بررسی گوناگونی ژنتیکی جمعیتهای راش در ایران (***Fagus orientalis* Lipsky**) به وسیله تجزیه و تحلیل داده‌های DNA کلروپلاستی

پروین صالحی شانجانی[۱]

چکیده

گونه راش *Fagus orientalis* Lipsky یکی از فراوانترین و از نظر اقتصادی مهمترین درختان شمال ایران است. گوناگونی ژنتیکی راش در ۱٤ توده جنگلی در طول گستره پراکنش این گونه در منطقه هیرکانی به وسیله مطالعات آنزیمی، cpDNA و مورفولوژیکی بررسی گردید.

پلی مورفیسم DNA کلروپلاستی در همان جمعیتهای راش ایران توسط آزمون PCR-RFLP بررسی گردید. دو منطقه ژنی cpDNA: OA و DT تکثیر و به وسیله آندونوکلئازهای محدود کننده *Hae*III و *Hinf*I هضم شدند و قطعات حاصل توسط الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید جداسازی گردیدند. برای شناسایی هاپلوتایپ‌های ایرانی، نیمرخ هضم شده دو منطقه DT و OA به طور همزمان با قطعات ناشی از هضم DNA شاهد هاپلوتایپ از قبل شناخته شده مقایسه گردید. قطعات محدود کننده منطقه DT هیچ پلی‌مورفیسمی در میان افراد جمعیتهای مورد مطالعه نشان ندادند. در حالی که در میان افراد درون جمعیتهای مورد مطالعه منطقه اسالم و جمعیت نکا- ۱٤۰۰، شاهد وجود پلی‌مورفیسم در قطعات محدود کننده منطقه OA بودیم. در مجموع سه هاپلوتایپ کلروپلاستی متفاوت شماره گذاری شدند. توزیع هاپلوتایپ‌های cpDNA نشان دهنده ساختار جغرافیایی در تمایز ژنتیکی با Gst=٪٦۸/۷ و Nst= ٪۷۰/۳ بود.

واژه‌های کلیدی: *Fagus orientalis* Lipsky، منطقه هیرکانی، گوناگونی ژنتیکی، cpDNA

---

[۱] - بخش جنگل مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، ایران، تهران، صندوق پستی ۱۳۱۸۵-۱۱٦

Psalehi@rifr-ac.ir

مقدمه

DNA کلروپلاست (cpDNA) به شدت محافظت شده بوده و دارای میزان جهش کمتری از توالیهای DNA در ژنوم هسته‌ای گیاه است (Wolfe و همکاران، ۱۹۸۷). به رغم طبیعت محافظت شوندگی تکامل cpDNA، گوناگونی در طول و جایگاه آندونوکلئوزهای محدود کننده درون بسیاری از گونه‌ها شناسایی شده است.

گوناگونی درون گونه‌ای cpDNA مطالعه فرایندهای جمعیتی مانند جریان ژن، انتشار بذرها در فواصل طولانی، و تنوع ژنتیکی جمعیتها را بدست می‌دهد و فرصتی نیز برای تعیین چگونگی و نقش متغیرهای cpDNA در اختلافهای قابلیت انطباق[1] را نیز فراهم می‌نماید. این فرایندها به طور مستقیم روی تفسیر تکامل cpDNA به منظور مطالعات فیلوژنتیکی اثر می‌گذارند (Soltis و همکاران، ۱۹۹۲a).

با توسعه روشهای مولکولی، امکان بررسی گوناگونی جغرافیایی با استفاده از نشانگرهای ملکولی و شناخت ساختارهای فیلوجغرافیایی درون گونه‌ای بوجود آمده است (Avise و همکاران ۱۹۸۷). فیلوجغرافیایی درون گونه‌ای که توسط Avise و همکاران (۱۹۸۷) به عنوان مطالعه روابط بین فیلوژنی آللها و توزیع جغرافیایی‌شان تعریف شده در علم تکامل کاربردهای بسیاری پیدا کرده است (Dumolin-Lapègue و همکاران، ۱۹۹۷).

مطالعات متعددی در مورد گوناگونی جغرافیایی در خانواده *Fagecea* با استفاده از نشانگرهای ملکولی cpDNA انجام شده است (Tarbelet و همکاران، ۱۹۹۸؛ Dumolin-Lapègue و همکاران، ۱۹۹۷، ۱۹۹۸؛ Whittemore و Schaal، ۱۹۹۱).

Demeasure و همکاران (۱۹۹۶) به وسیله مطالعه جایگاههای آنزیمهای محدود کننده قطعات DNA تکثیر شده با PCR، پلی‌مورفسیم را در ژنوم کلروپلاست راش اروپایی (*F. sylvatica*) بررسی نمود. آنها در میان ۳۹۹ درخت از ۸۵ جمعیت که در

---

[1] 1- Fitness

سطح گسترشگاه طبیعی این گونه پراکنده بودند ۱۱ هاپلوتایپ یافتند که از نظر فیلوژنتیکی قابل بررسی بودند. براساس نتایج آنها جمعیتهای منتهی‌الیه شمالی (در اروپا) از نظر ژنتیکی همگن بودند که می‌تواند نشان دهندهٔ 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 نوعی 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، ۱۹۹۹؛ Paffetti و همکاران، ۲۰۰۱) وجود دارد.

Geburek و همکاران (نتایج انتشار نیافته) بررسی ۳۷۰ جمعیت اروپایی (با استفاده از روش PCR-RFLP) سطوح بالایی از تمایز ژنتیکی را میان جمعیتهای راش اروپایی گزارش نمودند. آنها دو گروه اصلی هاپلوتیپ: اولی منشاء گرفته از پناهگاههای ایتالیایی و دومی از پناهگاههای بالکان را شناسایی کردند. هاپلوتیپ‌های پیدا شده در شبه جزیره بالکان و ترکیه به علت وجود گونه راش شرقی یا دورگهای بین *F. orientalis/F. sylvatica* بسیار متفاوت بودند. نتایج آنها با مطالعات قبلی تنوع cpDNA به وسیله Demesure و همکاران (۱۹۹٦) مطابقت دارد.

بررسی توزیع جغرافیایی گوناگونی cpDNA در ژنتیک جمعیتها بسیار جالب‌تر از مطالعه پلی‌مورفسیم هسته‌ای است. در نشانگرهایی که دارای وراثت مادری هستند همان گونه که به صورت نظریه به وسیله Birky و همکاران (۱۹۸۹) پیش‌بینی شده نسبت بسیار بالایی از تنوع در میان جمعیتها توزیع شده است. دلیل چنین توزیعی می‌تواند ناشی از نحوهٔ انتقال و جریان ژنها باشد، به طوری که ژنی که به وسیله گامت

نر منتقل می‌گردد ممکن است دوبار یعنی از طریق گرده و بعد از طریق بذر، انتشار یابد، در حالی که ژنی که به وسیله گامت ماده انتقال می‌یابد ممکن است فقط با بذر انتشار یابد (Petit و همکاران، a۱۹۹۳). سطوح بالای تمایز cpDNA در راش اروپایی (Gst=٪۸۳) برعکس وضعیت تمایز در ژنهای هسته‌ای (ایزوزیم‌ها) است که ٪Gst=۵/٤ است. اگر فرض کنیم که cpDNA در راش مشابه با سایر گونه‌های خانواده ***Fagaceae*** مانند بلوط *Quercus robur* (Dumolin-Lapègue و همکاران، ۱۹۹۵) دارای توارث مادری است، تفاوت در سطوح تمایز دو ژنوم احتمالاً ناشی از سطوح بسیار بالاتر جریان گرده در مقایسه با انتشار بذر است (Petit و همکاران، a۱۹۹۳ و McCauley، ۱۹۹٤).

