

بررسی نشانگر کلروپلاستی *trnL-F* در تعیین تمایز دو گونه صنوبر: سفیدپلت و سپیدار

اباصلت حسین زاده کلاگر^{۱،۲*}، آرمان محمودی اطاقوری^۳، مریم بادبر^{۳،۱}

^۱ بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

^۲ بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه پژوهشی نانو و بیوتکنولوژی

^۳ بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۱

چکیده

هدف این تحقیق بررسی قدرت نشانگر کلروپلاستی *trnL-F* در تمایز ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی سپیدار (*Populus alba*) و سفیدپلت (*Populus caspica*) است. تعداد ۱۵ نمونه برگ از هفت رویشگاه مختلف جنگلهای هیرکانی ایران، استانهای گیلان و مازندران، جمع‌آوری شدند. DNA ژنومی از برگها با استفاده از روش ترکیبی CTAB و SDS-پتاسیم استات استخراج گردید. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای جهانی انجام شد و قطعات *trnL-F* تکثیر شده توالی‌یابی گردید. نتایج نشان دادند که طول منطقه *trnL-F* تقریباً برای جمعیت‌های هر دو گونه در حدود ۳۹۲-۳۹۴ نوکلئوتید است. در مقایسه با توالیهای موجود در بانک ژنی، تعداد نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین در سفیدپلت و سپیدار بیشتر از دیگر نوکلئوتیدها است. ترکیب نوکلئوتیدی این دو گونه بسیار مشابه با حداقل فاصله ژنتیکی از یکدیگر (= ۰/۰۰۵) می‌باشد. آنالیز پارسیمونی از ۵۸۲ جایگاه نوکلئوتیدی، ۱۷۸ جایگاه محافظت‌شده، ۱۹۷ جایگاه متغیر، ۱۵۱ جایگاه پارسیمون و ۴۶ جایگاه انحصاری را نشان داد. رسم درخت فیلوژنی براساس نشانگر *trnL-F* نیز نشان داد که توالی این نشانگر نمی‌تواند تمایز بین پایه‌های دو گونه سپیدار و سفیدپلت ایجاد کند چرا که نمونه‌های بررسی‌شده در یک گروه مشترک قرار گرفتند. از نتایج این تحقیق می‌توان استنتاج نمود که نشانگر کلروپلاستی *trnL-F* نتوانست دو گونه سپیدار و سفیدپلت را از یکدیگر متمایز نماید. بنابراین برای شناخت دقیق این گونه‌ها، بازسازی فیلوژنی با استفاده از سایر نشانگرهای کلروپلاستی و یا هسته‌ای پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سفیدپلت، سپیدار، نشانگر مولکولی *trnL-F*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۰۱۱۳۵۳۰۲۴۵۲، پست الکترونیکی: ahcolagar@umz.ac.ir

مقدمه

فعالتهای اقتصادی و احیایی مستلزم شناخت گونه‌های موجود از این جنس در هر اکوسیستم طبیعی است. دوره‌ای شدن فراوان و تنوع ریختی بالا سبب ایجاد اختلاف نظر در تشخیص صحیح گونه‌های جنس صنوبر در دنیا شده است. برخی محققین ۲۹ گونه از این جنس در شش بخش (*Abaso*, *Aigeiros*, *Leucoides*, *Populus*)، این در *Tacamahaca*, *Turanga*) گزارش نمودند (۱۸)، این در

خانواده بید (*Salicaceae*) از دو جنس صنوبر (*Populus L.*) با ۳۰-۴۰ گونه و بید (*Salix L.*) با ۳۵۰-۴۵۰ گونه تشکیل شده است (۸). اهمیت صنوبرها به دلیل اینکه یک مدل مناسب و پیشگام و دارای پتانسیل بالا (ژنوم کوچک، توان بالای شکل‌پذیری، تولید مثل غیرجنسی، رشد سریع) جهت انجام تحقیقات زیستی برای درختان جنگلی هستند مورد توجه دانشمندان می‌باشند (۲۴، ۴۲ و ۴۵). بدیهی است که به کارگیری صنوبرها در

باعث ایجاد اختلافات مورفولوژیک و فنولوژیک در اغلب گونه‌ها می‌گردد. بنابراین اختلاف مورفولوژیک صرفاً نمی‌تواند منشاء ژنتیکی داشته باشد (۴) از این رو استفاده از روش‌های مولکولی و یا بیوشیمیایی اگرچه با افزایش هزینه همراه است ولیکن با توجه به دقت بالا در تمایز گونه‌ها از یکدیگر، امروزه کاربرد فراوانی در تاکسونومی گیاهی دارد.

از سیستماتیک مولکولی به طور گسترده در شناسایی گونه‌های گیاهی به ویژه برای جنسهایی که دورگه‌گیری در بین گونه‌های مختلف آن رایج و شباهت ریختی زیاد است، به کار گرفته شده است برای مثال Keim و همکاران (۱۹۸۹) از مارکر مولکولی RFLP برای بررسی و آنالیز فرآیند دخول در یک منطقه هیبریدی موجود در بین صنوبرهای *P. James* و *P. fremontii* Watson و *angustifolia* استفاده کردند (۲۸) و همچنین بر روی این دو گونه صنوبر، Woolbright و همکاران (۲۰۰۸) به منظور تهیه یک نقشه ژنی جهت بررسی‌های اکولوژیکی و مقایسه ژنوم آنها به عنوان یک مدل مناسب برای سایر درختان جنگلی مطالعاتی را بر اساس AFLP و SSR انجام دادند (۴۵). Alba و همکاران (۲۰۰۰) به منظور بررسی تنوع ایزوزایم در *P. alba* از ۱۸ لوکوس ایزوزایم بهره گرفتند (۸) و همچنین تلاش‌های Douhovinkoff و Dodd (۲۰۰۳) به منظور تعیین هویت و تشخیص آستانه شباهت در کلونهای بید *Salix exigua* Nutt با استفاده از نشانگر مولکولی AFLP با موفقیت انجام شد (۱۵). استفاده از DNA بارکدینگ یک مفهوم نسبتاً جدید با هدف دستیابی سریع و دقیق برای شناسایی گونه‌ها با به کارگیری منطقه استاندارد از DNA به عنوان یک علامت می‌باشد (۳۵). جهت بررسی روابط فیلوژنی استفاده از تکنیک DNA بارکدینگ، روز به روز در حال افزایش است و چند سالی است که مورد توجه قرار گرفته است (۲۳ و ۳۳). همان‌طور که Chase و همکاران در سال ۲۰۰۵ اشاره کرده‌اند دو دسته از کاربران از DNA بارکدینگ بهره می‌برند که شامل تاکسونومیستها و دانشمندان در زمینه‌های دیگر

حالی است که برخی دیگر از محققین حدود ۴۰ گونه از این جنس در دنیا گزارش نمودند (۵، ۸ و ۱۲).

