تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی
دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه و بررسی فیلوژنی مولکولی جنس *Linaria* Mill (Plantaginaceae) در ایران براساس توالی DNA کلروپلاستی

عباس رحمانی[1*]، طاهر نژاد ستاری[2]، سید محمد مهدی حمدی[3]، ایرج مهرگان[4]، مصطفی اسدی[5]

۱. *دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.*
۲. *دانشیار،گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران ، ایران.*
۳. *استادیار،گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ایران.*
۴. *استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران.*
۵. *استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران.*

چکیده

سابقه و هدف: جنس .*Linaria* Mill متعلق به خانواده Plantaginaceae از راسته Lamiales است. زیستگاه این جنس در نیمکره شمالی و در برخی نقاط ایران می‌باشد. هدف این تحقیق بررسی وضعیت تاکسونومی و یافتن روابط فیلوژنی این جنس در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعات مولکولی مطابق با روش زیر انجام گرفت: ۱- استخراج DNA کامل از برگ‌ها، ۲- تکثیر و تعیین ترادف قطعه ناحیه rpl32-trnL از ژنوم کلروپلاستی،۳- انجام آنالیزهای آماری مختلف برای به‌دست آوردن مدل تکاملی و بررسی فیلوژنی گروه‌های مورد مطالعه،۴- تفسیر کلادوگرام‌ها

یافته‌ها: ماتریس داده‌ها شامل ۷۱ تاکسون و ۷۰۲ جایگاه در آنالیز پارسیمونی بود. ۴۸۵ جایگاه ثابت، ۱۰۹ جایگاه از نظر پارسیمونی غیراطلاعاتی و ۱۰۸ جایگاه باقی‌مانده از نظر پارسیمونی اطلاعاتی بودند. ۴ شاخه اصلی از جمله A،B،C وD درآنالیز درخت شناسایی شد.

بحث: منوفیلی گونه‌های *Linaria* در این تحقیق حمایت می‌شود. اساس جدایی بین گونه‌های دارای دانه‌های بالدار و بدون بال به طور قاطع و آشکار حمایت نمی‌شود که دلیلی بر هموپلاسی بودن این صفت است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که گونه‌های *Linaria* یک گروه منوفیلتیک را تشکیل می‌دهند. با توجه به مجموعه‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیکی از جمله دارا بودن برگ‌های کامل بدون دمبرگ و دارای رگبرگ‌های شانه‌ای، گل آذین خوشه‌ای انتهایی دارای براکته و گل‌های مهمیزدار منوفیلی *Linaria* تأیید می‌شود.

کلمات کلیدی: .*Linaria*، آنالیز پارسیمونی، تاکسونومی، فیلوژنی

مقدمه

جنس *Linaria* متعلق به راسته Lamiales از خانواده Plantaginaceae است. زیستگاه این جنس نیمکره شمالی است. Lamiales یکی از راسته‌های بزرگ گیاهان دو لپه‌ای است که دارای ۲۳ خانواده ۱۸۰۰۰ گونه می‌باشد(۳۴،۳۰). این راسته یک کلاد منوفیلتیک می باشد (۲۸). علی‌رغم همه مطالعات انجام گرفته روابط میان اجداد Lamiales نامشخص است. جنس *Linaria* تا این اواخر در خانواده Scrophulariaceae طبقه بندی می‌شد. ولی در پی نتایج مطالعات مولکولی به خانواده Plantaginaceae منتقل شده است. Scrophulariaceae دارای چندین قبیله است که

*نویسنده مسئول : عباس رحمانی
پست الکترونیکی: Email:rh.abbas@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۴/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۱۱

