

فیلوژنی مولکولی و تایید گروه *Alpestris* در جنس *Myosotis* L. بر اساس ترکیب داده‌های هسته‌ای و کلروپلاستی

مریم خوش سخن مظفر^{*}، شاهرخ کاظم‌پور اوصالو^۲، محبوبه شرافتی^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۰۹

تاریخ تصویب: ۹۴/۰۸/۲۰

چکیده

جنس *Myosotis* دارای پانزده گونه در ایران است و ویژگی تشخیصی آن میوه صاف، سیاه و براق می‌باشد. به منظور نشان دادن موقعیت فیلوژنتیکی *Myosotis* ۴ گونه از آن به همراه گونه‌هایی از قبیله *Cynoglosseae* s. lat. با استفاده از مارکر کلروپلاستی *rpl32-trnL* و همچنین توالی ترکیبی *cpDNA r-132-trnL* به دو روش پارسیمونی و بایسین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج، تک تباری جنس *Myosotis* را تایید نمود. همچنین نشان داده شد دوزیر جنس *Myosotis* و *Strophostoma* بخشه‌های *Exarrhena* و *Myosotis* و گونه‌های یکساله تک تبار نیستند. در کلادوگرام حاصل از توالی کلروپلاستی *rpl32-trnL* تنها گروه‌های E، C و F تک تبارند، اما داده‌های

*۱ استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران (نویسنده مسئول m.khoshm@gmail.com)

۲ استاد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳ دانشجوی دکتری گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

ترکیبی تک تباری شش گروه A، B، C، D، E و F را نشان داد. گروه F با داشتن ویژگی‌های تشخیصی متعدد، گروهی است که بر اساس تمام توالی‌ها و روش‌های آنالیزی تک تبار بود. این گروه با چهار گونه‌ی *M. asiatica*، *M. alpestris*، *M. suave-* *M. lithospermifolia* و *M. lithospermifolia* در فلور ایران، با نام *Alpestris* به عنوان گروهی مجزا و تک تبار معرفی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: توالی *Myosotis*، cpDNA rpl32-trnLUAG،

فیلوژنی مولکولی، گاوزبانیان، گروه *Alpestris*

مقدمه

al. (2013)

برای جنس *Myosotis* در ایران تاکنون ۱۵ گونه شناسایی شده است، Khatamsaz (2002). گونه‌های *M. lithospermifolia* (Willd) Hornem, *M. ceaspitosa* Schulz, *palustris* L., *M. Riedl*, *M. anomala*, *M. alpestris* Schmidt, *M. Asiatica* Schizchik & Serg, *M. Olympica* Boiss. و *Ehrh. Ex Hoffm M. sylvatica* دو یا چند ساله‌اند و باقی گونه‌ها یکساله هستند. تقسیمات فرعی این جنس در فلور ایرانیکا Khatamsaz (1967) و فلور ایران Khatamsaz (2002) شامل دو زیرجنس *Myosotis* و *Strophiostruma* (Turez.) M. Pop. می‌باشد که وجه تمایز آن‌ها در نوع گل‌آذین و وجود یا فقدان زایده در محل ناف فندقه می‌باشد. زیر جنس *Myosotis* دارای سه سری به نام‌های *Palustres*, *Sylvatica* و *Arvenses* M. Pop. می‌باشد که هر سری چند گونه را شامل می‌شوند. زیرجنس *Strophiostruma* شامل چهار گونه، *M. Pseudopropinqua* M. Pop., *M. anomala* M., *M. Sparsiflora* Mikan in Hoppe و *M. Propinqua* Fisch. & Mey است و بقیه مربوط به زیر جنس *Myosotis* هستند. همچنین در فلور روسیه هم دو زیر جنس *Strophiostruma* و *Eumyosotis* DC معرفی شده است (Popov (1953).

Myosotis L. متعلق به خانواده‌ی گاوزبان می‌باشد. این جنس با داشتن میوه‌های صاف، سیاه و براق از بقیه‌ی جنس‌های این خانواده قابل تشخیص است Khatamsaz (2002). این جنس دارای ۱۰۰ گونه است و در طبقه بندی‌های مختلف در تبارهای متفاوت قرار گرفته است. در فلورهای منطقه‌ای از جمله فلور ایران جنس *Myosotis* جزء قبیله *Eritrichieae* می‌باشد (Khatamsaz (2002). ولی در فلور ایرانیکا (Riedl (1967) و فلور شوروی سابق (Popov (1953) و بر اساس تحقیقات Langstrom & Chase (2002) این جنس در قبیله *Myosotideae* قرار گرفته است. هر چند از نظر داشتن عدد پایه کروموزمی ۱۲، به تعدادی از اعضای قبیله *Eritrichieae* نزدیک است ولی به دلیل وجود فندقه‌های صاف و بدون تزئینات و دانه گرده با ۸ شیار ناجور (Khatamsaz, (2001)، همچنین با توجه به داده‌های مولکولی، قبیله *Myosotideae* تنها با جنس *Myosotis* با داشتن میوه صاف و بدون تزئینات گروهی تک تبار را تشکیل می‌دهد. Khoshokhan et al. (2013) طبق آخرین مطالعات مولکولی نشان داده شد که ۳ قبیله *Eritrichieae* *Myosotideae* و *Trigonotideae* جزئی از قبیله *Cynoglosseae* s. lat. هستند (Weigend et al. (2010), Khoshokhan et