صنوبرها معمولاً درختانی نورپسند و نم‌پسند بوده که در زمینهای آبدوست حاشیه رودخانه‌ها و در مناطقی با خاک آبرفتی مرطوب رشد می‌کنند (۵). صنوبرها به خوبی در نیمکره شمالی زمین (در جنوب، مرکز، شرق اروپا، آسیای میانه و شمال آفریقا) گسترده شده‌اند (۸) و همچنین تعداد اندکی از آنها در نیمکره جنوبی زمین نیز پراکنده شده‌اند و تاکنون هیچ صنوبر بومی در افریقای مرکزی و جنوبی گزارش نشده است (۲۱). سفید پلت (*Populus caspica* Bornm.) تنها گونه بومی از جنس صنوبر و بخش *Leuce* (*Populus*) و زیر بخش *Albidae* است که در جنگلهای هیرکانی از حوالی آستارا تا گلیداغی در شمال ایران پراکنش دارد (۱، ۴ و ۳۵). البته حضور سفید پلت در سایر مناطق ایران از جمله آذربایجان، کرمانشاه، فارس، کرمان و تهران نیز گزارش شده است (۶). شباهت ریختی بالای سپیدار با سفید پلت محققان را در شناسایی و مجزا ساختن این دو گونه از یکدیگر مورد تردید قرار داده است (۶ و ۳۵). سپیدار (*Populus alba* L.) از جنس صنوبر و بخش *Leuce* و زیر بخش *Albidae* است که رویشگاه اصلی آن مناطق استپی و مرکزی ایران است (۱، ۶، ۳۵ و ۳۹). تفاوت سپیدار با سفید پلت تنها در داشتن کرکهای نمدی (زیرین برگ) که به صورت یکنواخت خاکستری هستند، دم‌برگ به طول کم و بیش ۱۰ سانتیمتر، در درختان مسن غالباً در مقایسه با سفید پلت کوچکتر، گل آذین کوتاهتر به طول ۱۰-۱۵ سانتیمتر، دم‌گل با کرکهای کوتاه ولی در بقیه موارد این گونه مشابه سفید پلت می‌باشد (۶ و ۳۵). متداول بودن دورگه‌گیری بین گونه‌های مختلف جنس صنوبر (۴۳)، سبب ایجاد شباهتهای ریختی بین گونه‌های نزدیک به هم شده و در نتیجه محققان را در شناسایی و طبقه‌بندی صحیح آنها دچار اشتباه می‌سازد. از طرفی مشخصه‌های ریختی برای تعیین تمایز درختان نیز می‌تواند تحت تأثیر عوامل محیطی باشد که تأثیر این عوامل

هیرکانی ایران؛ استانهای مازندران و گیلان، انتخاب شدند (جدول ۱). سپس از هر رویشگاه دو درخت به فاصله حداقل ۱۰۰ متر از یکدیگر انتخاب و تعدادی برگ از هر درخت جمع‌آوری گردید.

استخراج DNA ژنومی و تکثیر قطعه ژنی *trnL-F* برای استخراج DNA ابتدا نمونه‌های برگ با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند. سپس استخراج DNA ژنومی از برگها، با استفاده از CTAB و SDS-پتاسیم استات که روشی ترکیبی از Doyle and Doyle (۱۹۸۷) و Dellaporta و همکاران (۱۹۸۳) است (۱۳، ۱۶، ۲۶ و ۴۷)، انجام شد. کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد و کمیت DNA نیز با استفاده از رابطه عمومی $[dsDNA]ug/ml = OD260 * P * 50$ ، که در این رابطه P رقت می‌باشد، محاسبه گردید (۳۶). سپس قطعه ژنی *trnL-F* با استفاده از پرایمرهای جهانی (۴۰ و ۴۱) کلروپلاستی UEFF با توالی 5/GGTTCAAGTCCCTCTATCCC به عنوان پرایمر مستقیم و پرایمر UEUFR با توالی 5/ATTTGAACTGGTGACACGAG معکوس با استفاده واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر شدند. فرآیند تکثیر DNA با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، PCR بافر 1X، $MgCl_2$ ۲ mM، از هر داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) ۲۰۰ μM و ۱ میکروگرم DNA ژنومی و در نهایت U ۰/۲۵ از *Taq DNA polymerase* انجام گردید.

برای این منظور از برنامه دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، در ۳۲ تکرار و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه در انتهای برنامه PCR استفاده شد.

(برای مثال علم پزشکی قانونی، بیوتکنولوژی، صنعت مواد غذایی و رژیم غذایی حیوانات) می‌باشند (۱۱). در واقع در علم تاکسونومی استفاده ترکیبی از توالی یابی DNA و ویژگیهای ریختی، سرعت طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌ها را در سطح جهانی افزایش داده است (۹، ۱۴، ۲۰، ۳۸ و ۴۴). DNA کلروپلاستی به دلیل محافظت شدگی بالا، عدم تغییر نوترکیبی و جهش (۳۷) و نیز میزان جانمایی اندک نوکلئوتیدی (۲۵)، از جمله نشانگرهایی است که برای جنسهای مختلف گیاهی به عنوان DNA بارکد مورد استفاده قرار گرفته است (۱۷، ۲۷، ۳۲ و ۳۴). از جمله توالیهای کلروپلاستی مورد استفاده گسترده در مطالعه‌های فیلوژنتیک، توالی فاصله انداز درون ژنی *trnL-F* و اینترون *trnL* است که در سطوح درون گونه ای و در سطح جنس برای گیاهان مطرح می‌گردد (۱۰، ۱۷، ۲۹، ۳۱، ۴۰ و ۴۶). مناطق غیر کد کننده نسبت به مناطق کد کننده پرتبتهای کمتر مورد توجه و اهمیت در انتخاب طبیعی هستند از این رو بیشتر برای مطالعه تاریخ تکاملی و بررسی روابط فیلوژنتیک مورد استفاده هستند (۲۲). منطقه غیر کدکننده DNA کلروپلاستی *trnL-F* تمایل بیشتری به تکامل با تجمع حذف/دخول و به همان اندازه تعویض نوکلئوتیدی نسبت به توالیهای کد کننده را دارا می‌باشند، چون ارزش مولکولی بالایی جهت بررسیهای فیلوژنتیک دارند از این رو از آنها می‌توان در مطالعات در سطح زیر خانواده استفاده کرد (۱۹). از آنجایی که گزارشی مبنی بر بررسی سفیدپلت و سپیدار با استفاده از نشانگر فیلوژنتیکی *trnL-F* در دست نبوده، تحقیق حاضر در نظر دارد تا با توالی یابی قطعه درون ژنی *trnL-F* از این دو گونه نزدیک به هم، تمایزی را بین آنها مشخص سازد و توانایی این نشانگر را در حل این اختلاف مورد ارزیابی قرار دهد.

