جایگاه تاکسونومیکی و تنوع ژنتیکی جنس شاه‌بلوط (راشیان) در شمال ایران براساس ناحیه ژنی *psbA* و بین‌ژنی *trnH-psbA* *

دریافت: ۱۳۹۲/۵/۱۴/ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۵

فاطمه اکبرزاده روشن: دانشجوی کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه مازندران، بابلسر

اباصلت حسین‌زاده کلاگر: دانشیار زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران، بابلسر

حامد یوسف‌زاده✉: استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور [h.yousefzadeh@modares.ac.ir (hamed_seraj20@yahoo.com)]

چکیده

شاه‌بلوط اروپایی (*Castanea sativa* Mill.) یکی از گونه‌های ارزشمند در خطر جنگل‌های هیرکانی است. در این تحقیق، استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان روشی آسان و سریع برای شناسایی جایگاه تاکسونومیکی شاه‌بلوط‌های شمال ایران مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق، از تمامی رویشگاه‌های این گونه در ایران (سه رویشگاه ذکر شده در بخش غربی استان گیلان) نمونه برگ تهیه و بعد از بیومتری، شش پایه انتخاب و ناحیه ژنی *psbA* و فاصله‌انداز غیرکدکننده *trnH-psbA* توالی‌یابی و با نمونه‌های گرفته شده از بانک ژنی (*Castanea sativa*، *C. dentata*، *C. pumila*) مقایسه شد. نتایج نشان داد که طول کل قطعه ژنی *psbA* برای نمونه‌های بانک ژنی و شاه‌بلوط‌های منطقه هیرکانی، ۶۶ جفت باز و بدون تنوع نوکلئوتیدی و طول قطعه بین‌ژنی *trnH-psbA*، ۴۱۶-۴۲۷ جفت باز است که شاه‌بلوط‌های منطقه هیرکانی با حذف ۱۱ جفت باز دارای کمترین طول به میزان ۴۱۶ جفت باز است. از پنج جایگاه انحصاری، جایگاه انحصاری اول و دوم در موقعیت ۳۶۶ و ۴۹۵ مربوط به گونه *Castanea dentata*، جایگاه انحصاری سوم در موقعیت ۴۰۱ و مربوط به *C. sativa*، جایگاه انحصاری چهارم و پنجم در موقعیت ۴۰۶ و ۴۳۷ مربوط به گونه *C. pumila* است. بررسی فاصله ژنتیکی گونه‌ها و جمعیت‌های مورد بررسی نشان داد که نمونه‌های جنگل هیرکانی فاقد فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند. در این تحقیق، براساس ناحیه ژنی *psbA* و بین‌ژنی *trnH-psbA* چهار هاپلوتیپ با تنوع هاپلوتیپی ۰/۵۸ شناسایی شد. در درخت فیلوژنی حاصل از تحلیل کل ناحیه ژنی *psbA* و بین‌ژنی *trnH-psbA* به روش حداکثر شباهت و با پشتوانه تکرار ۱۰۰۰، شاه‌بلوط‌های ناحیه هیرکانی در یک کلاد مجزا، البته بدون پشتوانه قرار گرفتند. همچنین، بیشترین شباهت ژنتیکی بین شاه‌بلوط‌های ناحیه هیرکانی و شاه‌بلوط اروپایی مشاهده شد. اگرچه تصمیم‌گیری در مورد جایگاه تاکسونومی شاه‌بلوط هیرکانی براساس یک نشانگر مولکولی از پشتوانه قوی برخوردار نمی‌باشد، ولی به دلیل وجود تفاوت ریختی قابل ملاحظه بین شاه‌بلوط هیرکانی و شاه‌بلوط اروپایی و نیز نتایج این تحقیق (وجود یک ناحیه حذفی در ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* و متمایز بودن هاپلوتیپی) تعلق شاه‌بلوط هیرکانی به گونه شاه‌بلوط اروپایی (*C. sativa*) را مورد تردید قرار می‌دهد و تصمیم‌گیری نهایی در این ارتباط را منوط به کارگیری چند نشانگر بارکد دیگر می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: تنوع نوکلئوتیدی، شباهت ژنتیکی، فیلوژنی، هاپلوتیپ

Taxonomic status and genetic variation of the genus *Castanea* (*Fagaceae*) in Iran based on *psbA* and *trnH-psbA*

Received: 05.08.2013/ Accepted: 26.12.2013

Fatemeh Akbarzadeh Roshan: MSc Student, Department of Molecular and Cell Biology; Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran

