دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۰، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۳-۱ (۱۳۹۱)

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[٤]

۱- کارشناس‌ارشد، 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

٤- کارشناس‌ارشد، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰٤/۱۱

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. DNAی 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 آغازگرnrDNA 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 خزری 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: nrDNA ITS، trnH- psbA، ممرز، هیرکانی، فیلوژنی.

مقدمه

جنس ممرز متعلق به تیره فندق Corylaceae است. تیره فندق گاهی به‌عنوان یکی از زیر تیره‌های تیره توسکا یا *Betulaceae* منظور شده است. تیره Coryloideae یکی از دو زیر تیره Betulaceae بوده که شامل چهار جنس: *Carpinus*، *Corylus*، *Ostrya* *Scopoli* و *Ostryopsis Decne* می‌باشد (Winkler, 1904; Cronquist, 1981). دیگر زیر تیره خانواده

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 (*Carpinus 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* subs *Carpinus orientalis* و *Carpinus orientalis* subs *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 تغر (*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 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 گونه های 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.

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

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

برای استخراج DNA، از روش اصلاح شده CTAB، (Doyle & Doyle, 1987) استفاده شد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر و سنجش جذب در طول موج‌های ٢٦٠ نانومتر و ٢٨٠ نانومتر غلظت و خلوص DNA کل ارزیابی شد. جذب ٠/١ در ٢٦٠ نانومتر نمایانگر وجود ٥٠µg از DNA در هر میلی‌لیتر محلول است. خواندن نسبت جذبی A260/A280 nm می‌تواند نمایانگر خلوص DNA باشد (حداکثر جذب DNA در ٢٦٠ نانومتر و پروتئین در ٢٨٠ نانومتر است). مناسبترین نسبت جذبی بین ١/٩–١/٧ می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR= Polymerase Chain Reaction) برای توالی هسته‌ای nrDNA ITS با آغازگرهای ITS4 و ITS5 (White *et al.*, 1990) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای توالی کلروپلاستی (trnH- psbA) با آغازگرهای trnh و psba (Shaw *et al.*, 2005) انجام شد. برای اطمینان از تکثیر DNA، محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ٠/٨ درصد مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه ژل آگارز ٠/٢ گرم پودر آگارز (Biomol-DNA Grade, Germany) را با استفاده از حرارت در ٢٥ 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 ١ درصد TBE است قرار داده شد. از هر نمونه PCR شده ٣ 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 ٢ میکرولیتر DNA Ladder در آخرین چاهک ریخته می‌شود. دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ٨٠ ولت و مدت زمان ٣٠ دقیقه سبب حرکت باندهای DNA در ژل آگارز شد. بعد از اتمام کار دستگاه، ژل درون محلول رنگ (Gel Red) به مدت ٢٠ دقیقه قرار داده شد سپس ژل رنگ آمیزی شده به مدت ١٠ دقیقه درون آب مقطر قرار گرفته تا رنگ‌های اضافی شسته شوند. در نهایت ژل برای بررسی و عکس‌برداری روی دستگاه (UVP Translluminator, UK) UV قرار داده شد. باندهای ٣٠ 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 ٦٠٧ تا ٦٠٨ جفت باز می‌باشد که درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده برای هر گونه در جدول ٢ نشان داده شده است. طول سه قطعه ITS1، 5/8S و ITS2 نیز به‌ترتیب ٢١٦، ١٥٩ و ٢٣٣ 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

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 (*C. orientalis*) 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	*C. schuschaensis* Kodir	*C. orientalis* Kojor	*C. orientalis* Kordkoy	*C. betulus* Noor	*C. betulus* Arasbaran
A	۲۱/۰۵	۲۱/۰۵	۲۱/۰۵	۲۱/۲۲	۲۰/۹۲
C	۳۱/۰۹	۳۱/۰۹	۳۱/۰۹	۳۱/۰۹	۳۱/۱٤
G	۲۸/۱۳	۲۸/۲۹	۲۸/۲۹	۲۷/۹٦	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	٤۰/٦۳	٤۰/٦۳	٤۰/٦۳	٤۰/۷۹	٤۰/٦۹
طول کل	٦۰۸	٦۰۸	٦۰۸	٦۰۸	٦۰۷

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. 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 *Carpinus* sect. *Carpinus* -*Ostrya* می‌باشد، جنس *Ostrya* نیز خواهر جنس *Carpinus* (sect. *Carpinus*) می‌باشد. جنس دیگر زیر خانواده Coryloideae، *Ostryopsis* خواهر کلاد *Ostrya* – *Carpinus* است و در آخر نیز *Corylus* خواهر کلاد (*Ostrya* - *Carpinus* - *Ostryopsis*) می‌باشد. حال به

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 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.

