

دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۲، شماره ۲، صفحه ۱۸۰-۱۶۸ (۱۳۹۳)

شناسایی مولکولی جنس توس (*Betula*) براساس توالی‌یابی ناحیه ITS و ساختار ثانویه آن در ایران

حمید بینا^۱، حامد یوسف‌زاده^{۲*}، محمد اسماعیل‌پور^۳ و امید اسماعیل‌زاده^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته جنگل‌داری، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲* - نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس، نور

پست الکترونیک: h.yousefzadeh@modares.ac.ir

۳- عضو هیئت علمی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان

۴ - استادیار دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس، نور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۰۷

چکیده

در این تحقیق فیلوژنی و جایگاه تاکسونومیکی توس‌های ایران بر اساس توالی‌یابی ناحیه فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه برگ از چهار جمعیت باقیمانده از توس در ایران جمع‌آوری و پس از استخراج DNA ناحیه ITS آن تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج نشان داد که طول کل ناحیه ITS برای زیرجنس‌های مختلف توس ۶۱۰ تا ۶۱۱ جفت باز و برای نمونه‌های توس ایران ۶۱۱ جفت باز بود. نمونه‌های توس ایران از لحاظ درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده بیشترین میزان شباهت و کمترین فاصله ژنتیکی را با گونه *B. pendula* نشان دادند. بر اساس تحلیل جایگاه‌های نوکلئوتیدی، توس‌های ایران به دلیل داشتن نوکلئوتید انحصاری T در جایگاه ۲۰۹ از سایر توس‌های مورد مطالعه متمایز بود. همچنین چهار نوع ساختار ثانویه ITS2 متمایز، برای کل گونه‌های مورد بررسی از جنس توس شناسایی شد. رسم درخت فیلوژنی حکایت از تک نیایی جنس توس داشت. بر این اساس گونه‌های مختلف جنس توس در سه گروه اصلی قرار گرفتند. توس‌های ایران به همراه گونه *B. pendula* در اولین شاخه گروه اول قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، توس، ITS، DNA بارکدینگ، تنوع ژنتیکی.

مقدمه

جمعیت‌های مختلف آن وجود دارد، قابل توجه است (Johnsson, 1949; Cote et al., 2002). پراکنش توس در ایران به صورت لکه‌ای و در ارتفاعات بندین واقع در استان مازندران (ارتفاع بالای ۲۲۰۰ متر از سطح دریا) و همچنین ارتفاعات شهرستانک واقع در استان البرز و در دره تالار واقع در استان سمنان (بین زیرآب و شه‌میرزاد) گزارش شده است (Sabeti, 1976). این گونه در منطقه مارمیشو

جنس توس (*Betula*) در دنیا مشتمل بر ۳۰ تا ۶۰ گونه بوده (Dejong, 1993; Furlow, 1990) که به صورت گونه‌های درختی و درختچه‌ای به طور گسترده‌ای در نیمکره شمالی پراکنش دارند (Furlow, 1990). گونه‌های مختلف این جنس به لحاظ ریختی شباهت‌های بسیار زیادی با همدیگر دارند، که این امر با توجه به ارتباط ژنی که در بین

پژوهش‌های فیلوژنی و تکنیک DNA بارکدینگ پیدا کرده است (Schultz *et al.*, 2009) که در آن بخش کوچکی از ژنوم گیاه توالی‌یابی می‌شود و برای شناسایی و تعیین ارتباط بین گونه‌های مختلف یک جنس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hollingsworth *et al.*, 2009). شواهد بیوشیمیایی حکایت از نقش مهم ITS در شکافتن آسان‌تر دامنه (Domain) و فراهم نمودن یک جایگاه اتصال برای پروتئین‌های درگیر در طول فرایند تولید ریبوزوم دارد (Nazar, 2003; 2004). محققان با مطالعه تغییرات حذف و اضافه در توالی ITS نشان دادند که محافظت‌شدگی و دست‌نخورده‌گی آن نقشی اساسی در فرایند بلوغ ریبوزوم ایفا می‌کند (Sande *et al.*, 1992; Nues *et al.*, 1994; Cote *et al.*, 2002). همچنین امروزه رسم ساختار ثانویه ITS و مقایسه آن برای استنباط درست روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها به دلایل افزایش دقت نتایج فیلوژنتیکی و امکان بررسی حضور تغییر باز جبرانی (Compensatory Base Change) - به عنوان یکی از ابزارهای مناسب برای تعیین حدود گونه‌ها مطرح است (Muller *et al.*, 2007). زمانی که در یک RNA رونویسی شده اولیه یک جفت نوکلئوتید در یک جایگاه بدون تغییر ساختار جهش پیدا کنند، تغییر باز جبرانی یا CBC رخ داده است (برای مثال جهش نوکلئوتید GC به AU) (Gutell *et al.*, 1994). به همین دلیل است که از این ناحیه به طور گسترده‌ای در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک در سطح گونه استفاده می‌شود (Coleman, 2003; Keller *et al.*, 2008; Yousefzadeh *et al.*, 2012; Alvarez & Wendel, 2003).

این تحقیق در نظر دارد تا با استفاده از توالی‌های ناحیه ITS، جایگاه تاکسونومیک توس‌های ایران را از طریق مقایسه با توس‌های سایر نقاط دنیا که اطلاعات آنها در پایگاه اینترنتی NCBI موجود می‌باشد، مورد ارزیابی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

انتخاب رویشگاه‌ها: رویشگاه‌های مورد بررسی در این تحقیق، شامل: مارمیشو ارومیه، شهرستانک کرج، سنگده

آذربایجان غربی هم وجود دارد و به نام محلی حاجی‌بیوک نامیده می‌شود (Sabeti, 1976). در منابع خارجی نیز تنها یک گونه از توس در ایران با نام علمی (*B. pendula*) (Roth) گزارش شده است (Browicz; 1972, 1982). در سال‌های اخیر نیز Zare و همکاران (۲۰۱۰) علاوه بر تأیید حضور گونه *B. pendula*، گونه *B. litwinowii* Douch را نیز به عنوان یک گونه جدید در لیست فلور گیاهان ایران ثبت کرده‌اند. با وجود اینکه ترکیبات شیمیایی متعددی نظیر فلاونوئیدها و تریپنوئیدها در جنس توس موجود می‌باشد، ولی تلاش محققان به منظور طبقه‌بندی این جنس بر مبنای این ترکیبات تاکنون نتیجه‌ای در پی نداشته است (Pokhilo *et al.*, 1988; Hansel & Horhammer, 1954).