Abaselt Hosseinzadeh Colagar: Associate Prof., Department of Molecular and Cell Biology; Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar 47416-95447, Iran

Hamed Yousefzadeh✉: Assistant Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran [h.yousefzadeh@modares.ac.ir (hamed_seraj20@yahoo.com)]

Summary

Species in the genus *Castanea* Mill. are one of the worthwhile species in the Hyrcanian forest of west Guilan (N Iran) with low region such as Siahmazgi, Ghalerodkhan and Visrod. that do not have good condition by reason of human interfering and disease. They have varying economic importance as nut tree crops, therefore, DNA barcoding technique can be a straightforward method for taxonomic status appointment of the genus *Castanea* Mill. in the north of Iran. In this research, six individuals from three relict populations of *Castanea* in western regions of Hyrcanian forest (Guilan province) were selected and amplified for plastid *trnH-psbA* region. Results indicated that, the length of *psbA* region is about 66 bp without any nucleotide diversity, and the length of *trnH-psbA* intergenic spacer is 427-416 bp. The Hyrcanian samples of *Castanea* with a 11 bp deletion in *trnH-psbA* spacer have the minimum length (416 bp). From five singleton position, first and second singleton positions were related to *C. dentata* (position 366 and 495), third position was related to *C. sativa* (position 401), and the fourth and fifth positions were related to *C. pumila* (positions 406 and 437). Hyrcanian samples did not show genetic distance, and they had most similarity with *C. sativa*. Haplotype diversity was 0.58, and totally, four haplotypes were recognized. Based on the obtained phylogenetic tree, the Hyrcanian samples of *Castanea* form a distinct clade but with bootstrap lower than 50%.

Keywords: Genetic similarity, haplotype, nucleotide diversity, phylogeny

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر اباصلت حسین‌زاده کلاگر و دکتر حامد یوسف‌زاده ارایه شده به دانشگاه مازندران