مواد و روشها

انتخاب رویشگاه: برای این تحقیق هفت رویشگاه طبیعی سفید پلت از مناطق پراکنش این گونه در جنگلهای

سایت NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) هم‌ردیف‌سازی شدند. در مطالعه بعدی توالی‌های بدست آمده به کمک برنامه Clustal W2 در نرم‌افزار Mega 5، با هم‌ردیف‌شدن، سپس بر اساس جایگاه‌های نوکلئوتیدی که دارای تغییر (جهش) بودند، میزان جهش‌های Transation و Transversion در بین نمونه‌ها بر اساس بیشینه صرفه جویی (Maximum Parsimony) تعیین گردید، در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزار Mega 5 درخت‌های فیلوژنی با استفاده از روش بیشینه صرفه جویی ترسیم شد. البته قبل از رسم درخت فیلوژنی بهترین الگوی تکاملی انتخاب می‌شود. جهت اطمینان از صحت درخت‌های رسم شده از پشتوانه تکرار ۱۰۰۰ استفاده گردید.

استخراج توالی *trnL-F* و آنالیز آنها: قطعات تکثیری PCR بعد از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد و حصول اطمینان از صحت انجام مراحل تکثیر، توسط شرکت MWG آلمان، تعیین توالی شدند. استخراج توالی از کروماتوگرام‌های دریافتی از شرکت با استفاده از نرم‌افزار Chromas ver. 2 صورت گرفت. پس از دریافت توالی‌ها، با به کارگیری نرم‌افزار Blast در بانک ژنی، اختصاصی بودن قطعه مورد نظر به سپیدار و سفیدپلت تأیید شد. توالی به دست آمده از منطقه *trnL-F* نمونه‌های سفیدپلت و سپیدار به همراه توالی‌های همین منطقه در صنوبرهای موجود در بانک ژن و یک نمونه از توالی *trnL-F* بید به عنوان برون‌گروه (جدول ۲) توسط برنامه آنالیز موجود در

جدول ۱- محل‌های جمع‌آوری گروه‌های مورد مطالعه سفیدپلت و سپیدار در مناطق شمال و غرب جنگل‌های هیرکانی ایران

شماره هرباریمی*	تاکسون	کد	استان و محل جمع‌آوری	مختصات جغرافیایی
۱۵۳۶	<i>P. caspica</i>	G ₁	مازندران- جویبار	۳۶°۲۸' N / ۵۳°۲۰' E
		G ₂		
۱۵۳۷	<i>P. caspica</i>	SD ₁	مازندران- ساری- چهاردانگه	۳۶°۲۱' N / ۵۴°۷۰' E
		SD ₂		
۱۵۳۹	<i>P. caspica</i>	N ₁	مازندران- نور- پارک جنگلی	۳۶°۲۸' N / ۵۲°۹۶' E
		NY ₃		
۱۵۳۸	<i>P. caspica</i>	CH ₁	مازندران- چالوس	۳۶°۲۵' N / ۵۱°۱۹' E
۱۵۴۲	<i>P. caspica</i>	RH ₁	گیلان- رودبار- حلیمه جان	۳۶°۵۰' N / ۴۹°۲۷' E
		RH ₂		
۱۵۴۳	<i>P. caspica</i>	RT ₁	گیلان- تالش- رضوانشهر	۳۷°۲۸' N / ۴۹°۰۷' E
		RT ₂		
۱۵۴۰	<i>P. caspica</i>	SC1	گیلان- آستانه اشرفیه- مرکز تحقیقات صنوبر کشور	۳۷°۷۹' N / ۴۹°۲۷' E
		SC2		
۱۵۴۱	<i>P. alba</i>	SA ₁	گیلان- آستانه اشرفیه- مرکز تحقیقات صنوبر کشور	۳۷°۷۹' N / ۴۹°۲۷' E
		SA ₂		

*شماره هرباریمی دانشکده علوم پایه دانشگاه مازندران

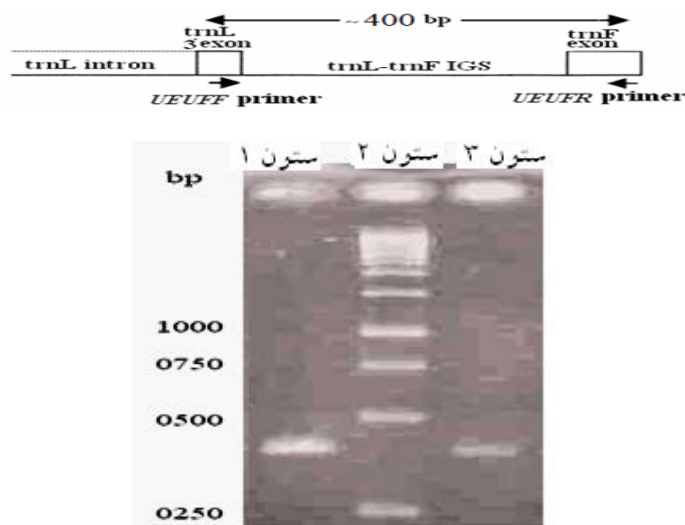
جدول ۲- نمونه‌های صنوبر ثبت شده در بانک ژن (NCBI)

شماره ثبت نمونه‌های بانک ژن	کد	تاکسون
GenBank, accession number: FJ490818	P.ni	<i>Populus nigra</i>
GenBank, accession number: AY757054	P.tr	<i>Populus tremuloides</i>
GenBank, accession number: AY757053	P.de	<i>Populus deltoides</i>
GenBank, accession number: AY757063	S.ba	<i>Salix babylonica</i>

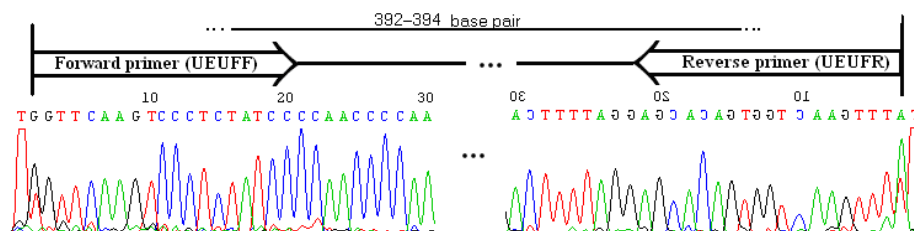
نتایج

ver 2 مشاهده شدند و توالی *trnL-F* استخراج گردید (شکل ۲). نتایج نشان داد پرایمرها دو طرف محصول PCR را در برگرفته اند و آنالیز Blast توالی به دست آمده نیز نشان داد توالی محصول تکثیری همان توالی *trnL-F* است.

