et al., 2012)، استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد (Formm, 2001). در استفاده از نشانگرهای مولکولی نیز باید نشانگری استفاده نمود که قابلیت تفکیک و شناسایی در ارتباط با جنس و گونه مورد مطالعه را دارا باشد. از آنجایی که کارایی نشانگر ITS رده بندی گونه های گیاهی پیش از این اثبات شده بود (Feliner & Rossello, 2007)، همچنین کارا بودن ITS در ارتباط با خانواده Corylaceae و جنس‌های مختلف آن



شکل ۲- درخت پارسیمونی مرکزی مطلق ۵۰۰۰۰ تا کوتاهترین درخت حاصل از تجزیه و تحلیل توالی ناحیه *trnH-psbA* با بوت استرپ بالای ۵۰ درصد

(علامت (H) نمونه‌های با مبدأ هیرکانی، (A) نمونه‌هایی با مبدأ ارسباران (A) و بقیه نمونه‌ها از بانک ژن گرفته شده است).

خصوصاً Chen و همکاران (2010) با بررسی ۶۶۰۰ نمونه از ۴۴۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۷۵۰ جنس با استفاده از مارکرهای مختلف به این نتیجه رسیدند که قطعه ITS2 در ۹۲/۷٪ موارد به درستی گونه‌های مورد مطالعه را شناسایی

همچنین نتایج نشان داد که نقاط اطلاع‌رسان (informative) در ITS2 بسیار بالاتر از ITS1 می‌باشد، در حالی که Yousefzadeh و همکاران (2011) عکس این مطلب را در ارتباط با جنس نمودار گزارش کردند. در این

جدا افتادگی جغرافیایی این گونه و قرار گرفتن آن در مسیر تکاملی متفاوت با توجه به شرایط محیطی و اقلیمی متفاوت دانست، پس می‌توان با توجه به فاصله ژنتیکی قابل ملاحظه، حضور یک گونه جدید را در ارسباران محتمل دانست. در تحقیقی مشابه Akhondnezhad (2011) گزارش کرد که گونه‌های ممرز موجود در ایران در دو کلاد جداگانه قرار می‌گیرند و ایشان همچنین اشاره نمود که در ایران دو گونه ممرز شامل *C. orientalis* و *C. betulus* وجود دارد و همچنین وجود گونه‌ها و واریته‌های جدید در منطقه ارسباران را محتمل دانستند.

فاصله بین ژنی *trnH-psbA* به دلیل الگوی جانشینی بالا همیشه به‌عنوان یک مارکر مناسب در مطالعاتی که با استفاده از روش DNA بارکد صورت می‌گیرد مد نظر گیاه‌شناسان بوده است (Whitlock et al., 2010) ولی در این مطالعه تغییرات نوکلئوتیدی محسوسی در بین نمونه‌های مورد مطالعه دیده نشد شاید دلیل آن را بتوان فرم رویشی درختی جنس ممرز و عمر بالای آن و همچنین پدیده‌ی تأثیر زمان نسلی (Generation time effect) که طبق آن جایگزینی نوکلئوتیدی در گونه‌های درختی کندتر از گونه‌های علفی می‌باشد دانست (Gaut et al., 1996; Graur & Li, 1999) به طوری که در درخت فیلوژنی همه نمونه‌های مورد بررسی از ایران درون یک کلاد قرار گرفتند. بنابراین نتایج این تحقیق، نشانگر *trnH-psbA* را ابزار مناسب جهت بررسی روابط بین گونه‌های جنس ممرز معرفی نمی‌کند.

از آنجا که در رده‌بندی گونه‌های جنس ممرز براساس صفات مورفولوژیک بین محققان مختلف اختلاف نظر وجود دارد، بنابراین برای رفع این اختلافات بی شک مطالعات مولکولی لازم بود که با توجه به مطالعات قبلی