مقدمه

شاه‌بلوط یکی از جنس‌های ارزشمند جنگل هیرکانی است که نخستین بار حضور آن توسط جزیره‌ای (Jazireh'ee 1961) در محدوده غربی استان گیلان و چند منطقه محدود نظیر مناطق کوهستانی تالش (سیاه‌مزگی) و فومن (قلعه رودخان) و ویسرود گزارش شد. شاه‌بلوط درختی است با ریشه‌ای عمودی و عمیق، ساقه‌ای بلند و برگ‌های پهن که علاوه بر تنوع زیاد آن، در ریخت‌شناسی برگ‌ها و کاسه‌ها برای سازماندهی میوه‌ها، از انواع سیستم گرده افشانی (گرده افشانی توسط باد، با دخالت انسان یا حیوان و یا هر سه حالت)، نیز برخوردار است. گونه‌های موجود در جنگل‌های هیرکانی از نظر انواع کرک پوششی برگ و نوع و اندازه و تراکم روزنه، با گونه‌های شاه‌بلوط‌های اروپایی (*C. sativa*) و آمریکایی (*C. pumila* و *C. dentata*) تفاوت دارند، به طوری که اندازه روزنه در شاه‌بلوط‌های خزری کوچکتر و تراکم روزنه در آن نسبت به گونه اروپایی بیشتر است. از نظر انواع کرک پوششی، شاه‌بلوط با منشاء خزری و آمریکایی، هر سه نوع کرک ساده، ستاره‌ای و چند شاخه‌ای را دارا می‌باشند ولی در گونه اروپایی فقط دو نوع ساده و ستاره‌ای دیده شد (Akbarinia *et al.* 2011). همچنین، ابعاد برگ شاه‌بلوط در جنگل‌های خزری نسبت به جنگل‌های اروپا بزرگتر و در مقابل طول دمبرگ آن کوچکتر است (Zarafshar *et al.* 2010). بلوط‌های اروپا، ژاپن و چین به علت دارا بودن اندازه بزرگ دانه‌ها و کیفیت بالا، از نظر اقتصادی برای مردم آن منطقه مهم هستند و قرن‌هاست که کشت داده می‌شود. با این حال، متاسفانه از تاریخچه پراکنش این گونه و وسعت پراکنش آن اطلاعات چندانی موجود نیست. اما آنچه مشخص است اندک رویشگاه‌های به جا مانده از این گونه نیز به دلیل تخریب وسیع انسانی و ابتلا به بیماری، از وضعیت مطلوبی برخوردار نیستند. در تایید این مطلب هدایتی و همکاران (Hedayati *et al.* 2003) بیان داشتند که حدود نه درصد از درختان شاه‌بلوط در داخل رویشگاه طبیعی خشک شدند و به دلیل خوراکی بودن بذر این درخت و جمع‌آوری آن توسط افراد محلی، امکان زادآوری طبیعی در سطح رویشگاه‌های آن وجود ندارد. بنابراین، به نظر می‌رسد ادامه روند کنونی، سبب حذف یکی از عناصر گیاهی شاخص جنگل هیرکانی گردد و شرایط ایجاب می‌نماید تا با به کارگیری راهکارهای مدیریتی مناسب، حفاظت از رویشگاه‌های این گونه در اولویت قرار گیرد. از طرف دیگر، براساس مرور منابع، تاکنون مطالعه جامعی در جهت شناسایی شاه‌بلوط‌های شمال ایران صورت نپذیرفته است، ولی در منابع داخلی بر مبنای مطالعه ریخت‌شناسی شاه‌بلوط ایران را با نام علمی *Castanea sativa* Mill. می‌شناسند (هدایتی و همکاران ۱۳۸۲). این در حالی است که شیوع پدیده دورگه‌ای شدن و شباهت‌های ریختی فراوان بین گونه‌های مختلف این جنس سبب ایجاد اختلاف نظر محققان در نامگذاری یکسان برخی از گونه‌های آن شده است (Lang *et al.* 2007, Fineschi *et al.* 2009). امروزه در چنین مواردی که شناسایی گونه‌های گیاهی براساس ریخت‌شناسی مشکل و همراه با تشخیص نادرست است، استفاده از تکنیک DNA بارکدینگ پیشنهاد می‌شود (Kress *et al.* 2005, Jeanson *et al.* 2011). بارکددهی، تکنیک طبیعی استفاده از شناساگرهای مختلف DNA در مطالعات فیلوژنی و سیستماتیک مولکولی است که با استفاده از توالی‌های کوتاه ارتولوگ و استاندارد DNA به شناسایی گونه‌ها می‌پردازند. استانداردسازی، ساده‌سازی و مقیاس‌پذیری سه اصل مهم درDNA بارکدینگ محسوب می‌شوند. اگرچه زیرواحد ۱ سیتوکروم اکسیداز (COI) به عنوان ناحیه‌ای برای بارکد در جانوران اثبات شده است، ولی تاکنون یک ناحیه خاص که بتواند به عنوان بارکد برای گیاهان معرفی شود یافت نشد (Chase *et al.* 2005, Presting 2006). البته مناطق مختلفی از ژنوم به عنوان بارکد در گیاهان مطرح هستند که بسته به نوع جنس گیاهی متفاوت است. ژنوم کلروپلاستی با داشتن نوترکیبی و میزان جانشینی کم در مقایسه با ژنوم هسته‌ای و ساختاری ثابت، دربرگیرنده ژن‌های مختلفی با حفاظت شدگی بالا است که امکان ساخت و طراحی پرایمرهای عمومی و در نتیجه عمل تکثیر با PCR را آسان می‌سازد و هم چنین با داشتن وراثت مادری امکان تحلیل آسان‌تر در مطالعات را فراهم می‌آورد (Palmer & Herbon 1988). از این رو نشانگرهای کلروپلاستی به عنوان یک نشانگر مولکولی مناسب جهت بررسی روابط فیلوژنتیک مورد تایید می‌باشند. در دهه‌های اخیر، مطالعات مختلفی براساس DNA کلروپلاستی (cpDNA) در مورد تغییرات و گوناگونی دامنه وسیعی از گیاهان از جمله درختان گزارش شده است، اما مطالعات کمی در زمینه مشخص کردن ارتباطات خویشاوندی در میان آرایه‌های *Castanea* با استفاده از توالی DNA کلروپلاستی گزارش شده است. تنها مطالعات مولکولی فراگیر روی این جنس، توسط استنفورد (Stanford 1998) انجام گرفت که با استفاده از نواحی *matK* و ITS هسته‌ای این جنس را آنالیز و تاریخ تکاملی پیچیده آن را گزارش کرده بود، ولی میزان کم اطلاعات در ناحیه *matK* و وجود داده‌های مبهم در ناحیه ITS، آنالیز و ارتباط درون این جنس را غیرقابل حل گذاشت. یکی دیگر از این نواحی ژنوم