از طرفی دیگر Grau و نویسنندگان دیگر (۱۹۸۲) بر اساس مطالعه‌شان روی مورفولوژی گرده و خصوصیات میکروسکوپی استیگما و جام گل در طبقه‌بندی *Myosotis* تجدیدنظر نمودند. آنها پیشنهاد کردند این جنس به دو بخشه *Exarrhena* و *Myosotis* تقسیم می‌شود که مرکز تنوع *Myosotis* در نیمکره شمالی و *Exarrhena* در نیمکره جنوبی است. در بین نمونه‌های بررسی شده در این پژوهش تنها *M. discolor* Pers. متعلق به بخشه‌ی *Exarrhena* وارد شده است (جدول ۱).

این مطالعه چند هدف را دنبال می‌کند: (۱) تعیین تک تباری واحدهای زیرجنسی، بخشه‌ای و همچنین تک تباری گونه‌های یکساله جنس *Myosotis* بر اساس توالی کلروپلاستی *rpl32-trnL* و داده‌های ترکیبی هسته‌ای و کلروپلاستی، (۲) بررسی تک تباری گروه‌های A تا F در این جنس و (۳) تعیین تک تباری گروه *Alpestris*.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری تاکسون‌ها

۱۵ نمونه (مربوط به ۱۴ گونه) از جنس *Myosotis* به همراه هفت گونه‌ی دیگر از *Cynoglosseae* s. lat.، در تحقیق حاضر بررسی شدند (جدول ۱). دو گونه-*Para-caryum leptophyllum* (DC.) Boiss و *Cynoglossum officinale* L. برون گروه انتخاب شدند (Khoshokhan et al., 2008 a, b و شرافتی ۲۰۱۴). نمونه‌ها از مناطق رویشی جمع‌آوری شده و در

در مطالعات مولکولی که تاکنون در مورد جنس *Myosotis* انجام شده است Winkworth و همکارانش در سال ۲۰۰۲، ۳۴ گونه از این جنس متعلق به آفریقا، اروپا، آمریکا و نیوزلند را مورد بررسی قرار داده و بر اساس توالی هسته‌ای ITS و سه توالی کلروپلاستی *matK*، *ndhF* و *trnK-psbA*، پنج گروه A، B، C، D، E و F را در این جنس مشخص کردند، همچنین شرافتی و همکاران در سال ۱۳۹۳ در پژوهشی که بر روی گونه‌های ایرانی و برخی گونه‌های غیرایرانی، باگسترده‌ی محدودتر، با استفاده از توالی هسته‌ای ITS انجام دادند، گروه‌های فوق را تایید نمودند و نشان دادند گونه‌های یکساله و چندساله، همچنین واحدهای بخشه‌ای تک تبار نیستند اما واحدهای زیرجنسی حمایت می‌گردند. در این پژوهش به منظور بررسی و بازسازی تاریخچه تکاملی جنس *Myosotis* از توالی

هرباریوم دانشگاه تربیت مدرس نگهداری موسسه جنگل‌ها و مراتع و پژوهشکده گیاهی شدند. همچنین از نمونه‌های هرباریومی دانشگاه فردوسی مشهد استفاده گردید

جدول ۱: لیست تاکسون‌های مورد بررسی، محل جمع آوری و شماره هرباریومی

نام تاکسون	محل جمع آوری و جمع آوری کننده	محل نگهداری و شماره هرباریومی	زیرجنس (Riedl ۱۹۶۷, Khatamsaz ۲۰۰۲)	بخشه (Grau & Schwab ۱۹۸۲)	فرم رویشی (یک یا چند ساله)
<i>M. ramosissima</i> Rochel. ex Schultes	گرگان، پارک جنگلی به جنوب تنگه راه ۵۵۰ متری، وندلیو، فروغی	TARI ۱۱۰۳۳	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	یک ساله
<i>M. lithospermifolia</i> (Willd.) Hornem.	آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، بخش غربی کلیدی، ۲۴۰۰ متر، اسدی و معصومی	TARI ۲۰۲۱۸	<i>Strophios- ma</i>	<i>Myosotis</i>	دو یا چند ساله
<i>M. lithospermifolia</i> (Willd.) Hornem.	آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، کوه‌های کلان، ۲۵۵۰-۲۴۷۰ متری، جمزاد و همکاران	TARI ۷۰۳۸۲	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	دو یا چند ساله
<i>M. anomala</i> Riedl.	آذربایجان، اردبیل به خلخال، دریاچه نور، ۲۴۵۰ متری، جمزاد و همکاران	TARI ۷۰۴۸۸	<i>Strophios- ma</i>	<i>Myosotis</i>	دو یا چند ساله
<i>M. sparsiflora</i> Mikan.	مازندران، جنوب رامسر، غرب جواهر ده، ۱۸۰۰ متری، رونه مارک و معصومی	TARI ۲۰۷۷۸	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	یک ساله
<i>M. refracta</i> Boiss.	خراسان، ۴۵ کیلومتری شمال شیروان، منطقه حفاظت شده گولول سرانی، ۲۳۰۰-۱۶۰۰ متر، اسدی و معصومی	TARI ۵۰۵۰۷	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	یک ساله
<i>M. stricta</i> Link.	تهران، منطقه حفاظت شده کویر، بخش شرقی سیاه کوه، ۱۳۰۰ متر، رونه مارک و همکاران	TARI ۱۹۴۸۸	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	یک ساله
<i>M. alpestris</i> Schmidt	آذربایجان، غرب رضائیه، تپه های غرب روستای سیلوانا، ۱۸۰۰-۱۵۵۰ متر، رونه مارک و فروغی	TARI ۱۹۵۹۲	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	دو یا چند ساله