پس از استخراج DNA کلروپلاستی و تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR از قطعه *trnL-F* (شکل ۱) هر یک از نمونه ها توسط شرکت MWG تعیین توالی گردید. کروماتوگرامهای دریافتی با استفاده از نرم افزار Chromas



شکل ۱- نمودار شماتیک از ناحیه *trnL-F* و محصولات PCR پرایمرهای آن از دو گونه سپیدار و سفیدپلت در ژل آگارز؛ فاصله بین ژنی *trnL-F* (intergenic spacer) ژنوم پلاستییدی و موقعیت پرایمرهای مستقیم و معکوس (در بالا) و ستون ۱ محصول PCR قطعه *trnL-F* سپیدار؛ ستون ۲ نشانگر DNA؛ و ستون ۳ محصولات PCR قطعه *trnL-F* سفید پلت در ژل آگارز ۱ درصد.



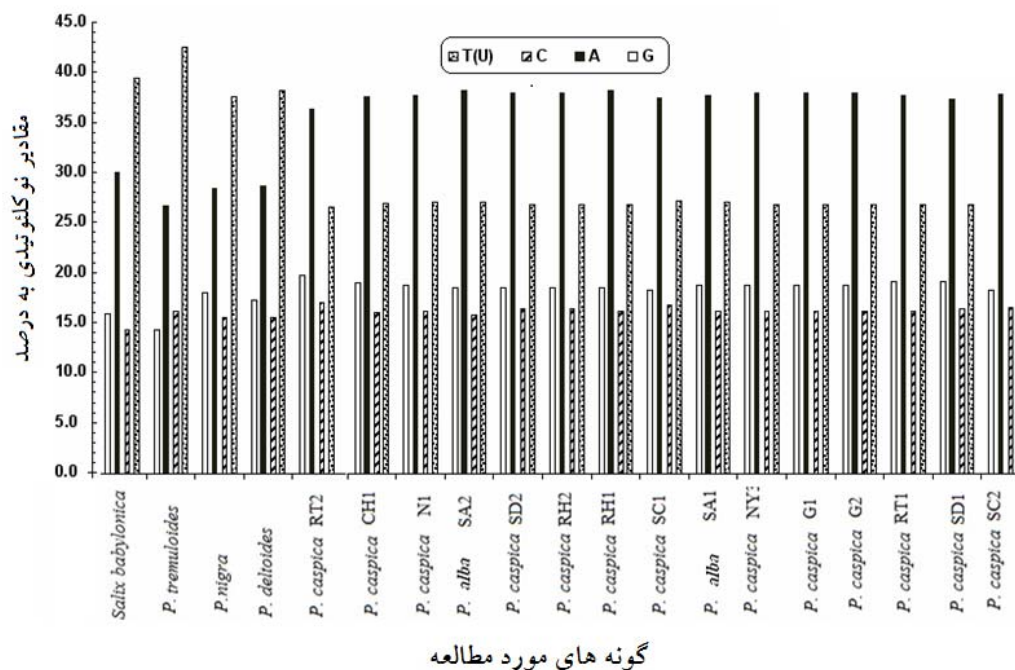
شکل ۲- کروماتوگرام توالی قطعه *trnL-F*

هر یک از نمونه‌های مورد مطالعه که دارای تغییر نوکلئوتیدی نسبت به دیگری بودند در (جدول ۳) آورده شد که حاکی از تفاوت سپیدار در ۳ موقعیت نوکلئوتیدهای شماره ۵۵ جانشینی (Transversion) (A→T)، در

نتایج همسان‌سازی توالی نمونه‌ها با همدیگر و با سایر نمونه‌های موجود در بانک ژن نشان داد تعداد نوکلئوتیدهای منطقه *trnL-F* تقریباً برای جمعیت‌های هر دو گونه در حدود ۳۹۲-۳۹۴ نوکلئوتید است. ترادف متغییر

صرفه جویی تخمین زده شد (جدول ۴). ترکیب و درصد نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده قطعه *trmL-F* برای هر یک از نمونه های مطالعه شده بر روی نمودار رسم شد که مشخص گردید از نظر تعداد نوکلئوتیدی سفیدپلت و سپیدار دارای آدنین بیشتر و تیمین کمتر در مقایسه با سایر صنوبرهای مورد مطالعه در این تحقیق بودند (شکل ۳). این موضوع حاکی از ترکیب نوکلئوتیدی مشابه برای دو گونه سفیدپلت و سپیدار را در بر داشت.

موقعیت نوکلئوتید ۶۸ حذف (deletion) نوکلئوتید آدنین، و در نوکلئوتید ۲۰۱ اضافه شدن (Insertion) نوکلئوتید آدنین مشاهده گردید. تعداد جایگاههای متغیر، تک متغیر، پارسیمون و محافظت شده برای توالی قطعه *trmL-F* به ترتیب ۱۹۷، ۴۶، ۱۵۱، ۱۷۸ محاسبه گردید. الگوی جابه جایی نوکلئوتیدی در کل قطعه *trmL-F* و میزان جایگزینی همجنس (Transation) و ناهمجنس (Transversion) جهشها و میزان تغییرات (حذف و اضافه) به روش بیشینه



شکل ۳- مقادیر نوکلئوتیدی نمونه های سفیدپلت و سپیدار و نمونه های بانک ژن

رودبار و پایه SD2 از رویشگاه مازندران منطقه ساری بودند ولی سایر نمونه های بررسی شده از سفیدپلت به همراه سپیدار در گروه اول قرار گرفته اند که حاکی از قرابت بیشتر این دو در مقایسه با سایر گونه ها مطالعه شده از این جنس در این تحقیق می باشند. (شکل ۴). حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی بین نمونه ها به روش توزیع گاما محاسبه گردید (جدول ۵).

