

مقایسه دو نوع مارکر کلروپلاستی (PCR-RFLP و SSR) در بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های راش *Fagus orientalis* Lipsky در جنگلهای خزری

پروین صالحی شانجانی^۱

۱- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، پست الکترونیک: Psalehi@rifr-ac.ir

تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۹

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۱۵

چکیده

پلی مورفیسم DNA کلروپلاست (cpDNA) در ۱۴ جمعیت راش (*Fagus orientalis* Lipsky) توسط مارکرهای PCR-RFLP و میکروساتلایتی (SSR) مطالعه شد تا تاریخچه تکاملی این گونه مهم اقتصادی-اکولوژیکی جنگلهای شمال ایران روشن گردد. دو منطقه ژنی cpDNA، OA و DT تکثیر و به وسیله آندونوکلازهای محدود کننده *HaeIII* و *HinfI* هضم شده و قطعات حاصل توسط الکتروفورز ژل پلی آکریل امید جداسازی گردیدند. قطعات محدود کننده منطقه DT هیچ پلی مورفیسمی در میان افراد جمعیت‌های مورد مطالعه نشان نداد. در حالی که در میان افراد درون جمعیت‌های مورد مطالعه منطقه اسالم و جمعیت نکا-۱۴۰۰، شاهد وجود پلی مورفیسم در قطعات محدود کننده منطقه OA بودیم. سه هاپلوتاایپ (که از نظر فیلوژنتیکی مرتب شده‌اند) در گستره توزیع این گونه مشاهده شد. میزان بالای تمایز ژنتیکی ($Gst=0.67$) با ساختار جغرافیایی در گوناگونی آن برخلاف مطالعات قبلی تمایز ژنتیکی هسته ای پایین (که از مطالعات قبلی توسط مارکرهای آنزیمی بدست آمده است) نشان دهنده کم بودن جریان ژن توسط بذر در راش می‌باشد. از ۹ میکروساتلایتی کلروپلاستی مطالعه شده فقط ۲ میکروساتلایتی کلروپلاستی پلی مورفیسم نشان دادند که براساس ترکیب‌های مختلف آللهای مشاهده شده، ۱۰ هاپلوتاایپ شناسایی شد. توزیع هاپلوتیپ‌ها تمایز قابل ملاحظه ای را با ساختار جغرافیایی مشخص ($Fst=0.80$) نشان دادند. طبق آزمون واریانس ملکولی (AMOVA) ۵۲٪ از گوناگونی کل میکروساتلایتهای کلروپلاستی به اختلاف‌های میان منطقه ای، ۲۸٪ به تفاوت‌های میان جمعیتی و ۲۰٪ به اختلاف‌های درون جمعیتی تعلق دارد. اگرچه تنوع هاپلوئیدی مشاهده شده توسط مارکر PCR-RFLP بسیار کمتر از SSR بود. با وجود این، هر دو مارکر غنای هاپلوئیدی بالایی در بخش غربی جنگلهای راش خزری نشان دادند. غنای هاپلوتیپی بالا در جمعیت‌های غربی که توسط هر دو مارکر در این بررسی مشاهده گردید تأکیدی بر این فرضیه است که سمت و سوی گسترش راش در جنگلهای خزری از غرب به شرق بوده و فاصله جغرافیایی مهمترین عامل تمایز جمعیتی در راش می‌باشد.

واژه های کلیدی: راش، جنگلهای خزری، میکروساتلایتی، cpDNA، PCR-RFLP، AMOVA.

مقدمه

جنگلهای خالص و آمیخته راش (*Fagus orientalis* Lipsky) مهمترین جنگلهای راش ناحیه خزری ایران می‌باشند که متعلق به دوران سوم زمین شناسی است. از آنجایی که دوران یخبندان بر روی جنگلهای هیرکانی تأثیر مستقیم نگذاشته، راش در این جنگلها تغییرات محیطی و زمین شناختی زیادی را تحمل کرده است

(Mobayen & Tregubov, 1969) و بنابراین تکامل

جوامع فعلی راش از دوران سوم زمین شناسی تا کنون ادامه داشته است (Gömöry *et al.*, 1995).

شناخت تاریخچه تکاملی یک گونه اهمیت ویژه‌ای برای ارزیابی راهبردهای مناسب جهت حفاظت از منابع ژنتیکی دارد. در سالهای اخیر به علت پیشرفت ژنتیک ملکولی، تکنیکهای بسیاری از جمله مارکرهای هسته ای،

بررسی بودند. براساس نتایج آنها جوامع منتهی‌الیه شمالی (در اروپا) از نظر ژنتیکی همگن بودند که می‌تواند نشان دهنده محدودیت انتشار و استقرار مجدد این گونه در دوران پس از یخچال باشد. آنها معتقد به وجود ارتباط بین توزیع جغرافیایی هاپلوتایپ‌های cpDNA و روابط فیلوژنتیکی‌شان می‌باشند، به طوری که آنها (۱) دو هاپلوتایپ بسیار وابسته به هم در ایتالیا، (۲) دو هاپلوتایپ متعلق به یک دودمان کاملاً جدا شده در کریمه و (۳) یک هاپلوتایپ بسیار فراوان و چندین آلل کمیاب (که وابسته به آلل بسیار فراوان هستند) را که در بیشتر اروپا یافت می‌شوند شناسایی کردند. از آنجایی که راش کریمه یک نوع بسیار متمایز بوده و با گسترشگاه گونه راش شرقی همپوشانی دارد احتمال انتقال بین گونه‌ای ژن‌های سیتوپلاسمی، مشابه با مورد گزارش شده در بلوط (Petit et al., 1993; Paffetti et al., 2001; Belahib et al., 2001) وجود دارد.