در یک دید کلی تشریح ساختار جغرافیایی درختان جنگلی از آنجایی مهم است که گونه‌های درختی بسیاری دارای گسترۀ جغرافیایی وسیعی بوده و توان بالایی برای انشعاب جغرافیایی دارند. به علاوه، شناخت ساختار ژنتیکی آنها روی مدیریت اصلاح درختان و برنامه‌های حفاظت راش اثر می‌گذارد (Demesure و همکاران، ۱۹۹٦).

مواد و روشها

نمونه‌های گیاهی با نمونه‌برداری از ۱٤ جمعیت طبیعی راش صورت گرفت که بخش وسیعی از گسترۀ پراکنش راش (*Fagus orientalis* Lipsky) را در شمال ایران زیر پوشش قرار داد. جنگلهای راش ایران روی شیب شمالی رشته کوه البرز در محدوده ارتفاعی ۵۰۰–۲۱۰۰ متر از سطح دریا واقع هستند. آنها نواری جنگلی به طول ۷۰۰ کیلومتر را در سه استان گیلان، مازندران و گلستان تشکیل می‌دهند.

به این منظور پنج نقطه در طول گسترشگاه راش از غرب به شرق (اسالم در استان گیلان، خیرود، سنگده و نکا در استان مازندران و گرگان در استان گلستان) جنگلهای هیرکانی انتخاب شده و در هر نقطه سه پایگاه (ارتفاعهای پایین، میان و بالابند، به

استثنای منطقه نکا که به علت نامساعد بودن وضعیت آب و هوایی فقط دو قطعه نمونه در نظر گرفته شد) مستقر گردید. اختصارهای بکار برده شده در متن برای نام و ارتفاع جمعیتهای مورد مطالعه عبارتند از: گ–۲۰۰۰، گ–۱۴۰۰ و گ–۶۰۰ (برای منطقه گرگان ارتفاعهای ۲۰۰۰، ۱۴۰۰ و ۶۰۰)، ن–۱۴۰۰ و ن–۹۰۰ (برای منطقه نکا ارتفاعهای ۱۴۰۰ و ۹۰۰)، س–۱۹۰۰، س–۱۴۰۰ و س–۹۰۰ (برای منطقه سنگده ارتفاعهای ۱۹۰۰، ۱۴۰۰ و ۹۰۰)، خ–۲۰۰۰، خ–۱۲۰۰ و خ–۶۰۰ (برای منطقه خیرود ارتفاعهای ۲۰۰۰، ۱۲۰۰ و ۶۰۰)، الف–۱۹۰۰، الف–۱۲۰۰ و الف–۶۰۰ (برای منطقه اسالم ارتفاعهای ۱۹۰۰، ۱۲۰۰ و ۶۰۰).

جوانه‌های خواب درختان راش از ۱۴ جمعیت طبیعی راشهای (۵–۶ درخت غیر مجاور) فوق جمع‌آوری شدند و به وسیله نشانگرهای کلروپلاستی و از روش PCR-RFLP مورد آزمون قرار گرفتند. DNA از جوانه‌های خواب (۱۰۰ میلی‌گرم به عنوان ماده اولیه) با استفاده از کیت (Germany, Macherey Negel Nucleospin plant) جداسازی گردید.

عصاره‌ها (یک میکرولیتر به ازای هر چاهک) به وسیله دستگاه الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ (W/V) با نیروی برق ۱۰ ولت در سانتیمتر به مدت یک ساعت و بافر TEA X ۵۰ حاوی ۰/۵ $mgml^{-1}$ (W/V) اتیدیوم‌برماید کنترل شده و ژلها پس از عکس‌برداری با یک اسکنر UVP تجزیه شدند (شکل شماره ۱).

دو قطعه ژنی trnD-trnT و orf184- petA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کلروپلاستی DT (Demesure و همکاران، ۱۹۹۵) و OA (Grivet و همکاران، ۲۰۰۱) (جدول شماره ۱) و از طریق PCR تکثیر شدند. ژلها پس از عکس‌برداری با یک اسکنر UVP تجزیه شدند (شکل شماره ۲).

فرآورده‌های تکثیر DT و OA (۱۵μ L حاوی DNA ۱ mg) به ترتیب با ۵ واحد آنزیم محدود کننده *Hae* III و *Hinf* I، در حجم نهایی ۲۰μ L در ۳۷^{o} C به مدت ۴

ساعت تیمار شدند. محصول نهایی به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل‌آمید غیر تقلیبی تعیین ترادف ۸٪ (W/V) تجزیه شدند.

ژلها پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم‌برماید عکس‌برداری شده و با اسکنر ژل UVP بررسی شدند. از یک DNA شاهد (لدر ۱۰۰ bp) به عنوان نشانگر اندازه استفاده شد (مثال: شکلهای شماره ٤-٥).

پلی‌مورفیسم ناشی از جهش نقطه‌ای و حذف و اضافه می‌باشد. قطعات پلی‌مورفیک براساس کاهش طول قطعه در ژل پلی‌اکریل‌آمید نام‌گذاری شده بودند. هاپلوتایپ‌ها براساس ترکیبهای مختلف قطعات پلی‌مورفیک شناسایی شده تعیین شدند.

روشهای آماری: گوناگونی در هر دو قطعات DT و OA مورد بررسی به عنوان جهشهای نقطه‌ای یا حذف و اضافه بازها نسبت داده می‌شود. ترکیب این متغیرها در هر دو لوکوس تعیین کننده یک هاپلوتایپ است.

عوامل تنوع ژنتیکی (hs و ht) و تمایز ژنتیکی (Gst و Nst) در ژنوم کلروپلاست از روشهای Pons و Petit (۱۹۹۵ و ۱۹۹٦) با استفاده از نرم‌افزار HAPLODIV برآورد گردید. تنوع ژنتیکی درون جمعیتها به وسیله فرمول زیر محاسبه می‌گردد: $hs=1-\sum_{i=1}^{n}P_i^2$، که P، فراوانی نسبی هاپلوتایپ دو لوکوسه درون یک جمعیت است. تنوع جمعیت کل از طریق میانگین حسابی کل هاپلوتیپ‌های دو لوکوسه محاسبه می‌گردد. برای برآورد تمایز ژنتیکی Gstc Nei (۱۹۷۷) که به وسیله Pons و Petit (۱۹۹۵) اصلاح شده از فرمول زیر استفاده شد که hs برآورد تنوع درون جمعیتها و ht برآورد تنوع جمعیت کل است: $Gstc = ۱- hs/ht$. بر خلاف Gstc که فقط براساس فراوانی هاپلوتایپ‌ها محاسبه می‌شود، Nst شباهت ژنتیکی بین هاپلوتایپ‌ها را نیز بررسی می‌کند. این دو عامل از طریق U -test مقایسه شدند. میزان شرکت یک جمعیت در تنوع کل (C_t) نیز توسط نرم‌افزار مذکور محاسبه و مقایسه شد (Petit و همکاران،

۱۹۹۷). نسبت جریان گرده (Pollen Flow) به جریان بذر (Seed Flow) با استفاده از معادله Ennos (۱۹۹٤) محاسبه شد.

$$\frac{\text{pollen flow}}{\text{seed flow}}=\frac{\left(\frac{1}{Gstb}-1\right)-2\left(\frac{1}{Gstc}-1\right)}{\left(\frac{1}{Gstc}-1\right)}$$

نتایج

برای بررسی گوناگونی ژنتیکی جمعیتهای راش ایران با استفاده از روش PCR-RFLP، دو قطعه از cpDNA به نامهای DT و OA تکثیر و تجزیه شدند.