تاکنون پنج طبقه‌بندی مختلف در مورد توس‌ها انجام شده است که از آن جمله، می‌توان به تقسیم‌بندی DeJong (1993) در مورد توس‌ها اشاره کرد که بر اساس فرم رویشی (درختی یا درختچه‌ای بودن)، وجود متیل سالیسیلات در پوست درخت و همچنین نوع گل‌آذین، برای توس‌ها ۵ زیرجنس مختلف در نظر گرفت ولی (Skvortsov, 2002) تقسیم‌بندی جدیدی شامل چهار زیرجنس و هشت بخش (Section) برای توس‌ها در نظر گرفت. در این تحقیق هم‌راستا با سایر تحقیقاتی که در مورد فیلوژنی جنس توس انجام شد از تقسیم‌بندی که Dejong (1993) در مورد جنس توس انجام داد، استفاده شد (Jarvinen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). در سال‌های اخیر از یکسو به دلیل شباهت‌های ریختی بالایی که بین گونه‌های مختلف جنس توس وجود دارد و از سوی دیگر به دلیل ضعف شیمی تاکسونومی در طبقه‌بندی و تشخیص صحیح گونه‌های مختلف توس و وابستگی شدید برخی از صفات ریختی به شرایط رویشگاه، استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تاکسونومی و طبقه‌بندی در این جنس و بررسی تفاوت و تغییرات در بین جمعیت‌های مختلف آن، پیشنهاد شده است (Howland *et al.*, 1995). ناحیه فاصله‌انداز رونویسی شونده داخلی (Internal Transcribed Spacer) یکی از انواع نشانگرهای مولکولی است که در دهه‌های اخیر کاربرد بسیاری در

ساری، سیامرزکوه استان گلستان و باغ گیاه‌شناسی نوشهر (یک نمونه) بودند که مورد استفاده قرار گرفت. از این رویشگاه‌ها برای استخراج DNA، نمونه برگ توس جمع‌آوری شد. مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده در جدول ۱ بیان شد.

جدول ۱- مشخصات ثبت شده مکان‌های نمونه‌برداری از توس در ایران

نام جمعیت	استان	ارتفاع از سطح دریا (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
سیاه‌مرزکوه	گلستان	۲۳۴۴	۵۵ ۰۱	۳۶ ۳۸
بند بن	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

(2014a) آنزیم برشگر مناسب انتخاب شد. سپس برای هضم آنزیمی محصولات PCR ابتدا مخلوط واکنش‌گرهای آنزیمی در داخل تیوپ‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تهیه شد. بعد از ورتکس کوتاه، تیوپ‌ها به مدت ۳ تا ۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند. سپس مخلوط واکنش در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (که دمای بهینه آنزیم *EcoRI* است) به مدت یک ساعت اینکوبه شده و به منظور تأیید عملکرد آنزیم، محصول PCR به حجم ۵ میکرولیتر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. در نهایت محصول تأیید شده، برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. استخراج توالی از الکتروفروگرام‌های دریافتی با استفاده از نرم‌افزار Chromas ver. 2 انجام شد.

رسم درخت فیلوژنی: توالی‌های ناحیه ITS زیرجنس‌های مختلف توس (DeJong, 1993) از بانک جهانی ژن (NCBI) دریافت شد (جدول ۲). درخت فیلوژنی بر اساس روش‌های نزدیک‌ترین همسایه (Joinin, NJ), حداکثر پارسیمونی (Maximum MP), حداکثر شباهت (Parsimony, Maximum ML), با استفاده از نرم‌افزار Mega. 5 و درخت فیلوژنی (Bayesian inference, BI), با استفاده از نرم‌افزار TOPALI v.2 رسم گردید. از آنجا که درختان فیلوژنی رسم شده به روش‌های (NJ) (MP) و (ML) کاملاً مشابه هم‌دیگر بودند، در اینجا فقط نتایج درخت رسم شده بر اساس روش ML و BI ارائه گردید (شکل ۲).

استخراج DNA و تکثیر ناحیه ITS: استخراج DNA ژنومی از برگ توس، با استفاده از روش Porebski و همکاران (۱۹۹۷) با اعمال کمی تغییرات انجام شد (Esmailpour, 2013). ناحیه ITS با استفاده از توالی آغازگر پیش‌رو (ITS1:5-TCGAAACCTGCCTAGCAG) و پس‌رو (ITS4:5- ATGCGAGCATCGTTCTGA) گزارش شده توسط White و همکاران (۱۹۹۰) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از کیت لیوفلیزه شده (شرکت Bioneer) انجام شد. به این منظور به هر یک از تیوپ‌ها، ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو و DNA الگو (۲۰ نانوگرم) اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۶۰ ثانیه، ۳۲ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر به مدت ۹۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۶۰ ثانیه بود.