Salvini و همکاران تنوع ژنتیکی بسیار پایینی $Gst = 0.22$ را میان ۱۰ جامعه ایتالیایی صنوبر لزان *Populus tremula* (به وسیله PCR-RFLP) یافتند که ۴ برابر کمتر از میزان برآورد شده برای گونه‌های جنگلی پهن برگ است. چنین مقادیر پایینی را می‌توان به وسیله کارایی بالای انتشار بذر (توسط باد به فواصل طولانی) توضیح داد (Salvini et al., 2001).

بررسی حدود ۴۰۰ جامعه اروپایی راش، بوسیله مارکرهای PCR-RFLP و میکروساتلایت cpDNA، سطوح بالایی از تمایز ژنتیکی را میان جوامع اروپایی راش در دست گزارش است. محققان دو گروه اصلی هاپلوتایپ: اولی منشأ گرفته از پناهگاه‌های ایتالیایی و دومی از پناهگاه‌های بالکان، را شناسایی کردند. هاپلوتایپ‌های پیدا شده در شبه جزیره بالکان و ترکیه به علت وجود گونه راش شرقی یا دورگ‌های بین *F. orientalis* / *F. sylvatica* بسیار متفاوت بودند (Magri et al., 2005). نتایج آنها با مطالعات قبلی تنوع cpDNA به وسیله Demesure و همکاران (۱۹۹۶) مطابقت دارد.

کلروپلاستی و میتوکندریایی برای مطالعه تمایز جمعیتها ابداع شده است. هر دو نوع ژنوم سیتوپلاستی (کلروپلاست و میتوکندری) در بیشتر نهاندانگان دارای وراثت مادری بوده و بنابراین فقط به وسیله بذر منتقل می‌شوند که می‌تواند برای مطالعه مسیرهای انتشار بذر از طریق توزیع جغرافیایی گوناگونی cpDNA استفاده شود. مطالعات در مورد مارکرهای DNA اندامکی ثابت نموده که وقتی انتشار بذر کمتر از جریان گرده باشد (همان گونه که در بسیاری از نهاندانگان مشاهده می‌شود) پلی مورفیسیم اندامکی در مقایسه با هسته ای دارای ساختار مشخصی است (Petit et al., 1993) این واقعیت به ویژه در درختان نهاندانه که انتشار بذرهای سنگین شان از طریق جاذبه صورت می‌گیرد صحت دارد (Salvini et al., 2001). cpDNA به دلیل میزان نسبتاً کم تکامل در توالی و فقدان نوترکیبی جنسی، مارکر مناسبی برای مطالعات فیلو جغرافی ملکولی است (Sperisen, 2001) (Mátyás & مادری دارند، بخش زیادی از تنوع ژنتیکی ناشی از تنوع در میان جمعیتها (نه در درون جمعیتها) است (Birky et al., 1989).

در طی دهه گذشته مطالعات متعددی در مورد بررسی گوناگونی cpDNA در بسیاری از گیاهان از جمله درختان گزارش شده است (Petit, 1999). پلی مورفیسیم cpDNA و توزیع جغرافیایی آنها در برخی گونه‌های *Fagus* تشریح شده است: *Fagus sylvatica* L. (Demesure et al., 1996)، *F. orientalis* Lipsky و (Fujii et al., 2002) *F. crenata* (Salehi Shanjani et al., 2004) به وسیله مطالعه جایگاه‌های آنزیم‌های محدودکننده قطعات DNA تکثیر شده با PCR، پلی مورفیسیم را در ژنوم کلروپلاست راش اروپایی (*F. sylvatica* L.) بررسی نمودند (Demesure et al., 1996). آنها در میان ۳۹۹ درخت از ۸۵ جامعه که در سطح گسترشگاه طبیعی این گونه پراکنده بودند ۱۱ هاپلوتایپ یافتند که از نظر فیلوژنتیکی قابل

هر داکسی‌نوکلئوزیدتری فسفات (dNTP)، ۱ μM از هر پرایمر و ۱ واحد Taq DNA polymeras می‌باشد که پس از نگهداری محلول واکنش به مدت ۶۰ ثانیه در 90°C ، محلول واکنش در معرض چرخه‌های مختلف دمایی زیر قرار گرفتند: (۱) ۵ چرخه: 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 60°C به مدت ۳۰ ثانیه، 72°C به مدت ۴ دقیقه. (۲) ۵ چرخه: 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 55°C به مدت ۳۰ ثانیه، 72°C به مدت ۴ دقیقه. (۳) ۲۵ چرخه: 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، 50°C به مدت ۳۰ ثانیه، 72°C به مدت ۴ دقیقه. سپس فرآورده‌های تکثیر در 72°C به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شدند (شکل ۱). در این کار از دستگاه PCR ساخت شرکت Perkin Elmer 9700 استفاده شد. فرآورده‌های تکثیر DT و OA ($15\ \mu\text{L}$ حاوی ۱ mg DNA) به ترتیب با ۵ واحد آنزیم محدود کننده *HaeIII* و *HinfI* در حجم نهایی $20\ \mu\text{L}$ در 37°C به مدت ۴ ساعت تیمار شدند. محصول نهایی به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌امید non-denaturing تعیین ترادف ۸٪ (W/V) تجزیه شدند. قطعات پلی‌مورفیک براساس کاهش طول قطعه در ژل پلی‌اکریل‌امید نام‌گذاری شدند. هاپلوتایپ‌ها براساس ترکیب‌های مختلف قطعات پلی‌مورفیک شناسایی شده تعیین شدند. گوناگونی در هر دو قطعات DT و OA مورد بررسی به عنوان جهش‌های نقطه‌ای یا حذف و اضافه بازها نسبت داده می‌شود.^۱ هاپلوتایپ‌ها بر اساس ترکیب‌های مختلف قطعات پلی‌مورفیک شناسایی شده (آل‌ها) تعیین شدند. عوامل تمایز ژنتیکی (Gst) در ژنوم کلروپلاست از روش‌های (Pons & Petit, 1995 & 1996) با استفاده از نرم‌افزار HAPLODIV برآورد گردید.