کلروپلاستی *trnH-psbA* است. فاصله انداز غیرکدکننده *trnH-psbA* با طولی حدود ۴۵۰ جفت باز است که نخستین بار توسط کرس و همکاران (Kress *et al*. 2005) مطرح شد. هولینگورس و همکاران (Hollingsworth *et al*. 2009) ناحیه *trnH-psbA* را به عنوان یک کاندید مهم و قوی برای شناسایی گیاهان در کنار بارکدهای دیگری همچون *rbc*L و *matK* معرفی نمودند. این منطقه یکی از تغییرپذیرترین ناحیه غیرکدکننده در ژنوم پلاستیدی نهاندانگان با طول کوتاه است که تکثیر آن، حتی برای نمونه‌های خرد شده DNA، به آسانی قابل انجام است (Shaw *et al*. 2005). کارایی این قطعه در شناسایی و تفکیک گونه‌های مختلف جنس *Gentianaceae* (Whitlock *et al*. 2010)، *Solanaceae* (Kress *et al*. 2005)، *Verbenaceae* (Chen *et al*. 2012) و *Myristicaceae* (Newmaster *et al*. 2007) اثبات شد. از مطالعاتی که با استفاده از نشانگر *trnH-psbA* برای جنس شاه‌بلوط صورت پذیرفت، تحقیقی بود که کندی (Kennedy 2008) برای شناسایی و تعیین جمعیت‌های درهم آمیخته *Castanea* موجود در گرجستان انجام داد. او با استفاده از ۱۰ ناحیه غیرکدکننده کلروپلاستی که ناحیه *trnH-psbA* جزیی از آن‌ها بود، سه جمعیت *C. dentata*، *C. pumila* var. *pumila* و *C. pumila* var. *ozarkensis*، گرجستان را مورد بررسی قرار داد. بنابراین، از آنجایی که مطالعات بسیار اندکی براساس ناحیه *trnH-psbA* روی جنس شاه‌بلوط صورت گرفته است، این تحقیق در نظر دارد تا با تعیین توالی ناحیه پلاستیدی *trnH-psbA* و مقایسه آن با سایر گونه‌های این جنس، نزدیکی و شباهت شاه‌بلوط‌های شمال ایران را با شاه‌بلوط‌های سایر نقاط دنیا، مورد مقایسه قرار دهد.

روش بررسی

- نمونه برداری، استخراج DNA و تکثیر ناحیه *trnH-psbA*

برای بررسی جایگاه تاکسونومیکی شاه‌بلوط ایران، ابتدا شش پایه از این گونه در سه منطقه (هر منطقه دو پایه) پراکنش این گونه در استان گیلان شامل منطقه ویسرود، سیاه‌مزگی و قلعه رودخان انتخاب شدند (شکل۱). همچنین، از بانک ژن گونه‌های *Castanea sativa*، *C. dentata* و *C. pumila* (تقریبا تمامی گونه‌های شاه‌بلوط که توالی ناحیه *trnH-psbA* آن‌ها ثبت شده بود) و نیز گونه *Quercus psedosemecarpifoli* به عنوان برون‌گروه برای رسم درخت فیلوژنی انتخاب شدند (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی و مشخصات نمونه‌های مورد بررسی

Table 1. Characteristics of studied samples

گروه (Group)	نام (Sample)	کد دسترسی (Accession No.)	محل جمع‌آوری (Locality)
1	Hyrcanion samples	HS_1	Visrod
		HS_2	
2	Hyrcanion samples	HS_3	Ghalerodkhan
		HS_4	
3	Hyrcanion samples	HS_5	Siahmazgi
		HS_6	
European origin	*Castanea sativa*	FN687510	NCBI
Southeast America origin	*C. pumila*	JQ677933	NCBI
North America origin	*C. dentata*	JQ677925	NCBI
Outgroup	*Quercus psedosemecarpifoli*	HE591333	NCBI

شکل۱- موقعیت جغرافیایی رویشگاه‌های شاه‌بلوط در جنگل هیرکانی (شمال ایران).
Fig. 1. Geographic natural location sites of *Castanea* sp. in the Hyrcanian forest (N Iran).