نتایج درخت فیلوژنی بر اساس کل قطعه *trmL-F* به روش بیشینه صرفه جویی (Straight consensus) نشان داد که گونه های جنس صنوبر تک نیاء می باشند و نمونه های مورد بررسی از جنگلهای هیرکانی در یک کلاد تقسیم شده اند اما در کلاد اول، دو گروه شناسایی شده اند که شامل سه نمونه به ترتیب پایه SC1 از رویشگاه گیلان منطقه آستانه اشرفیه و پایه RH2 از رویشگاه گیلان منطقه

جدول ۳- نوکلئوتید های منطقه *tmiL-F* نمونه های مورد مطالعه که دارای تغییرات نوکلئوتیدی بودند، نوکلئوتید متغیر به رنگ خاکستری مشخص گردید.

Position: 9-330		9	16	23	37	43	55	68	82	108	123	146	148	171	179	183	187	193	201	205	206	211	216	221	239	284	292	296	300	330	
Taxon																															
SC2	C	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	R	A	A	T	R	A	A	A	G	
SC1	A	A	G	A	A	T	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	R	A	A	T	R	A	A	A	C	
SA1	A	A	G	A	T	T	-	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	A	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
SA2	A	A	G	A	T	T	-	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	A	A	G	G	A	A	T	A	A	A	A	G	
G1	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
NY3	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
G2	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
RH2	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	C	
SD2	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	C	
RH1	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	A	A	A	A	G	
N1	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
CH1	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
RT1	A	A	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	G	A	A	A	G	
SD1	C	G	G	A	T	A	A	A	A	A	A	G	A	-	A	C	T	G	-	A	G	G	A	A	T	A	A	A	A	G	
RT2	C	G	C	T	A	A	A	A	A	A	A	G	A	-	C	C	G	G	-	A	G	A	A	T	G	A	A	A	A	G	
P.de	G	A	A	A	C	-	-	A	-	-	A	-	-	-	A	T	T	A	-	-	-	-	-	T	-	-	T	G	A	A	
P.ni	G	A	A	A	C	-	-	A	-	-	A	-	-	-	A	T	T	A	-	-	-	-	-	T	-	-	T	G	A	A	
S.ba	A	A	A	A	C	-	-	A	-	T	A	-	-	-	A	T	T	A	-	-	-	-	-	T	-	T	C	T	C	A	
P.fr	G	-	A	A	C	-	-	A	-	-	A	-	-	-	A	T	T	A	-	-	-	-	-	T	-	T	-	-	-	-	

جدول ۵- حداقل و حداکثر فاصله ژنتیکی (به روش توزیع gamma) گونه‌های مطالعه شده

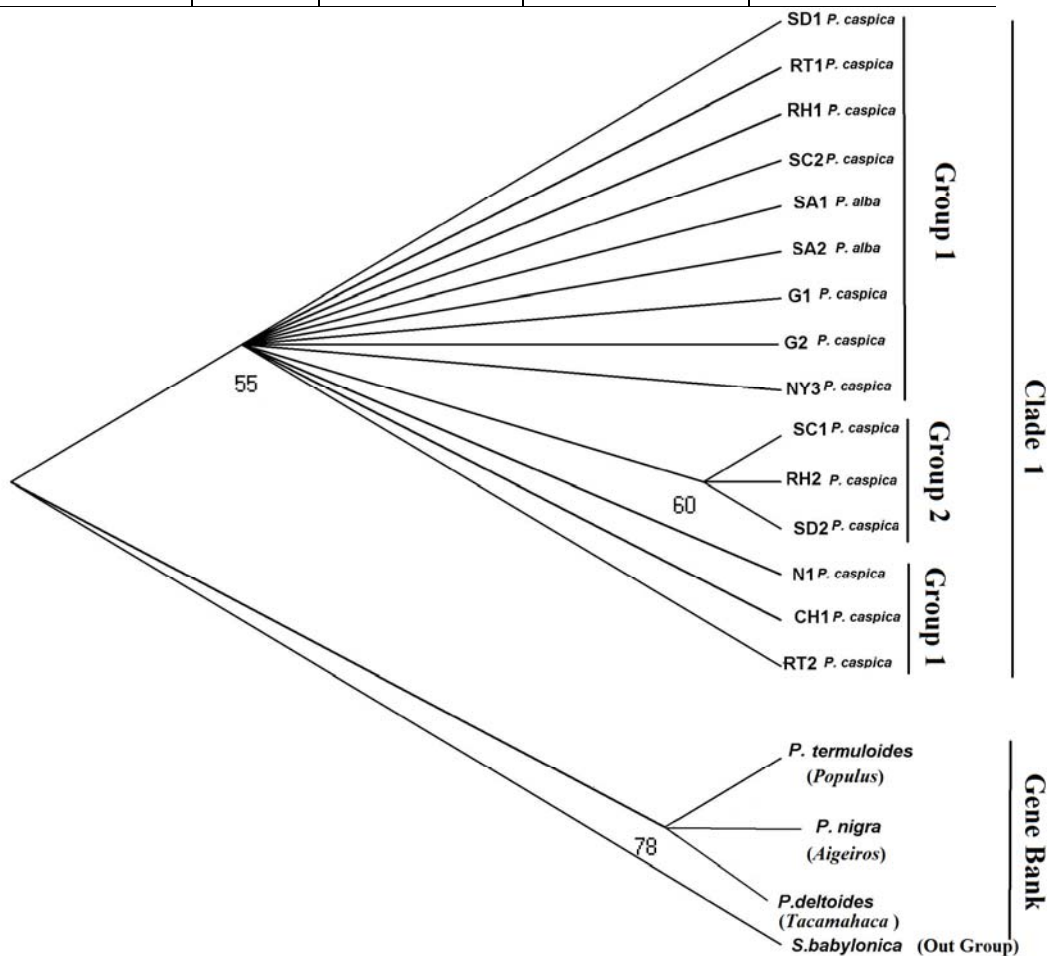
		Samples NCBI																			
		Hyrcanian Sample																			
		SC ₂	SD ₁	RT ₁	G ₂	G ₁	NY ₃	SA ₁	SC ₁	RH ₁	RH ₂	SD ₂	SA ₂	N ₁	CH ₁	RT ₂	P.de	P.ni	P.tr	S.ba	
SC ₂	*																				
SD ₁	*/0.05																				
RT ₁	*/0.05																				
G ₂	*/0.05		*																		
G ₁	*/0.05		*	*																	
NY ₃	*/0.05		*	*	*																
SA ₁	*/0.1	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05															
SC ₁	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05													
RH ₁	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05												
RH ₂	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05											
SD ₂	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05										
SA ₂	*/0.1	*/0.1	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05									
N ₁	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05							
CH ₁	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05	*/0.05						
RT ₂	*/0.36	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41	*/0.41					
P.de	1/30.1	1/30.1	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2	1/30.2
P.ni	1/30.5	1/30.5	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6	1/30.6
P.tr	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1	1/30.1
S.ba	1/30.3	1/30.3	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4	1/30.4