به وسیله تعیین توالی دو ناحیه cpDNA، گوناگونی cpDNA در راش ژاپنی بررسی شده و ۱۳ هاپلوتایپ مشخص شناسایی شده که در دو گروه عمده دسته‌بندی شدند که در طول دریای ژاپن و سواحل اقیانوس آرام توزیع شده بودند. براساس توزیع دو گروه عمده cpDNA، دو راه مهاجرت در تاریخ پراکنش *F. crenata* پیشنهاد می‌شود که یکی در طول دریای ژاپن و دیگری در طول سواحل اقیانوس آرام می‌باشد (Fujii et al., 2002). در پژوهش پیش رو با مطالعه مارکرهای کلروپلاستی (SSR و PCR-RFLP) ساختار ژنتیکی جمعیت و توزیع گوناگونی هاپلوتیپی جمعیت‌های راش مطالعه شد. هدف بررسی سطح تمایز cpDNA درون جمعیت‌های راش و تاریخچه تکاملی راش در جنگلهای خزری ایران می‌باشد.

مواد و روشها

جوانه‌های خواب درختان راش به صورت همزمان از ۱۴ جمعیت طبیعی راش که در شیب شمالی رشته‌کوه البرز در جنگلهای هیرکانی ایران قرار دارند جمع‌آوری شدند (۲-۳ ارتفاع از هر منطقه؛ گرگان از استان گلستان؛ نکا، سنگده، خیرود و کلاردشت از استان مازندران؛ و اسالم از استان گیلان). کل DNA ژنومی از جوانه‌های خواب (۱۰۰ میلی‌گرم به عنوان ماده اولیه) ۱۴ درخت در هر جمعیت با استفاده از کیت Nucleospin plant (Germany, Macherey Negel) جداسازی گردید.

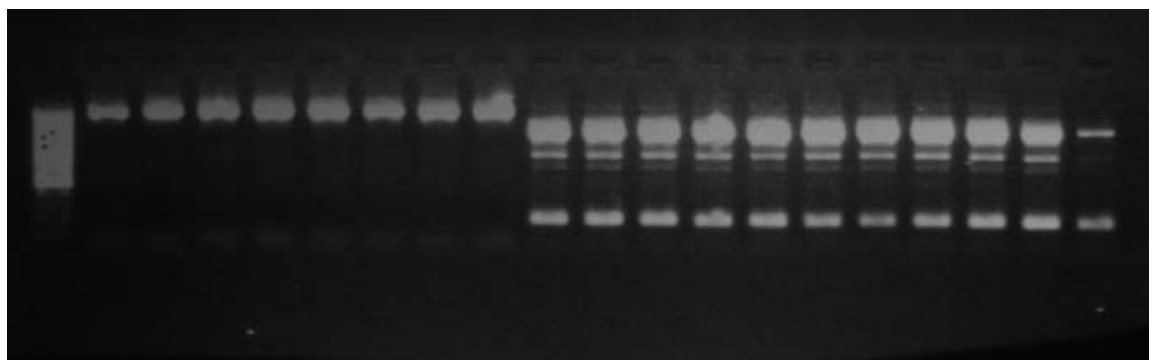
PCR-RFLP

دو قطعه ژنی *trnD-trnT* و *orf184-petA* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کلروپلاستی (Demasure et al., 1995) DT و (Grivet et al., 2001) OA (جدول ۱) و از طریق واکنش زنجیری پلی‌مراس (PCR) تکثیر شدند. محیط فرایند PCR با حجم نهایی $20\ \mu\text{l}$ شامل: $1/5\ \text{mM}$ MgCl_2 ، ژلاتین 0.01% (W/V)، $250\ \mu\text{M}$ ، $50\ \text{mM}$ KCL ، $10\ \text{mM}$ (pH ۸/۳) Tris-HCl ،

^۱ - بر اساس مذاکرات شفاهی با Giannini و Vettori (۲۰۰۵).

جدول ۱- ویژگیهای ۲ مارکر کلروپلاستی (PCR-RFLP) و آنزیم‌های محدود کننده آنها

ژن	عملکرد	جفت پرایمر ها و توالی '۵ - '۳	لوکوس	آنزیم محدود کننده
<i>TrnD</i>	tRNA-Asp	ACCAATTGAACTACAATCCC	DT	<i>HaeIII</i>
<i>TrnY</i>	tRNA-Tyr	CTACCACTGAGTTAAAAGGG		
<i>trnE</i>	tRNA-Glu			
<i>trnT</i>	tRNA-Thr			
<i>orf184</i>	Hypothetical protein ORF184	TGGCGATCAGAACATATATGGATAG	OA	<i>HinfI</i>
<i>orf226</i>	Hypothetical protein ORF226	CCCTCGGAAACAAGAAGTT		
<i>petA</i>	Cytochrome f			



شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز قطعات OA و DA تکثیر شده روی ژل آگارز. ستون اول از سمت چپ: نشانگر مولکولی (لدر ۱۰۰ bp)، از ستون دو تا نهم: قطعات OA و از دهم تا نوزدهم: قطعات DT است.