دو یا چند ساله	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	TARI ۵۱۲۱۲	مازندران، ۴۰ کیلومتری جنوب رامسر، شیب جنوبی کوه خسته چال، ۳۶۰۰-۲۹۰۰ متر، اسدی و معصومی	<i>M. olympica</i> Boiss.
دو یا چند ساله	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	TARI ۶۹۲۳۳	مازندران، سیاه بیشه، ۲۰۵۰ متری، خاتم ساز و رحمان پور	<i>M. asiatica</i> Schizchk. & Serg.
دو یا چند ساله	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	TARI ۳۲۹۷۸	تهران، ۲۴ کیلومتر از کندوان به جاده هراز، ۳۱۰۰ متر، اسدی و مظفریان	<i>M. sylvatica</i> Ehrh. ex Hoffm.
یک ساله	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	TARI ۲۵۵۹۹	کرمانشاه	<i>M. koelzii</i> Riedl, Oster. Bot
دو یا چند ساله	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	TARI ۲۰۷۴۹	مازندران، جنوب غربی رامسر، شرق جواهر ده، ۱۸۰۰ متر، رونه مارک و معصومی	<i>M. palustris</i> L.
یک ساله	<i>Exarrhena</i>	<i>Myosotis</i>	TARI	پاکستان	<i>M. discolor</i> Pers.
یک ساله	<i>Myosotis</i>	<i>Myosotis</i>	TARI ۷۵۸	پاکستان	<i>M. suaveolens</i> Waldst. Et Kit
-	-	-	TMUPC	کاظم پوراوصالو ۲۰۰۷	<i>Heterocaryum szvitsianum</i> Fisch. & Mey.
-	-	-	TMUPC	کاظم پوراوصالو ۲۰۰۷	<i>Lappula sinaica</i> DC.
-	-	-	TARI ۳۲۷	آذربایجان، ارومیه، سیلوانا، بردوس و صیامی	<i>Paracaryum leptophyllum</i> (DC.) Boiss.
-	-	-	FUMH ۵۷۱۹۵	۲۲۰۰ متر، چهارمحال بختیاری، بروجن، مظفریان	<i>Trichodesma aucheri</i> DC.
-	-	-	TARI ۷۳۵۲۶	مازندران، پل سفید، جنگل بالای روستای سنگده، ۲۵۰۰-۱۵۰۰ متر، اسدی	<i>Cynoglossum officinale</i> L.
-	-	-	TMUPC TARI	کاظم پوراوصالو ۲۰۰۷	<i>Asperugo perocumbens</i> L.

استفاده از نرم افزار BioEdit v.7.0.9.0 (جدول ۱). شناسایی نمونه‌ها با استفاده از منابع مختلف (Riedl (1967), Popov (1953), Khatamsaz (2002) صورت گرفت.

استخراج، تکثیر و توالی یابی DNA

استخراج DNA کل از سلول‌های برگ نمونه‌های هرباریومی صورت گرفت. استخراج به روش Doyle & Doyle (1987) همراه با کمی تغییر و افزودن استات آمونیوم انجام گرفت. از استات آمونیوم جهت حذف متابولیت‌های ثانویه استفاده شد. به منظور تکثیر توالی cpDNA rpl32-trnLUAG از آغازگرهای (trnL(UAG) ('CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT3'5) و (rpl-32' CAGTTCCAAAAAAA) و (CGTACTTC3'5) استفاده گردید (Show et al. 2005). برنامه PCR به این صورت بود: واسرشتگی اولیه 94°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشتگی ثانویه 94°C به مدت یک دقیقه، اتصال 53°C به مدت یک دقیقه، بسط اولیه 72°C به مدت ۲:۳۰ دقیقه و بسط نهایی 72°C به مدت ۷ دقیقه. بعد از حصول اطمینان از صحت PCR و تکثیر قطعه مورد نظر تک باندهای قوی (۲۰ نانوگرم) و فاقد باند اضافی و کشیدگی به منظور تعیین توالی از طریق شرکت پیشگام به کشور کره ارسال شد و توسط شرکت Macrogen تعیین توالی گردید.