مناطق DT و OA از cpDNA قبلاً در جمعیتهای ایتالیایی *Fagus sylvatica* تکثیر و تعیین توالی شده بودند. اندازه مناطق DT و OA به ترتیب از ۱٦٦۱ تا ۱٦٦٤ جفت باز و از ۲۸۸۹ تا ۲۸۹۳ جفت باز متغیر بود. تجزیه توالی مناطق فوق نشان دادند که ۱- منطقه DT شامل بخشی از ژن trnD (tRNA-Asp)، ژن trnY (tRNA-Tyr)، ژن trnE (tRNA-Glu) و بخشی از ژن trnT (tRNA-Thr)، ۲- منطقه OA شامل بخشی از ژن orf ۱۸٤، ژن orf ۲۲۹ و بخشی از ژن Pet A است. دو جایگاه محدود کننده *Hae*III و ۱۲ جایگاه محدود کننده *Hinf*I به ترتیب در مناطق DT و OA شناسایی شده است (جدول شماره ۲). براساس توالیهای *F. sylvatica* قطعات مورد انتظار پس از هضم مناطق DT و OA شامل ۱) ۳ قطعه برای DT (۲۰، ٤۹٦-٤۹۹ و ۱۱٤٥ جفت باز) و ۲) ۱۳ قطعه برای OA (۸٤۰، ٤٦۲-٤٦٦، ۳۰۳، ۲۷٥، ۲۳۲، ۲۲۸، ۱۸۱، ۱٦٦، ۸۱، ٥۳، ٤۲، ۲۱ و ٥ جفت باز) است. قطعات پلی‌مورفیک DT و OA به ترتیب ٤۹٦-٤۹۹ جفت باز و ٤٦۲-٤٦٦ جفت باز دارند. دو میکروسانلایت [DT-CDR1: تکرارهای تک نوکلئوتیدی A (۱۲/۹)؛ و DT-CDR2: تکرارهای تک نوکلئوتیدی A (۷)] در قطعه

پلی‌مورفیک DT (از ٤٩٦ تا ٤٩٩ جفت باز) و سه میکروساتلایت [OA-CDR1: تکرارهای تک نوکلئوتیدی T (١٠/٩)؛ OA-CDR2: تکرار تک نوکلئوتیدی T (٨/٩)؛ و OA-CDR3: تکرار تک نوکلئوتیدی T (١٢/٩)] در قطعه پلی‌مورفیک OA (از ٤٦٢ تا ٤٦٦ جفت باز) پیدا شدند. توالی مناطق DT و OA در راش با همان مناطق در *Nicotiana tabacum* به ترتیب ٩٠٪ و ٨٠٪ شباهت نشان دادند (شکل شماره ٣). هیچ اختلافی در اندازهٔ فرآورده‌های تکثیر شدهٔ DT و OA در میان جمعیتهای راش ایرانی توسط الکتروفورز روی ژل آگارز مشاهده نشد (شکل شماره ٢).

برای شناسایی هاپلوتایپ‌های ایرانی، نیمرخ هضم شده دو منطقه DT و OA به طور همزمان با قطعات ناشی از هضم DNA شاهد هاپلوتایپ از قبل شناخته شده (به لطف پرفسور IMGPF-CNR, Giannini، ایتالیا، در اختیار قرار گرفت) مقایسه گردید. قطعات محدود کننده منطقه DT هیچ پلی‌مورفیسمی در میان افراد جمعیتهای مورد مطالعه نشان ندادند. در حالی که در میان افراد درون جمعیتهای مورد مطالعه منطقه اسالم و جمعیت نکا- ١٤٠٠، شاهد وجود پلی‌مورفیسم در قطعات محدود کننده منطقه OA بودیم. با مقایسه همزمان نیمرخ‌های هضم شده مناطق DT و OA با قطعات هضم شده DNA شاهد هاپلوتایپ‌های از قبل شناخته شده، امکان تعیین متغیرهای DT و OA جمعیتهای راش ایران بدست آمد (مثال: شکلهای شماره ٤ و ٥). در منطقه DT به استثناء درختان جمعیت خیرود- ٦٠٠ که قطعه پلی‌مورفیکی به طول ٤٩٨ جفت باز داشتند درختان سایر جمعیتهای مورد مطالعه دارای قطعه پلی‌مورفیک مشابه ٤٩٦ جفت بازی بودند. طول قطعه پلی‌مورفیک در منطقه OA در یکی از درختان جمعیت نکا- ١٤٠٠ و نیمی از درختان جمعیتهای منطقه اسالم ٤٦٣ جفت باز و در باقی درختان جمعیتهای مورد مطالعه ٤٦٢ جفت باز بود. به عبارت دیگر پس از تجزیه با آنزیم‌های محدود کننده، دو متغیر در هر یک از مناطق DT و OA یافت شدند که با هم به

صورت ۳ هاپلوتایپ cpDNA ترکیب شدند (جدولهای شماره ۳ و ٤). توزیع هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در هر جمعیت در جدول شماره ۵ نشان داده شده است.

بخش عمده هاپلوتایپ‌ها در یک مورد جهش با هم اختلاف داشتند. توزیع جغرافیایی هاپلوتایپ‌های cpDNA در جمعیتهای مطالعه شده در شکل شماره ٦ نشان داده شده است. فراوانترین هاپلوتایپ، هاپلوتایپ ۲ با فراوانی ۰/۷۹ است که به استثناء یک جمعیت (خیرود- ٦۰۰) در تمام دامنه پراکنش راش در جنگلهای هیرکانی وجود دارد. یک هاپلوتایپ نسبتاً نادر با فراوانی ۰/۱۰۲ (هاپلوتایپ ۳) در فرد یا افرادی از برخی جمعیتهای غرب جنگلهای هیرکانی (اسالم- ٦۰۰، اسالم- ۱۲۰۰ و اسالم- ۱۹۰۰) یا در یک جمعیت در مرکز جنگل‌های هیرکانی (نکا- ۱٤۰۰) مشاهده گردید. هاپلوتایپ ۱٤ ویژه به جمعیت خیرود- ٦۰۰ دارد و بیشترین تمایز cpDNA در میان جمعیتها توزیع شده است (Gst = ٦۸/۷٪). میزان Nst (۷۰/۳٪) مشابه با Gst (٦۸/۷٪) است که نشان دهندهٔ همترازی فیلوژنتیکی هاپلوتایپ‌ها است. تنوع ژنتیکی کل (ht) ۰/۳٦٤ بود که میزان شرکت جمعیتهای خیرود- ٦۰۰، اسالم- ۱۹۰۰، اسالم- ۱۲۰۰ و Asalem- ٦۰۰ در تنوع کل به ترتیب ۰/۲۹، ۰/۰۲٦، ۰/۰۲٦، ۰/۰۲۷ است.

نتایج بدست آمده از کاربرد فرمول Ennos (نسبت جریان گرده به بذر) نشان می‌دهد که جریان گرده میان جمعیتها ٤٤ بار بزرگتر از جریان بذر است.

بحث

در گونه راش شرقی *F. orientalis* جنگلهای هیرکانی ۳ هاپلوتایپ cpDNA تشخیص داده شد. توزیع هاپلوتایپ‌های PCR-RFLP نشا می‌دهد که: ۱) فراوانترین هاپلوتایپ (شماره ۲) به استثناء یک جمعیت در تمام جمعیت وجود دارد، ۲) ۱۰ تا از ٤ جمعیت منومورفیک هستند (توسط هاپلوتایپ ۲ و ۱٤). این مشاهدات نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی راش شرقی در ایران دارای ساختار جغرافیایی می‌باشد.