SSR

شدند. سپس فرآورده‌های تکثیر در 72°C به مدت ۸ دقیقه نگهداری شدند. در این کار از دستگاه PCR ساخت شرکت Perkin Elmer 9700 استفاده شد. طول قطعات تکثیر شده توسط توالی یاب خودکار (Alf Express, Pharmacia) اندازه گیری گردید و نتیجه توسط برنامه نرم افزاری (Fragment Manager 1.2 Pharmacia) بررسی شد. هاپلوتایپ‌ها بر اساس ترکیبهای مختلف قطعات پلی مورفیک شناسایی شده (آلها) تعیین شدند. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان جمعیتی و منطقه‌ای توسط آزمون واریانس ملکولی AMOVA (Excoffier et al., 1992) و برنامه نرم افزاری Arlequin 1.1 (Schneider et al., 2000) تعیین گردید.

۹ میکروساتلایت با استفاده از پرایمرهای کلروپلاستی (جدول ۲) از طریق PCR واکنش زنجیری پلی مرز (PCR) تکثیر شدند. محیط فرایند PCR با حجم نهایی $20\mu\text{l}$ شامل ۱۰ نانوگرم DNA الگو، بافر واکنش $10\times$ Amersham (۱۰۰ mM Tris-HCl) با $\text{pH}=9$ ، 50 mM KCL ، 15 mM MgCl_2 ، 1 mM MgCl_2 با مقادیر جدول ۲، 0.2 mM از هر داکسی نوکلئوزیدتری فسفات (dNTP)، $0.4\mu\text{M}$ از هر پرایمر و ۱ واحد Taq DNA polymerase می‌باشد که پس از نگهداری محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در 90°C ، محلول واکنش در معرض 30°C چرخه دمایی (یک دقیقه در دمای دناتوراسیون 95°C درجه سانتیگراد، یک دقیقه در دمای آنیلاسیون طبق جدول ۲ و یک دقیقه در دمای اکستانسسیون 72°C درجه سانتیگراد) تکثیر

جدول ۲- ویژگیهای ۹ مارکر میکروساتلایت کلروپلاستی

توالی	دمای	جفت پرایمر ها و توالی	اندازه آللهای (bp)	عملکرد	
تکراری	انیلاسیون (°C)	'۵ - '۳	در		
					<i>Castanea sativa</i>
(T) _{۱۳}	*۵۰	AATGCTGAATCGAYGACCTA CCAAAAATATTBGGAGGACTCT	۱۲۶	atpF intron	Ccmp۴
(A) _{۱۳}	*۵۰	CAACATATACCACTGTCAAG ACATCATTATTGTATCATCTTTC	۱۳۳	atpB-rbcL intergenic	Ccmp۷
(T) _{۱۴}	*۵۰	TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA TTCGTCGDCGTAGTAAATAG	۱۰۳	rpl2_rps19 intergenic	Ccmp۱۰
(AT) _۷	**۵۵	ATTCATTTCCCTTGCATTGA TTTACTTGTTACTAATAGGGTCTA GC	۱۰۹	petD intergenic	Cmcs۱
(AT) _۹	**۵۵	GAGCCATTCCCTTTTAGAAT TTGAAAACCGGTATAGTTCC	۱۵۱	psbC-trnS intergenic	Cmcs۲
(TC) _۵	**۵۵	ATTCATTTCCCTTCTATATC CCTAGTATCCCACCAATTA	۱۱۰	ycf10 gene	Cmcs۴
(T) _{۱۰}	**۵۵	GAAAAAGGACCCTTCCTAAT CTTATGATCGTCACGAATTG	۱۹۹	ndhG-ndhI intergenic	Cmcs۶
(A) _{۱۰}	**۵۵	GGTCTATTTTCCACTCACAA AGAAATAAACACCCCATTA	۱۷۹	ndhH-rps15 intergenic	Cmcs۸
(AT) _۷	**۵۵	GGATTGTAACAAATTTTTCAGG GTGCAAGGAATGTGCGAACTA	۱۷۸	accD-psaI intergenic	Cmcs۱۴

G یا T، A = D، T یا C، G = B، T یا C = Y

Sebastiani ;** و همکاران (۲۰۰۴)

Weising و Gardner (۱۹۹۹)

نتایج

PCR-RFLP

افراد جمعیت‌های مورد مطالعه نشان نداد. در حالی که در میان افراد درون جمعیت‌های مورد مطالعه منطقه اسالم و جمعیت نکا-۱۴۰۰، شاهد وجود پلی مورفیسم در لوکوس OA بودیم. بر اساس ترکیب آللهای مختلف، ۳ هاپلوتیپ در جمعیت‌های راش ایران شناسایی گردید. توزیع هاپلوتیپ-های مشاهده شده در هر جمعیت در جدول ۳ نشان داده شده است. توزیع جغرافیایی هاپلوتیپ‌های cpDNA در جمعیت‌های مطالعه شده نشان داد که فراوان‌ترین هاپلوتیپ، هاپلوتیپ A با فراوانی ۰/۷۹ است که به استثناء یک جمعیت (خیرود- ۶۰۰) در تمام دامنه