جدول ۴- تخمین الگوی جابه‌جایی نوکلئوتید در کل قطعه *trnL-F* (بیشینه صرفه جویی)

نوکلئوتید	A	T	C	G
A	۹۵	۴	۳	۶
T	۱۰	۷۶	۶	۵
C	۴	۳	۴۲	۱
G	۷	۲	۲	۴۵

Transition/transversion rate	Purines	Pyrimidines	Overall	
	۰/۰۳	۰/۲۴	۰/۰۵۲	

<i>trnL-F</i>	Identical pairs	Transitional pairs	Transversional pairs	Transitional pairs/ Transversional pairs
	۲۵۸	۲۱	۳۱	۰/۶۸



شکل ۴- بررسی روابط بین نمونه‌های مورد بررسی از جنس صنوبر بر اساس توالی *trnL-F* به روش درخت (Straight consensus) اعداد کنار شاخه‌ها نشان‌دهنده ارزش حمایتی شاخه‌ها بوده و به صورت درصد بیان شده است.

بحث

خاص و در سطح داخل گونه‌ای، استفاده می‌کنند (۳۴). مناطق غیر کد کننده همچون اینترون‌ها و فضاهای بین ژنی اغلب تنوع بیشتری را در جایگاه بازی نسبت به مناطق کد کننده DNA نشان می‌دهند که احتمالاً محدودیتهای

محققین از نشانگر مولکولی *trnL-F* برای مطالعه روابط فیلوژنتیکی در سطح بین گونه‌ای، در بین دسته‌های

بخشه *Populus* ایجاد شد. بنابراین غیر منطقی نخواهد بود اگر فرض شود که مجال و فرصتی برای تبادل ژنی بین گونه‌های همجا (Sympatric) و یا حتی بین تاکسونهای از بخشهای مختلف وجود داشته است (۸ و ۹) در نتیجه این احتمال که *P. alba* یا *P. caspica* جمع‌آوری شده از مناطق هیرکانی تحت این شرایط باشند نیز وجود دارد.

نتایج حاصل از تحقیق فلاح و همکاران (۱۳۹۰) که به بررسی اکوتیپهای سفیدپلت براساس نشانگر مورفولوژیک برگ و ایزوآنزیمی پراکسیداز پرداخته بودند، نشان داد که تنوع درون جمعیتی سفیدپلت در جوامع بزرگ بیشتر از جوامع کوچک تر بوده که دلیل آن را به خاطر کاهش پدیده درون لقاحی و ایزوله شدن جمعیتها، وجود جریان ژنی متنوع و ازدیاد هتروزیگوتی مطرح ساختند. در مطالعه حاضر نیز حضور نمونه‌های SC1، RH2، SD2 که در کلادی جداگانه در بین جمعیتهای سفیدپلت قرار گرفته‌اند نیز بر صحت وجود تنوع درون جمعیتی در بین جوامع سفیدپلت اشاره دارد. در واقع سه عامل تنوع جغرافیایی و اقلیمی و تاریخ تکاملی گونه‌ها و ویژگیهای گونه از مهم‌ترین عوامل مؤثر در ایجاد تنوع و تمایز ژنتیکی هستند (۴).

بررسی پتانسیل نشانگر *trnL-F* به عنوان یک منطقه غیر کد کننده کلروپلاستی برای تفکیک این دو گونه نزدیک به هم حاکی از این بود، که این نشانگر، قدرت تفکیکی کمی در مقابل سایر مناطق غیر کد کننده کلروپلاستی را دارا می‌باشد. علت انتخاب نشانگر *trnL-F* این است که معمولاً قدرت تفکیکی کم این نشانگر در مقابل چندین فایده آن تا حدی جبران می‌شود. چرا که اولاً، این مناطق به شدت حفاظت شده (Conserve) بود (۳۷ و ۴۰). ثانیاً آغازگرهای جهانی این نشانگر در دسترس هستند و راحتی امکان سنتز آغازگرها و همچنین شرایط بهینه شده تکثیر این نشانگر در منابع موجود است. ثالثاً اطلاعات زیادی از توالیهای مناطق غیر کد کننده (*trnL-F*) در پایگاه

عملکردی کمتری را منجر می‌شوند (۳۴). جمع‌آوری و افزایش داده‌ها از توالیهای منطقه *trnL-F* اطلاعات زیادی از گیاهان را جهت مطالعه بیشتر ساختار، عملکرد و تکامل گیاهان گل‌دهنده فراهم می‌سازد (۱۰). نتایج این تحقیق نیز براساس نشانگر مولکولی *trnL-F* با نتایج سایر محققین (۹، ۲۱ و ۳۰) تک‌نیایی بودن سفیدپلت و سپیدار جمع‌آوری شده از جنگل هیرکانی را تأیید می‌نماید. در نتیجه رسم درخت فیلوژنی و با توجه به تعلق سپیدار به بخشه *Populus* و گونه دیگر از این بخشه با نام *P. tremuloides* و یک گونه از بخشه *Aigeiros* با نام *P. nigra* و از بخشه *Tacamahaca* گونه‌ای با نام *P. deltoids* که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند، مشخص گردید که، سفیدپلت براساس نشانگر کلروپلاستی *trnL-F* مطابق با سایر مطالعات محققین (۳) به بخشه *Populus* تعلق دارد و قرابت ژنتیکی نزدیکی را با سپیدار جمع‌آوری شده در این تحقیق نشان می‌دهد. در این بین سه نمونه از بین نمونه‌های مورد بررسی (SC1، RH2، SD2) با قرار گرفتن در گروهی مجزا، دارای الگوی نوکلئوتیدی و فاصله ژنتیکی متفاوت تر با سپیدار و سفید پلت بودند و حالت پلی‌تومی در آنها دیده می‌شود. از آنجایی که در بین صنوبرها دو رگه‌گیری و پلی‌پلوئیدی بدلیل دو پایه بودن زیاد است به همین جهت پایه‌های بینابینی در بین گونه‌ها فراوان است. لذا بین دانشمندان در اینکه صنوبر یک درخت وارپته‌ای از یک گونه است و یا خود گونه‌ای مجزایی است اختلاف نظر وجود دارد (۲). بنابراین با اینکه *P. alba* و *P. tremuloides* هر دو به بخشه *Populus* تعلق دارند ولی در جایگاه جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند در واقع وجود هیبریداسیون طبیعی در بین بخشه‌های *Populus* با سایر بخشه‌ها مثلاً *P. alba* و *P. termula* امکان‌پذیر می‌باشد (۲۱). در بررسیهای انجام شده براساس RFLP بر روی cpDNA و rDNA نشان دادند که *P. nigra* در اثر دخول بین اجداد *P. alba* و برخی از اجداد والدینی ناشناخته از