تأیید ناحیه ITS و توالی‌یابی آن: به منظور حصول اطمینان از اینکه قطعه تکثیر شده اختصاص به جنس توس دارد، دو سیستم تأییدی شامل استفاده از الگوی هضم آنزیمی توالی‌یابی و ابزار اینترنتی Blast استفاده شد. در سیستم تأییدی با استفاده از الگوی هضم آنزیمی، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار (Anonymous,) Nebcutter Ver. 2.0

جدول ۲- مشخصات و کد دسترسی نمونه‌های مورد مطالعه در بانک جهانی ژن (NCBI)

گونه	کد دسترسی	گونه	کد دسترسی	گونه	کد دسترسی
<i>B. pendula</i>	۵۹۷۲۴۹۵۰	<i>B. fruticosa</i>	۵۹۷۲۴۹۳۲	<i>Co. heterophylla</i>	۱۱۵۹۶۲۲۵
<i>B. platyphylla</i>	۸۳۷۵۸۳۳۶	<i>B. middendorffii</i>	۸۳۷۵۸۳۴۰	<i>Co. chinensis</i>	۵۷۳۲۲۳۴
<i>B. populifolia</i>	۵۷۳۳۵۱۸۲	<i>B. pumila</i>	۵۷۳۳۵۱۸۰	<i>Co. avellana</i>	۱۱۵۹۶۲۰۷
<i>B. alleghaniensis</i>	۵۹۷۲۴۹۲۳	<i>A. japonica</i>	۱۷۰۶۵۶۵۳	<i>Co. maxima</i>	۱۱۵۹۶۲۱۰
<i>B. lenta</i>	۵۹۷۲۴۹۳۸	<i>A. hirsuta</i>	۱۷۰۶۵۶۵۴	<i>Co. cornuta</i>	۱۱۵۹۶۲۱۲
<i>B. grossa</i>	۵۹۷۲۴۹۳۵	<i>A. jorullensis</i>	۱۷۰۶۵۶۵۵	<i>Co. sieboldiana</i>	۱۱۵۹۶۲۱۸
<i>B. globispica</i>	۸۳۷۵۸۳۲۸	<i>A. acuminata</i>	۱۷۰۶۵۶۵۶	<i>Co. americana</i>	۱۱۵۹۶۲۲۲
<i>B. corylifolia</i>	۸۳۷۵۸۳۲۹	<i>A. hirsuta</i>	۱۷۰۶۵۶۵۷	<i>Co. columna</i>	۱۱۵۹۶۲۲۷
<i>B. davurica</i>	۸۳۷۵۸۳۳۹	<i>A. subcordata</i>	۱۷۰۶۵۸۶۳	<i>Ca. hupeana</i>	۵۷۳۲۲۳۵
<i>B. utilis</i>	۵۹۷۲۴۹۵۷	<i>A. glutinosa</i>	۱۷۰۶۵۶۵۰	<i>Ca. fangiana</i>	۵۷۳۳۵۱۷۱
<i>B. schmidtii</i>	۵۹۷۲۴۹۵۶	<i>A. incana</i>	۱۷۰۶۵۶۵۲	<i>Ca. japonica</i>	۵۷۳۳۵۱۷۳
<i>B. chichibuensis</i>	۸۳۷۵۸۳۲۶	<i>A. rubra</i>	۱۷۰۶۵۸۶۶	<i>Ca. betulus</i>	۵۷۳۳۵۱۷۴
<i>B. maximowicziana</i>	۸۳۷۵۸۳۳۵	<i>A. rhombifolia</i>	۱۷۰۶۵۸۶۷	<i>Ca. caroliniana</i>	۱۹۹۵۹۹۹۴۶
<i>B. alnoides</i>	۵۷۳۳۵۱۷۹	<i>A. nepalensis</i>	۱۷۰۶۵۸۶۹	<i>Ca. polyneura</i>	۵۷۳۲۲۳۱
<i>B. humilis</i>	۵۹۷۲۴۹۳۷	<i>A. nitida</i>	۱۷۰۶۵۸۷۰	<i>Ca. turczaninovii</i>	۵۷۳۲۲۳۲

لحاظ درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده بیشترین میزان شباهت را با گونه‌های متعلق به زیرجنس *Betula* دارند (جدول ۳).

توس‌های ایران بیشترین فاصله ژنتیکی را با گونه کمترین فاصله را با گونه *B. pendula* از زیرجنس *Betula* Schmidt's *B. schmidtii* از زیرجنس *Neurobetula* داشتند. از لحاظ فاصله ژنتیکی در بین گونه‌های توس ایران نیز کمترین فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های رویشگاه نوشهر و مارمیشو (۰/۰۰۰) و بیشترین فاصله ژنتیکی بین رویشگاه شهرستانک با رویشگاه‌های نوشهر و مارمیشو (۰/۰۰۷) مشاهده گردید (جدول ۴).

بر اساس تحلیل توالی‌های تکراری در ناحیه‌های ITS1 و ITS2، جمعیت شهرستانک به همراه گونه *B. pendula* و Schrk *B. humilis* به دلیل داشتن توالی تکراری CTGCTG در موقعیت ۱۹۷ از سایر جمعیت‌های ایران متمایز بود. علاوه بر آن، نمونه شهرستانک در جایگاه ۱۹۸ دارای توالی تکراری TGTTGT بود که این توالی تکراری در هیچ‌یک از گونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۵).

توالی‌های تکراری: بررسی حضور توالی‌های تکراری در دو ناحیه ITS1 و ITS2 با استفاده از ابزار اینترنتی آنالاین (http://biophp.org/minitools/microsatellite_repeats_finder/demo.php) انجام شد.

نتایج

پس از دریافت توالی‌ها، با استفاده از ابزار اینترنتی Blast در بانک بین‌المللی ژن، اختصاص ناحیه مورد نظر به جنس توس تأیید شد. سپس توالی ناحیه ITS توس‌های ایران به همراه سایر توالی‌های اخذ شده از بانک جهانی ژن در نرم‌افزار Mega 5 ردیف‌سازی شدند و طول کل ناحیه ITS برای زیرجنس‌های مختلف توس ۶۱۰ تا ۶۱۱ جفت باز به دست آمد. برای نمونه‌های توس ایران طول این قطعه ۶۱۱ جفت باز به دست آمد. نمونه‌های توس ایران همانند بیشتر زیرجنس‌های توس فاقد جایگاه متغیر (Variable Site) در نواحی 5.8s و ITS1 بوده و تنها در دو جایگاه (در ناحیه ITS2 در جایگاه‌های ۲۰۱ و ۲۱۲) متغیر بودند (جدول ۳). نتایج نشان داد که نمونه‌های توس ایران از