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

جنس *Linaria* در قبیله Antirrhineae قرار داشت. ویژگی‌های مرفولوژیکی گل در این قبیله را اولین بار لینه در سال ۱۷۴۹ بر روی جنس *Linaria* شرح داده است. *Linaria* جنس بزرگی است که در سرتاسر اروپا، آسیا و شمال آفریقا پراکنش دارد. جام گل مهمیزدار و معمولاً بسته *Linaria* برای درک بهتر توسعه وتکامل از نظر تقارن گل (۱۱) ، رنگ گل(۱۵) ، عصاره و شهد مهمیز(۸) مورد توجه بوده است. تحقیقات فعال و مستمری بر روی سازوگارهای تولید مثلی و گرده افشانی(۴۰) فیتوشیمیایی(۴)، جغرافیای زیستی(۱۴) و تهاجم زیستی(۴۲) انجام شده است. علی‌رغم همه این تحقیقات یک چارچوب کاری تکاملی برای *Linaria* موجود نیست. *Linaria* برای اولین بار توسط گیاه‌شناسان پیش از لینه از لحاظ تاکسونومی موجودیت یافت و شناسایی شد (۴۶،۳۸، ۳۳). لینه در سال ۱۷۵۳ براساس شناسایی‌های قبلی گونه‌های *Linaria* را در جنس *Antirrhinum* قرار داد (۳۱). با این وجود مدت کوتاهی بعد در سال ۱۷۵۴ توسط Miller به عنوان جنس مجزایی در نظر گرفته شد و شرح معتبری توسط وی برای آن نوشته شد (۳۲). مؤلفان اولیه جنس *Linaria* را در یک معنای گسترده در نظر می‌گرفتند که همه گونه‌هایی که دارای جام مهمیزدار هستند را در ارتباط با *Antirrhinum* در نظر می‌گرفتند (۱۰،۷،۷). *Linaria* یک جنس پیچیده است به صورتی که هیبریداسیون در آن فراوان است و اغلب گروه‌هایی را تشکیل می‌دهند که گونه‌ها ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند و اغلب به آسانی قابل تشخیص نیستند (۴۷،۳۹،۳۳). محققین مختلف ضوابط مختلفی را برای جداسازی گونه‌ها در نظر می‌گیرند. Viano در سال ۱۹۷۹ از صفات و ویژگی‌های دانه برای مطالعه مورفولوژی گونه‌های *Linaria* استفاده کرد. مطالعات آناتومیکی اطلاعات ارزشمندی را از جنس *Linaria* به ما داده است. محققین مختلف بر اساس ویژگی‌های دانه روندهای تکاملی مختلفی را برای *Linaria* پیشنهاد می‌کنند. Viano در سال ۱۹۷۸ یک تکامل موازی را برای دانه‌های بال‌دار و بدون بال از یک جد در نظر می‌گیرد، حضور بال در این جنس لااقل دو بار منشأ گرفته است (۵۰،۴۹). بر طبق مطالعات Sutton در سال ۱۹۸۸ بال می‌تواند منشاء از کرک‌های طولی دانه داشته باشد مثل آنچه در بخش *Macrocentrum*. وجود دارد. وی خاطر نشان کرد که منشاء پارافیلتیک احتمالی بخش *Diffusae* منجر به حضور گونه های مختلف ناخالص با صفات بسیار هتروژن شده است. وی پیشنهاد کرد که *Linaria* در دو گروه تقسیم بندی کنند. گروه اول شامل گونه‌های دارای دانه‌های گرد فاقد بال است و گروه دوم شامل گونه‌هایی با دانه‌های گرد و کم و بیش بالدار است. بر این اساس بخش‌های *Versicolores* و *Diffusae* در دسته اول قرار می‌گیرند و گونه‌های باقی مانده در گروه دوم جای می‌گیرند (۴۴). گونه‌های مختلف این جنس با زیبایی خیره کننده خود می‌توانند ارزش بالایی از نظر اقتصادی داشته باشند. جنس ذکر شده از معدود جنس‌هایی است که تاکنون در مجموعه Flora Iranica منتشر نشده است. حمدی در سال ۸۳-۸۴ رساله دکتری خود را در مورد بیوسیتماتیک جنس *Linaria* در ایران به اتمام رسانده است، شناسایی ۱۴گونه جدید *Linaria* برای دنیا و گزارش ۴ گونه جدید برای ایران، گزارش یک بخش جدید برای ایران، گزارش دو زیر گونه جدید برای ایران و تأیید مترادف شدن ۴ گونه توسط این محقق به انجام رسیده است (۱). در آخرین مطالعات حمدی و اسدی تعداد ۶ بخش و ۳۵ گونه از جنس *Linaria* در ایران به ثبت رسیده و در کتاب فلور ایران شماره ۶۸ به چاپ رسیده است (۲). این ۶ بخش شامل بخش‌های *Linaria* با ۲۰ گونه، *Diffusae* با دوگونه، *Speciosae* با ۶ گونه، *Macrocentrum* با دو گونه، *Supinae* با ۴ گونه و *Versicolores* با ۱ گونه در ایران رویش دارند (۳۵-۲۷، ۱۸). با توجه به اینکه فاز شناسایی گونه‌های این جنس اخیراً پایان یافته هنوز بررسی‌های لازم در مورد فیلوژنی این جنس در ایران صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه شناسایی وضعیت تاکسونومی و نیز فیلوژنی این جنس در گونه‌های ایرانی از جنس *Linaria* با کمک روش‌های مدرن آنالیزهای مولکولی بود.

روش کار

نمونه برداری و انتخاب گونه‌ها

تعدادی از نمونه ها (۴ نمونه) از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و با استفاده از سیلیکاژل خشک شد. تعدادی از نمونه‌ها نیز از هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور (TARI) تهیه گردید (۲۹). در جدول ۱ نام گونه‌ها، محل جمع‌آوری، کد هرباریومی و نام جمع‌آوری کننده ذکر شده است. شناسایی نمونه‌ها با استفاده از فلور ایران صورت گرفت (۲).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