شکل ۱- درخت پارسیمونی مرکزی مطلق ۵۰۰۰۰ تا کوتاهترین درخت حاصل از تجزیه و تحلیل توالی ناحیه nrDNA ITS با بوت استرپ بالای ۵۰ درصد

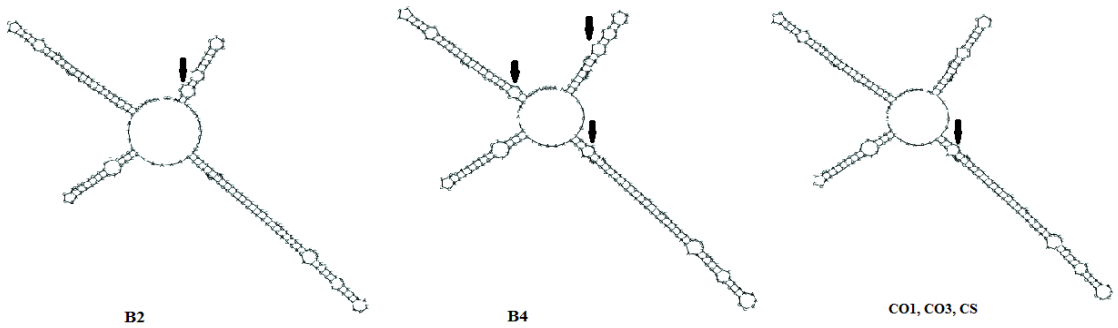
(علامت (H) نمونه‌های با مبدأ هیرکانی، (A) نمونه‌هایی با مبدأ ارسباران (A) و بقیه نمونه‌ها از بانک ژن گرفته شده است).

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. putoensis*، *C. betulus* و *C. tientaiensis* 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 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).

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

تاگزون	I	II	III	IV
CB2	٤٤	٢٢	٦٦	١٨
CB4	٤٠	٢٤	٦٤	٢٤
CO1, CO3, CS	٤٢	٢٤	٦٤	٢٦



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

اندازه و مشخصات قطعه trnH- psbA و ترکیب نوکلئوتیدی آن در گونه‌های مورد بررسی در جدول ٤ آمده است. سه نمونه CS، CO3 و CO1 از لحاظ ترکیب 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

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 ٤- ۲۵ نشان داده شده است. درخت به‌دست آمده با درخت حاصل از ITS متفاوت می‌باشد یکی از این تفاوت‌ها در ارتباط با جایگاه‌های Corylus ، Ostryopsis 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. betulus* و *C. orientalis* با مبدأ اروپا و مستخرج از بانک ژن می‌باشند.