برای بررسی گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های راش ایران با استفاده از روش PCR-RFLP، دو قطعه از cpDNA به نامهای OA و DT تکثیر و تجزیه شدند. نتایج هضم مناطق تکثیر شده فوق با ۲ آنزیم اندونوکلیئاز محدود کننده (*HaeIII* برای لوکوس DT و *HinfI* در لوکوس OA) نشان داد که هر دو لوکوس OA و DT دارای پلی مورفیسم بوده و در هر لوکوس ۲ آلل مشاهده شد. تفاوت آللهای مشاهده شده در هر لوکوس ناشی از گوناگونی در طول آللهای است. لوکوس DT هیچ پلی مورفیسمی در میان

۱۴۰۰) مشاهده گردید. هاپلوتایپ C انحصار به جمعیت خیرود- ۶۰۰ دارد. بیشترین تمایز cpDNA در میان جمعیتها توزیع شده است ($Gst = 0.68$).

پراکنش راش در جنگل‌های هیرکانی وجود دارد. یک هاپلوتیپ نسبتاً نادر با فراوانی ۰/۱۰۲ (هاپلوتایپ B) در فرد یا افرادی از برخی جمعیت‌های غرب جنگل‌های هیرکانی (اسالم- ۶۰۰، اسالم- ۱۲۰۰ و اسالم- ۱۹۰۰) یا در یک جمعیت در مرکز جنگل‌های هیرکانی (نکا-

جدول ۳- برخی ویژگیهای مناطق مورد بررسی و فراوانی هاپلوتیپی مشاهده شده در مارکر کلروپلاستی (PCR-RFLP)

فراوانی هاپلوتایپ‌ها در هر جمعیت			تعداد نمونه	ارتفاع	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	منطقه
C	B	A					
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۲۰۰۰	۳۶°۴۵'	۵۴°۰۷'	گرگان
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۱۴۰۰	۳۶°۴۱'	۵۴°۰۵'	گرگان
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۶۰۰	۳۶°۴۲'	۵۴°۰۶'	گرگان
۰/۰	۰/۰	۰/۸	۵	۱۴۰۰	۳۶°۲۲'	۵۳°۳۳'	نکا
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۹۰۰	۳۶°۲۹'	۵۳°۲۷'	نکا
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۱۹۰۰	۳۶°۰۰'	۵۳°۱۲'	سنگده
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۱۴۰۰	۳۶°۰۳'	۵۳°۱۴'	سنگده
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۹۰۰	۳۶°۰۶'	۵۳°۱۶'	سنگده
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۲۰۰۰	۳۶°۳۲'	۵۱°۳۹'	خیرود
۰/۰	۰/۰	۱/۰	۵	۱۲۰۰	۳۶°۳۲'	۵۱°۳۹'	خیرود
۱/۰	۰/۰	۰/۰	۶	۶۰۰	۳۶°۳۵'	۵۱°۳۳'	خیرود
۰/۰	۰/۴	۰/۶	۵	۱۲۰۰	۳۷°۳۸'	۴۸°۴۸'	اسالم
۰/۰	۰/۴	۰/۶	۵	۶۰۰	۳۷°۴۱'	۴۸°۴۸'	اسالم
۰/۰	۰/۵	۰/۵	۶	۱۴۰۰	۳۶°۴۱'	۵۴°۰۵'	گرگان
۰/۰۸	۰/۱۰۲	۰/۷۹	۷۲				کل

SSR

هاپلوتیپ شماره ۳ که در مناطق مختلف (در ۲ جمعیت غربی و یک جمعیت مرکزی) مشاهده شدند، سایر هاپلوتیپ‌ها در مناطق مجزا دیده شدند. توزیع هاپلوتیپ‌ها تمایز قابل ملاحظه‌ای را با ساختار جغرافیایی مشخص ($Fst = 0.80$) نشان دادند. طبق آزمون واریانس ملکولی (AMOVA) ۵۲٪ از گوناگونی کل میکروساتلایتهای کلروپلاستی به اختلافات میان منطقه‌ای، ۲۸٪ به تفاوت‌های میان جمعیتی و ۲۰٪ به اختلافات درون جمعیتی تعلق دارد.

تعداد متغیرهای مشاهده شده (آلها) و گستره طولی آنها را در ۹ مارکر میکروساتلایت cpDNA در جدول ۴ نشان داده شده است. تعداد ۲ تا از ۹ میکروساتلایت (ccmp4 و ccmp7) به ترتیب با ۲ و ۶ آلل، پلی مورفسم نشان دادند. بر اساس ترکیبهای مختلف متغیرهای مشاهده شده در کل ۱۰ هاپلوتیپ شناسایی شدند. فراوانی هاپلوتیپی در جدول ۵ گزارش شده است. توزیع هاپلوتیپ‌های میکروساتلایتهای نشان داد که ۸ تا از ۱۳ جمعیت، گوناگونی درون جمعیتی دارند، درحالی که در ۵ جمعیت فقط یک نوع هاپلوتیپ مشاهده گردید. به استثناء