جدول ۳- مشخصات ناحیه ITS مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

	توس‌های ایران			زیرجنس‌های توس								
	ITS1	5.8s	ITS2	ITS1			5.8s					
				<i>Betula</i>	<i>Betulanta</i>	<i>Neurobetula</i>	<i>Betulaster</i>	<i>Chamaebetula</i>	<i>Betula</i>	<i>Betulanta</i>	<i>Neurobetula</i>	<i>Betulaster</i>
A(%)	۲۲/۴	۲۳/۳	۱۶	۲۲/۵	۲۲/۹	۲۲/۶	۲۲/۶	۲۲/۵	۲۲/۵	۲۳/۶	۲۳/۵	۲۲/۵
G(%)	۳۰/۵	۲۸/۲	۲۹/۹	۳۰/۶	۳۱/۲	۳۰/۸	۳۰/۹	۳۰/۴	۲۴/۸	۲۸/۳	۲۸/۴	۲۴/۸
C(%)	۳۱	۲۷/۶	۳۳/۸	۳۰/۹	۳۱/۳	۳۰/۳	۳۰/۷	۳۱	۲۷/۸	۲۷/۷	۲۷/۸	۲۷/۸
U(%)	۱۶/۲	۲۹/۹	۲۰/۳	۱۶	۱۴/۷	۱۶/۳	۱۵/۷	۱۶/۱	۲۰/۴	۲۰/۵	۲۰/۴	۲۰/۴
طول قطعه (bp)	۲۱۷	۱۶۳	۲۳۱	۲۱۷	۲۱۷	۲۱۸	۲۱۷	۲۱۷	۱۶۲	۱۶۲	۱۶۲	۱۶۲
جایگاه محافظت شده	۲۱۷	۱۶۳	۲۲۹	۲۱۳	۲۰۹	۲۰۷	۲۱۵	۲۱۳	۱۶۲	۱۶۰	۱۶۲	۱۶۲
جایگاه متغیر	-	-	۲	۴	۸	۱۰	۱	۴	۱	۲	-	-
جایگاه پارسیمون	-	-	-	۱	۳	۳	-	۱	۱	-	-	-
جایگاه انحصاری	-	-	۲	۵	۷	-	-	۳	-	۲	-	-
دامنه (C+G)	-۶۱/۶	۵۵/۸	-۶۴/۱	-۶۱/۸	-۶۳/۵	-۶۱/۴	-۶۱/۷	-۶۱/۲	۵۶/۷	۵۶/۱	۵۶/۱	۵۶/۱
	۶۱/۳		۶۳/۲	۶۱/۳	۶۱/۷	۶۰/۸	۶۱/۵	۶۱/۱				
جفت‌های همسان *	۲۱۶	۱۶۳	۲۳۰	۲۱۵	۲۱۳	۲۱۰	۲۱۵	۲۱۴	۱۶۲	۱۶۱	۱۶۲	۱۶۲
R**	-	-	-	۰/۸۶	۲/۸	۲/۵	-	۰/۸۶	-	-	-	-

تثیکی بین نمونه‌های توس ایران با سایر گونه‌های توس موجود در بانک جهانی ژن بر اساس ناحیه ITS به روش K₂P

گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱) شهرستانک										
۲) سیامرزکوه	۰/۰۰۵									
۳) نوشهر	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲								
۴) مارمیشو	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰							
۵) بند بن	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲						
۶) <i>B. papyrifera</i>	۰/۰۱۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷					
۷) <i>B. pendula</i>	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵				
۸) <i>B. davurica</i>	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷			
۹) <i>B. schmidtii</i>	۰/۰۲۷	۰/۰۲۱	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱		
۱۰) <i>B. maximowicziana</i>	۰/۰۱۴	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۱۱	۰/۰۱۶	
۱۱) <i>B. alnoides</i>	۰/۰۰۹	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰
۱۲) <i>B. alleghaniensis</i>	۰/۰۱۹	۰/۰۱۸	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۴	۰/۰۱۸	۰/۰۱۶	۰/۰۱۹	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰
۱۳) <i>B. lenta</i>	۰/۰۲۵	۰/۰۱۹	۰/۰۱۸	۰/۰۱۸	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۱۸	۰/۰۲۱	۰/۰۱۸	۰/۰۰۰
۱۴) <i>B. humilis</i>	۰/۰۰۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۷	۰/۰۱۹	۰/۰۰۰
۱۵) <i>B. grossa</i>	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰

ل ۵- توالی‌های تکراری در ناحیه‌های ITS1 و ITS2، حداقل طول توالی ۶ نوکلئوتید و حداقل تکرار ۲

جایگاه	ITS1						ITS2				
	۱۲	۳۲	۳۹	۵۲	۱۶۵	۱۶۷	۷۹	۱۱۵	۱۱۶	۱۳۲	۱۳۳
گونه	CAGCAG	TGTGTG	TGTGTG	GGGGGG	CCGCCG	GCCGCC	CAATGCATG	CGCGCG	CGCGCG	GGTGGT	GGTGGT
شهرستانک	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
سیامرزکوه	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
نوشهر	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
مارمیشو	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
بندین	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>B. papyrifera</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>B. pendula</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>B. davurica</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>B. schmidtii</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>B. maximowicziana</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>B. alnoides</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>B. alleghaniensis</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>B. lenta</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>B. humilis</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>B. pumila</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+

انحصاری C است که نمونه‌های توس ایران نیز همانند *B. pendula* در این جایگاه دارای نوکلئوتید C هستند. همچنین نمونه شهرستانک در جایگاه ۵۷۳ دارای نوکلئوتید T می‌باشد که در هیچ‌یک از گونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد (جدول ۶).