جدول ۱ : نام گونه‌ها، نام محل، نام جمع‌آوری‌کننده و کد هرباریومی

گونه ها	محل جمع آوری و جمع آوری کننده
L. vulgaris	تهران: گلندوک. مظفریان (52344 TARI).
L. odora	خراسان: نیشابور. پاریاب و عباسی (8825 TARI).
L. korasanensis	خراسان: مشهد، اسدی و حمدی (85531 TARI).
L. striatella	تهران: رودهن ، رحمانی (9920 IAUH).
L. bamianica	خراسان: تربت جام، جوهرچی (30649 TARI).
L. michauxii	تهران: کرج، رحمانی (9921 IAUH).
L. farsensis	فارس: آباده، (17870 TARI).
L. pyramidalis subsp. pyramidalis	آذربایجان: ارومیه،اسدی (78929 TARI).
L. pyramidalis subsp. kopetdaghensis	خراسان: بجنورد. مهرگان (13934 TARI).
L. fastigiata	همدان: مظفریان (64470 TARI) .
L. remotiflora	کهکیلویه و بویراحمد، یاسوج، اسدی و ابوحمزه(46411 TARI) .
L. nurensis	فارس: نورآباد، مظفریان (45932 TARI).
L. kurdica subsp. kurdica	کردستان: سنندج، اسدی.(60498 TARI)
L. kurdica subsp. pycnophylla	آذربایجان: جلفا، ، اسدی و شاهسواری (65736 TARI).
L. lineolata	تهران: لواسان. رحمانی (9919 IAUH).
L. karajensis	تهران:. ریاضی (8470 TARI).
L. elymatica	کرمان:. فروغی و اسدی (16360 TARI).
L. azerbaijanensis	آذربایجان: تبریز. اسدی (85348 TARI).
L. khalkhalensis	آذربایجان: خلخال. اسدی (86496TARI).
L. shahroudensis	سمنان: شاهرود. اسدی و حمدی (85676 TARI).
L. guilanensis	قزوین: ۵۰ کیلومتری جاده رشت-قزوین. رحمانی (9922IAUH).
L. bousherensis	بوشهر: گناو. فروغی (3107 TARI).
L. albifrons	بوشهر: بندر امیر. رونه مارک و مظفریان (26985 TARI).
L. mazandaranensis	مازندران: قائم شهر، موسوی (33702 TARI).
L. genistifolia	مازندران، رامسر ۲۷۵۰ وندلبو و موسوی. (20889 TARI)
L. golestanensis	گلستان: مراوه تپهفروغی نیا و زنگوئی (32889 TARI).
L. dalmatica	آذربایجان: سراب،. ترمه (39071 TARI).
L. grandiflora	آذربایجان: اهر. ترمه وموسوی (38822 TARI).
L. orientalis	سمنان: شاهرود. ریاضی (8496 TARI)
L. chalepensis	کهکیلویه و بویراحمد: دوگنبدان. اسدی و ابوحمزه (38592 TARI).
L. armenica	آذربایجان: خوی. حمدی (82225 TARI).
L. arvensis	خوزستان: دهدز. مظفریان (74494 TARI) .
L. simplex	گیلان، بندر انزلی. مظفریان (75120 TARI).
L. kavirensis	یزد: تفت. دهقان زاده (26052 TARI).
L. micrantha	خوزستان: بهبهان. مظفریان (62494 TARI).
L. iranica	کرمان: جیرفت، ، میرتاج الدینی (64563 TARI).

ناحیه rpl32-trnL

ناحیه rpl32-trnL یک قطعه بین ژنتیکی در ناحیه تک-نسخه‌ای کوچک از ژنوم کلروپلاستی است. این ناحیه دارای قابلیت تغییرپذیری بالای است (۴۵). میانگین طول این ناحیه ۱۰۱۸ جفت باز است و محدوده آن از ۵۴۳ تا ۱۴۱۷ جفت باز است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که این بهترین ناحیه از ۳۴ ناحیه برای مطالعه در سطوح پایین مولکولی است(۴۱).

استخراج DNA

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

جهت استخراج DNA از نمونه‌های هرباریومی و یا نمونه‌های جمع‌آوری شده از محیط، از کیت آماده استخراج یعنی Qiagene DNeasy plant mini kit استفاده گردید. در جدول۲ نام پرایمرهای کلروپلاستی به‌کاررفته به همراه توالی آنها آورده شده است.

جدول۲: نام پرایمرهای کلروپلاستی به‌کاررفته به همراه توالی آن‌ها(٤١)

نام پرایمر	توالی '۳- '۵
trnL(UAG)	5’-CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT-3’
rpL32-F	5’-CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C-3’

PCR (Polymerase chain reaction)

برنامه PCR ، مطابق با جدول ۳ به دستگاه داده شد. به منظور اطمینان از وجود DNA تکثیر شده به منظور مشاهدهٔ فراورده-های حاصل از آن، یعنی بخشی از DNA تکثیر یافته، از روش الکتروفورز افقی یا ژل آگارز یک درصد استفاده گردید. جدول ۳ نشان دهنده برنامه PCR به کار رفته هنگام استفاده از پرایمرهای کلروپلاستی(rpl32-trnL) می‌باشد(۴۱).

جدول ۳: برنامه PCR به‌کار رفته هنگام استفاده از پرایمرهای کلروپلاستی (٤١).

نام مرحله	Preheating (واشرسته سازی اول)	Amplification (30 cycles) (تکثیر)			Final extention
		Denaturation (تقلیب)	Annealing (اتصال)	Extention (گسترش)	Final Extention
دما(درجه سانتیگراد)	۸۰	۹۵	۶۵	۶۵	۶۵
زمان (دقیقه)	۵	۱	۱	۴	۵
جمع زمان در مرحله	۵	۳۰×۶ = ۱۸۰			۵
۱۹۰ = ۵ + ۱۸۰ + ۵ (۳ ساعت، ۱۰ دقیقه)					

تعیین توالی DNA

پس از توالی‌یابی، گونه‌های مورد مطالعه، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Sequencher، توالی نوکلئوتیدها کاملاً بررسی شد، در صورت وجود فاصله و یا اشتباه با استفاده از توالی معکوس تصحیح گردید. جهت مقایسهٔ توالی به‌دست آمده با توالی‌های گونهٔ دیگر این جنس و نیز جنس‌های دیگر، از توالی‌های موجود در Gen Bank استفاده شد. در جدول ۴ نام گونه‌های غیر ایرانی مورد استفاده در آنالیز قطعات rpl32-trnL به همراه کد ژن بانک آورده شده است.