مطالعات بسیاری، ساختار جغرافیایی برای گوناگونی cpDNA در سطح زیر گونه‌ای گزارش نموده‌اند (Mayer و همکاران، ۱۹۹۴؛ Sewell و همکاران، ۱۹۹۶؛ Dumolin-Lapégue و همکاران، ۱۹۹۷؛ Soltis و همکاران، ۱۹۸۹؛ Van Dijk و Bokx-Schatman، ۱۹۹۷؛ Wolf و همکاران، ۱۹۹۷؛ King و Ferris، ۱۹۹۸؛ Tremblay و Schoen، ۱۹۹۰؛ Abbott و همکاران، ۲۰۰۰). به علاوه گوناگونی cpDNA درون گونه‌ای در میان گونه‌های راش شامل ***Fagus sylvatica*** (Demesure و همکاران، ۱۹۹۶)، ***F. crenata*** (Fujii و همکاران، ۲۰۰۲) گزارش شده است. نتایج بیشتر این مطالعات پیشنهاد می‌کند که وقایع تاریخی کلیدی (مانند وقایع یخبندان) ساختار جغرافیایی گوناگونی cpDNA را شکل داده‌اند.

در پژوهش حاضر، هاپلوتایپ ۲ به استثناء جمعیت خیرود-۶۰۰ در تمام جمعیتها توزیع پیدا کرده بود و هاپلوتایپ ۳ که بیشتر در مناطق غربی مشاهده شد این مناطق را از مناطق باقیمانده جدا نمود. 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 پژوه، ۱۳۵۵؛ حبیبی، ۱۳۶۴). توضیحی 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. زیرا نتایج مطالعات درباره تنوع ژنتیکی راش اروپایی نشان داده است که گوناگونی ژنتیکی با طول زمان رابطه مستقیمی دارد. چنانچه Demesure و همکاران (۱۹۹۶) تنوع cpDNA و ساختار جغرافیایی راش اروپایی ***F. sylvatica*** را بررسی کردند. آنها توزیع گسترده یک هاپلوتیپ cpDNA منفرد را در شمال اروپا و چندین هاپلوتایپ را در جنوب اروپا (پناهگاههای ایتالیا و فرانسه) تشخیص دادند.

جمعیت راش خیرود-٦۰۰ که از نظر نوع هاپلوتایپ cpDNA از سایر جمعیتهای راش ایران متمایز بود دارای سطوح بالایی از گوناگونی آلوزیمی نیز بود که اساساً به علت فراوانی آللهای نادر، است.

سطح تمایز ژنتیکی کلروپلاستی در گونه‌های اروپایی خانواده *Fagaceae* بسیار بالا است: *F. sylvatica* = ۰/۹۰۲ (Demesure و همکاران، ۱۹۹٦)، *Quercus petraea* = ۰/۸۲۹، *Q. pubescens* = ۰/۹۰۷ و *Q. robur* = ۰/۷۸۲ (Dumolin-Lapégue و همکاران، ۱۹۹۷). در راش ایرانی برخلاف تنوع و تمایز محاسبه شده به وسیله نشانگرهای ژنی ایزوآنزیمی که دارای ساختار مشخصی نیست ولی در سطح تمایز ژنتیکی کلروپلاستی، ساختار جغرافیایی تقریباً نسبتاً متمایزی (Gst = ٦۸/۷٪) مشاهده می‌شود که 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 بذرها سنگین به فواصل دور است.

بررسی گوناگونی cpDNA درون گونه‌ای ثابت کرده است که عمدهٔ گوناگونی در میان جمعیتها قرار دارد و سطوح گوناگونی درون جمعیتی بسیار پایین است (Soltis و همکاران، ۱۹۸۹، ۱۹۹۱؛ Kim و همکاران، ۱۹۹۲؛ Petit و همکاران، b۱۹۹۳). در مطالعه‌ای مقایسه‌ای تمایز ژنتیکی کلروپلاستی برای ۹۷ گونه = ۰/۷ اندازه‌گیری شد که این برآورد برای گونه‌های درختی نهاندانه = ۰/۷۳ بود. گونه‌های خانواده *Fagacea* که بذرها سنگین تولید می‌کند مانند *F. sylvatica*، *Quercus robur* و *Q. petraea* دارای تمایز ژنتیکی کلروپلاستی بین ۰/۸۳-۰/۹۰ هستند (Demesure و همکاران، ۱۹۹٦؛ Dumolin-Lapégue و همکاران، ۱۹۹۷). در حالی که در *Populus termula* L. نشانگرهای کلروپلاستی تمایز ژنتیکی بسیار پایینی را در میان جمعیتها نشان دادند (Gst=۰/۲۲-۰/۷) که حدود ٤-۱۰ بار کمتر از میانگین Gst برآورد شده در گونه‌های

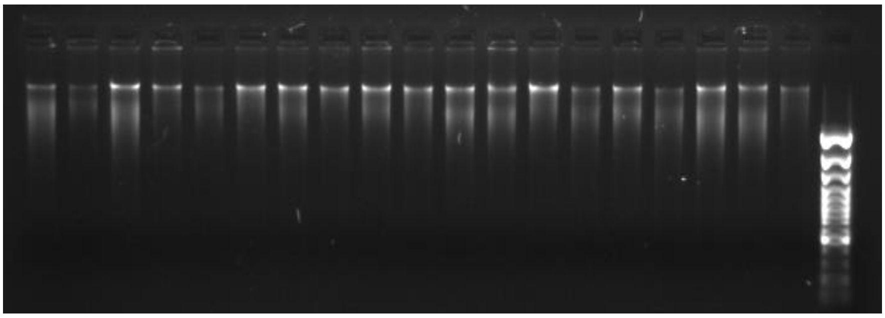
جنگلی پهن برگ برای نشانگرهایی با وراثت مادری است. این موضوع اساساً می‌تواند به کارآیی بالایی انتشار بذرها *P. tremula* به وسیله باد به فواصل دور و در نتیجه عدم ساختار جغرافیایی محسوس در تنوع ژنتیکی نسبت داده شود (Salvini و همکاران ٢٠٠١).

نسبت شارش یا جریان گرده به بذر برای راش ایرانی ٤٤ است. این میزان قابل مقایسه با سایر گونه‌های باد گرده‌افشان خانواده *Fagaceae* (*Quercus robur* = ٢٨٦، *Q. petraea* = ٥٠٠ و *F. sylvatica* = ٨٤، Petit، ١٩٩٩) و مغایر با شاه بلوط Castanea sativa= ١، Fineschi و همکاران، ٢٠٠٠) است که حشرات در گرده‌افشانی شرکت می‌کنند و انسان نقش مؤثری در انتقال میوه‌ها و قلمه‌ها به نقاط مختلف دارد. به عبارت دیگر، نسبت شارش یا جریان گرده به بذر در مواردی که گرده‌افشانی با حشرات انجام می‌شود یا مکانیسمهای مؤثری برای انتشار بذر وجود دارد پایین است (Fineschi و همکاران، ٢٠٠٠).

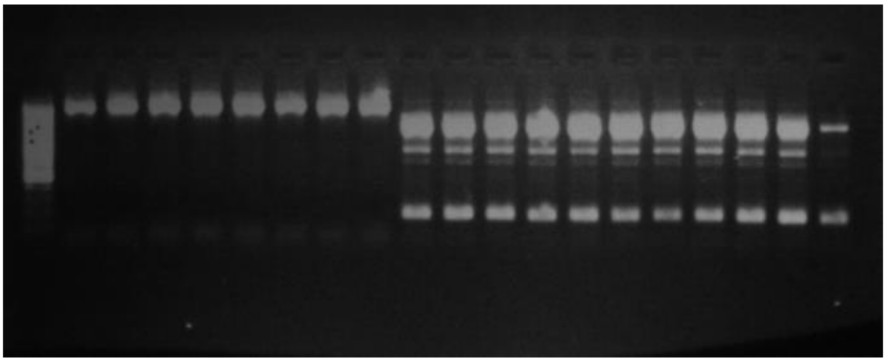
براساس مطالعات حاضر می‌بایست اهمیت خاصی به جمعیتهای خیرود- ٦٠٠ و اسالم برای حفاظت سریع آنها در برابر عوامل موجود داد.