جدول ۴- برخی ویژگیهای ۹ میکروساتلایتی کلروپلاستی مطالعه شده

اندازه آللهای (bp)	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل مشاهده شده در	تعداد آلل مشاهده شده	اندازه آللهای (bp) در	پرایمر
در تنباکو	<i>Castanea sativa</i> در	<i>Quercus petraea</i>	مشاهده شده	<i>F.orientalis</i> ایران	
۱۲۶	-	-	۲	۱۲۰-۱۱۹	Ccmp4
۱۳۳	-	-	۶	۱۵۵-۱۵۰	Ccmp7
۱۰۳	-	-	۱	۱۲۰	Ccmp10
-	۱	۱	۱	۱۱۵	Cmcs1
-	۲	۱	۱	۱۳۸	Cmcs2
-	۲	۱	۱	۱۱۱	Cmcs4
-	۲	۲	۱	۱۸۸	Cmcs6
-	۱	۱	۱	۱۵۸	Cmcs8
-	۲	۱	۱	۱۸۰	Cmcs14

جدول ۵- برخی ویژگیهای مناطق مورد بررسی و فراوانی هاپلوتیپی مشاهده شده مارکر میکروساتلایت کلروپلاستی

منطقه	ارتفاع (متر)	عرض جغرافیایی (شمالی)	طول جغرافیایی (شرقی)	تعداد نمونه	هاپلوتیپ												
					۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰			
گرگان	۲۰۰۰	۳۶°۴۵'	۵۴°۰۷'	۸	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گرگان	۱۴۰۰	۳۶°۴۱'	۵۴°۰۵'	۱۴	۰	۰	۰	۰/۰۷	۰/۹۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
گرگان	۶۰۰	۳۶°۴۲'	۵۴°۰۶'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نکا	۱۴۰۰	۳۶°۲۲'	۵۳°۳۳'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۰/۲۹	۰/۷۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نکا	۹۰۰	۳۶°۲۹'	۵۳°۲۷'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سنگده	۱۹۰۰	۳۶°۰۰'	۵۳°۱۲'	۱۴	۰	۰	۰/۷۱	۰/۲۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سنگده	۱۴۰۰	۳۶°۰۳'	۵۳°۱۴'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۰/۲۱	۰/۷۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سنگده	۹۰۰	۳۶°۰۶'	۵۳°۱۶'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۰/۹۳	۰/۰۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
خیرود	۱۲۰۰	۳۶°۳۲'	۵۱°۳۹'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
خیرود	۶۰۰	۳۶°۳۵'	۵۱°۳۳'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۲۱	۰/۷۹	۰	۰
کلاردشت	۱۳۰۰	۳۶°۳۸'	۵۱°۴۶'	۱۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۱۴	۰/۸۶	۰	۰
اسالم	۱۲۰۰	۳۷°۳۸'	۴۸°۴۸'	۱۴	۰/۷۱	۰/۲۲	۰/۰۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
اسالم	۶۰۰	۳۷°۴۱'	۴۸°۴۸'	۱۴	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کل تعداد نمونه				۱۷۶	۱۰	۳	۲۵	۵	۷۷	۱۳	۱۲	۲	۳	۲۵			
فراوانی کل				۱	۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۴۴	۰/۰۷	۰/۰۷	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۱۴		

بحث

جمعیت منومورفیک بودند (توسط هاپلوتیپ A و C). هاپلوتیپ B که بیشتر در مناطق غربی مشاهده شد این مناطق را از مناطق باقیمانده جدا نمود. بیشترین تمایز cpDNA در میان جمعیتها توزیع شده بود ($Gst=0.67$).

توزیع هاپلوتیپهای PCR-RFLP نشان می‌دهد که فراوان ترین هاپلوتیپ (A) به استثناء یک جمعیت (خیرود-۶۰۰) در تمام جمعیتها وجود دارد و ۱۰ تا از ۱۴

این مشاهدات نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی راش شرقی در ایران دارای ساختار جغرافیایی می‌باشد.

توزیع هاپلوتیپ‌های میکروساتلایتی نشان می‌دهد که ۸ تا از ۱۳ جمعیت، گوناگونی درون جمعیتی دارند، در حالی که در ۵ جمعیت فقط یک نوع هاپلوتیپ مشاهده گردید. به استثناء هاپلوتیپ شماره ۳ که در مناطق مختلف (در ۲ جمعیت غربی و یک جمعیت مرکزی) مشاهده شدند، سایر هاپلوتیپ‌ها در مناطق مجزا دیده شدند. توزیع هاپلوتیپها تمایز قابل ملاحظه‌ای را با ساختار جغرافیایی مشخص ($F_{st} = 0.80$) نشان دادند.

وجود تعداد محدود هاپلوتیپ کلروپلاستی چنانچه در جمعیت‌های راش ایران مشاهده گردید (۱-۳ هاپلوتیپ) در مطالعات بسیاری نیز گزارش شده است (Marchelli *et al.*, 1998; Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997, Caron *et al.*, 2000; Mohanty *et al.*, 2001; Dutech *et al.*, 2000; Hamilton, 1999) هاپلوتیپ در جمعیت‌های غربی می‌تواند ناشی از قدمت بیشتر جمعیت‌های غربی جنگلهای خزری باشد که فرض می‌گردد جهت پراکنش آن از غرب به شرق است.