.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

جدول ۴: گونه‌های غیر ایرانی مورد استفاده در آنالیز قطعات rpl32-trnL به همراه کد ژن بانک

نام تاکسون	کد ژن بانک
Linaria aeruginea subsp. aeruginea	JN663396
Linaria albifrons	JQ814606
Linaria alpina	JN663403
Linaria amethystea subsp. amethystea	JN663405
Linaria anticaria	JN663409
Linaria arvensis	JN663418
Linaria badalii	JN663421
Linaria depauperata	JN663431
Linaria filicaulis	JN663436
Linaria flava	JQ814608
Linaria genistifolia	JF694124
Linaria genistifolia subsp. dalmatica	JQ814607
Linaria glacialis	KC625797
Linaria glauca	JN663440
Linaria haelava	JQ814610
Linaria joppensis	JQ814611
Linaria latycalyx	JN663454
Linaria loeselii	JQ814613
Linaria multicaulis subsp. heterophylla	JF694157
Linaria multicaulis subsp. galioides	JF694152
Linaria munbyana	JN663447
Linaria oblongifolia subsp. oblongifolia	JN663449
Linaria orbensis	JN663452
Linaria peloponnesiaca	JQ814616
Linaria polygalifolia subsp. polygalifolia	JN663457
Linaria saxatilis	JN663464
Linaria simplex	JN663477
Linaria spartea	JN663478
Linaria thibetica	JQ814618
Linaria triornithophora	JF694128
Linaria triphylla	JQ814619
Linaria tursica	JN663492
Linaria ventricosa	JQ814620
Antirrhinum graniticum	JF694120

آنالیز فیلوژنی

کروماتوگراف‌های حاصل از تعیین توالی DNA، با استفاده از نرم‌افزار Sequencher، ویرایش و سپس با استفاده از نرم‌افزار Mac Clade و Mesquite(version 2.74)، هم‌ردیف سازی شدند. ماتریس داده‌های هم‌ردیف سازی شده با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی (۱۶،۱۷)، و با استفاده از نرم‌افزار PAUP 4.0 و نیز با روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار MrBayes version 3.12 آنالیز شدند (۳۷، ۱۲).

در این تحقیق، آنالیز پارسیمونی روی داده‌های حاصل از تعیین ترادف قطعات rpl32-trnL متعلق به ۳۷ گونه *Linaria* ایرانی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

مورد مطالعه، به علاوه ۳۴ ترادف موجود در ژن‌بانک از گونه‌های غیر ایرانی هم‌چنین گونه *Antirrhinum graniticum* به عنوان برون‌گروه (مجموعا ۷۱ گونه) انجام گرفت.

آنالیز پارسیمونی با استفاده از برنامه PAUP (Version 4.0b10) انجام شد.۲۰۰۰۰تکرار با TBR branch swapping انجام شد. ماتریس داده ها شامل ۷۱ تاکسون و ۷۰۲ جایگاه بود. از این میان، ۴۸۵ جایگاه ثابت، ۱۰۹ جایگاه از نظر پارسیمونی غیراطلاعاتی و ۱۰۸ جایگاه باقی‌مانده از نظر پارسیمونی اطلاعاتی بودند.

بر اساس نتایج، درخت فیلوژنی توافقی به دست به طول ۷۹۰ گام دارای شاخص‌های آماری زیر بود:

شاخص ثبات (CI) = ۰/۶۴۹

شاخص پایداری (RI) = ۰/۸۹۳

شاخص هموپلاسی (HI) = ۰/۳۵۱

آنالیز بوت‌استراپ برای دست‌یابی به تخمین حمایتی شاخه‌ها در درخت فیلوژنی توافقی به‌دست آمده انجام گرفت. این آنالیز به روش مرحله‌ای سریع با ۲۰۰۰۰ تکرار انجام شد.

آنالیز Bayesian

در آنالیز Bayesian مجموعه داده‌های نوکلئوتیدی ناحیه rpl32-trnL با استفاده از نرم‌افراز MrBayesian انجام شد(۳۷). قبل از آن توالی‌های تصحیح شده با نرم‌افزار Sequencher، توسط نرم-افزار Mac clade، هم‌ردیف سازی و به منظور انتخاب بهترین مدل جانشینی از برنامه Modeltest (version:3.7) استفاده شد (۳۶).

پارامترهای بیشینه احتمال (ML) به صورت زیر به دست آمده است:

مدل انتخابی توسط نرم‌افزار (Model selected):TVM+G

مدل جانشینی (Substitution model):

