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

مریم خوش سخن مظفر[۱*]، 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، ۱۴ گونه از آن به همراه گونه‌هایی از قبیله Cynoglosseae s. lat. با استفاده از مارکرکلروپلاستی rpl32-trnL و همچنین توالی ترکیبی cpDNAr-pl32-trnLUAG-nrDNAITS، به دو روش پارسیمونی و بایسین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج، تک تباری جنس Myosotis را تایید نمود. همچنین نشان داده شد دوزیرجنس Myosotis و Strophiostoma، بخشه‌های Exarrhena و Myosotis، وگونه‌های یکساله تک تبار نیستند. درکلادوگرام حاصل از توالی کلروپلاستی rpl32-trnL تنها گروه‌های C، E و F تک تبارند، اما داده‌های

۱* استادیارگروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی، واحدقم، 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. suaveolens* **و** *M. lithospermifolia* **در فلور ایران، با نام** Alpestris **به عنوان گروهی مجزا و تک تبار معرفی می‌گردد.**

واژه های کلیدی: *Myosotis* **توالی** cpDNArpl32-trnLUAG، **فیلوژنی مولکولی، گاوزبانیان، گروه** Alpestris

مقدمه

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 تحقیقاتLangstrom& Chase (2002) این جنس در قبیله *Myosotideae* قرار گرفته است.

هر چنداز نظر داشتن عدد پایه کروموزمی۱۲، 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.. Khoshsokhan et al. (2013) طبق آخرین مطالعات مولکولی نشان داده شد که۳ قبیله *Eritrichieae*, *Myosotideae* و *Trigonotideae* جزئی از قبیله *Cynoglosseae* s. lat. هستند Weigend et al. (2010), Khoshsokhan et al. (2013).

برای جنس *Myosotis* در ایران تاکنون ۱۵ گونه شناسایی شده است Khatamsaz, (2002). گونه‌های *M.lithospermifolia* (Willd) *Hornem, M.* ceaspitosa Schultz ،*palustris* L. .M، *Riedl M. anomala*، M. *alpestris Schmidt*،*M. Asiatica* Schizchk & *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 Riedl (1967) وفلور ایران Khatamsaz (2002) شامل دو زیرجنس *Myosotis* و *Strophiostoma* (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 *Strophiostoma* شامل چهار گونه،M. *Pseudopropinqua* M. Pop. *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 *Strophiostoma* و DC *Eumyosotis*. معرفی شده‌است(1953)Popov .

از طرفی دیگر Grau ونویسندگان 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(جدول۱).

درمطالعات مولکولی که تاکنون درمورد جنس *Myosotis* انجام شده است Winkworth وهمکارانش در سال ۲۰۰۲، ۳٤ گونه از این جنس متعلق به آفریقا،اروپا،آمریکاو نیوزلند را مورد بررسی قرار داده و براساس توالی هسته‌ای ITS وسه توالی کلروپلاستی matK، ndhF وtrnK-psbA ،پنج گروه A،B،C،D،Eو F را دراین جنس مشخص کردند،همچنین شرافتی وهمکاران درسال ۱۳۹۳ در پژوهشی که بر روی گونه‌های ایرانی و برخی گونه‌های غیرایرانی،باگستره‌ی محدودتر، بااستفاده ازتوالی 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 منظوربررسی و بازسازی تاریخچه تکاملی جنس *Myosotis* از توالی کلروپلاستی rpl32-trnL استفاده شد. این توالی یک فاصله‌گر بین ژنی است که در ناحیه SSC از ژنوم کلروپلاستی قرار دارد. این ناحیه بسیار متنوع است ومیانگین طول آن ۱۰۱۸ جفت باز و رنج تغییرات طول آن ۱٤۱۷- ٥٤۳ جفت باز است .Show et al (2005) . برای دستیابی به درخت گونه‌ای (species tree) نیز این توالی با توالی هسته‌ای ترکیب می‌گردد.

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-trnLو داده های ترکیبی هسته ای و کلروپلاستی، ۲) بررسی تک تباری گروه های A تا F در این جنس و ۳) تعیین تک تباری گروه *Alpestris*.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری‌تاکسون‌ها

۱۵ نمونه (مربوط به ۱٤ گونه) از جنس *Myosotis* به همراه هفت گونه‌ی دیگر از *Cynoglosseae* s. lat. ، در تحقیق حاضر بررسی شدند (جدول۱). دو گونه *Para-caryum leptophyllum* (DC.) Boiss. و *Cynoglossum officinale* L. نیز به عنوان برون گروه انتخاب شدند (Khoshsokhan et al., (2008 a, b و شرافتی ۲۰۱٤). نمونه‌ها از مناطق رویشی جمع آوری شده و در