محیط و کلید پایداری و سلامت محیط زیست طبیعی است و همگام با پیشرفت فنی و علمی در علوم زیست محیطی و آشکار شدن اهمیت تنوع زیستی، اهداف مدیریت کلان جنگل نیز به سمت افزایش تنوع زیستی گرایش یافته است (۷)، از این رو به خاطر حضور اکوتیپ‌های متعدد و وجود تنوع ژنتیکی در بین رویشگاه‌های مختلف این گونه بومی مورد مطالعه هیرکانی، لزوم حفظ و مدیریت این ذخایر ژنتیکی مطرح می‌گردد، از طرفی استفاده از سایر نشانگرهای مولکولی و طراحی پرایمرهای اختصاصی برای استنباط فیلوژنتیکی این گونه و نقش برداری کل ژنوم در چنین تحقیقاتی ضروری به نظر می‌رسد.

داده‌ها در بانک ژن در دسترس می‌باشد که اجازه شناسایی بسیاری از گونه‌ها و جنسها را امکان‌پذیر می‌سازد.

وجود تنوع درون جمعیتی در جوامع سفیدپلت، دورگه‌گیری و امکان پراکنش گسترده بذر توسط باد و در نتیجه سطوح مختلف پلی‌پلوئیدی و همچنین شرایط اکولوژیک و جغرافیایی ناهمگون منطقه هیرکانی می‌تواند حاکی از اختلافات ژنتیکی زیاد این گونه نسبت به گونه‌هایی که امکان حرکت ژن در داخل جوامعشان وجود ندارد باشد (۴). با توجه به این مسائل اکوتیپ‌های زیادی برای سفیدپلت پیش‌بینی می‌شد که با نتایج حاضر نیز سازگاری دارد. از آنجایی که تنوع زیستی یکی از شاخص‌های خودتنظیمی

منابع

- ۱- ثابتی، ح. ۱۳۸۷. جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران. مرکز نشر دانشگاهی، یزد.
- ۲- زرین‌بال ماسوله، الف. ۱۳۸۳. اصلاح ساختار صنوبر سفیدپلت از طریق تولید دو رگه‌های بین‌گونه‌ای با استفاده از روش نجات جنین. (پایان‌نامه کارشناسی ارشد). دانشگاه تهران.
- ۳- ضیایی ضیابری، س. ف. ۱۳۷۱. ذخایر ژنتیکی گونه‌های صنوبر در ایران و روش حفاظت از آنها. فصلنامه پژوهش و سازندگی، ۱۶: ۲۸-۳۱.
- ۴- فلاح، ح. طبری، م. آزادفر، د. جلالی، غ. ۱۳۹۰. پراکنش و ویژگی‌های اکولوژی گونه در حال انقراض سفیدپلت در جنگل
- ۵- قهرمان، الف. ۱۳۸۳. کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). جلد ۱، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.
- ۶- مظفریان، و. ۱۳۸۳. درختان و درختچه‌های ایران. مرکز نشر فرهنگ معاصر، تهران.
- ۷- مجربی، م. مفتخر جویباری، م. کوچ، ی. جلیلود، ح. ۱۳۹۰. مقایسه تراکم زادآوری و تنوع گونه‌های گیاهی در جنگل کاربهای صنوبر دلتوئید (*Acer velutinum* Boiss.) و پلت (*Populus deltoides* Marsh.) دلاکخیل مازندران، مجله زیست‌شناسی ایران جلد ۲۴، ۴: ۶۱۴-۶۲۱.
- 8- Alba, N. and Agundez, D. 2000. Characterisation of *populus alba* L. by isozymes. *Inv. Agr* 92: 305- 315.
- 9- Azuma, T., Kajita, T., Yokoyama, J. and Ohashi, H. 2000. Phylogenetic relationships of *Salix* based on *rbcL* sequence data. *American Journal of Botany* 87: 67- 75.
- 10- Bakker, F. T., Culham, A., Gomez, M. R., Carvalho, J., Compton, J., Dawtrey, R. and Gibby, M. 2000. Patterns of nucleotide substitution in angiosperm cpDNA *trnL* (UAA) – *trnF* (GAA) regions. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1146- 1155.
- 11- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N. and Savolainen, V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Biological Sciences* 360 (1462):1889-1895.
- 12- Cullen, B. R. 2006. Viruses and microRNAs. *Nat Genet* 38: 25-30.
- 13- Dellaporta, S. L. Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep version II. *Plant Molecular Biology Report*. 1(4): 19- 21.
- 14- Desalle, R. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology* 20 (5): 1545- 7.