میزان جانشینی A-C = ۱/۳۴۷۰

میزان جانشینی A-G = ۱/۷۹۴۰

میزان جانشینی A-T = ۰/۴۰۷۵

میزان جانشینی C-G =۱/۴۶۵۵

میزان جانشینی C-T =۱/۰۰۰۰

میزان جانشینی G-T =۱/۰۰۰۰

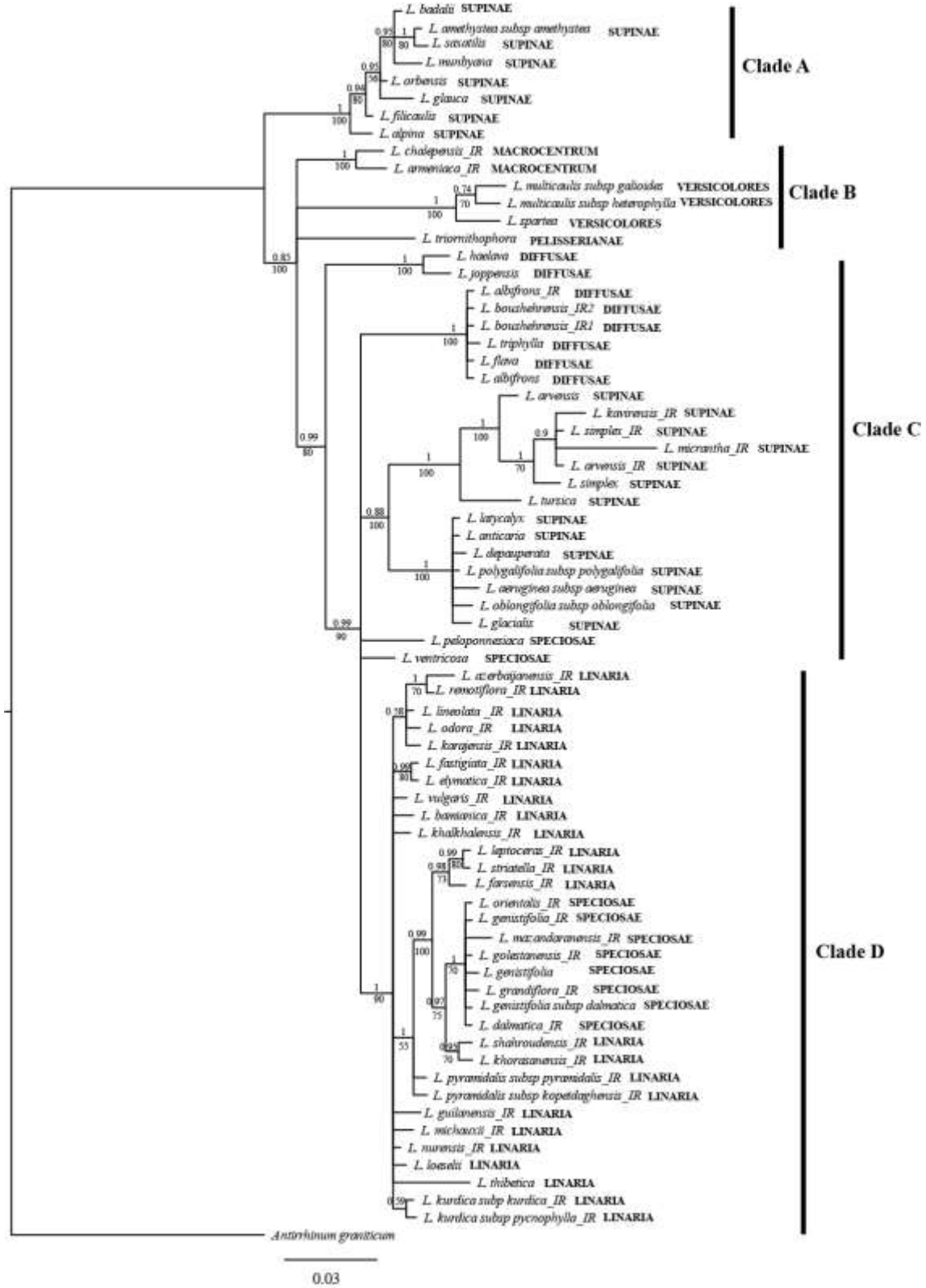
میزان جایگاهای غیرمتغیر(Proportion of invariable site)(I) : ۰/۲۷۳۶

پارامتر شکل پراکنش گاما (Gamma distribution shape parameter)(G): ۰/۸۵۲۴

سپس این پارامترها در نرم‌افزار MrBayes تنظیم شد. شاخه های با احتمال پسین برابر وبالاتر از ۰/۹۵ به عنوان شاخه‌هایی با حمایت بالا در نظر گرفته شدند. در این آنالیز *Antirrhinum graniticum* به عنوان برون‌گروه در نظر گرفته شده است که دارای احتمال پسین ۱/.. می‌باشد. این کلادوگرام دارای چندین گروه مونوفیلتیک است. در درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده-ها (شکل ۱)، ۴ شاخه اصلی مشخص می‌شود (شاخه های A، B، C و D). شاخه A با احتمال پسین ۱ و بوت استراپ ۱۰۰ از ۸ گونه *Linaria* غیر ایرانی از بخش *Supinae* تشکیل شده است. شاخه B با احتمال پسین ۰/۸۵ و بوت استراپ ۱۰۰ شامل بخش‌های *Macrocentrum*، *Versicolores* و *Pelisserianae* می‌باشد. دو گونه ایرانی *L. chalepensis* و *L. armenica* در *Macrocentrum* در این شاخه قرار دارند. از بخش *Pelisserianae* تاکنون گونه‌ای از ایران گزارش نشده است. شاخه C با احتمال پسین ۰/۹۹ و بوت استراپ ۸۰ شامل بخش-های *Diffusae*، *Supinae* و *Speciosae* می‌باشد. گونه‌های ایرانی *L. albifrons* و *L. bousherensis* از بخش *Diffusae* و *L. kavirensis*، *L. simplex*، *L. micrantha* و *L. arvensis* از بخش *Supinae* در این شاخه قرار دارند. تمامی گونه‌های بخش *Linaria* از جمله گونه‌های ایرانی این بخش هم‌چنین تمامی گونه‌های ایرانی بخش *Speciosae* در شاخه *D* با احتمال پسین ۰/۹۰ و بوت استراپ ۱ قرار دارند. درخت فیلوژنی حاصل نشان دهنده این است که گونه‌های با داشتن دانه‌های بال‌دار و بدون بال در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و شاخه‌های مجزایی را تشکیل نمی‌دهند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]