بر اساس جایگاه نوکلئوتیدهای انحصاری، توس‌های ایران همگی در جایگاه ۲۰۹ دارای نوکلئوتید T هستند که سایر توس‌های مورد مطالعه، در این جایگاه فاقد این نوکلئوتید هستند. در جایگاه نوکلئوتید ۱۲۵ گونه *B. pendula* نسبت به بقیه گونه‌های توس دارای نوکلئوتید

جدول ۶- جایگاه نوکلئوتیدهای انحصاری در گونه‌های مورد بررسی

گونه	جایگاه										
	۴۳	۴۵	۶۲	۸۸	۱۲۵	۱۵۸	۲۰۹	۴۰۳	۵۱۳	۵۶۲	۵۷۳
شهرستانک	T	T	T	T	C	G	T	C	T	C	T
سیامرزکوه	T	T	T	T	C	G	T	C	T	C	-
نوشهر	T	T	T	T	C	G	T	C	T	C	-
مارمیشو	T	T	T	T	C	G	T	C	T	C	-
بند بن	T	T	T	T	C	G	T	C	T	C	-
<i>B. papyrifera</i>	C	G	T	T	T	C	-	T	T	C	-
<i>B. pendula</i>	T	T	T	T	C	G	-	C	T	C	-
<i>B. davurica</i>	T	G	T	T	T	C	-	C	T	C	-
<i>B. schmidtii</i>	T	G	G	T	T	A	-	T	A	T	-
<i>B. maximowicziana</i>	T	G	T	C	T	G	-	C	A	T	-
<i>B. alnoides</i>	T	G	T	T	T	G	-	C	T	C	-
<i>B. alleghaniensis</i>	C	G	G	C	T	G	-	C	A	T	-

این ساختار را از دو لحاظ با سایرین متفاوت کرد (شکل ۱- A). همه نمونه‌ها در بازوی سوم خود دارای چهار لوپ بودند ولی نمونه شهرستانک در بازوی سوم خود دارای سه لوپ بود. به‌علاوه، لوپ دوم موجود در بازوی چهارم این جمعیت از سایر جمعیت‌ها بزرگ‌تر بود (شکل ۱- A). شکل ۱- B دربردارنده اغلب نمونه‌ها از جمله نمونه‌های سیامرزکوه، نوشهر، مرمیشو و بندبن و همچنین گونه‌های *L. B. alleghaniensis* Britt و *B. pendula B. schmidtii* *B. pumila* می‌باشد. ساختار سوم (شکل ۱- C) مربوط به دو گونه *B. davurica* Pall. و *B. Papyrifera* Marsh. بود که از لحاظ طول بازوی اول با سایرین متفاوت بودند. در نهایت ساختار منحصر به فرد چهارم (شکل ۱- D) مربوط به گونه *B. grossa* Siebold & Zucc بود که این گونه نیز از لحاظ طول بازوی چهارم با سایرین متفاوت بود (جدول ۷).

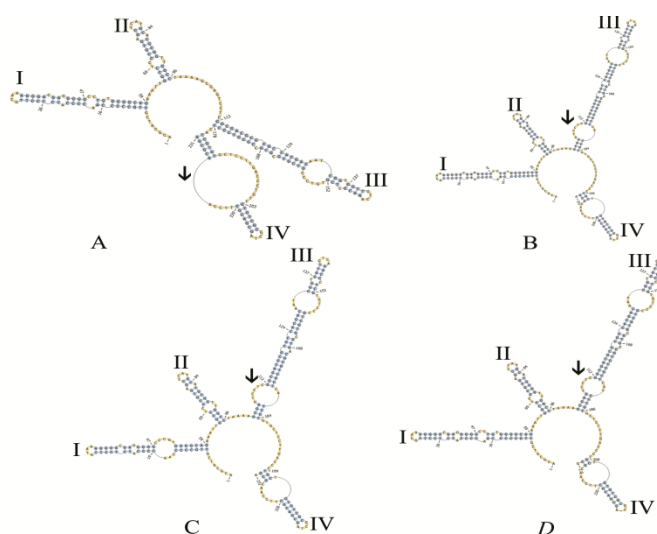
الف) ساختار ثانویه ITS2

پس از رسم ساختار ثانویه توس‌های مورد بررسی با استفاده از ابزار اینترنتی و آنلاین (Anonymous, 2014b) و شمارش تعداد جفت بازوهای هر بازو و همچنین تعداد بازوهای جفت نشده، مشخص شد که ساختار ثانویه ITS2 برای گونه‌های مورد بررسی همانند ساختار متداول ITS2 در گیاهان گلدار دارای چهار بازو است (Schultz et al., 2005) (شکل ۲). بیشترین تغییر طول بازو در ساختار ثانویه ITS2 در مورد گونه‌های مختلف توس مربوط به بازوی چهارم است که طول آن بین ۲۶ - ۲۰ جفت بازو متغیر است. بازوی سوم بلندترین طول را نسبت به سایر بازوها داشته و طول آن برای توس‌های ایران بجز شهرستانک ۵۸ جفت بازو است. مطالعه ساختار ثانویه ITS2 چهار شکل متفاوت از توس‌های مورد مطالعه را نشان داد (شکل ۱). نمونه شهرستانک، دارای ساختار ثانویه منحصر به فردی بود که

جدول ۷- مشخصات ساختارهای ثانویه در توس‌های مورد بررسی و ایران

گروه	طول بازو				کل بازوهای جفت نشده
	۱	۲	۳	۴	
A	۴۰	۲۲	۵۰	۲۶	۵۹
B	۴۰	۲۲	۵۸	۲۰	۵۴
C	۳۶	۲۲	۵۸	۲۰	۵۹
D	۴۰	۲۲	۵۰	۲۴	۵۹

A = شهرستانک، B = سیامرزکوه، نوشهر، مارمیشو، بندین، *B. schmidtii*، *B. pendula*، *B. alleghaniensis*، *B. pumila*، *B. papyrifera* = C - *B. grossa* = D - *B. davurica*