آنالیز فیلوژنی

کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی با

استفاده از نرم افزار BioEdit v.7.0.9.0 (Hall, (1999) مشاهده شدند و به صورت قالب فستا (Fasta) در آمدند. توالی‌های مورد نظر با فرم فستا توسط برنامه Clustal Larkin et al. (2007) و نرم افزار Muscle V. 4.0 Edgar (2004) هم‌ردیف سازی شدند و نقاط مبهم نیز به صورت چشمی تنظیم گردیدند. داده‌های هم‌ردیف سازی شده موجود در ماتریس، به روش بیشینه صرفه جویی (Maximum Parsimony) با استفاده از نرم افزار Swofford (2003) PAUP* 4.b10 و نرم افزار Mrbayes V. (2002) مورد بررسی قرار گرفتند.

روش صرفه جویی حداکثر Maximum Parsimony

برای آنالیز داده‌ها، از جست و جوی ابتکاری (Heuristic search) و روش تبادل شاخه‌ای (Swapping)، دو نیمه سازی درخت و اتصال مجدد شاخه‌ها Tree Bisection Reconnection (TBR) و گزینه چندین درخت (MULTrees) با ۱۰۰ تکرار از Random additionsequences و MaxTrees = 20000 (بیشینه درختان ذخیره شده) استفاده گردید.

برای تعیین حدود اطمینان کلادها در درخت مطلق مرکزی (Strict Consensus) حاصل

توالی کلروپلاستی *rpl32-trnLUAG* با استفاده از مدل *F81+G* و داده‌های ترکیبی دو توالی هسته‌ای و کلروپلاستی با استفاده از مدل *GTR+I+G* آنالیز شدند. برنامه *MrBayes version 3.12 Ronquist & Huelsenbeck (2003)* برای آنالیزهای فیلوژنتیکی *Bayesian* استفاده شد. احتمالات ثانویه بر روی پارامترهای مدل از داده‌ها با استفاده از پیش فرض‌های اولیه برآورد شدند. آنالیز در ۵ میلیون نسل تکرار شد. ۴ زنجیره مارکوف مونته کارلو (*MCMC*) در یک زمان از یک درخت به طور تصادفی شروع به کار کرد. یک درخت را در هر ۱۰۰ نسل نمونه برداری کرد. درختان نمونه برداری شده بعد از رسیدن به فاز خطی (بعد از ۵۰۰۰۰۰ نسل یا ۵۰۰۰ نمونه) جمع آوری شدند و برای ایجاد یک درخت توافقی با بیشینه ۵۰٪، همراه با ارزشهای احتمال ثانویه با استفاده از *Treeview (Page 1996)* استفاده شدند.

نتایج

داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *rpl32-trnL* ماتریس همردیف سازی شده توالی کلروپلاستی *rpl32-trnL* مربوط به ۲۲ تاکسون مورد آنالیز، ماتریسی به طول ۱۰۶۹ جایگاه نوکلئوتیدی ایجاد کرد. از میان نوکلئوتیدهای آنالیز شده، ۱۲۸ جایگاه به لحاظ پارسیمونی،

از هر یک از آنالیزهای مذکور، آنالیز *Bootstrap (1985) Felsenstein* با روش جستجوی ابتکاری و انتخاب گزینه‌های *Simple addition sequences* و *TBR* و با انتخاب گزینه *off* برای *MULTREES*، انجام شد. تعداد تکرارها در تمامی آنالیزهای *Bootstrapping*، ۲۰۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد. بیشینه‌ی درختان ذخیره شده به ازای هر تکرار در تمامی موارد ۱۰۰ درخت انتخاب شد.