شکل۱- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ژنوم کلروپلاستی گونه‌های ایرانی جنس *Linaria* اعداد نوشته شده در زیر خطوط بیانگر بوت استراپ و اعداد نوشته شده بر روی خط نشان دهنده احتمال پسین است

بحث

روابط فیلوژنتیکی در میان جنس‌های قبیله Antirrhineae گزارش شده در اینجا با مطالعات Vargas بر روی نواحی مشابه DNA این طایفه مطابقت دارد. طبیعی بودن این جنس برای اولین بار توسط Vargas بر اساس گروه منوفیلی از هشت گونه از هفت بخش طبقه‌بندی Sutton که مورد حمایت قاطع بود پیشنهاد شد (۴۸). در فیلوژنی ژنوم کلروپلاستی همه گونه‌های *Linaria* در ایران به طور قاطع یک گروه منوفیلتیک را تشکیل

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

می‌دهند. منوفیلی *Linaria* هم‌چنین با توجه به تعداد کروموزوم‌های پایه x=6 و مجموعه‌ای از ویژگی‌های مورفولوژیکی از حضور ساقه‌های برگ‌های کامل بدون دمبرگ و دارای رگبرگ‌های شانه‌ای، گل آذین خوشه‌ای انتهایی دارای براکته و گل‌های مهمیزدار طور قاطع تأیید می‌شود (۴۴،۴۷). فرضیه Viano در مورد تکامل *Linaria* براساس دو شاخه بودن گونه‌های *Linaria* در دو گروه خواهری طبیعی با گونه‌های دارای دانه‌های بالدار و بدون بال (۵۰، ۴۹) توسط نتایج حاصل از تحقیق ما در ایران رد شد. بخش‌های *Macrocentrum* و *Versicolores* تشکیل گروه‌های منوفیلتیک می‌دهند. در مقابل بخش‌های *Diffusae*، *Speciosae*، *Linaria* و *Supinae* گروه-های منوفیلتیک حمایت شده‌ای تشکیل نمی‌دهند. بخش *Macrocentrum* از دو گونه *L. chalepensis* و *L. armeniaca* تشکیل شده است که ویژگی‌های غیر عادی از خود نشان می-دهند که در داخل *Linaria* منحصر به فرد و یا کمیاب هستند و همین امر منجر شد Sutton آن‌ها را از بخش *Versicolores* جایی که قبلاً توسط Bentham به آن تعلق گرفته بودند، جدا کند (۴۴، ۵). اول از همه در این دو گونه لوب سربالای کاسه گل کوتاه تر از چهار لوب رو به پایین است. این ویژگی در جایی دیگر از *Linaria* دیده نمی‌شود. دوم: زائده کوچک جانبی که در قاعده هر میله وجود پرچمی دارد که در درون *Antirrhineae* منحصر به فرد است. مرفولوژی واضح و مشخص بخش *Versicolores* همان‌طوری که توسط Sutton معین شده است بر اساس صفات پیشرفته مشترک مرفولوژیکی است که در هیچ جای دیگری از جنس‌ها و یا قبیله‌های دیگر مشاهده نمی‌شود (۴۳). این ویژگی شامل خامه منشعب با فضای کلاله‌ای مجزا می‌باشد. خامه منقسم به طور آشکاری در اکثر گونه‌های این بخش دیده می‌شود. هر دو بخش به طور آشکار منوفیلتیک هستند و این ویژگی با فیلوژنی کلروپلاستی گذشته مطابقت دارد (۱۳). طبیعی بودن بخش *Versicolores* به وسیله الگوهای رشد و توسعه گیاهچه مورد تأیید و حمایت است (۹). برخلاف بخش‌های *Macrocentrum* و *Versicolores* چهار بخش باقی مانده از *Linaria* در آنالیزهای ما به عنوان منوفیلتیک مشخص نشدند. علی‌رغم تفاوت‌های بارز و مشخص در شکل دانه‌ها، Sutton در سال ۱۹۸۸ نشان داد که روابط مرفولوژیکی نزدیکی بین گونه‌های هر دو بخش *Linaria* و *Speciosae* بر اساس شکل رویشی چند ساله، ساقه‌های راست و مستقیم، برگ‌های مشابه و مرفولوژی گل و کپسول وجود دارد. گونه‌های بخش *Diffusae* دارای دانه‌های بدون بال ، لوب بالایی کاهش یافته کاسه گل و خامه غیر منقسم هستند. این ویژگی‌ها با بخش *Speciosae* مشترک است، در حقیقت بخش *Diffusae* و *Speciosae* به طور آشکاری با یکدیگر متفاوت نیستند. اگرچه در *Diffusae* شکل رویشی یکساله است و ساقه‌های زایا بر روی زمین خوابیده یا صعودی هستند اما در *Speciosae* شکل رویشی چند ساله است و معمولاً دارای ساقه‌های زایای ایستاده هستند. طبیعی بودن بخش *Diffusae* توسط Valde´s و Sutton مورد سوال و تردید بوده است. Valde´sبرای اولین بار پیشنهاد کرد که احتمالاً این بخش پارافیلتیک است درحالی که Sutton ملاحظه کرد که این بخش از گروه‌های هتروژن تشکیل شده است که باید در دیگر بخش‌ها تجدید حدود شود و محدوده آنها دوباره تعیین شود (۳،۱۳،۴۴،۴۷). طبیعی‌بودن بخش *Supinae* به طور قوی با مطالعات اخیرکه براساس ترکیب توالی ژنوم کلروپلاستی و هسته‌ای می‌باشد، تأیید شده است (۶).