نموده است و ITS2 قابلیت استفاده به‌عنوان DNA بارکد را در شناسایی گونه‌های گیاهی و درک رابطه بین آنها را دارد. یافته‌های ما نتایج آن تحقیق را تأیید می‌کند. بررسی ساختار ثانویه قطعه ITS2 در رده‌بندی گونه‌هایی که دارای ارتباط بسیار نزدیک با هم هستند مارکر مناسبی می‌باشد (Muller et al., 2007). از این رو بکارگیری آن در گونه‌های ممرز که قرابت بسیار بالایی با هم دارند (Li & Cheng, 1979) نیز کارآمد خواهد بود. در این پژوهش با بررسی ساختار هلیکس‌ها در قطعه ITS2 سه نوع ساختار متفاوت شناسایی گردید، که در واقع این سه نوع ساختار متفاوت مربوط به نمونه‌هایی می‌باشد که در درخت فیلوژنی در کلادها و زیرکلادهای مختلف قرار می‌گیرند. این یافته بیانگر نقش و رابطه قطعه ITS در درخت فیلوژنی بوده و نقش آن را در بازسازی درخت فیلوژنی گونه‌های مختلف تأیید می‌نماید (Young & Coleman, 2004; Oliverio et al., 2002). بررسی درخت فیلوژنی ITS ارتباط نزدیک بین گونه‌های جنس ممرز ایران با مبدأ هیرکانی را با گونه‌های *C. turczaninowii* و *C. mobiegiana* نشان داد که در واقع یافته‌های ما نتایج Sun و همکاران (2011)، Yoo و Wen (2002) و Akhondnezhad (2011) مبنی بر اینکه که گونه‌های *C. monbeigiana*، *C. orientalis*، *C. turczaninowii* و *C. polyneura* براساس خصوصیات ریختی و درخت ITS در یک گروه هستند را تأیید می‌کند. هرچند که در این مطالعه گونه *C. polyneura* در درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار نگرفت ولی بررسی توالی نوکلئوتیدی این گونه درصد تشابه بسیار بالایی را با گونه‌های ممرز جنگل‌های هیرکانی نشان داد. جدا قرار گرفتن نمونه ممرز ارسباران در یک کلاد کاملاً جداگانه را می‌توان ناشی از

نشانه‌های ITS و trnH-psbA مورد توجه قرار گرفت. نتایج نشان داد که نشانگر trnH-psbA برخلاف اثبات کارآمد بودن آن در ارتباط با جنس‌های مختلف گیاهی، در مورد جنس ممرز کارآمد نبود. بررسی توالی نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد که نقاط جایگاه اطلاع‌رسان (Informative) در قطعه ITS2 بیشتر از ITS1 می‌باشد. بنابراین با رسم ساختار ثانویه ITS2 به بررسی ساختار هلیکس‌ها پرداخته شد و سه گروه متفاوت شناسایی و از هم تفکیک شد که البته نمونه‌هایی که دارای ساختار ثانویه یکسان هستند در درخت فیلوژنی نیز دارای جایگاه یکسان هستند. گروه اول شامل نمونه‌هایی از گونه لور و کچف می‌باشد که از مشخصات بارز آنها نداشتن لوب جانبی و وجود دندان بر روی براکت می‌باشد، بنابراین می‌توان ادعا کرد که دو گونه لور و کچف در واقع یک گونه بوده (Synonymous) و شاید بتوان تنوع بین جمعیتی لور را عامل اصلی ابهام این دو گونه دانست. گونه ممرز از جنگل‌های هیرکانی به تنهایی در گروهی جداگانه و به همراه دو گونه لور و کچف در درون یک کلاد قرار گرفت و مشخصه قابل تمایز این گروه وجود براکت سه لوبه، با لوب‌های جانبی نسبتاً بزرگ و بدون دندان روی براکت می‌باشد. گروه سوم نیز نمونه‌ای از گونه ممرز از جنگل‌های ارسباران می‌باشد که با فاصله ژنتیکی زیاد در یک کلاد کاملاً جداگانه نسبت به نمونه‌های جنگل‌های هیرکانی قرار گرفته و دارای ویژگی‌هایی مانند براکت دندان دار و لوب‌های جانبی بسیار کوچک و تحلیل رفته که البته فرم رویشی درختچه‌ای را نیز باید به آن اضافه نمود می‌باشد. با توجه به این فاصله ژنتیکی نسبتاً زیاد و انزوای جغرافیایی ارسباران از جنگل‌های هیرکانی انتساب واریته *Carpinus*