تعیین شاخص‌های آماری

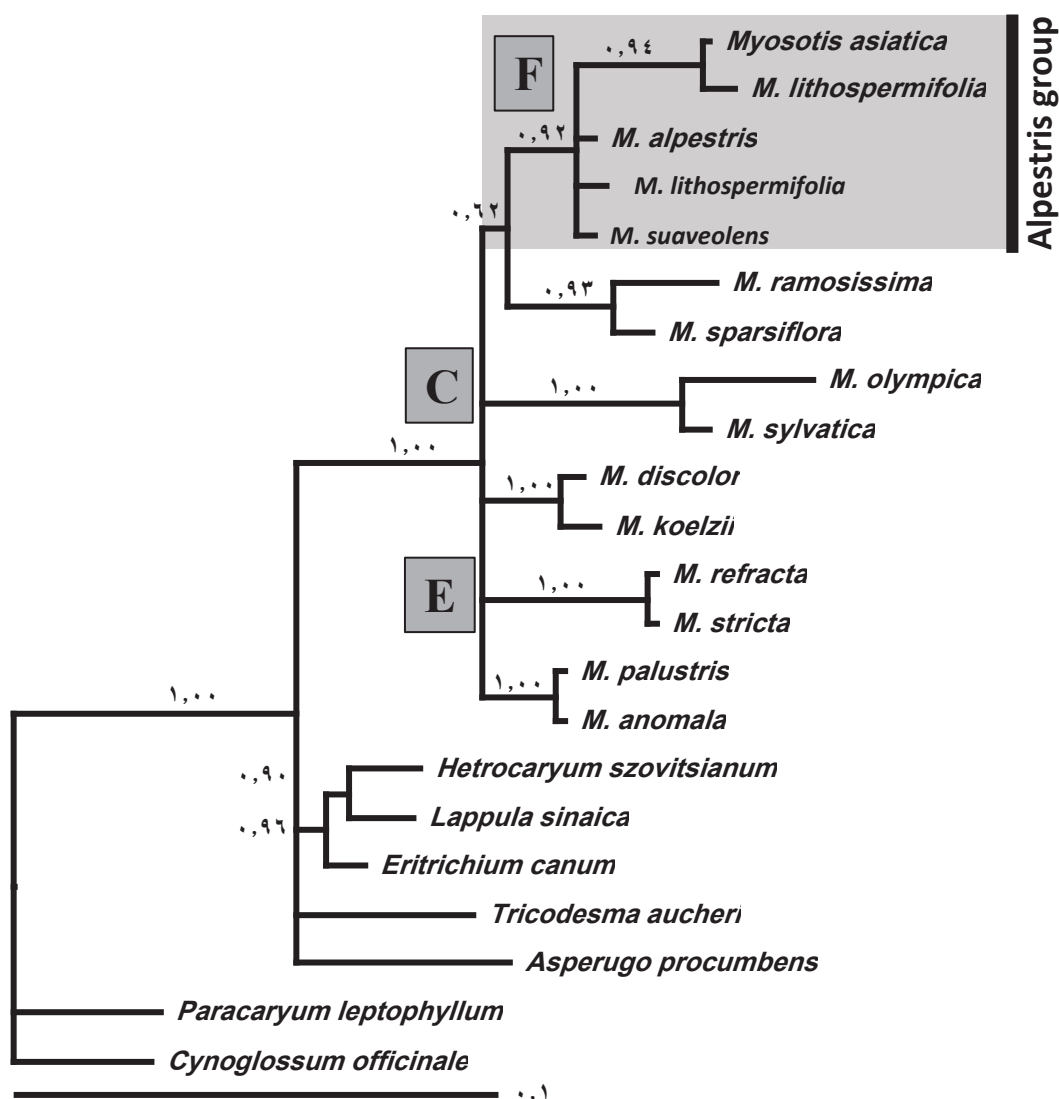
تعیین شاخص *RC (rescaled consistency index)* (شاخص پایداری *consistency index*) و *CI* (شاخص گروه‌پذیری *retention index= RI*) با استفاده از دستور *pscores all/ ci=yes ri=yes rc=yes* در نرم افزار *PAUP* 4.b10 Swofford (2002)* انجام شد.

روش Bayesian

این روش بر مدل‌های تکاملی متمرکز شده و تمامی مکان‌های جاننشینی را بررسی می‌کند. برای آنالیز داده‌های حاصل، مدل‌های تکاملی با استفاده از برنامه *MrModeltest (Nylander 2004) version 2.3*، اجرا شده در *MrMTgui (Nuin 2005)* بر اساس معیار اطلاعاتی *Akaike (AIC) (Posada & Buckley 2004)* انتخاب شدند. داده‌های

اطلاعاتی یا informative و ۹۴۱ جایگاه غیر اطلاعاتی یا uninformative بودند. آنالیز ماکزیمم پارسیمونی منجر به تولید شش کوتاهترین درخت شد که درخت توافقی آنها ۱۹۱ گام طول داشت و شاخص‌های آماری آن $CI = 0.759$ (شاخص پایداری (Consistency Index) و $RI = 0.816$ (شاخص نگهداری (Retention Index) می‌باشد.