مارکرهای میکروساتلایتی در مقایسه با مارکرهای هسته‌ای، سطوح بالایی از تمایز ژنتیکی را میان جمعیتها نشان می‌دهند (Petit, 1999). میانگین تمایز ژنتیکی اندازه‌گیری شده (G_{st}) در ۹۷ گونه گیاهی ۷۰٪ و در گونه‌های درختان نهاندانه ۷۳٪ می‌باشد. گونه‌های متعلق به خانواده Fagaceae از جمله *Fagus sylvatica*، *Quercus robur* و *Q. petraea* به علت تولید بذر سنگین، تمایز ژنتیکی بالایی، بین ۸۳٪ تا ۹۰٪، نشان می‌دهند (Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997; Demesure *et al.*, 1996)

در این پژوهش نیز تنوع ژنتیکی بالایی (۸۰٪ برای مارکر SSR و ۶۹٪ برای مارکر PCR-RFLP) در میان جمعیت‌های ایران مشاهده گردید. طبق آزمون واریانس ملکولی (AMOVA) ۵۲٪ از گوناگونی کل میکروساتلایت‌های کلروپلاستی به اختلاف‌های میان منطقه

ای، ۲۸٪ به تفاوت‌های میان جمعیتی و ۲۰٪ به اختلاف‌های درون جمعیتی نسبت تعلق دارد. این وضعیت می‌تواند از آنجایی باشد که ژن‌های هسته‌ای از طریق دانه گرده و بذر، ولی ژن‌های کلروپلاستی فقط از طریق بذر منتقل می‌شود. وضعیت مشاهده شده ناشی از کارآیی خوب انتشار ژن‌های هسته‌ای از طریق گرده به وسیله باد و عدم انتشار ژن‌های کلروپلاستی از طریق بذرهای سنگین به فواصل دور است.

اگرچه تنوع هاپلوئیدی مشاهده شده توسط مارکر PCR-RFLP بسیار کمتر از SSR است، ولی هر دو مارکر غنای هاپلوئیدی بالایی در بخش غربی جنگلهای راش خزری نشان دادند. چنین توزیعی می‌تواند ناشی از اختلاف‌های محیطی به ویژه در میزان بارندگی، رطوبت هوا، نوع هوموس و سنگ مادر از شرق به غرب باشد (مروی مهاجر، ۱۳۵۵؛ پارسا پزوه، ۱۳۵۵؛ حبیبی، ۱۳۵۴). توضیح دیگر برای طرح توزیع هاپلوتایپ‌های cpDNA می‌تواند به تاریخچه مهاجرت راش در طول توزیع تاریخی راش در دوران سوم از اسالم (منطقه بسیار پلی‌مورفیک) به شرق جنگلهای هیرکانی نسبت داده شود. نتایج مطالعات در مورد تنوع ژنتیکی راش اروپائی نشان داده است که گوناگونی ژنتیکی با طول زمان رابطه مستقیمی دارد. چنانچه با مطالعات انجام شده در مورد تنوع cpDNA و ساختار جغرافیایی راش اروپایی *F. sylvatica* توزیع گسترده یک هاپلوتیپ cpDNA منفرد در شمال اروپا و چندین هاپلوتایپ در جنوب اروپا (پناهگاه‌های ایتالیا و فرانسه) تشخیص داده شده است (Demesure *et al.* 1996).

سپاسگزاری

پژوهش حاضر توسط مساعدتهای مالی انسیتو بین المللی منابع ژنتیک گیاهی (IPGRI) ممکن گردیده است. دکتر جوزپه جوانی و ندرامین، پروفیسور رافائلو جیانینی و خانم دکتر کریستینا وتوری (موسسه ژنتیک گیاهی، فلورانس، ایتالیا) که در اجرای این پژوهش نویسنده را یاری نمودند که به این وسیله از آنان قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Dutech, C. Maggia L. Joly H.I. 2000. Chloroplast diversity in *Vouacapoua Americana* (Caesalpiniaceae), a neotropical forest tree. *Molecular Ecology*, 9: 1427-1432.
- Excoffier, L. Smouse, P. Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variances among DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Fujii, N., Tomaru, N., Okuyama, K., Koike, T., Mikami, T., and Ueda, K., 2002. Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus Creneta* (Fagaceae) in Japan. *Plant Syst. Evol.*, 232(1-2): 21-33.
- Gömöry, D., Vyšný, J. and Paule, L. 1995. Genetic differentiation of populations in the transition zone between *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. In: Madsen, S. (Ed.) Genetic and Silviculture of Beech. Proceeding of the 5th Beech Symposium of the IUFRO Project Group P 1.10.00, 19-24 September 1994, Mogenstrup, Denmark. *Frskningsserien*. 11: 238-244.
- Grivet, G., Heinze, B., Vendramin, G. G. and Petit, R. J., 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1.
- Hamilton, M.B. 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. Deforestation affects the genetic structure of the surviving forest fragments. *Nature*, 401: 129-130.
- Marchelli, P., Gallo, L., Scholz, F. and Ziegenhagen, B. 1998. Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Distribution area. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 642-646.
- Mátyás, G. and Sperisen, C. 2001. Chloroplast DNA polymorphisms provide evidence for postglacial recolonisation of oaks (*Quercus* spp.) across the Swiss Alps. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 12-20.
- Mobayen, S. and Tregubov, V. 1969. The vegetative map of Iran. Publication of Tehran University. No. 14, 50 p.
- Mohanty, A. Martín J.P., Aguinagalde, I. 2001. A population genetic analysis of chloroplast DNA in wild populations of *Prunus avium* L. in Europe. *Heredity*, 87: 421-427.
- Paffetti, D., Vettori, C. and Giannini, R. 2001. Relict populations of *Quercus calliprinos* webb on Sardinia island identified by chloroplast DNA sequences. *Forest Genetics*, 8 (1): 1-11.
- Petit, R. J., 1999. Diversité Génétique et Historie des Populations d' Arbres Forestiers. Dossier d' habilitaion à diriger des recherches, Université de Paris- Sud, Université Formation de Recherche Scientifique d' Orsay, Paris. 223p.
- Petit, R. J., Kremer, A., and Wagner, D. B. 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 122-128.
- پارسا پژوه، د. ۱۳۵۵. تحقیق روی کمیت های فیزیکی چوب های راش ایران در مناطق مختلف رویشی. مجله منابع طبیعی ایران، ۳۴: ۲۱-۳۴.
- حبیبی، ح. ۱۳۵۴. مطالعه وضعیت عناصر (N, P, K, Ca) خاک جنگل های راش در ایران و بررسی نقش آنها روی رشد راش. مجله منابع طبیعی ایران، ۳۲: ۴۷-۶۲.
- مروی مهاجر، م. ۱۳۵۵. برخی ویژگی های کمی جنگل های راش ایران. مجله منابع طبیعی ایران، ۳۴: ۷۷-۹۷.
- Belahbib, N. Pemonge, N.H. Ouassou, A. Sbay, H. Kremer, A., Petit, R.J. 2001. Frequent cytoplasmic exchanges between oak species that are not closely related: *Quercus suber* and *Q. Ilex* in Morocco. *Molecular Ecology*, 10: 2003-2012.
- Birky, C. W., Fuerst, P., Maruyama, T. 1989. Orangelle gene diversity under migration, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to unclar gens. *Genetics*, 121: 631-627.
- Caron, H. Dumas, S. and Marque, G. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology*, 9: 1089-1098.
- Demesure, B., Comps, B. and Petit, R. J. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the European beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50(6): 2515-2520.
- Demesure, B., Sodzi, B. N. and Petit, R. J., 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4: 129-131.
- Dumolin-Lapègue, S., Demesure, B., Fineschi, S. Lecorre, V. and Petit, R. J. 1997. Phylogenetic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics*, 146: 1475-1487.