نشانگرهای ITS و trnH-psbA مورد توجه قرار گرفت. نتایج نشان داد که نشانگر trnH-psbA برخلاف اثبات کارآمد بودن آن در ارتباط با جنس‌های مختلف گیاهی، در مورد جنس ممرز کارآمد نبود. بررسی توالی نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد که نقاط جایگاه اطلاع‌رسان (Informative) در قطعه ITS2 بیشتر از ITS1 می‌باشد. بنابراین با رسم ساختار ثانویه ITS2 به بررسی ساختار هلیکس‌ها پرداخته شد و سه گروه متفاوت شناسایی و از هم تفکیک شد که البته نمونه‌هایی که دارای ساختار ثانویه یکسان هستند در درخت فیلوژنی نیز دارای جایگاه یکسان هستند. گروه اول شامل نمونه‌هایی از گونه لور و کچف می‌باشد که از مشخصات بارز آنها نداشتن لوب جانبی و وجود دندان بر روی براکت می‌باشد، بنابراین می‌توان ادعا کرد که دو گونه لور و کچف در واقع یک گونه بوده (Synonymous) و شاید بتوان تنوع بین جمعیتی لور را عامل اصلی ابهام این دو گونه دانست. گونه ممرز از جنگل‌های هیرکانی به تنهایی در گروهی جداگانه و به همراه دو گونه لور و کچف در درون یک کلاد قرار گرفت و مشخصه قابل تمایز این گروه وجود براکت سه لوبه، با لوب‌های جانبی نسبتاً بزرگ و بدون دندان روی براکت می‌باشد. گروه سوم نیز نمونه‌ای از گونه ممرز از جنگل‌های ارسباران می‌باشد که با فاصله ژنتیکی زیاد در یک کلاد کاملاً جداگانه نسبت به نمونه‌های جنگل‌های هیرکانی قرار گرفته و دارای ویژگی‌هایی مانند براکت دندان دار و لوب‌های جانبی بسیار کوچک و تحلیل رفته که البته فرم رویشی درختچه‌ای را نیز باید به آن اضافه نمود می‌باشد. با توجه به این فاصله ژنتیکی نسبتاً زیاد و انزوای جغرافیایی ارسباران از جنگل‌های هیرکانی انتساب واریته *Carpinus*

سپاسگزاری

از کارکنان باغ گیاه‌شناسی نوشهر بخصوص جناب آقای دکتر زارع و سرکار خانم امینی به دلیل کمک‌های ارزشمندشان و همچنین سرکار خانم اولنج و پرکان و دیگر عزیزان پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی و سرکار خانم توسلی که در انجام این مطالعه زحمات فراوان کشیده‌اند و اینجانب را یاری نموده‌اند کمال تشکر را دارم.

منابع مورد استفاده

- Akhondnezhad, S., 2011. Biosystematics of the genus *Carpinus* in Iran Islamic Azad University, PhD thesis, Tehran, Iran.
- Balasaravanan, T., Chezhan, P., Kamalakannan, R., Yasodha, R., Varghese, M., Gurumurthi, K., and Ghosh, M., 2006. Identification of species-diagnostic ISSR markers for six *Eucalyptus* species. *Silvae Genetica* 55: 119-122.
- Baldwin, B. G., 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1: 3-16.
- Chapolagh Paridari, I., Jalali, Gh., Sonboli, A., and Zarafshar, M., 2012. Leaf, stomata and trichome morphology of *Carpinus* Genus. *Taxonomy and Biosystematic*, 4: 11-26.
- Chen Z.D., Manchester, S.R. and Sun, H.Y., 1999. Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany. *American Journal of Botany*. 86: 1168-1181.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y. and Leon, C., 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE*, 5 : e8613.