بعد از جمع‌آوری برگ از درختان، نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و استخراج DNA ژنومی از برگ شاه‌بلوط، با استفاده از CTAB و سدیم دودسیل سولفات- پتاسیم استات که روش ترکیبی دویل (Doyle & Doyle 1987) و روش دلاپورتا (Dellaporta *et al.* 1983) می‌باشد، انجام شد. ناحیه *trnH-psbA* شاه‌بلوط با استفاده از پرایمر عمومی trnAR (trnAR: 5′- GTTATGCATGAACGTAATGCTC) (Sang *et al.* 1997) و پرایمر trnHF (trnHf: 5′- CGCGCATGGTGGATTCACAATCC) (Tate & Simpson 2003) تکثیر شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر برای هر واکنش شامل ۳۳/۶ میکرولیتر آب تزریقی دو بار تقطیر، ۵ میکرولیتر بافر (10x PCR)، ۱/۵ میکرولیتر از محلول $MgCl_2$ ، ۱/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۳ میکرولیتر از هر یک از جفت پرایمرها در غلظت ۰/۵مولار، ۲ میکرولیتر از DNA الگو، و در نهایت ۰/۴ میکرولیتر (۲U) آنزیم Taq پلی‌مراز به میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری اضافه شد. بعد از یک ورتکس کوتاه و سپس چرخش دادن (spin) نمونه‌ها، مراحل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل: واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۳۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۲ چرخه تکراری پشت سر هم (مرحله اتصال به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۵۴ درجه سلسیوس، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله واسرشت به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس) و در مرحله پایانی بسط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ بود.

- تحلیل فیلوژنتیکی

نمونه‌های تعیین توالی شده به کمک ابزار اینترنتی Blast با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و تعلق آن به جنس شاه‌بلوط تایید شد. در گام بعدی توالی‌های به دست آمده به روش MUSCLE تعبیه شده در نرم‌افزار Mega5 با هم ردیف‌خوانی شدند. تعداد نقاط اطلاع‌رسان پارسیمونی، متغیر و محافظت شده برای توالی مرتب شده مشخص شد. درخت‌های فیلوژنی با استفاده از روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) رسم شد. جهت اطمینان از صحت درخت‌های رسم شده از پشتوانه بوت‌استرپ ۵۰۰ نسخه کاذب استفاده گردید. تمامی مراحل تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 (Tamura 2007) انجام شد.

نتیجه

- مشخصات قطعات *trnH-psbA* در جنس شاه‌بلوط با استفاده از آنالیز تعیین توالی

نتایج آنالیز تعیین توالی نشان داد که قطعه تکثیر شده شامل ژن *psbA* و ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* است. طول کل قطعه ژنی *psbA* برای نمونه‌های شاه‌بلوط گرفته شده از بانک ژنی (*Castanea sativa*، *C. dentate* و *C. pumila*) و شاه‌بلوط هیرکانی مورد مطالعه ۶۶ جفت باز و بدون تنوع نوکلئوتیدی بود. طول قطعه بین‌ژنی *trnH-psbA* بین ۴۱۶-۴۲۷ جفت باز است که نمونه‌های شاه‌بلوط هیرکانی با حذف ۱۱ جفت باز دارای کمترین طول به میزان ۴۱۶ جفت باز بودند. بررسی تنوع

نوکلئوتیدی ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* در پایه‌های مربوط به شاه‌بلوط هیرکانی صفر بود، در حالی که در کل پایه‌های مورد مطالعه، ۰/۰۰۲ بود. ترکیب نوکلئوتیدی گونه‌های مورد بررسی به تفکیک هر ناحیه در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج ردیف‌خوانی نشان داد که از بین ۵۱۴ جایگاه بررسی شده، تنها پنج جایگاه متغیر و از نوع انحصاری بودند. جایگاه انحصاری اول و دوم در موقعیت ۳۶۶ و ۴۹۵ مربوط به گونه *C. dentata*، جایگاه انحصاری سوم در موقعیت ۴۰۱ و مربوط به *C. sativa*، جایگاه انحصاری چهارم و پنجم در موقعیت ۴۰۶ و ۴۳۷ مربوط به گونه *C. pumila* است (جدول ۳).

جدول ۲- ترکیب و درصد نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده ناحیه *trnH-psbA* در شاه‌بلوط‌های مطالعه شده

Table 2. Nucleotide composition of *trnH-psbA* regions in studied samples of *Castanea*

Specimens*	***psbA***				***trnH-psbA* spacer**			
	T(U)	C	A	G	T(U)	C	A	G
HS1	30.3	24.2	30.3	15.2	42.2	9	33	15.4
HS2	30.3	24.2	30.3	15.2	42.2	9	33	15.4
HS3	30.3	24.2	30.3	15.2	42.2	9	33	15.4
HS4	30.3	24.2	30.3	15.2	42.2	9	33	15.4
HS5	30.3	24.2	30.3	15.2	42.2	9	33	15.4
HS6	30.3	24.2	30.3	15.2	42.2	9	33	15.4
C. sativa (FN687510)	30.3	24.2	30.3	15.2	41.89	10	32.9	15.3
C. pumila (JQ677933)	30.3	24.2	30.3	15.2	42.28	9	33.3	15
C. dentata (JQ677925)	30.3	24.2	30.3	15.2	41.98	10	33.2	15.1