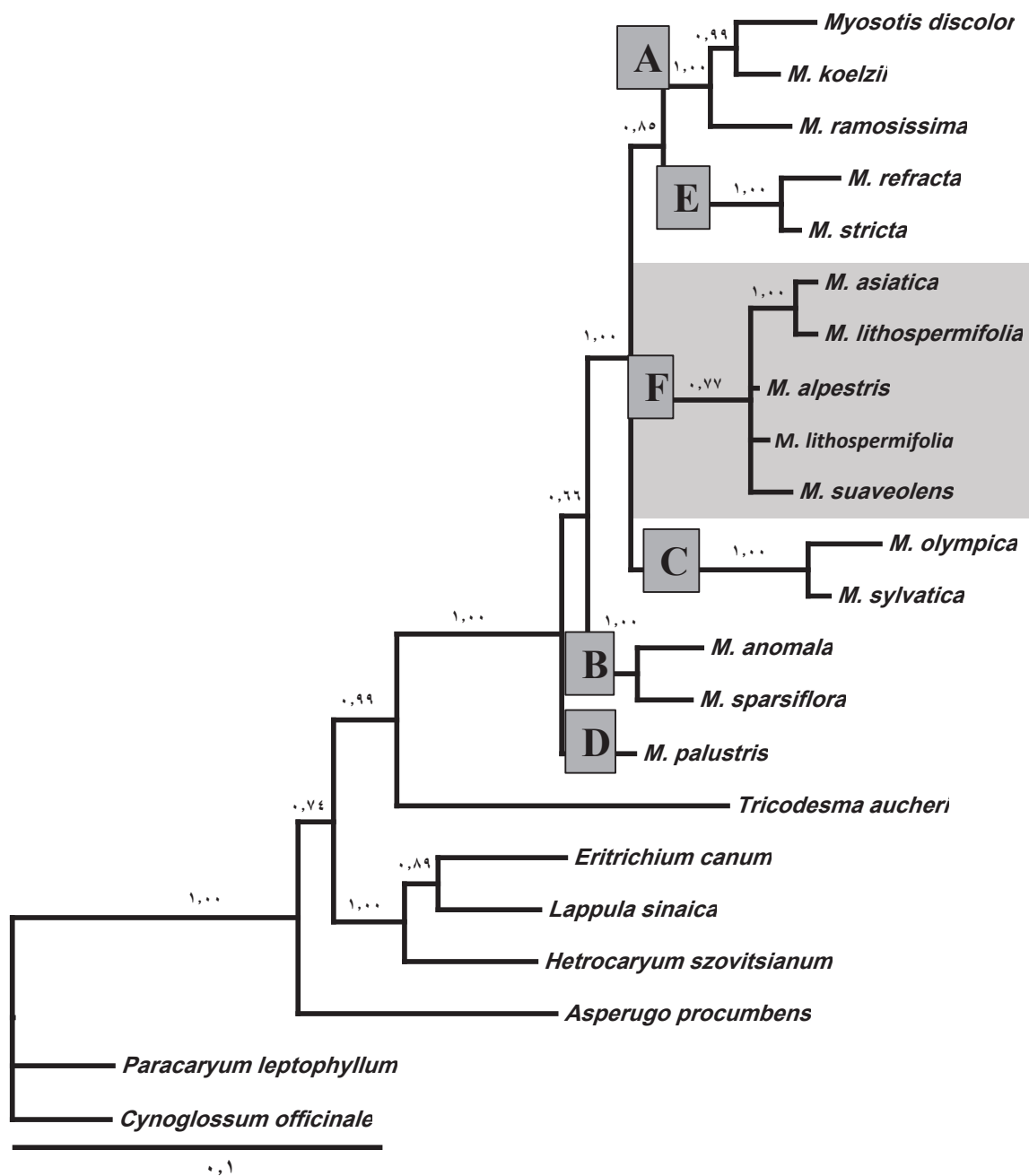
در درخت حاصل پس از دو گونه برون گروه، شاخه‌ای شامل *Tricodesma aucheri* DC. و چهار گونه *Asperugo procumbens* L.، *Eritrichium canum* DC.، *Lappula sinaica* و *Hetrocaryum szovitsianum* Fisch. قرار گرفته است. کلاد بعدی قبیله Myosotidese شامل چهارده گونه از جنس *Myosotis* می‌باشد. اولین شاخه از این کلاد، گروه E است که



شکل ۱: درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های کلروپلاستی $rpl32-trnL$ با روش Bayesian. اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده احتمال ثانویه (Posterior Probability) و مربع خاکستری نشان دهنده گروه F می‌باشد.

مشتمل بر دو گونه‌ی *M. stricta* و *M. re-* *fracta* با حمایت ۱۰۰ درصد می‌باشد. پس از آن کلادی شامل مخلوطی از گونه‌های کلاد A، B و D قرار دارد. به طوری که مجموعه گونه‌های *M. koelzi* و *M. discolor* کلاد

خواهری با مجموعه‌ی *M. anomala* و *M. palustris* هستند. در ادامه، کلاد C با حمایت قوی قرار گرفته که شامل گونه‌های *M. olympica* و *M. sylvatica* است. سپس شاخه‌ای با مجموعه گونه‌های گروه A و B، یعنی



شکل ۲: درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ترکیبی nrDNAITS- cpDNA rpl۳۲-trnL با روش Bayesian. اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده احتمال ثانویه (Posterior Probability) می‌باشند. مربع خاکستری نشان دهنده‌ی گروه F می‌باشد.

درخت ایجاد کرد. در درخت توافقی به طول ۷۴۷ گام ضرایب آماری $CI=0.0572$ و $RI=0.0770$ می باشند. شاخه بندی داده های ترکیبی به روش MP تاحدی با کلادوگرام حاصل از داده ی کلروپلاستی به همین روش متفاوت می باشد، به این صورت که گونه ی *Tricodesma aucheri*، خواهر با مجموعه ی اعضای قبیله ی *Myosotideae* است. همچنین تمام گروه های A تا F در این کلادوگرام تک تبار می باشند. در کلادوگرام حاصل از آنالیز بایسینیز روابط به خوبی حل شده اند. گونه ی *Tricodesma aucheri* گروه خواهری با گونه های *Myosotis* است و تمام پنج گروه این جنس با حمایت قوی تک تبارند (شکل ۲).

بحث

مقایسه ی نتایج حاصل از داده های کلروپلاستی و ترکیبی با روش های آنالیزی مختلف

در درخت حاصل از توالی کلروپلاستی cpDNA rpl32-trnLUAG- nrDNAITS از ۶ کلاد A-F ذکر شده، سه کلاد E، C و F مشابه با نتایج قبلی تک تبارند. اما گروه های A، B و D تک تبار نیستند. در آنالیز ترکیبی nrDNAITS و cpDNA rpl32، ۶ گروه مذکور کاملاً مطابق با نتایج Winkworth 2002 و شرافتی ۱۳۹۳ تک تبار می باشند. همچنین گونه ی *Trichodesma aucheri* مشابه با دو پیشینه ی ذکر شده گروه خواهری با قبیله ی

M. ramosissima و *M. sparsiflora* جای گرفته است. در نهایت گروه F با گونه های *M. asiatica*، *M. alpestris*، *M. suaveo-lens* و دو نمونه از گونه ی *M. lithospermi-folia* به صورت تک تبار وجود دارد (شکل نشان داده نشده است).