- Rehder, A., 1990. Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America. Portland, OR: Dioscorides Press, 996p.
- Sabety, H., 2001. Tree and shrubs of Iran. Yazd University, 791pp.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. and Small, R.L., 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. American Journal of Botany 92:142-166
- Sun, Y.L., Wang, D., Lee, H.B., Park, W.G., Kwon, O.W. and Hong, S. K., 2011. Phylogeny of Korean Hornbeam (*Carpinus turczaninovii*) based on nuclear ribosomal ITS Sequence, African Journal of Biotechnology. 10: 17435-17442.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony(*and other methods), vers. 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies, pp. 315-322 in *PCR Protocols*, edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, San Diego.
- Whitlock, B.A., Hale, A.M. and Groff, P.A., 2010. Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. PLoS ONE, 5: e11533
- Winkler, H., 1904. Betulaceae. In A. Engler [ed.], Das Pflanzenreich19 (IV.61): 1-149. Engelmann, Leipzig.
- Yoo, K.O. and Wen, J., 2002. Phylogeny and biogeography of *Carpinus* and subfamily Coryloideae (Betulaceae). International Journal of Plant. 163: 641-650.
- Young, I. and Coleman, A.W., 2004. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. Molecular Phylogenetics and Evolution. 30:236-42.
- Yousefzadeh, H., 2011. Biosystematics of the genus *Tilia* in north of Iran, PhD thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- Chen, Z. D., 1994. Phylogeny and phylogeography of the Betulaceae. Acta Phytotax Sinica. 32: 101-153.
- Cronquist, A., 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, London.640p.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19:11-15.
- Feliner, G.N. and Rossello, J. A., 2007. Better the devil you know? Guideline for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. Molecular Phylogenetics and Evolution, 44: 911-919.
- Gaut, B.S., Morton, B.R., Mccaig, B.C. and Clegg. M.T., 1996. Substitution rate comparisons between grasses and palms: Synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. Proceedings of the National Academy of Science. 93: 10274-10279.
- Ghahreman, A., 2000 . Biodiversity of plant species in Iran, vol. 1. Tehran University Publications. Tehran. Iran.
- Graur, D. and Li, W.H., 1999. Fundamentals of Molecular Evolution, 2nd Edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids Symposium Series. 41:95-98.
- Harris, D.J. and Crandall, K.A., 2000. Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of crayfish (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. Molecular Biology and Evolution, 17:284-291.
- Li, P.C., and Cheng, S.X. 1979. Betulaceae. In: Kuang, K.Z. and Li, P.C. [Eds.], Flora Republicae Popularis Sinicae 21: 44-137. Science Press, Beijing (Chinese).
- Mobayen, S., 1979. Flora of Iran, Vascular Plants vol. 2: 161-169. (Persian language). Tehran. Iran
- Monde, R.A., Schuster, G. and Stern, D.B., 2000. Processing and degradation of chloroplast mRNA. Biochimie 82: 573-582.
- Mozaffarian, V., 2005. Trees and Shrubs of Iran, Tehran University Publications. Iran.
- Oliverio, M., Cervelli, M. and Mariottini, P., 2002. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods(Caenogastropoda, Muricoidea). Molecular Phylogenetics and Evolution. 25:63-9.

Revision of Iranian *Carpinus* species using of molecular markers (nrDNA ITS and trnH-psbA)

I. Chapolagh Paridari¹, Gh. Jalali², A. Sonboli^{*3} and M. Zarafshar⁴

1- M.Sc., Department of Forestry, Faculty of Natural Resource, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran.

2- Assoc. Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resource Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran.

3* - Corresponding author, Assis. Prof., Department of Biology, Medicinal Plants and Drugs Research Institute of Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. Iran. Email: a-sonboli@sbu.ac.ir

4- M.Sc., Department of Forestry, Faculty of Natural Resource, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran.

Received: 21.02.2012

Accepted: 01.07.2012

Abstract

Carpinus Genus is an important element in the Hyrcanian forest. There are some ambiguities and disagreements among botanist about the genus. In the current research, useful molecular markers were used for revision of the genus. We used DNA barcode nrDNA ITS and trnH-psbA and compared the performance of the two markers. CTAB method was used in order to extracting of leaves genomic DNA. PCR product sequencing and alignment and phylogenetic analyses of the dataset were conducted according to maximum parsimony (MP) method by using PAUP* A software. Results indicated that nrDNA ITS is more efficient than trnH-psbA for separation of the species. The surveyed results show that different species of the genus are placed in two separate clades. Before that *C. Betulus* form Arasbaran was assumed same and similar to *C. betulus* from Hyrcanian forest but the current finding showed that it was completely isolated and placed in the separate clade. Furthermore, *Carpinus orientalis* and *Carpinus schuschaensis* are Synonymous. Finally, we proposed that *C. betulus* from Arasbaran should be considered by botanists.

Key words: nrDNA ITS, cpDNA, *Carpinus*, Hyrcanian, Phylogeny.