HS: Hyrcanion samples

* Gene bank samples with the accession numbers

جدول ۳- موقعیت جایگاه متغیر و انحصاری گونه‌های شاه‌بلوط مورد مطالعه

Table 3. Position of variable and singleton sites in analyzed *Castanea* species

	Position																
Taxon	256	355	356	357	358	366	401	406	437	488	489	490	491	492	493	494	495
HS1	_	-	-	-	-	A	A	C	G	-	-	-	_	-	-	-	G
HS2	-	-	-	-	-	A	A	c	G	-	-	-	_	-	-	-	G
HS3	-	-	-	-	-	A	A	C	G	-	-	-	_	-	-	-	G
HS4	-	-	-	-	-	A	A	C	G	-	-	-	_	-	-	-	G
HS5	-	-	-	-	-	A	A	C	G	-	-	-	_	-	-	-	G
HS6	-	-	-	-	-	A	A	C	G	-	-	-	_	-	-	-	G
C. sativa	T	-	-	-	-	A	C	C	G	C	A	T	A	C	A	G	G
C. pumila	-	T	T	T	A	A	A	A	T	C	A	T	A	C	A	G	G
C. dentata	-	-	-	-	-	T	A	C	G	C	A	T	A	C	A	G	A

- نقاط خاکستری، بیانگر جایگاه انحصاری برای هر آرایه است.

- Gray boxes represent singleton sites for each.

همچنین، بررسی فاصله ژنتیکی گونه‌های مورد بررسی نشان داد که نمونه های مورد بررسی از جنگل هیرکانی فاقد فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند. همچنین، بیشترین شباهت ژنتیکی بین شاه‌بلوط‌های ناحیه هیرکانی با شاه‌بلوط اروپایی مشاهده شد (جدول ۴).

- فیلوژنی جنس شاه‌بلوط با استفاده از قطعات *trnH-psbA*

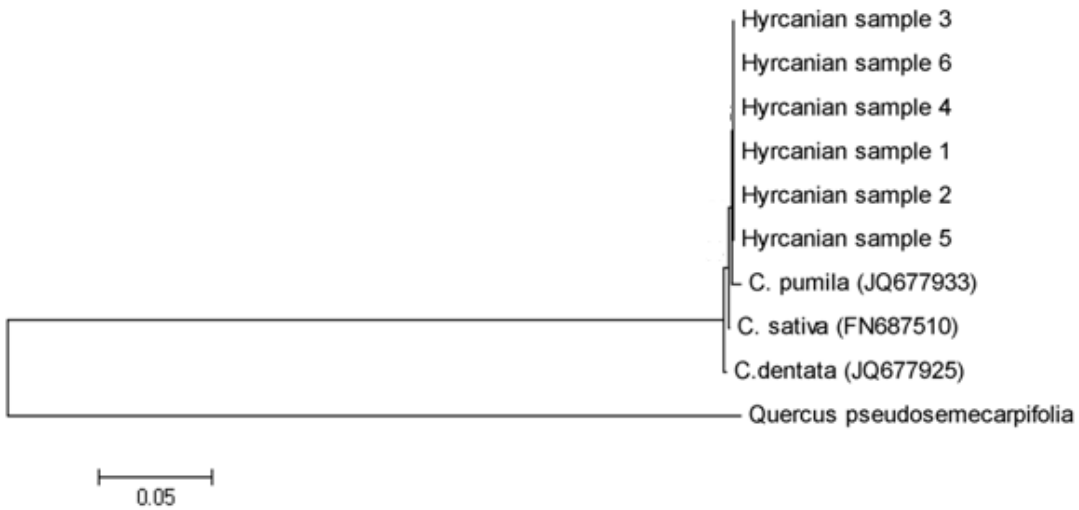
در این تحقیق براساس ناحیه ژنی *psbA* و بین‌ژنی *trnH-psbA* چهار هاپلوتیپ شناسایی شدند. تنوع هاپلوتیپی ۰/۵۸ بود. تمامی شش پایه بررسی شده از سه رویشگاه شاه‌بلوط در شمال ایران، هاپلوتیپ اول را تشکیل دادند. هریک از سه گونه *C. sativa*، *C. pumila* و *C. dentata* هریک به تنهایی یک هاپلوتیپ جداگانه را به خود اختصاص دادند. درخت فیلوژنی براساس کل ناحیه ژنی *psbA* و بین‌ژنی *trnH-psbA* به روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum likelihood) و با پشتوانه بوت استرپ حاصل از ۱۰۰۰ نسخه کاذب، شاه‌بلوط هیرکانی در یک کلاد مجزا البته با پشتوانه کمتر از ۵۰ درصد قرار گرفت (شکل ۲).