سپاسگزاری

به این وسیله از پروفسور رافائلو جیانینی رئیس و خانم دکتر کریستینا وتوری عضو هیأت علمی مؤسسه ژنتیک گیاهی، فلورانس، ایتالیا که در اجرای این پژوهش مرا یاری نمودند قدردانی می‌شود.



شکل شماره ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز **DNA** استخراج شده (به همراه نشانگر **bp** ۱۰۰، اولین ستون از سمت راست) روی ژل آگارز.



شکل شماره ۲- 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.

جدول شماره ۱– جزییات پرایمرها و آنزیمهای محدود کننده

آنزیم محدود کننده	کد	جفت پرایمر ها و توالی	عملکرد	ژن
*Hae*III	DT	ACCAATTGAACTACAATCCC CTACCACTGAGTTAAAAGGG	tRNA-Asp tRNA-Tyr tRNA-Glu tRNA-Thr	*Trn*D *Trn*Y *trn*E *trn*T
*Hinf*I	OA	TGGCGATCAGAACATATATGGATAG CCCTCGGAAACAAGAAGTT	Hypothetical protein ORF184 Hypothetical protein ORF226 Cytochrome f	*orf*184 *orf*226 *pet*A

جدول شماره ۲– اندونوکئازهای محدود کنندهٔ مورد استفاده در *Nicotina tabacum* و *Fagus orientalis / F. sylvatica* و تعداد جایگاههای محدود کنندهٔ در قطعات DT و OA

آنزیم محدود کننده	توالی تشخیص آنزیم	***N. tabacum***	***F. orientalis / F. sylvatica***
Hae III	5` GG/CC 3`	٣	٢
Hinf I	5` G/ANTC 3`	١٥	١٣

N = A، C، T، یا G

جدول شماره ۳– اندازه قطعات تکثیر شده DT و OA، تعداد و نوع متغیرهای مشاهده شده

کد پرایمر	اندازه تقریبی فرآورده PCR(bp)	تعداد کل باندهای RFLP (١)	اندازهٔ باندهای پلی‌مورفیک (bp)	تعداد کل متغیرها (٢)	کد هر متغیر	نوع جهش هر متغیر
DT	١٦٦١–١٦٦٤	٣	٤٩٦–٤٩٨	٢	١ و ٤	حذف / اضافه
OA	٢٨٧٥–٢٨٧٦	١٤	٤٦٢–٤٦٣	٢	٣ و ٤	حذف و اضافه

(١) نشان دهندهٔ تعداد کل باندهای مورد انتظار بعد از هضم هر قطعه تکثیر شده

(٢) نشان دهندهٔ تعداد متغیرهای مشاهده شده در قطعات DT و OA

DT:

ACCAATTGAACTACAATCCCAGGGAAATACGGGATCTAGCAGAAAATTTGATTCTTTTTTATCTCCGGAT
CGGGTATTTCTGAAGTACGAAGGGGGTTATATCATCTCATGGCGGATTGGCGAATTTTTGGGCCGAGCTGG
ATTTGAACCAGCGTAGACATATTGCCAACGAATTTACAGTCCGTCCCCATTAACCGCTCGGGCATCGACCC
AAGAAGAATCAATTTTAGACTTATTGGTAATCCATGATCAACTTCCTTTCGTAGTACCCTACCCCCAGGGG
AATTCGAATCCCCGCTGCCTCCTTGAAAGAGAGATGTCCTAAACCACTAGACGATGGGGGCCTGCTTGACC
AACCGCCATCATACTATGATCATAGTATGATCAGTTTTTTGAAATTGTCAATATAATCGAATGATTCTATCC
GAGGGATCTTTCCCCCTTTCAGAATTGCATAGAATTTTTTTATTCGTCATTGATGAATTATTCATTAGAATC
GCCATTAGAAATCTAGTAGTAGTATTTTTTTTTTTTTTGGAATTATTTCAATTGAATTTCTTTCGATTATTTTA
GTTTAGATTATTTAGTATTTAGAATTTTCTTTTTTTATTATAAATAAAAAAAAAAATTAATAAATACAAAAAA
TAGAAATAATAAGGAAGAGTAGGATTTTTGCAGGGAATGATTGGTCCGTCAGAAAAGGAAAAAGGTGTGA
AATTCTATTTCTTTCACTTTCATTTGATTCATTGTTAAGACGAGATATCCTTATCTCCCTCCCACCAAGACAG
GAAATTAACAAACGAGAAATCTAGTAAGCGGGATCAAGAAGAAAATTCTTTTTTCTCCAAGAATTTAGTTC
AGGAGACAAGTAGAATCTCTTCATTCCATGATTCGATGAAATATCTTGAATTTTATGTTGAATTGCTAGGT
GTATGTACATGTATCAATCAAGTGAATTTTGTTCTGGTGGGATCAATTCAATAAAAGAAAAAAAGCAATTC
GAGTCGGTCTTGAAACAATTCATTGCATTTTCTCCTAGACTTCCTAGGTAAATCCATTTTATTATTCAACAA
TGAGCCACTAGACACTATGTATCTACTGCATGTACTTATGCATATATACTTATGTTTATAATATATGTACCT
ATAGATATTTTATCCACATAGTGAATAATTCCGGAATTAAATCAAAAAGG**CCCTTTTAACTCAGTGGTAG**

OA:

TGGCGATCAGAACATATATGGATAGAACTTATAACGGGGTCTCGAAAAATAAGTAATTTCTGCTGGGCC
TTTATCCTTTTTTTAGGTTCATTAGGCTTCTTATTAGTTGGAACTTCCAGTTATCTTGGTAGAAATTTGATAT
CTTTTTTTCCGCCTCAGCAAATCATTTTTTTTCCACAAGGACTCGTGATGTCTTTCTACGGAATTGCGGGTCT
CTTTATTAGCTCTTATTTGTGGTGCACAATTTCCTGGAATGTAGGTAGTGGTTATGATCGATTCGATAGAAA
GGAAGGAATAGTCTGTATTTTTCGTTGGGGATTTCCGGGAAAAAATCGTCGCATATTCCTCCGATTCCTTAT
AAAAGATATTCAGTCCGTTAGAATAGAAGTTAAAGAGGGTATTTCTGCTCGTCGTGTTCTTTATATGGACA
TCCGAGGCCAGGGGTCCATTCCCTTGACTCGTACTGATGAGAATTTGACTCCACGAGAAATTGAACAAAAG
GCTGCTGAATTAGCCTATTTCTTGCGTGTACCAATTGAAGTATTTTGAGAAATTGAGATATCAGTATCAGG
AAACAATATTCTGAATTTCTTCATTCGAAGTGAATTCTTAGCTTTTTTCTGGATTCTTTCTAGATTCAAAGA
CTAACCACAAAATCACAAAGAAAATAGATTCATTAGTCCGATACCTTGTATAAAACTCATGTGTGTAAGAA
ATATTCGATCGCATAGAGTGTACGAATGGGTTGATTAACAATTCACAGATGAAAAAATGGCAAAAAAGAA
AGCATTCACTCCTCTTTTCTATCTTGCATCTATAGTATTTTTGCCCTGGTGGATTTCTTTCTCAGTTAATAAA
TGTCTGGAATCTTGGGTTACCAATTGGTGGAATACTGGGCAATCCGAAATTTTTTTGAATAATATTCAAGA
AAAGAGTCTTCTAGAAAAATTCATAGAATTAGAGGAACTCCTCTTCTTGGACGAAATGATCAAGGAATACT
CGGAAACACATCTCGAAGAGTTTGGGATAGGAATCCATAAAGAAACGATCCAATTAATCAAGATACAAAA
TGAGAATCGTATCCATACGATTTTGCACTTCTCGACAAATATCATCTGTTTTATTATTCTAAGCGGGTATTC
AATTTTGGGTAATGAAAAACTTGTTATTCTTAACTCTTGGGCTCAGGAATTCCTATATAACTTAAGTGACAC
AGTAAAAGCTTTTTCTATTCTTTTATTAACTGATTTATGTATCGGATTCCATTCACCCCACGGTTGGGAATT
AATGATTGGCTCTATCTATAAAGATTTTGGATTTGTTCATAATGATCAAATCATATCTGGTCTTGTTTCCAC
CTTTCCAGTCATTCTCGATACAATTTTTAAATATTGGATTTTCCGTTATTTAAATCGTCTGTCTCCGTCACTT
GTAGTTATTTATCATTCAATGAATGACTGATAAAGGATCCATTGATATTAATCTAATCCAATTAGAATGCTT
GGTACTTTGTAGTTGTACATAAGCAAAGTATTGAAAATCATATTTACTCTTTCTATTTCTAACCATCGGGGA
GATTCATCCTATATTATTCCTAGATTATTCCAGCAAATAGCAGAATCGTGGCTAGGGAACTATACTAGCGA
CCTACCCAATTTATTGTAGAAATTTTCGCGATCAATGATTGGACCATGCAAACTAGAAATGCTTTTTCTTGG
CTAAAGAAACAGATTACTCGATCTATTTCCGTATCGCTCATGATATATATCTTAACTCGGACATCCATTTCA
AGTGCATATCCCATTTTTGCACAGCAGGGTTATGAAAATCCACGAGAAGCGACTGGGCGTATTGTATGTGC
CAATTGCCATTTAGCTAATAAGCCCGTGGAGATTGAGGTTCCACAAGCGGTACTTCCTGATACTGTATTTG
AAGCAGTTGTTCGAATTCCTTATGATATGCAACTGAAACAGGTTCTTGCTAATGGTAAAAGGGGGGGGTTG
AACGTGGGGGCTGTTCTTATTTTACCGGAGGGGTTTGAATTAGCTCCTCCCGATCGTATTTCTCCCGAGATG
AAAGAAAAGATTGGCAATTTGTCTTTTCAGAGCTATCGCCCCAATAAAAAAAATATTCTTGTGATAGGCCC
TGTCCCTGGTCAAAAATATAGTGAAATAACCTTCCCTATTCTTTCCCCGGACCCTGCTACTAAGAAGGATG
TTCACTTCTTAAAATATCCTATATACGTAGGCGGGAACAGGGGAAGGGGTCAGATTTATCCCGACGGCAGC
AAGAGTAACAATACTGTTTATAATGCTACAGCAGCAGGTATAGTAAGCAAAATCATACGAAAAGAAAAGG
GTGGGTATGAGATAACCATAACGGATGCGTCGGATGGACGTCAAGTGGTTGATATTATCCCTCCCGGACCA
GA**ACTTCTTGTTTCCGAGGG**

شکل شماره ۳- توالی قطعات DT و OA همراه موقعیت توالیهای تشخیص آنزیمهای محدود کنندهٔ *Hae*III و *Hinf*I در cpDNA گیاه تنباکو *Nicotina tabacum*

جدول شماره ٤- جزییات در مورد اندازه نمونه‌برداری، موقعیت، تعداد افراد در هر هاپلوتایپ و فراوانی هاپلوتایپ‌ها در جمعیتهای مطالعه شده *Fagus orientalis* ایران.

محل	گوناگونی		هاپلوتایپ‌های PCR-RFLP			اندازه نمونه‌برداری	فراوانی هاپلوتایپ‌ها در هر جمعیت		
	DT	OA	۲*	۳**	٤***		۲	۳	١٤
گ- ۲۰۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
گ- ١٤۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
گ- ٦۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
ن- ١٤۰۰	۱	۳ و ٤	٤	۱	۰	۵	۰/۸	/۰/۰	۰/۰
ن- ۹۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
س- ۱۹۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
س- ١٤۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
س- ۹۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
خ- ۲۰۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
خ- ۱۲۰۰	۱	۳	۵	۰	۰	۵	۱/۰	۰/۰	۰/۰
خ- ٦۰۰	٤	۳	۰	۰	٦	٦	۰/۰	۰/۰	۱/۰
الف- ۱۹۰۰	۱	۳ و ٤	۳	۲	۰	۵	۰/٦	۰/٤	۰/۰
الف- ۱۲۰۰	۱	۳ و ٤	۳	۲	۰	۵	۰/٦	۰/٤	۰/۰
الف- ٦۰۰	۱	۳ و ٤	۳	۳	۰	٦	۰/۵	۰/۵	۰/۰
کل		۵۸		۸	٦	۷۲	۰/۷۹	۰/۱۰۲	۰/۰۸

*، فراوانترین هاپلوتایپ در شمال اروپا و شمال ایتالیا + ۲ جمعیت در بلغارستان (اطلاعات شفاهی دریافت شده از Giannini، ۲۰۰۲).

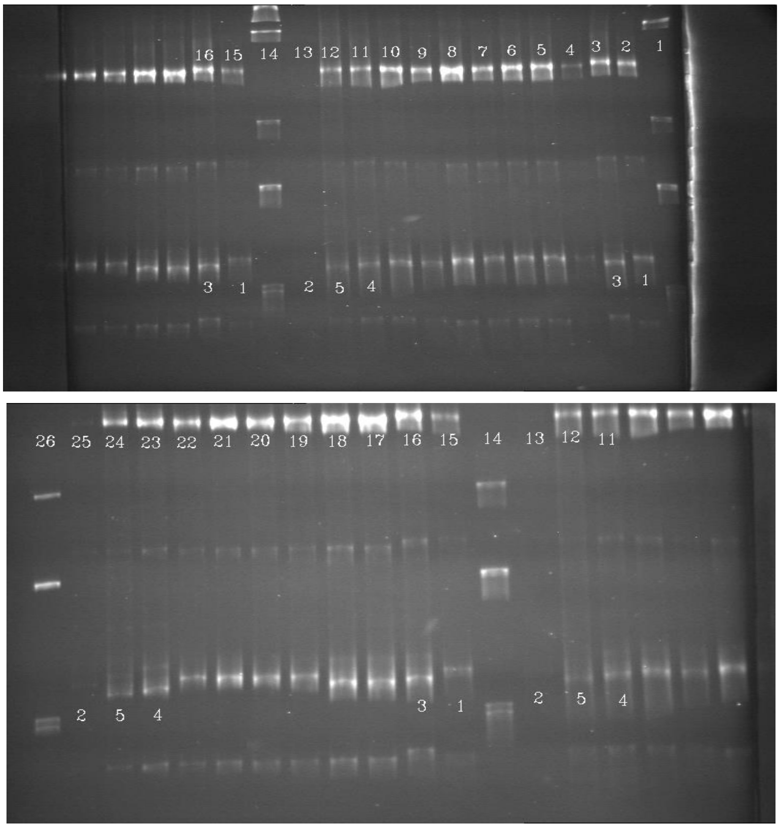
**، فراوانترین هاپلوتایپ در شمال اروپا و شمال ایتالیا + ۲ فرد یک جمعیت در بلغارستان (اطلاعات شفاهی دریافت شده از Giannini، ۲۰۰۲).