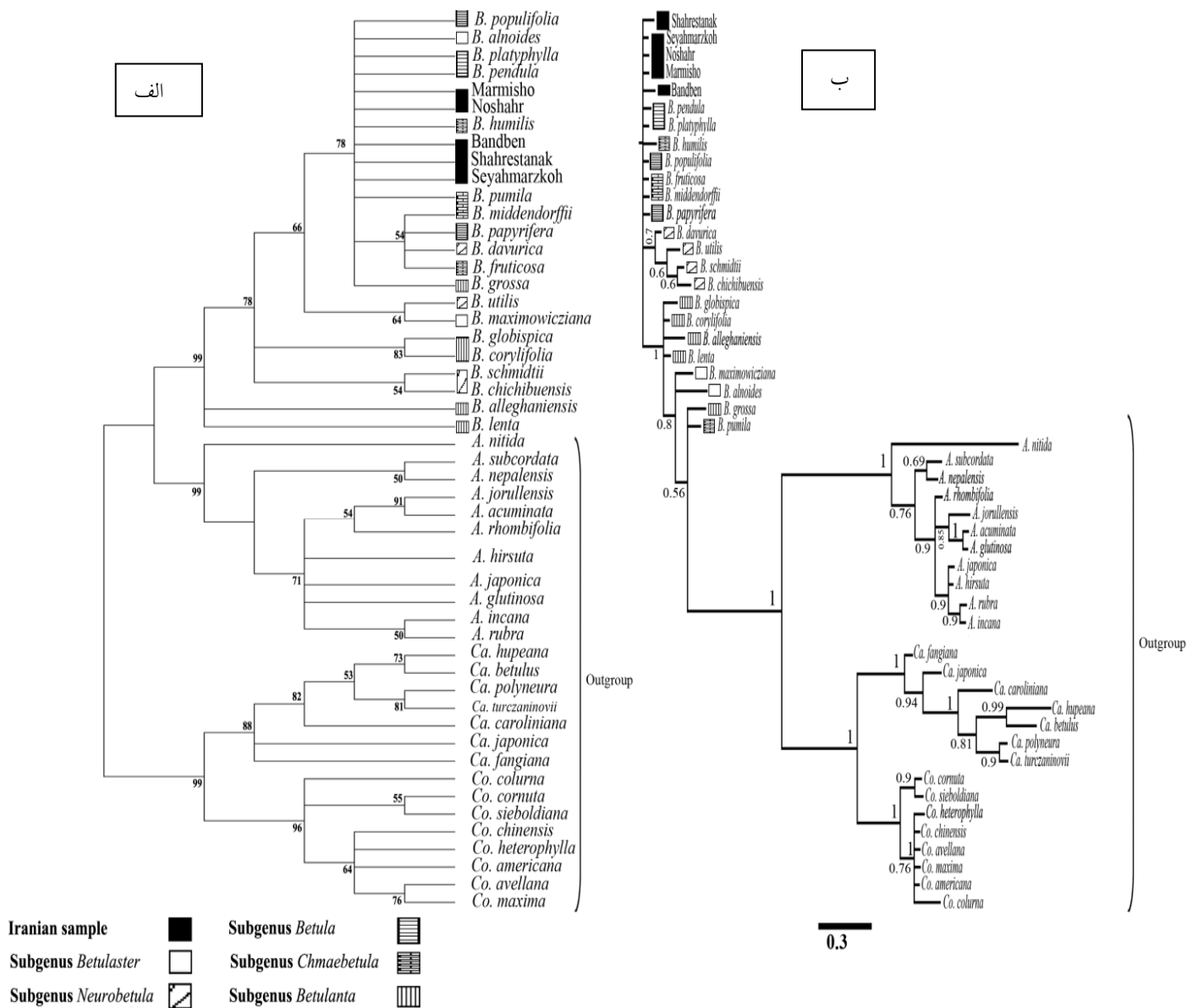
شکل ۱- ساختار ثانویه ITS2 برای گونه‌های توس مورد مطالعه؛ علامت پیکان نشان‌دهنده وجود تفاوت در بین لوپ‌های موجود در

بازوی سه با نمونه A می‌باشد. A = شهرستانک، B = سیامرزکوه، نوشهر، مارمیشو، بندین، *B. schmidtii*، *B. pendula*

B. alleghaniensis، *B. pumila* و *B. papyrifera* = C و *B. grossa* = D - *B. davurica*

شاخه سوم، شامل دو گونه *B. globispica* Shirai و Regel و *B. corylifolia* & Maxim از زیرجنس *Betulanta* است. شاخه چهارم نیز، شامل دو گونه *B. schmidtii* و *B. Bitter* از زیرجنس *chichibuenis* است. دو گونه *B. alleghaniensis* و *B. lenta* L که هر دو متعلق به زیرجنس *Betulanta* هستند نیز هر یک به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. بر اساس روش BI نیز گونه‌های توس ایران به همراه گونه‌های متعلق به زیرجنس - های *Chamaebetula* و *Betula* در یک گروه قرار می‌گیرند، در روش BI نیز زیرجنس‌های مختلف توس همانند روش ML به خوبی از همدیگر تفکیک نشدند (شکل ۲ - ب).

نتایج درخت فیلوژنی بر اساس روش حداکثر شباهت رسم درخت فیلوژنی به دو روش BI و ML حکایت از تک‌نیا بودن (Monophyletic) جنس توس داشت (شکل ۲). بر اساس ناحیه ITS و روش ML توس‌های مورد بررسی در سه گروه اصلی قرار گرفتند؛ گروه اول خود دارای چهار شاخه (کلاد) است که در شاخه اول توس‌های ایران به همراه گونه‌های متعلق به زیرجنس‌های *Betula*، *Betulaster*، *Chamaebetula*، *Neurobetula* و *Betulanta* در یک شاخه با ضریب حمایت (۷۶) بالا قرار می‌گیرند. شاخه دوم، شامل دو گونه *B. utilis* Wall. و *B. maximowicziana* Regel به ترتیب از زیرجنس‌های *Betulaster* و *Neurobetula* است.



شکل ۲- الف: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ناحیه ITS به روش ML و توزیع گاما- ب: درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس ناحیه ITS به روش BI

بحث

دسترسی به روش‌هایی که امر شناسایی گونه‌ها را برای عموم محققان (تاکسونومیست یا غیر آن) تسهیل نماید، ضروری به نظر می‌رسد (Howland et al., 1995). در این تحقیق یکی از پرکاربردترین نواحی مورد بررسی در تکنیک DNA بارکدینگ برای گیاهان، که در بسیاری از موارد نیز کارایی آن برای تشخیص صحیح گونه‌های یک جنس تأیید شده است، مورد استفاده قرار گرفته است.