جدول ۴- فاصله ژنتیکی بین شاه‌بلوط‌های مورد بررسی

Table 4. Pairwise genetic distance among analyzed *Castanea* samples

	HS1*	**HS2**	**HS3**	**HS4**	**HS5**	**HS6**	***C. sativa***	***C. pumila***	***C. dentata***
HS1	0								
HS2	0	0							
HS3	0	0	0						
HS4	0	0	0	0					
					0	0	0	0	0	HS5
				0	0	0	0	0	0	HS6
			0	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	*C. sativa*
		0	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	*C. pumila*
	0	0.008	0.006	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	*C. dentata*

HS*: Hyrcanion samples of *Castanea*



شکل ۲- درخت فیلوژنی براساس توالی کل ناحیه *trnH-psbA* (به دلیل اینکه هیچ‌کدام از شاخه‌ها در آنالیز بوت‌استرپ حمایت نشدند، نتایج آن گزارش نشد).

Fig. 2. Phylogenetic tree based on complete *trnH-psbA* region.

بحث و نتیجه‌گیری

جنس شاه‌بلوط با داشتن پراکنش وسیع در آسیا، آمریکا و اروپا به دلیل اهمیت اقتصادی و وجود ترکیب و تنوع عناصر با ارزش، همواره به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های درختی جنگلی، مورد توجه محققان علوم گیاهی است. بدیهی است که به کارگیری شاه‌بلوط‌ها در فعالیت‌های اقتصادی مستلزم شناخت گونه‌های موجود از این جنس در هر اکوسیستم طبیعی است. اینها گیاهانی با حالت درختی و درختچه‌ای هستند که از قاره آسیا منشا گرفته‌اند و دانشمندان معتقدند که در دوره سوم، مهاجرت رو به شرق داشتند و به سمت آمریکا پراکنش یافتند (Fineschi *et al*. 2000). وجود هیبریدها و تنوع ریختی بالا سبب ایجاد اختلاف نظر در تشخیص صحیح گونه‌های جنس شاه‌بلوط در دنیا شده است. از این‌رو، در تحقیق‌های زیستی استفاده از صفات ریخت‌شناسی به تنهایی، نمی‌تواند به محققان در شناسایی گونه‌ها کمک کند و آن‌ها را با مشکل مواجه می‌کند، اما سیستم‌های شناسایی بر مبنای DNA این قدرت را دارد که شناسایی گونه‌های معروف و کشف گونه‌های جدید را با توجه به روند روزافزون کاهش تنوع زیستی، برای محققان علوم زیستی آسان کند (Casiraghi *et al.* 2010). نتایج نشان داد که ناحیه کلروپلاستی بین‌ژنی *trnH-psbA* در جمعیت‌های مختلف شاه‌بلوط شمال ایران فاقد تنوع نوکلئوتیدی است. این نتیجه هم‌راستا با مطالعه سایر محققان (Schaal *et al.* 1998, Byrne *et al.* 2002) نرخ تکاملی پایین این ناحیه کلروپلاستی را مانند سایر نواحی کلروپلاستی، تایید می‌نماید. در این تحقیق، آزمون درخت فیلوژنی به منظور تشخیص روابط تکاملی، نشان داد که شاه‌بلوط‌های هیرکانی از سه رویشگاه ویسرود، قلعه رودخان و سیاه‌مزگی، با دارا بودن حذف ۱۱ جفت بازی در ناحیه بین‌ژنی، در یک کلاد جدا قرار گرفته‌اند. پیش از این نیز، اکبری‌نیا و همکاران (۱۳۹۰) با مقایسه صفات ریختی شاه‌بلوط ایران و شاه‌بلوط اروپا بیان داشتند که شاه‌بلوط ایران به دلیل دارا بودن کرک‌های ستاره‌ای پایک‌دار (fasciculate) در سطح پشتی برگ از شاه‌بلوط اروپا متمایز است. اما همچنان شاه‌بلوط ایران در مقایسه با سایر گونه‌ها، کمترین فاصله ژنتیکی را با شاه‌بلوط اروپایی نشان داد. با این وجود، قرار گرفتن شاه‌بلوط هیرکانی در یک گروه هاپلوتیپی مجزا و وجود یک ناحیه نسبتا بزرگ حذف نوکلئوتیدی در ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* و اثبات وجود تمایز ریختی، بیانگر تمایز شاه‌بلوط هیرکانی از سایر شاه‌بلوط‌های تحت مطالعه در این تحقیق دارد.