نتیجه‌گیری

فیلوژنی مولکولی ژنوم کلروپلاستی گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نخستین دیدگاه فیلوژنتیکی درباره تکامل و سیستماتیک جنس *Linaria* در ایران را فراهم می‌کند. منوفیلی گونه‌های *Linaria* در این تحقیق حمایت می‌شود. اساس جدایی بین گونه‌های دارای دانه‌های بال‌دار و بدون بال به طور قاطع و آشکار حمایت نمی‌شود که دلیلی بر هموپلاسی بودن این صفت است. در پایان لازم به ذکر است که مارکرهای مولکولی و آنالیزهای بیشتری بر روی تعداد نمونه‌های بیشتری از گونه‌های *Linaria* برای ایجاد فهم دقیق روابط تکاملی این جنس مورد احتیاج است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاری متصدی هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تشکر می‌کنند.

منابع

۱. حمدی م م. بررسی بیوسیستماتیک جنس *Linaria* (Scrophulariaceae) در ایران. رساله دکتری، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۱۳۸۴.

۲. حمدی م م، اسدی م. جنس *Linaria* در فلور ایران، شماره ۶۸. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران. ۱۳۹۰.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

3. Albach DC, Meudt HM, Oxelman B. Piecing Together the ‘‘New’’ Plantaginaceae. Am J Bot, 2005; 92:297–315.
4. Beninger CW, Cloutier RR, Grodzinski B. A Comparison of Antirrhinoside Distribution in the Organs of Two Related Plantaginaceae Species with Different Reproductive Strategies. J Chem Ecol, 2009; 35:1363–1372.
5. Bentham G. Scrophulariaceae. in A De Candolle, ed. Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis. Sumptibus Victoris Masson, Paris ,1846;10:186–598
6. Blanco-Pastor JL, Vargas P, Pfeil BE. Coalescent Simulations Reveal Hybridization and Incomplete Lineage Sorting in Mediterranean *Linaria*. Plos One, 2012; 7:e39089.
7. Boissier E Flora orientalis, AH Georg, Geneva, 1879; 4.
8. Box MS, Dodsworth S, Rudall PJ, Bateman RM, Glover BJ. Characterization of Linaria Knox Genes Suggests a Role in Petal-Spur Development. Plant J, 2011; 68:703–714.
9. Champagnat M. Recherches de Morphologie Descriptive et Expe´rimentale Sur leGenre *Linaria*. Ann Sci Nat Bot Biol,1961;12: 1–170.
10. Chavannes E. Monographie Des Antirrhine´es. C Treuttle etWu¨ rtz, Paris, 1833.
11. Cubas P, Vincent C, Coen E. An Epigenetic Mutation Responsible for Natural Variation in Floral Symmetry. Nature, 1999; 401: 157–161.
12. Douzery EJP, Pridgeon AM, Kores P, Linder H P, Kurzwell H, Chase MW. Molecular Phylogenetics of Diseae (Orchidaceae): A Contribution From Nuclear Ribosomal ITS Sequences. Am J Bot,1999; 86(6): 887–899.
13. Ferna´ndez-Mazuecos M, Blanco-Pastor JL, Vargas P. A Phylogeny of Toadflaxes (*Linaria* Mill.) Based on Nuclear Internal Transcribed Spacer Sequences: Systematic and Evolutionary Consequences. Int J Plant Sci, 2013; 174(2):234–249.
14. Ferna´ ndez-Mazuecos M, Vargas P. Historical Isolation Versus Recent Long-Distance Connections Between Europe and Africa in Bifid Toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). PLoS ONE, 2011; 6:e22234.
15. Galego L, Almeida J. Molecular Genetic Basis of Flower Colour Variegation in Linaria. Genet Res, 2007; 89:129–134.
16. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML, 2010; 3.0. SystbBiol 59:307–321.
17. Guindon S, Gascuel O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies By Maximum Likelihood. Syst Biol, 2003; 52:696–704.
18. Hamdi SMM, Assadi M, Fallahian F, Maassoumi AA. A New Species of the Genus *Linaria* (Scrophulariaceae) from Iran. Iran J Bot, 2005a; 11: 79–83.
19. Hamdi SMM, Fallahian F, Assadi M, Maassoumi AA. *Linaria khorasanensis* (Scrophulariaceae), A New Species from Iran. *Willdenowia* , 2005b; 35: 299–304.
20. Hamdi SMM, Assadi M, Fallahian F , Maasoumi AA. *Linaria mazandaranensis* and *Linaria golestanensis* (Scrophulariaceae), Two New Species from Iran. Iran J Bot, 2006; 11 (2): 251- 258.
21. Hamdi SMM, Assadi M, Nejadsatari. *Linaria farsensis*, A New Species of Linaria Sect. *Linaria* (Scrophulariaceae) from Iran. Bot Stud T, 2007a; 48 (2):233-237.
22. Hamdi SMM, Assadi M, Zare Sh, Aghbeigi F. *Linaria guilanensis*, A New Species of *Linaria* Sect. *Linaria* (Scrophulariaceae) from Iran. Feddes Reportorium , 2007b; 117 (6): 501-508.
23. Hamdi SMM, Assadi M. A New Subspecies and A Record of *Linaria* (Scrophulariaceae) from Iran. Iran J Bot, 2007c; 13 (1).
24. Hamdi SMM, Assadi M, Maasoumi AA, Attar F, Jouharchi MR. *Linaria kavirensis* (Scrophulariaceae-Antirrhineae), ANew Species from Iran. Ann Bot Fennici, 2008a; 45: 74-79.
25. Hamdi SMM, Assadi M, Maasoumi AA. A New Species of Linaria Sect *Diffusae* (Scrophulariaceae) from Iran. Iran J Bot, 2008b; 14 (1).
26. Hamdi SMM, Assadi M, Maasoumi AA. Two New Species of *Linaria* Section *Linaria* (Scrophulariaceae-Antirrhineae) from Iran. Bot J Lin Soc, 2008c; 158, 734–742.
27. Hamdi SMM, Assadi M, Maasoumi AA (2009) *Linaria khalkhalensis* (*Linaria* sect. *Linaria*, Scrophulariaceae), A New Species from Iran. Kew Bull 64: 339–344
28. Hilu KW, Borsch T, M¨uller K, Soltis DE, Soltis PS, *et al.* Angiosperm Phylogeny Based on *matK* Sequence Information. *American Journal of Botany*, 2003; **90**, 1758–1776.
29. Holmgren PK, Holmgren NH. (continuously updated): Index Herbariorum, 2006; Visited Available at http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbarium.asp