- 15- Douhovnikoff, V. and Dodd, R. S. 2003. Intracolonial variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers. *Theor Appl Genet* 106: 1307–1315.
- 16- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochem* 19: 11- 15.
- 17- Drabkova, L., Kirschner, J., Vlcek, C. and Paces, V. 2004. *TrnL-trnF* Intergenic Spacer and *trnL* Intron Define Major Clades Within *Luzula* and *Juncus* (Juncaceae): Importance of Structural Mutations. *Journal of Molecular Evolution* 59: 1– 10.
- 18- Eckenwalder, J. E. 1996. Systematics and evolution of *Populus*. In *Biology of Populus and its implications for management and conservation* (ed. Stettler, R. F) 7–32. Ottawa, Ontario, Canada.
- 19- Gielly, L. and Taberlet, P. 1994. The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus *rbcL* Sequences. *Molecular Biology Evolution* 11(5):769-777.
- 20- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. and Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23(4): 167- 172.
- 21- Hamzeh, M. and Dayanandan, S. 2004. Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany* 91: 1398- 1408.
- 22- Hao, D. C., Huang, B. L., Chen, S. L. and Mu, J. 2009. Evolution of the Chloroplast *trnL-trnF* Region in the Gymnosperm Lineages Taxaceae and Cephalotaxaceae Evolution of the Chloroplast *trnL-trnF* Region. *Biochem Genet* 47:351– 369.
- 23- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. and deward, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit divergences among closely related species. *Proc. R. Soc* 270: 96– 99.
- 24- Hidalgo E. and Herguedas, D. A. L. 2009. *Populus alba* L. and *P. x canescens* (Ait.) Sm. In the Douro basin (Spain), identification, hybridization and clonality. MS.c. Thesis, University Valladolid, INIA.
- 25- Holt, H. S. D., Horova, L. and Bures, P. 2004. Indel patterns of the plastid DNA *trnL-trnF* region within the genus *Poa* (Poaceae). *J Plant Res* 117: 393– 407.
- 26- Hosseinzadeh Colagar, A., Saadati M., Zarea M. and Ahmadi Talei, S. 2010. Genetic variation of the Iranian *Sclerotinia sclerotiorum* isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. *Biotechnology (Pakistan)* 9(1): 67- 72.
- 27- Johnson L. A., Chan L. M., Weese, T. W. L., Weese, L. D. and Mcmurry, S. 2008. Nuclear and cpDNA sequences combined provide strong inference of higher phylogenetic relationships in the phlox family (Polemoniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 48: 997–1012.
- 28- Keim, P., Shoemaker, R. C. and Palmer, R. G. 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. *Theor Appl Genet* 77: 786-792.
- 29- Kojoma, M., Kurihara, K., Yamada, K., Sekita, S., Satake, M. and Iida, O. 2002. Genetic identification of *cinnamon* (*Cinnamomum spp.*) based on the *trnL-trnF* chloroplast DNA. *Planta Medicine* 68(1): 94– 96.
- 30- Leskinen, E. and Alstrom, C. 1999. Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: evidence from 5.8S, ITS1 and ITS2 of the rDNA. *Plant Systematics and Evolution* 215: 209– 227.
- 31- Mes, T. H. M., Fritsch, R. M., Pollner, S. and Bachmann, K. 1999. Evolution of the chloroplast genome and polymorphi ITS regions in *Allium subg. Melanocrommyum*. *Genome*. 42, 237- 247.
- 32- Pirie M. D., Vargas M. P. B. Z., Botermans, M., Bakker, F. T. and Chatrou, L.W. 2007. Ancient paralogy in the cpDNA *trnL-F* region in Annonaceae: implications for plant molecular systematics. *American Journal of Botany* 94(6): 1003– 1016.
- 33- Qing Ren, B., Guo xiang, X. and Duan chen, Z. 2010. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Molecular Ecology Resources* 10: 594– 605.
- 34- Randal, L., Small, a., Edgar, B., Lickey, A., Shaw, J. A., Warren, D. and Hauk, A. 2005. Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 509– 522.
- 35- Rechinger, K. H. 1969. *Flora Iranica. Salicaceae*. Graz: Akademische Druck – u Verlagsanstalt, Wien: Naturhistorisches Museum . pp 1-12.
- 36- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd

- ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 37- Shaw, J., Lickey, E., Beck, J., Farmer, S., Liu, W., Miller, J., Siripun, K., Winder, C., Schilling, E. and Small, R. 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.
- 38- Smith, M. A . and Green, D.M. 2005. Dispersal and the metapopulation paradigm in amphibian ecology and conservation: are all amphibian populations metapopulations? *Ecography* 28: 110– 128.
- 39- Stettler, E. R. F., Bradshaw, H. D., Heilman, P. E. and Hinckley, T. M. 1996. *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*. NRC Research Press, Ottawa, pp 515– 539.
- 40- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L. and Miquel, C. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 35 (3): 3-14.
- 41- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105– 1109.
- 42- Tuskan, G. A., Wulschleger, S. D., Bradshaw, H. D. and Dahlman, R. C. 2002. sequencing the *Populus* genus: Application to the energy related mission of DOE. *Plant, Animal and Microbial Genomes*, San Diego, CA, 40 p.
- 43- Whitham, T. G., Floate, K. D., Martinsen, G. D., Driebe, E. M. and Keim, P. 1996. Ecological and evolutionary implications of hybridization: *Populus*–herbivore interactions. NRC Research Press, Ottawa, Canada.
- 44- Will, K. W., Mishler, B. and Wheeler, Q. D. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst. Biol* 54: 844– 851.
- 45- Woolbright, S. A., DiFazio, S. P., Yin, T., Martinsen, G. D., Zhang, X., Allan, G. J., Whitham, T. G. and Keim, P. 2008. A dense linkage map of hybrid cottonwood (*Populus fremontii*-*P. angustifolia*) contributes to long-term ecological research and comparison mapping in a model forest tree. *Heredity* 100: 59– 70.
- 46- Yi, T., Miller, A. J. and Wen, J. 2004. Phylogenetic and biogeographic diversification of *Rhus* (Anacardiaceae) in the Northern Hemisphere. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 33: 861- 879.
- 47- Yosefzadeh, H., Hosseinzadeh Colagar, A., Tabari M., Sattarian A. and Assadi, M. 2012. Utility of ITS region sequence and structure for molecular identification of *Tilia* species from Hyrcanian forests. *Iran Plant Systematics and Evolution* 298(5): 947- 941.

The investigation of chloroplast marker *trnL-F* in determination of different between two species of *Populus*: *P. caspica* and *P. alba*

Hossinzadeh Colagar A.^{1,2*}, Mahmoudi Otaghviri A.³, Badbar M.^{1,3}

¹ Molecular and Cell Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

² Nano and Biotechnology Research Group, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

³ Biology Dept., Faculty of Science, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

Abstract

The purpose of this study is to evaluate of the chloroplast *trnL-F* marker's power in genetic differentiation and phylogenetic relationships between *Populus caspica* and *P. alba*. The 15 leaves samples collected from seven different growing areas of hyrcanian forests, Iran; Guilan and Mazandaran provinces. Genomic DNA extracted from leaves using the CTAB and SDS-potassium acetate combined method. PCR performed by universal primers and amplified *trnL-F* fragments sequenced. Results showed that, the entire length of the *trnL-F* region was 392-394 nucleotides in both species. In compare to available sequences of the GenBank, Adenin and Thimine nucleotides in *P. caspica* and *P. alba* are more than other nucleotides. These two species have shown high similarity in nucleotide composition of *trnL-F* spacer region with minimum genetic distance (=0.005). Parsimony analysis of 582 characters revealed 178 constant, 56 variable, 151 parsimony informative and 46 characters are unique position. Too, bootstrap consensus trees showed that the *trnL-F* sequence data cannot distinguish *P. caspica* from *P. alba* because, investigated samples have located in common group. Therefore, for accurate recognition of this species, phylogenetic reconstruction using other chloroplast and nuclear markers suggested.

Key words: *Populus caspica*; *Populus alba*; *trnL-F* molecular marker