شناسایی صحیح گونه‌ها پیش شرط لازم برای تحقیقات زیستی به‌شمار می‌رود. تاکنون حدود یک و نیم میلیون گونه از ۱۰ میلیون گونه پیش‌بینی شده در دنیا شناسایی شده‌اند (Wilson, 2003) که شناسایی و کسب مهارت لازم برای تشخیص درست آنها، کاری بسیار سخت و مستلزم صرف زمان طولانی است. با توجه به روند کاهش روزافزون تنوع زیستی،

نوشهر، جمعیت دست‌کاشت واقع در باغ گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و کشاورزی استان مازندران است؛ بنابراین این احتمال وجود دارد که رویشگاه مارمیشو منشأ جمعیت گیاهی مورد مطالعه از باغ گیاه‌شناسی نوشهر باشد.

به‌طور کلی در این تحقیق، اگرچه ناحیه ITS توانست جنس‌های مختلف خانواده *Betulaceae* را از یکدیگر تفکیک نماید، اما یک ناحیه DNA در صورتی می‌تواند به‌عنوان یک بارکد ایده‌آل مطرح شود که دارای تنوع کافی در بین گونه‌های یک جنس باشد. این در حالیست که ناحیه ITS در جنس توس به‌دلیل تغییرپذیری اندک، ناحیه مناسبی برای بررسی روابط فیلوژنی و تشخیص مولکولی این جنس تشخیص داده نشد.

همچنین پیشنهاد می‌شود به‌دلیل ساختار ثانویه متمایز جمعیت گیاهی مورد استفاده از شهرستانک، مطالعه تکمیلی (ریختی و مولکولی) در مورد این جمعیت برای تعیین دقیق جایگاه تاکسونومیکی آن انجام شود.

سیاسگزاری

از آقای مهندس فرید جهانگیری که در بسیاری از مراحل این تحقیق ما را یاری کردند، تشکر می‌کنیم.

منابع مورد استفاده

- Alvarez, I. and Wendel, J. F., 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29:417-434.
- Anonymous, 2014a. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- Anonymous, 2014b. <http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>
- Browicz, K., 1972. *Betulaceae* in K. H. Rchingeer (ed.), *Flora Iranica* No. 96: ,p.6.
- Browicz, K. and Zielinski, J., 1982. *Chorology of Trees and Shrubs in South-West Asia and Adjacent Regions*, vol. 1. Polish Scientific Publishers, Warsaw, PoznaM, ,p.6.
- Chen, S. L., Yao. H., Han, J. P., Liu, C. and Song, J. Y., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 5: e8613.

با توجه به کارایی ناحیه ITS به‌ویژه ناحیه ITS2 در شناسایی و تفکیک گونه‌های گیاهی و استفاده رو به افزایش آن در دهه‌های اخیر، انتظار بر این بود که این ناحیه در شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف جنس توس کارآمد باشد. تعداد نقاط متغیر در بین توالی‌های به‌دست آمده از این ناحیه در مورد توس‌های ایران تنها در دو نوکلئوتید در ناحیه ژنی ITS2 بود که این امر نشان‌دهنده تغییرپذیری کم ناحیه ITS در بین گونه‌های مختلف توس در ایران است. ساختار ثانویه ITS2 توس نیز مشابه با سایر گیاهان گل‌دار دارای چهار بازو است که طول بازوی سوم، نسبت به سایر بازوها بیشتر بود (Coleman, 2007; Wilson, 2003; Schultz *et al.*, 2005). در تحقیقاتی که در گذشته در مورد ساختار ثانویه ITS2 جنس‌های مختلف انجام شد (Coleman, 2003; Keller *et al.*, 2008; Yousefzadeh, 2010; Chen *et al.*, 2012) ساختار ثانویه ITS2 همواره به‌عنوان یکی از نواحی اصلی در تعیین و تفکیک گونه‌های مختلف از همدیگر مورد استفاده قرار گرفته بود. اما در این تحقیق ساختار ثانویه ITS2 توانست از تقسیم‌بندی گونه‌های مختلف جنس توس که بر اساس صفات ریختی (نوع گل‌آذین و وجود متیل سالیسیلات در پوست درختان توس) (Dejong, 1865; Regel, 1993) انجام شده بود، حمایت کند. در واقع در جنس‌هایی که تغییرات نوکلئوتیدی ناحیه ITS آنها اندک است، ساختار ثانویه ITS2 نمی‌تواند در تفکیک گونه‌ها از یکدیگر موفق عمل نماید (Meyer & Paulay, 2005). بنابراین با توجه به جدول فاصله ژنتیکی و شباهت ساختار ثانویه در توس‌های مورد بررسی، می‌توان بیان داشت که یکی از علل عدم موفقیت این ناحیه در تفکیک گونه‌های متعلق به زیرجنس‌های مختلف، تغییرپذیری کم آن در بین گونه‌های مختلف جنس توس است. همچنین در مورد عدم وجود فاصله ژنتیکی بین رویشگاه مارمیشو با جمعیت نوشهر، لازم به توضیح است که جمعیت