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]

30. Hong DY. The Distribution of the Scrophulariaceae in the Holarctic with Special Reference to the Floristic Relationships between Eastern Asia and Eastern North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* ,1983; 70: 701–712.
31. Linnaeus C. Species Plantarum.Impensis Laurentii Salvii, Stockholm, 1753; 2.
32. Miller P. The Gardeners Dictionary. J Rivington and J Rivington London, 1754; 4th ed. 2.
33. Morison R. Plantarum Historiae Universalis Oxoniensis. E Theatro Sheldoniano, Oxford, 1680; 2.
34. Olmstead RG, dePamphilis CW, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA. Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*, 2001; 88, 348–361.
35. Parsa A : Scrophulariaceae Flora de lIran. Tehran,1949; 4:320-460.
36. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol Biol Evol, 2008; 25:1253–1256.
37. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. Bioinformatics, 2003;19: 1572–1574.
38. Rothmaler W. Zur Gliederung der Antirrhineae. Feddes Repert,1943; 52:16–39.
39. Sa´ez L, Bernal M. Linaria Mill in S Castroviejo, A Herrero, C Benedı´, E Rico, J Gu¨ emes, eds. Flora iberica, Madrid ,2009; 13:232–324 CSIC.
40. Sa´nchez-Lafuente AM, Rodrı´guez-Girone´s MA, Parra R. Interaction Frequency and Per-Interaction Effects as Predictors of Total Effects in Plant-Pollinator Mutualisms: A Case Study with the Self-Incompatible Herb *Linaria lilacina*. Oecologia, 2011; 168:153–165.
41. Shaw J, Edgar B, Lickey E, Schilling E, Randall L. Comparison of Whole Chloroplast Genome Sequences to Choose Noncoding Regions for Phylogenetic Studies in Angiosperms: The Tortoise and the Hare III. American Journal of Botany, 2007: 94(3): 275–288.
42. Sing SE, Peterson RKD. Assessing Environmental Risks for Established Invasive Weeds: Dalmatian (*Linaria dalmatica*) and Yellow (*L. vulgaris*) Toadflax in North America. Int J Environ Res Public Health, 2011; 8:2828–2853.
43. Sutton DA. A New Section of Linaria (Scrophulariaceae: Antirrhineae). Bot J Linn Soc, 1980; 81:169–184.
44. Sutton DA. A Revision of the Tribe Antirrhineae. Oxford University Press, Oxford. Tournefort JP 1700 Institutiones rei Herbariae. E Typographia Regia, Paris,1988.
45. Timme R, Kuehl EJ, Boore JL, Jansen RK. A Comparative Analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae)Plastid Genomes: Identification of Divergent Regions and Categorization of Shared Repeats. American Journal of Botany, 2007; 94: 302–313.
46. Tournefort JP. Institutiones rei Herbariae. E Typographia Regia, Paris,1700.
47. Valde´s B. Revisio´n de las Especies Europeas de Linaria Con Semillas Aladas. An Univ Hipalense,1970; 7:1–288.
48. Vargas P, Rossello´ JA, Oyama R, Gu¨emes J. Molecular Evidence for Naturalness of Genera in the Tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae) and Three Independent Evolutionary Lineages from the New World and the Old. Plant Syst Evol, 2004; 249:151–172.
49. Viano J. Les Linaires a` graines apte`res Du Bassin Me´diterrane´en Occidental. 1. Linaria sect. Versicolores. Candollea ,1978a; 33:33–88.
50. Viano J. Les Linaires a` graines apte`res du Bassin me´diterrane´en Occidental. 2. Linaria sect. Elegantes, Bipunctatae, Diffusae, Speciosae, Repentes. Candollea ,1978b; 33:209–267.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.12.6]