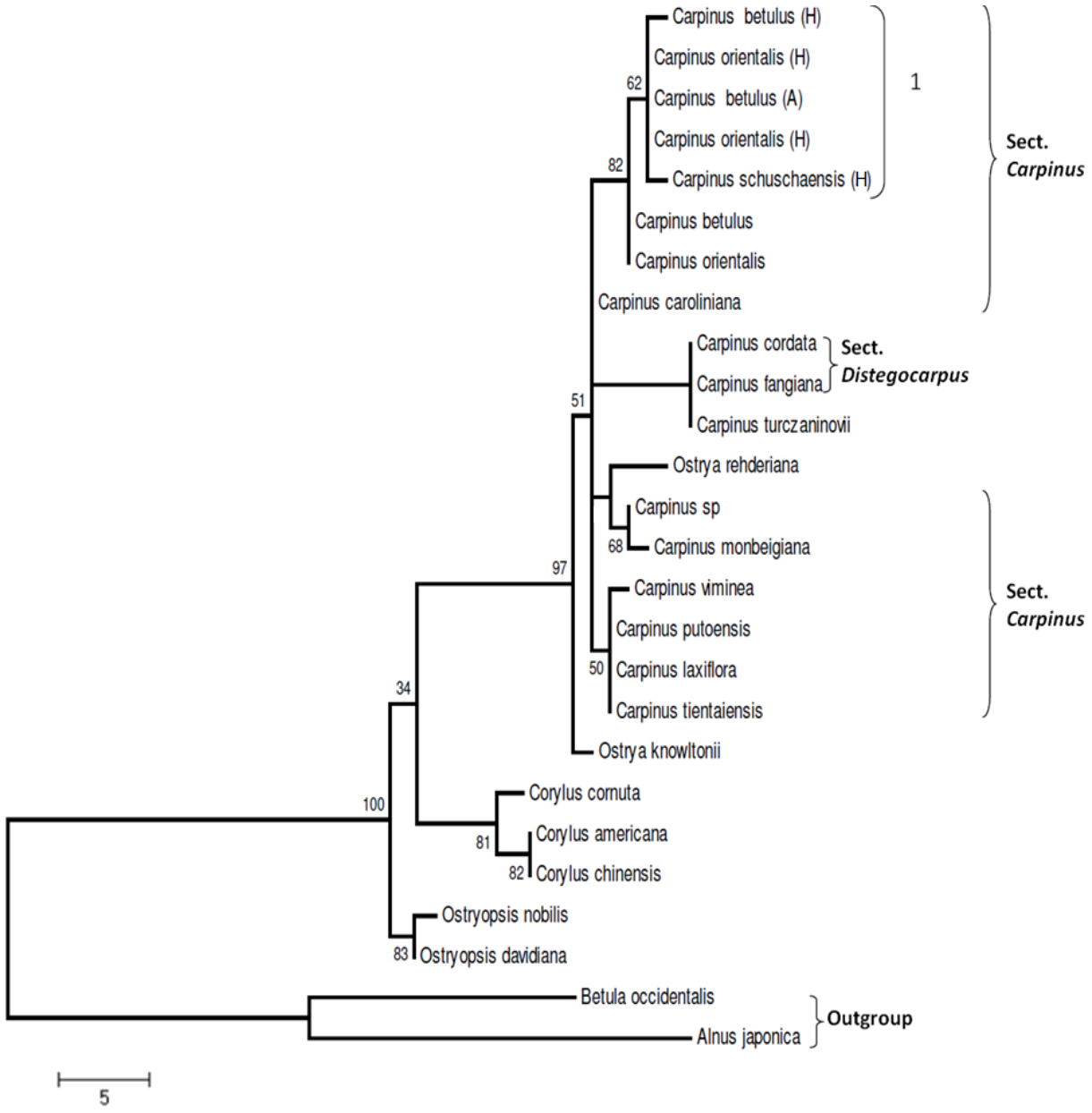
جدول ٤- درصد و ترکیب نوکلئوتید قطعه trnH- psbA در ممرزهای مطالعه شده

نوکلئوتید	*C. schuschaensis* Kodir	*C. orientalis* Kojor	*C. orientalis* Kordkoy	*C. betulus* Noor	*C. betulus* Arasbaran
A	۲۸/۲۳	۲۸/۸۸	۲۸/۸۸	۲۹/۱۰	۲۸/۷۳
C	۱۲/۰٤	۱۱/٦۰	۱۱/٦۰	۱۱/٦۰	۱۱/٦۲
G	۱٦/۸۵	۱٦/٦۳	۱٦/٦۳	۱٦/٤۱	۱٦/٦۷
T	٤۲/۸۹	٤۲/۸۹	٤۲/۸۹	٤۲/۸۹	٤۲/۹۸
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	٤۵۷	٤۵۷	٤۵۷	٤۵۷	٤۵٦

بحث و نتیجه‌گیری

راهکار مناسب در ارتباط با رده‌بندی گونه‌هایی که دارای شباهت‌های ریختی فراوان می‌باشند مانند گونه های 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 در 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 ازجمله 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.



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 و بقیه نمونه‌ها از بانک ژن گرفته شده است).

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 نمدار گزارش کردند. در این خصوص Chen و همکاران (2010) با بررسی ٦٦٠٠ نمونه از ٤٤٠٠ 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

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 با 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. turczaninovii* 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. turczaninowii*، *C. orientalis*، *C. monbeigiana* 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 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

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 نمونه های 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 دندانه بر روی براکته 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 براکته سه لوبه، با لوب‌های جانبی نسبتاً بزرگ و بدون دندانه روی براکته 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 براکته دندانه دار و لوب های 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 betulus* L. var. *parva* Radde-Fomin) به این نمونه تأمل برانگیز بوده و مطالعات تکمیلی تاکسونومیکی را برای روشن شدن جایگاه سیستماتیکی آن می‌طلبد.

سپاسگزاری

از کارکنان باغ گیاه‌شناسی نوشهر بخصوص جناب آقای دکتر زارع و سرکار خانم امینی به‌دلیل 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 geneus *Carpinus* in Iran Islamic Azad University, PhD thesis, Tehran, Iran.
- Balasaravanan, T., Chezhian, 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.

– Chen, Z. D., 1994. Phylogeny and phytogeography 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 evoultionary 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 Evoution, 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.
– 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 phylog- enies, 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 geneus *Tilia* in north of Iran, PhD thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

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

I. Chapolagh Paridari[1], Gh. Jalali[2], A. Sonboli[*3] and M. Zarafshar[4]

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 claudes. 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 claude. 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.