در درخت حاصل از روش بایسین (شکل ۱)، بعد از خروج برون گروه، شاخه ای با حمایت بالا قرار گرفته که گونه های *Asperugo procumbens*، *Tricodesma aucheri*، مجموعه ی سه گونه ی *Eritrichium canum*- *Lappula sinaica*- *Heterocaryum szovitsianum* و گونه های جنس *Myosotis* به صورت پلی تومی قرار گرفته اند. در این درخت همانند درخت حاصل از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی فقط گروه های E، C و F با احتمال ثانویه بالا، تک تبارند و گونه های مربوط به گروه های A، B و D به صورت پراکنده در کلادوگرام مشاهده می شوند.

داده های حاصل از توالی ترکیبی cpDNA rpl32-trnLUAG- nrDNAITS بیست و دو گونه با استفاده از توالی ترکیبی cpDNA rpl32- nrDNAITS آنالیز شدند. در نتایج حاصل از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی ماتریس همردیف سازی شده دارای ۱۷۰۶ جایگاه نوکلئوتیدی بود که از میان آنها ۲۷۲ جفت باز اطلاعاتی یا informative و ۱۴۳۴ جفت باز نیز غیر اطلاعاتی یا uninformative بودند.

داده های حاصل از این آنالیز، ۱۸ کوتاهترین

Myosotideae می‌باشد. درخت‌های حاصل از توالی‌های یک ژن، خواه هسته‌ای، کلروپلاستی یا میتوکندریایی، تحت عنوان *gene tree* مطرحند که همواره درخت گونه‌ای (*species tree*) را نشان نمی‌دهند. عوامل متعددی در ناسازگاری بین انواع مختلف *gene tree* دخالت دارند که از جمله آنها می‌توان به دورگه‌گیری، نفوذ ژن یا *introgression*، جاذبه شاخه‌های بلند، سرعت‌های نابرابر تکامل مولکولی و هماهنگ شدن سویه‌ها (*lineage sorting*)، خطاهای آزمایشی و ناکافی بودن نمونه برداری‌های تاکسونومیک اشاره کرد (Rieseberg & Soltis 1995, Wendel & Doyle 1998). به طور کلی قدرت جداکنندگی شاخه‌ها در درخت حاصل از توالی ترکیبی کلروپلاستی و هسته‌ای بالاتر می‌باشد. اختلافات مربوط به قرارگیری تاکسون‌ها در درخت‌ها، بر اساس DNA کلروپلاستی و ترکیبی می‌تواند تحت تاثیر عوامل ذکر شده و پائین تر بودن سرعت تکاملی توالی *trnLUAG-rpl32* کلروپلاستی باشد. آنالیز ترکیبی در این مطالعه، مناسب‌ترین الگوی شاخه‌بندی و بهبود یافته‌ترین روابط بین گونه‌ها را نشان می‌دهد.

روابط فیلوژنی جنسی و درون جنس *Myosotis*
بر اساس نتایج به دست آمده از توالی

کلروپلاستی و توالی ترکیبی، جنس *Myosotis* تک تبار است (شکل ۱ و ۲). تک تباری این جنس پیش از این توسط نویسندگان مختلف (Khoshokhan et al. (2013), Weigend et al. (2014), Sherafati et al. (2010) نشان داده شده بود. بر اساس داده‌های حاصل از توالی هسته‌ای ITS (شرافتی و همکاران ۱۳۹۳) و همچنین داده‌های ترکیبی nrDNAITS و *cpDNA rpl32*، در این تحقیق، برای جنس *Myosotis* ۶ زیرکلاد جدا شد. همانطور که گفته شد این جنس دارای دو زیر جنس به نام *Strophiosoma* و *Myosotis* و دو بخش به نام *Myosotis* و *Exarrhena* است. در نتایج به دست آمده هم بر اساس توالی کلروپلاستی و هم ترکیبی، گونه‌های مربوط به *subgen. Strophiosoma* در میان اعضای *Myosotis* قرار گرفته‌اند، بنابراین هیچکدام از زیرجنس‌های ذکر شده تک تبار نمی‌باشند. همچنین تنها گونه‌ی بخشه‌ی *Exarrhena*، یعنی *M. discolor* در میان اعضای بخشه‌ی *Myosotis* قرار گرفته، بنابراین این بخشه‌ها نیز تک تبار نمی‌باشند.

علاوه بر آن گونه‌های یکساله شامل: *M. koelzii*، *M. ramosissima*، *M. sparsiflora*، *M. discolor*، *M. stricta* و *M. refracta* (جدول ۱) در تمامی کلادوگرام‌های به دست آمده، در سرتاسر پراکنده شده گروهی تک تبار را تشکیل نمی‌دهند.