- Biotechnology, Fungal Genomics and Bioinformatics, vol. 3. Elsevier Inc. Science and Technology / Academic Press, San Diego, Calif, 3: 161-183.
- Nazar, R., 2004. Ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in eukaryotes. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 56: 457-465.
 - Nues, R. W., Rientjes, J. M., Vander, C. A., Zerp, S. F., Sluiter, C., Venema, J. and Raue, H. A., 1994. Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct the formation of 17S and 26S rRNA. *Nucleic Acids Research*, 22: 912-919.
 - Pokhilo, N. D. and Uvarova, N. I., 1988. Isoprenoids of various species of the genus *Betula*. *Chemistry of Natural Compounds*, 24: 273-285.
 - Porebski, S., Bailey, L. G. and Baum, B. R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.
 - Regel, E., 1865. Bemerkungen ber die Gattungen *Betula* und *Alnus* nebst Beschreibung einiger neuer Arten. *Bulletin of Society of Naturalists (Moscou)*, 38: 388-434.
 - Sabeti, H., 1976. *Forests, Trees and Shrubs of Iran*. Agriculture and Natural Resources Research Organization Publications, Tehran, 810p.
 - Sande, C. A., Kwa, M., Vannues, R. W., Heerikhuizen, H., Raue, H. A. and Planta, R. J., 1992. Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *Journal of Molecular Biology*, 223: 899-910.
 - Schultz, J., Maisel, S., Gerlach, D., Muller, T. and Wolf, M., 2005. A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *Rna*, 11: 361-364.
 - Schultz, J. and Wolf, M., 2009. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 520-523.
 - Skvortsov, A. K., 2002. A new system of the genus *Betula*. *Byull. Moskovske. Obshch. Isp. Prir., Otd. Biol.*, 107: 73-76.
 - White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and 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.
 - Wilson, E. O., 2003. The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 77-80.
 - Yousefzadeh, H., Hosseinzadeh Colagar, A., Tabari, M., Sattarian, A. and Assadi, M., 2012. Utility of the ITS region sequence and structure for molecular identification of the *Tilia* species from Hyrcanian forest, Iran. *Plant Systematic and Evolution*, 298: 947-961.
 - Zare, H., Akbarinia, M., Hosseini, S. M., Ejtehadi, H. and Amini Eshkevari, T., 2010. A new record of *Betula litwinowii* (*Betulaceae*) and a review of the geographical distribution of the genus *Betula* L. in Iran. *Journal of Botany*, 16: 237-241.
 - Coleman, A. W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19: 370-375.
 - Coleman, A. W., 2007. Pan eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res*, 35: 3322-3329.
 - Cote, C. A., Greer, C. L. and Peculis, B. A., 2002. Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. *RNA*, 8: 786-797.
 - Dejong, P. C., 1993. An introduction to *Betula*: its morphology, evolution, classification and distribution, with a survey of recent work. In D. Hunt [ed.], *In Proceedings of the IDS Betula symposium*, 2: 4.
 - Esmaeilpour, M., 2013. Diversity morphology and molecular tree birch in hyrcanian forest. Ph.D Thesis, Guilan University, Guilan, Iran, p.126
 - Furlow, J., 1990. The genera of *Betulaceae* in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 71: 1-67.
 - Gutell, R.R., Larsen N. and Woese C.R., 1994. Lessons from an evolving ribosomal-RNA - 16S and 23S ribosomal-RNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev*, 58: 10-26.
 - Hansel, R. and Horhammer, L., 1954. Vergleichende Untersuchungen uber die Flavonglykoside der *Betulaceen*. *Archiv der Pharmazie*, 287: 117-126.
 - Howland, D. E., Oliver, R. P. and Davy, A. J., 1995. Morphological and molecular variation in natural populations of *Betula*. *New Phytologist*, 130: 117-124.
 - Hollingsworth, M. L., Andra Clark, A. L. E. X., Forrest, L. L., Richardson, J., Pennington, R., Long, D. G. and Hollingsworth, P. M., 2009. Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*, 9: 439-457.
 - Jarvinen, P., Palmé, A., Morales, L.O., Länneppää, M., Keinänen, M., Sopanen, T., and Lascoux, M., 2004. Phylogenetic relationships of *Betula* species (*Betulaceae*) based on nuclear ADH and chloroplast matK sequences. *American Journal of Botany*, 91: 1834-1845.
 - Johnsson, H., 1949. Studies on birch species hybrids. *Hereditas*, 35: 115-135.
 - Keller, A., Schleicher, T., Forster, F., Ruderisch, B., Dandekar, T., Muller, T. and Wolf, M., 2008. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales). *Bio Med Central Evolutionary Biology*, 8: 218.
 - Li, J., Shoup, S., and Chen, Z., 2005. Phylogenetics of *Betula* (*Betulaceae*) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA. *Rhodora*, 107: 69-86.
 - Meyer, C. P. and Paulay, G., 2005. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS biology*, 3: e422.
 - Muller, T., Philippi, N., Dandekar, T., Schultz, J. and Wolf, M., 2007. Distinguishing species. *Rna*, 13: 1469-1472.
 - Nazar, R. N., 2003. Ribosome biogenesis in yeast: rRNA processing and quality control. In: Arora, D. K., Khachatourians, G.G. (Eds.), *Applied Mycology and*

Molecular identification of the genus *Betula* based on ITS sequence data and its secondary structure in Iran

H. Bina¹, H. Yousefzadeh*², M. Esmailpour³ and O. Esmailzadeh⁴

1- M.Sc., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran

2* - Corresponding author, Assist. Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran, Email: h.yousefzadeh@modares.ac.ir; ham ed_sera20@yahoo.com

3- Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Kerman, I.R.Iran

4- Assist. Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R.Iran

Received: 05.04.2014

Accepted: 29.07.2014

Abstract

Nucleotide sequences of internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA were used to infer the phylogeny and molecular taxonomy status of *Betula* species. Three remnant populations of *Betula* from Hyrcanian forests and one population from Zagros forest were selected. Leaf DNA were extracted and ITS regions were amplified on the selected samples. Entire lengths of the ITS1-5.8S-ITS2 region were 610-611 bp for all of the studied *Betula* samples and 611 bp for Iranian samples. Maximum similarity in nucleotide composition and minimum genetic distance of Iranian *Betula* were observed with *Betula pendula* from subgenus of *Betula*. According to character based method, Iranian *Betula* was distinguished from other *Betula* species due to having unique nucleotide at position 209. Four secondary structure ITS2 type were recognized for all of the studied *Betula* species. Construction of the phylogenetic trees of ITS data supported monophyly of the genus *Betula* and divided into three major groups with more than 73% bootstrap support. The first Group comprises four minor groups by which Iranian *Betula* with *B. pendula* was located in Clade I.

Keywords: *Betula*, DNA barcoding, genetic diversity, ITS, phylogeny.