***، یک جمعیت در ایران.

جدول شماره ۵- توالیهای نوکلئوتیدی‌هاپلوتایپ‌ها فقط میکروساتلایت‌های پلی‌مورفیک مناطق پلی‌مورفیک **DT** و **OA** گزارش شده‌اند

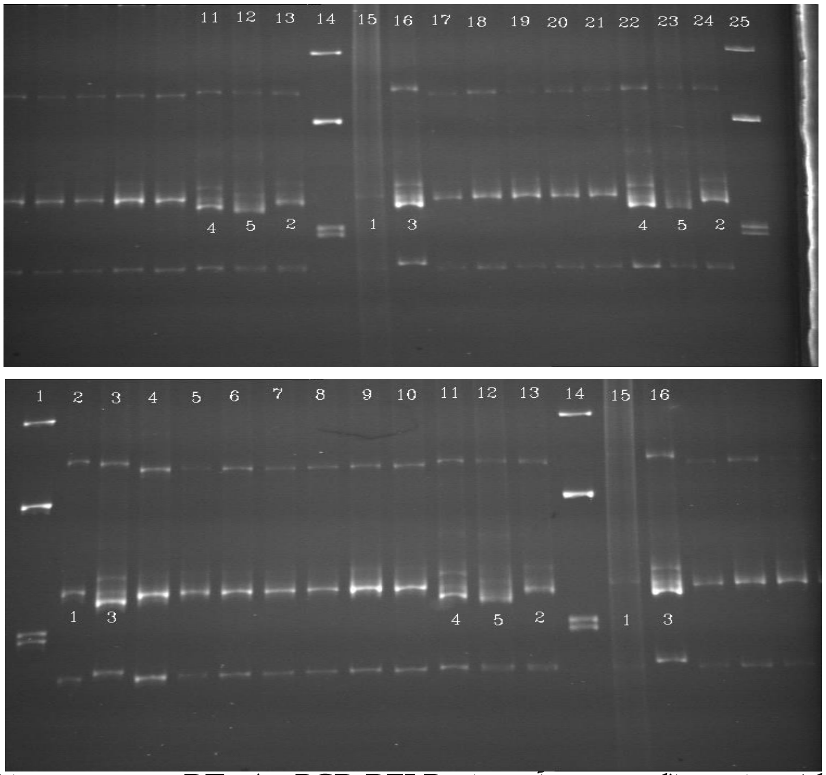
هاپلوتایپ	منطقه **DT**	منطقه **OA**		
	DT-CDR 1	OA-CDR1	OA-CDR2	OA-CDR3
2	(231) CAATGAAAAAAAAAA---GAG (1660)	(936) TTATCTTTTTTTTT-GTT	(96) GTCATTTTTTTT-GATCA	(59) ATAGTTTTTTTTT---CAAA (2889)
3	(231) CAATGAAAAAAAAAA---GAG (1660)	(936) TTATCTTTTTTTTT-GTT	(96) GTCATTTTTTTTTGATCA	(59) ATAGTTTTTTTTT---CAAA (2890)
14	(231) CAATGAAAAAAAAAAAA-GAG (1664)	(936) TTATCTTTTTTTTT-GTT	(96) GTCATTTTTTTT-GATCA	(59) ATAGTTTTTTTTT---CAAA (2889)

اعداد درون پرانتز نشان دهندهٔ شمارهٔ توالیها در محل میکروساتلایت‌ها هستند.


16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
3 1 2 5 4 3 1
26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11
2 5 4 3 1 2 5 4

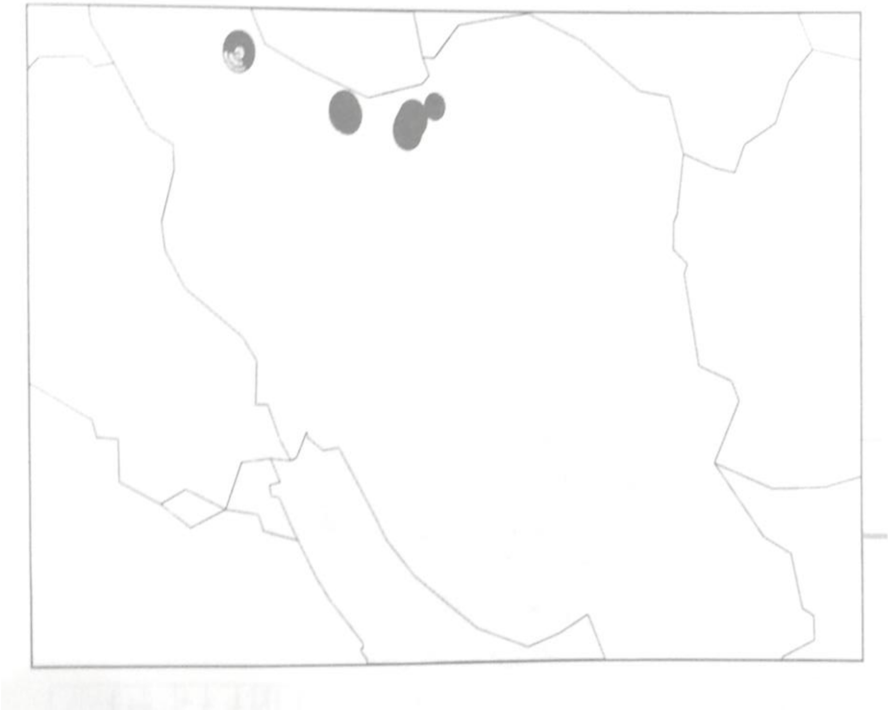
شکل شماره ٤– الکتروفورز فرآورده‌های PCR-RFLP منطقه DT در برخی نمونه‌ها از جمعیتهای ذکر شده در جدول (کد نمونه استاندارد و محل و نام درخت). دو تصویر متعلق به دو بخش یک ژل می‌باشد.

شماره	نمونه
۱	نشانگر ۱۰۰ bp
۲	نمونه استاندارد ۱
۳	نمونه استاندارد ۳
٤	س–۱۹۰۰: ۲
٥	س–۱۹۰۰: ٤
٦	س– ۱۹۰۰: ٥
۷	س– ۱۹۰۰: ٦
۸	س– ۱۹۰۰: ۱۰
۹	ج– ٦۰۰: ۱
۱۰	خ– ٦۰۰: ٦
۱۱	نمونه استاندارد: ٤
۱۲	نمونه استاندارد: ٥
۱۳	نمونه استاندارد: ۲
۱٤	نشانگر، 1kbp
۱٥	نمونه استاندارد: ۱
۱٦	نمونه استاندارد: ۳
۱۷	ج– ٦۰۰: ۱۱
۱۸	خ– ٦۰۰: ۱۲
۱۹	س– ۱٤۰۰: ٥
۲۰	س–۱٤۰۰: ۷
۲۱	س– ۱٤۰۰: ۲
۲۲	گ– ۲۰۰۰: ۱
۲۳	نمونه استاندارد: ٤
۲٤	نمونه استاندارد: ٥
۲٥	نمونه استاندارد: ۲
۲٦	نشانگر ۱۰۰ bp


11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
4 5 2 1 3 4 5 2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
1 3 4 5 2 1 3

شکل شماره ٥- الکتروفورز فرآوردههای **PCR-RFLP** منطقه **DT** در برخی نمونهها از جمعیتهای ذکر شده در جدول (کد نمونه استاندارد و محل و نام درخت). دو تصویر متعلق به دو بخش یک ژل میباشد.