گروه *Alpestris*

در فلور اروپا ۴۱ گونه از جنس *Myosotis* معرفی شده است. در بین این گونه‌ها، گروهی با ویژگی‌های زیر معرفی شد: گیاهانی پایا با ریزوم‌های کوتاه و متعدد، گاهی گوشتی، ساقه‌ها با موهای خشن، گل آذین و کاسه با کرک‌های متراکم و بهم فشردده، جام کوتاه‌تر از کاسه با حاشیه صاف، فندقه‌ها بیش از ۲ میلی‌متر، تخم مرغی با نوک کند، سیاه، براق، با ناحیه اتصال وسیع و معمولاً توسط دو شیار جانبی به دو قسمت تقسیم می‌شوند (Grau and Merxmuller, 1972). این گروه در فلور اروپا شامل ۹ گونه است که از بین آنها ۴ گونه‌ی «*M. asiatica*»، «*M. alpestris*»، «*M. lithospermifolia*» و «*M. suaveolens*» در ایران وجود دارند و در آنالیز حاضر وارد شده‌اند. این گروه با نام «Alpestris»، یا گروه F، گروهی است که توالی هسته‌ای ITS، توالی کلروپلاستی rpl32-trnUAG به طور جداگانه و همچنین داده‌های حاصل از ترکیب این دو توالی، کلادوگرام‌های حاصل از هر دو روش ماکزیمم پارسیمونی و بایسین، تک تبار بودن آن را نشان داده و این گروه را تایید می‌نمایند.

سپاسگزاری

این پژوهش به حمایت معاونت محترم پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت مزبور کمال تشکر را دارند.

نتیجه گیری

با توجه به آنالیزهای صورت گرفته با استفاده از توالی کلروپلاستی rpl32-trnUAG و توالی ترکیبی nrDNAITS-cpDNArpl32-

- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Edgar, R.C. (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Felsenstein, J. (2004) *Inferring phylogenies*, Sinauer Associates. Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Grau, J. and Merxmuller, H. (1972) *Myosotis* (Boraginaceae). In: *Flora Europea* (Eds. Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valeatine, D. A., Walters, S. M. and Webb, D. A.) 3: 111-117. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Grau, J. and Schwab, A. (1982) Mikromerkmale der blute zur gliederung der gattung *Myosotis*. *Mitteilungen der Botanischen. Staatssammlung München* 18: 9-58.
- Hall, T.A. (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.
- Khatamsaz, M. (2002) Boraginaceae. In: *Flora of Iran* (Eds. Assadi, M., Khatamsaz, M. and Maassoumi, A. A.) No. 39, Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran (in Persian).
- Khoshsokhan Mozaffar, M., Kazempour Osaloo, S., Oskoueian, R., Naderi Saffar, K. and Amirahmadi, A. (2013) *Tribe Eritrichieae* (Boraginaceae s.str.) in west Asia: a molecular phylogenetic perspective. *Plant Systematic and Evolution* 299: 197-208.
- Langstrom, E. and Chase, M.W. (2002) Tribes of Boraginoideae (Boraginaceae) and placement of *Antiphytum*, *Echiochilon*, *Ogastemma* and *Sericostoma*: A phylogenetic analysis based on atpB plastid DNA sequenca data. *Plant Systematic and Evolution* 234: 137-153.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Madison, W.P. and Madison, D.R. (2011) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Retrieved from <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>. On: 23 May 2012.
- Nylander, J.A.A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre Uppsala University. Uppsala.
- Popov, M.G. (1953) Boraginaceae. In: *Flora USSR* (Eds. Shishkin, B. K. and Bobrov, E.) 19: 97-691. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva and Leningrad.
- Posada, D., Buckley T.R. (2004) Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systems Biology* 53(5): 793-808.
- Rieseberg, L.H., Soltis, D.E. (1991) Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *American Journal of Botany* 5:65-84
- Riedl, H. (1967) Boraginaceae. In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) 48: 97-146. Akademische Druck- und Verlagsanstalt, Graz.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Show, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, w., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. and Small, R.L. (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for pylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142- 166.
- Sherafati, M. Khoshokhan, M., Kazempour Osaloo, S., Esmaelbegi, S. and Saadati, N. (2014) Molecular phylogeny of the genus *Myosotis* (Boraginaceae) based on nrDNA ITS sequences. *Taxonomy and Biosystematics* 19: 83-94.
- Soltis, D.E., Kuzoff, R.K. (1995) Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the Heuchera group (Saxifragaceae). *Evolution* 49:727-742.

- Swofford, D. L. (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). version 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Weigend, W., Gottschling, M., Selvi, F., Hilger, H.H. (2010) Fossil and Extant western hemisphere Boragieae, and the polyphyly of Trigonotideae Riedl (Boraginaceae: Boraginoideae). *Systematic Botany* 35:409-419.
- Wendel, J. F. Doyle, J. J. (1998) Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution. Pp. 265–296. in: D. E. Soltis, P. S. Soltis and J. J. Doyle (eds.) *Molecular Systematics of Plants II, DNA Sequencing*. Kluwer Academic Publishers, London.
- White, J. Bruns, T. Loe, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. in: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Winkworth, R.C. Grau, J. Robertson, A.W. and Lockhart, P.J. (2002) The origins and evolution of the genus *Myosotis* L. (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 180-193.