- Populus tremula* L. (Salicacea) estimated using chloroplast PCR-RFLP and microsatellite markers. *Forest Genetics*. 8 (1): 81-87
- Schneider, S. Roessli, D. Excoffier L. 2000. Arlequin, Version 2000: A Software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Sebastiani, F., Carnevale, S., Vendramin, G.G. 2004. A new set of mono- and di-nucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. *Molecular Ecology Notes*, 4: 259-261.
- Weising, K., Gardner, R.C. 1999. a set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, 42: 9-19.
- Pons, O. and Petit, R.J., 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. 1. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 462-470.
- Pons, O., and Petit, R. J., 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144: 1237-1245.
- Salehi Shanjani, P., Vettori, C. Giannini, R. and R.A. Khavari-Nejad 2004. Intraspecific variation and geographic patterns of *Fagus orientalis* Lipsky chloroplast DNA. *Journal of Silvae Genetica*, 53: 193-197.
- Salvini, D., Anzidei, M., Fineschi, S., Malvoti, M. E., Turchini, D. and Vendramin, G. G. 2001. Low genetic differentiation among Italian populations of

Comparison of PCR-RFLP and SSR chloroplast markers in study of genetic structure of beech (*Fagus orientalis*) populations in Hyrcanian forests

P. Salehi Shanjani¹

1 - Member of Scientific board, Research Institute of Forests and Rangelands, P. O. BOX 13185-116, Tehran, Iran.
e-mail: psalehi@rifr-ac.ir

Abstract

Chloroplast (cp) DNA polymorphism was analyzed in 14 populations of beech (*Fagus orientalis* Lipsky) by PCR-RFLP and microsatellite (SSR) chloroplast markers. Two cpDNA inter genic regions DT and OA were amplified and treated with *Hae*III and *Hinf*I, respectively. The restriction fragments of the region DT did not show polymorphism among individuals within any population analyzed. However, among individuals within the analyzed populations of Asalem region and Neka-1400 population, polymorphism in the restriction fragments of the OA region was found. Three haplotypes, which could be phylogenetically ordered, were detected in this survey encompassing most of the natural range of the species. The high level of genetic differentiation ($G_{st}=69\%$) together with the highly structured geographic variation contrast with low level of nuclear genetic differentiation measured in previous studies with isozymes and indicate a low level of gene flow by seeds. Among nine analyzed microsatellites, two showed polymorphism. Two and six different length variants at *ccmp4* and *ccmp7* loci were found, respectively, which combined into 10 different haplotypes. The distribution of haplotypes showed a very strong differentiation among populations ($F_{st}=80\%$) and clear geographic structure. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 52, 28 and 20% of the total cpSSR variation was attributable to differences among regions, among populations within regions and within populations, respectively. Clear evidence has been obtained that geographical distance is a major factor of population differentiation in the beech. This long-range pattern of variation was partially expected, given the huge natural range of beech and the existence of a gradient of variation in ecological factors. The high haplotype richness in the western populations, which found by the both markers in this investigation, is in accordance with this hypothesis that the beech forests of the Hyrcanian regions distributed from West to East.

Keywords: AMOVA, Beech, cpDNA, *Fagus orientalis* Lipsky, Hyrcanian zone, Microsatellite, PCR-RFLP.