در پایان، اگرچه از نظر ریخت‌شناسی (اکبری‌نیا و همکاران ۱۳۹۰) و مولکولی براساس ناحیه trnH-psbA (نتایج این تحقیق)، بین شاه‌بلوط هیرکانی و شاه‌بلوط اروپایی تفاوت وجود دارد، ولی تصمیم‌گیری در مورد جایگاه تاکسونومی شاه‌بلوط هیرکانی تنها براساس یک نشانگر بارکد از پشتوانه قوی برخوردار نمی‌باشد. بنابراین، پیشنهاد می‌گردد جهت تصمیم‌گیری نهایی در این ارتباط و افزایش دقت نتیجه‌گیری، ضمن مطالعه تفصیلی صفات ریختی، از سایر نشانگرهای بارکد نیز استفاده گردد.

References

Akbarinia, M., Zarafshar, M., Sattarian, A., Babaie Sustani, F., Ghanbari, E. & Chaplagh Paridari, I. 2011. Morphological variations in stomata, epidermal cells and trichome of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Caspian ecosystem. Taxonomy and Systematic 3(7): 23–32.

Byrne, M., MacDonald, B. & Coates, D. 2002. Phylogeographical patterns in chloroplast DNA variation within the *Acacia acuminata* (*Leguminosae*: *Mimosoideae*) complex in Western Australia Journal of Evolutionary Biology 15: 576–587.

Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A. & De Mattia, F. 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. Briefings in Bioinformatics 11: 440– 453.

Chase, M.W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J.M., Kesanakurthi, R.P., Haidar, N. & Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences 360: 1889–1895.

Chen, Q., Liu, Y., Liu, Z., Chen, S. & Chen, K. 2012. DNA bacording of *Verbenaceae* medicinal plant by using ITS2 and psbA-trnH region. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 37: 1107–1113.

Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19–21.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin of Evolution 19: 11–15.

Fineschi, S., Taurchini, D., Villani, F. & Vendramin, G. 2009. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (*Fagaceae*) throughout southern European countries. Molecular Ecology 9: 1495–1503.

Hedayati, M. 2003. *Castanea* siliviculture in Guilan province and the manner of its propagation. PhD thesis of Forestry, Tehran University, Tehran.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS One 6: e19254.

Hosseinzadeh Colagar, A., Saadati, M., Zarea, M. & Ahmadi Talei, S. 2010. Genetic variation of the Iranian *Sclerotinia sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. Biotechnology (Pakistan) 9: 67–72.

Jazireh'ee, M. 1961. *Castanea*, forest tree in Iran. Forestry organization of Iran, Tehran.

Jeanson, M.L., Labat, J.N. & Little, D.P. 2011. DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? Annals of Botany 1–7.

Kennedy, S.E. 2008. Chloroplast DNA Analysis of Putative Chestnut Chinquapin Hybrids. Departmental Honors Thesis, 49 pp. Chattanooga.

Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 8369–8374.

Lang, P., Dane, F., Kubisiak, T.L. & Huang, H. 2007. Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America. Molecular Phylogenetics and Evolution 43: 49–59.

Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, R.A. & Janovec, J. 2007. Testing candidate plant barcode regions in the *Myristicaceae*. Molecular Ecology Notes 8: 480–490.

Palmer, J.D. & Herbon, L.A. 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. Journal of Molecular Evolution 87–97.

Presting, G.G. 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 84: 1434–1443.

Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (*Paeoniaceae*). American Journal of Botany 84: 1120–1136.

Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T. & Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology 7: 465–474.

Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. & 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(1): 142–166.

Stanford, A. 1998. The Biogeography and Phylogeny of *Castanea*, *Fagus* and *Juglans* based on matK and ITS Sequence Data Biology UNC, Chapel Hill.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. doi: 10.1093/molbev/msm092.

Tate, J.A. & Simpson, B.B. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (*Malvaceae*) and diverse origins of the polyploid species. Systematische Botanik 28: 723–737.

Whitlock, B.A., Hale, A.M. & Groff., P.A. 2010. Intraspecific Inversions Pose a Challenge for the *trnH-psbA* Plant DNA Barcode. PLoS One 5: e11533.

Zarafshar, M., Akbarinia, M., Bruschi, P., Hosseini, S.M., Yousefzadeh, H., Taieby, M. & Sattarian, A. 2010. Phenotypic variation of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) natural populations in Hyrcanian forest (north of Iran), revealed by leaf morphometrics. Folia Oecologica 37(1): 113–121.