شماره	نمونه
۱	نشانگر ۱۰۰ bp
۲	نمونه استاندارد: ۱
۳	نمونه استاندارد: ۳
٤	س– ۹۰۰: ۳
٥	گ– ۲۰۰۰: ۱۳
٦	گ– ۱٤۰۰: ۲
۷	گ– ٦۰۰: ۱
۸	ن– ۹۰۰: ٦
۹	ن– ۹۰۰: ۷
۱۰	خ– ۲۰۰۰: ٥
۱۱	نمونه استاندارد: ٤
۱۲	نمونه استاندارد: ٥
۱۳	نمونه استاندارد: ۲
۱٤	نشانگر، 1kbp
۱٥	نمونه استاندارد: ۱
۱٦	نمونه استاندارد: ۳
۱۷	خ– ۱۲۰۰: ۳
۱۸	الف– ۱۹۰۰: ٤
۱۹	الف– ۱۹۰۰: ۱۳
۲۰	الف– ٦۰۰: ٤
۲۱	الف– ٦۰۰: ٥
۲۲	نمونه استاندارد: ٤
۲۳	نمونه استاندارد: ٥
۲٤	نمونه استاندارد: ۲
۲٥	نشانگر ۱۰۰ bp



شکل شماره ٦- توزیع جغرافیایی هاپلوتایپ‌های مشاهده شده در جمعیتهای مورد مطالعه ایران (هاپلوتایپ ۲: رنگ طوسی تیره، هاپلوتایپ ۳: رنگ طوسی روشن و هاپلوتایپ ١٤: رنگ سیاه).

منابع مورد استفاده

۱- پارسا پژوه، د. ۱۳۵۵. تحقیق روی کمیتهای فیزیکی چوبهای راش ایران در مناطق مختلف رویشی. مجله منابع طبیعی ایران. ۳٤: ۲۱-.۳٤

۲- حبیبی، ح. ۱۳۵٤. مطالعه وضعیت عناصر (N, P, K, Ca) خاک جنگلهای راش در ایران و بررسی نقش آنها روی رشد راش. مجله منابع طبیعی ایران. ۳۲: ٤۷-٦۲

۳- حبیبی، ح. ۱۳٦٤. مطالعه خاک جنگلهای راش در ایران و بررسی نقش آن بر توسعه انواع مختلف راش. مجله منابع طبیعی ایران. ۳۹: ٦-.۱۸

٤- صالحی شانجانی، پ. ۱۳۸۱. تنوع ژنتیکی راش شرقی و ارتباط آن با برخی ویژگیهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی راش در راشستانهای ایران. رساله دکتری دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران، ایران. ۲۲۰ صفحه

۵- مروی مهاجر، م. ۱۳۵۵. برخی ویژگیهای کمی جنگلهای راش ایران. مجله منابع طبیعی ایران. ۳٤: ۷۷-۹۷.

6- Abbott, R. J., Smith, L. C., Milne, R. I., Crawford, R. M. M., Wolff, K. and Balfour, J., 2000. Molecular analysis of plant migration and refugia in the arctic. Science, 286: 1343 - 1346.

7- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermigham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. and Sauners, N. C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 489 - 522.

8- Birky, C. W., P. Fuerst and T. Maruyama. 1989. Orangelle gene diversity under migration, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to unclear gens. Genetics, 121: 631 - 627.

9- 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.

10- 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.

11- Dumolin–Lapégue S., Demesure, B. and Petit, R. J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in peduncolate oak investigated with an efficient PCR method. Theor. Appl. Genet. 91: 1253 - 1256.

12- Dumolin–Lapégue S., Demesure, B., Lecorre, V., Fineschi, S. and Petit, R. J., 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. Genetics, 146: 1475 - 1487.

13- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M. H. and Petit, R. J., 1998. Association between chloroplast and mitochondrial lineage in oaks. Biol. Evol., 15: 1321 - 1331.

14- Ennos, R. A., 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations Heredity, 80: 548 - 593.

15- Farris, M. A. and Mitton, J. L. 1984. Population density out-crossing rate and heterozygote superiority in ponerosa pine. Evolution. 38: 1151 - 1154.

16- Fineschi, S. Taurchini, F., Villani, F., and Vendramin, G. G., 2000. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in Castanea sativa Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. Molecular Ecology, 9: 1495 - 1503.

17- 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.

18- 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.

19- Kim, K. J., Jansen, R. K. and Turner, B. L. 1992. Evolutionary implications of intraspecific chloroplast DNA variation in Dwarf Dandelions (Krigia, Asteracea). American Journal of Botany, 79: 708 - 715.

20- King, R. A. and Fwrris, C., 1998. Chloroplast phylogeography of Alnus glutinosa (L.) Gaetn. Molecular Ecology, 7: 1151 - 1161.

21- Mayer, M. S., Soltis, P. S., Soltis, D. E., 1994. The evolution of the Streptanyhus glandulosus complex (Cruciferae): genetic divergence and gene flow in serpentine endemics. Amer. J. Bot., 81: 1288 - 1299.

22- McCauley, D.E. 1994. Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of silene alba: Implications for studies of gens flow in plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91: 8127 - 8131.

23- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Ann. Hum. Genet.41: 225 - 233.

24- Paffetti, D., Vettori, C. and Giannini, R. 2001. Relict populations of Quercus calliprinos webb on Sardinia islan identified by chloroplast DNA.

25- Petit, R. J., A. Kremer, and D. B. Wagner., 1993a. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. Heredity 71: 630 - 641.

26- Petit, R., Kremer, A., and Wagner, D. B., 1993b. Geographic structure of chloroplasy DNA polymorphisms in European oaks. Theoretical and Appled Genetics 87: 122 - 128.

27- Petit, R. J., E1 Mousadik A. and Pons, O., 1997. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conserv. Biol. 12: 844 - 855.

28- 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.

29- 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.

30- Pons, O., and petit, R. J., 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. Genetics, 144: 1237 - 1245.

31- Salvini, D., Anzidei, M., Fineschi, S., Malvoti, M. E., Taurchini, D. and Vendramin, G. G. 2001. Low genetic differentiation among Italian populations of Populus tremula L. (Salicacea) estimated using chloroplast PCR-RFLP and microsatellite markers. Forest Genetics. 8 (1): 81 - 87

32- Sewell, M. M., Parks C. R., Chase, M. W., 1996. Interaspecific chloroplast DNA variation and biogeography of North American Liriodendron L. (Magnoliaceae). Evolution, 50: 1147 - 1154.

33- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Ranker, T. A. and Ness, B. D., 1989. Chloroplast DNA variation in a wild plant, Tolmiea menzii. Genetics, 121: 819 - 826.

34- Soltis, D. E., Mayer, M. S., Soltis, P. S. and Edgerton, M., 1991. Chloroplast DNA variation in Tellima grandiflora (Saxifragaceae). American Journal of Botany 78: 1379 - 1390.

35- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Kuzoff, R. K. and Trucker, T. L. 1992a. Geographic structuring of chloroplast DNA genotypes in Tiarella trifoliate (Saxifragacea). Plant systematics and Evolution, 181: 203 - 216.

36- Soltis, D. E., Soltis, P. S. and Milligon, B. G., 1992b. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: Soltis, P. S., Soltis, D. E. and Doyle, J. J. (Eds) Molecular systematics of plants. Chapman and Hall, New York. 529 p.

37- Tarbelet, P., Fumagalli, L, Wust-Saucy, A.-G. and Cosson, J.-F., 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Mol. Eco., 7: 453 - 464.

38- Tremblay, N. O. and Schoen, D. J., 1990. Molecular phylogeography of Dryas integrifolia: glacical refugia and postglacial recolonization. Molec. Ecol., 8: 1187 - 1198.

39- Van Dijk, P. and Bakx- Schotman T., 1997. Choroplast DNA phylogeography and cytotype geography in autopolyploid Plantago media. Molec. Ecol., 6:345 - 352.

40- Whittemore, A. T. and Schaal, B. A., 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. Proc. Natl. Acad. Sci., 88: 2540 - 2544.

41- Wolf, P. G. Murray, R. A. and Sipes, S. D., 1997. Species- independent, geographical structuring of chloroplast DNA haplotypes in a montane herb Ipomopsis (Polemoniaceae). Molec. Ecol., 6: 283 - 291.

42- Wolfe, K. H., Li, W. H. and Sharp, P. M., 1987. Rates of Nucleotide substituation vary greatly among plant mitochondrial, chloroplat and Nuclear DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 9054 - 9058.