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 تاکسون های 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)
M. ramosissima Rochel. ex Schultes	گرگان، پارک جنگلی به جنوب تنگه راه ۵۵۰متری،وندلبو، فروغی	TARI ۱۱۰۳۳	*Myosotis*	*Myosotis*	یک ساله
M. lithospermifolia (Willd.) Hornem.	آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، بخش غربی کلیدی،۲۴۰۰متر، اسدی و معصومی	TARI ۲۰۲۱۸	*Strophiosto-ma*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. lithospermifolia (Willd.) Hornem.	آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، کوههای کلان، ۲۵۵۰-۲۴۷۰ متری، جمزاد و همکاران	TARI ۷۰۳۸۲	*Myosotis*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. anomala Riedl.	آذربایجان، اردبیل به خلخال،دریاجه نور، ۲۴۵۰ متری، جمزاد و همکاران	TARI ۷۰۴۸۸	*Strophiosto-ma*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. sparsiflora Mikan.	مازندران، جنوب رامسر، غرب جواهر ده، ۱۸۰۰ متری، رونه مارک ومعصومی	TARI ۲۰۷۷۸	*Myosotis*	*Myosotis*	یک ساله
M. refracta Boiss.	خراسان ، ۴۵ کیلومتری شمال شیروان، منطقه حفاظت شده گولول سرانی، ۲۳۰۰-۱۶۰۰متر،اسدی و معصومی	TARI ۵۰۵۰۷	*Myosotis*	*Myosotis*	یک ساله
M. stricta Link.	تهران، منطقه حفاظت شده کویر، بخش شرقی سیاه کوه، ۱۳۰۰ متر، رونه مارک و همکاران	TARI ۱۹۴۸۸	*Myosotis*	*Myosotis*	یک ساله
M. alpestris Schmidt	آذربایجان، غرب رضائیه، تپه های غرب روستای سیلوانا، ۱۸۰۰-۱۵۵۰ متر، رونه مارک و فروغی	TARI ۱۹۵۹۲	*Myosotis*	*Myosotis*	دو یا چند ساله

M. olympica Boiss.	مازندران، ٤٠ کیلومتری جنوب رامسر، شیب جنوبی کوه خشه چال، ٣٦٠٠–٢٩٠٠متر، اسدی و معصومی	TARI ٥١٢١٢	*Myosotis*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. asiatica Schizchk. &Serg.	مازندران، سیاه بیشه، ٢٠٥٠ متری، خاتم ساز و رحمان پور	TARI ۶۹۲۳۳	*Myosotis*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. sylvatica Ehrh. ex Hoffm.	تهران، ٢٤ کیلومتر از کندوان به جاده هراز، ٣١٠٠ متر، اسدی و مظفریان	TARI ٣٢٩٧٨	*Myosotis*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. koelzii Riedl, Oster. Bot	کرمانشاه	TARI ٢٥٥٩٩	*Myosotis*	*Myosotis*	یک ساله
M. palustris L.	مازندران، جنوب غربی رامسر، شرق جواهر ده، ١٨٠٠متر، رونه مارک و معصومی	TARI ٢٠٧۴٩	*Myosotis*	*Myosotis*	دو یا چند ساله
M. discolor Pers.	پاکستان	TARI	*Exarrhena*	*Myosotis*	یک ساله
M. suaveolens Waldst. Et Kit	پاکستان	TARI ٧٥٨	*Myosotis*	*Myosotis*	یک ساله
Heterocaryum szvitsianum Fisch. & Mey.	کاظم پوراوصالو ٢٠٠٧	TMUPC	-	–	–
Lappula sinaica DC.	کاظم پوراوصالو ٢٠٠٧	TMUPC	-	–	–
Paracaryum leptophyllum (DC.) Boiss.	آذربایجان،ارومیه، سیلوانا، بردوس و صیامی	TARI ٣٢٧	-	–	–
Trichodesma aucheri DC.	٢٢٠٠ متر، چهارمحال بختیاری، بروجن، مظفریان	FUMH ٥٧١٩٥	-	–	–
Cynoglossum officinale L.	مازندران، پل سفید، جنگل بالای روستای سنگده، ٢٥٠٠–١٥٠٠متر،اسدی	TARI ٧٣٥٢۶	-	–	–
Asperugo perocumbens L.	کاظم پوراوصالو٢٠٠٧	TMUPC TARI	-	–	–

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

استخراج، تکثیر و توالی یابی DNA

استخراج DNA کل از سلول‌های برگ نمونه‌های هرباریومی صورت گرفت. استخراج به روش,CTAB Doyle & Doyle (1987) همراه با کمی تغییر و افزودن استات آمونیوم انجام گرفت. ازاستات آمونیوم جهت حذف متابولیت‌های ثانویه استفاده شد.

به منظور تکثیر توالی-cpDNArpl32 trnLUAG از آغازگرهای trnL(UAG) (′CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT3′5) و rpl-32′CAGTTCCAAAAAAA)(CGTACTTC3′5)استفاده گردید (Show et al. 2005). برنامه PCR به این صورت بود: واسرشتگی اولیه ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، واسرشتگی ثانویه ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال ۵۳°C به مدت یک دقیقه، بسط اولیه ۷۲°C به مدت ۲:۳۰ دقیقه و بسط نهایی ۷۲°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 وکشیدگی 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) ونرم 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) بااستفاده از نرم افزارPAUP* 4.b10(Swofford (2002) ونرم افزار.Mrbayes V 3.12(Ronquist& Huelsenbeck (2003) 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

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= CI) و شاخص گروه‌پذیری (retention index= RI) بااستفاده از دستور pscores all/ ci=yes ri=yes rc=yes در نرم افزار PAUP* 4.b10Swofford (2002) انجام شد.

روش Bayesian

این روش بر مدل‌های تکاملی متمرکز شده و تمامی مکان‌های جانشینی را بررسی می‌کند.برای آنالیز داده‌های حاصل، مدل‌های تکاملی با استفاده از برنامهMrModeltest version 2.3 (Nylander 2004)، اجرا شده درMrMTgui (Nuin 2005) بر اساس معیار اطلاعاتیAkaike (AIC) (Posada & Buckley 2004) انتخاب شدند. داده‌های 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. ٤ 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

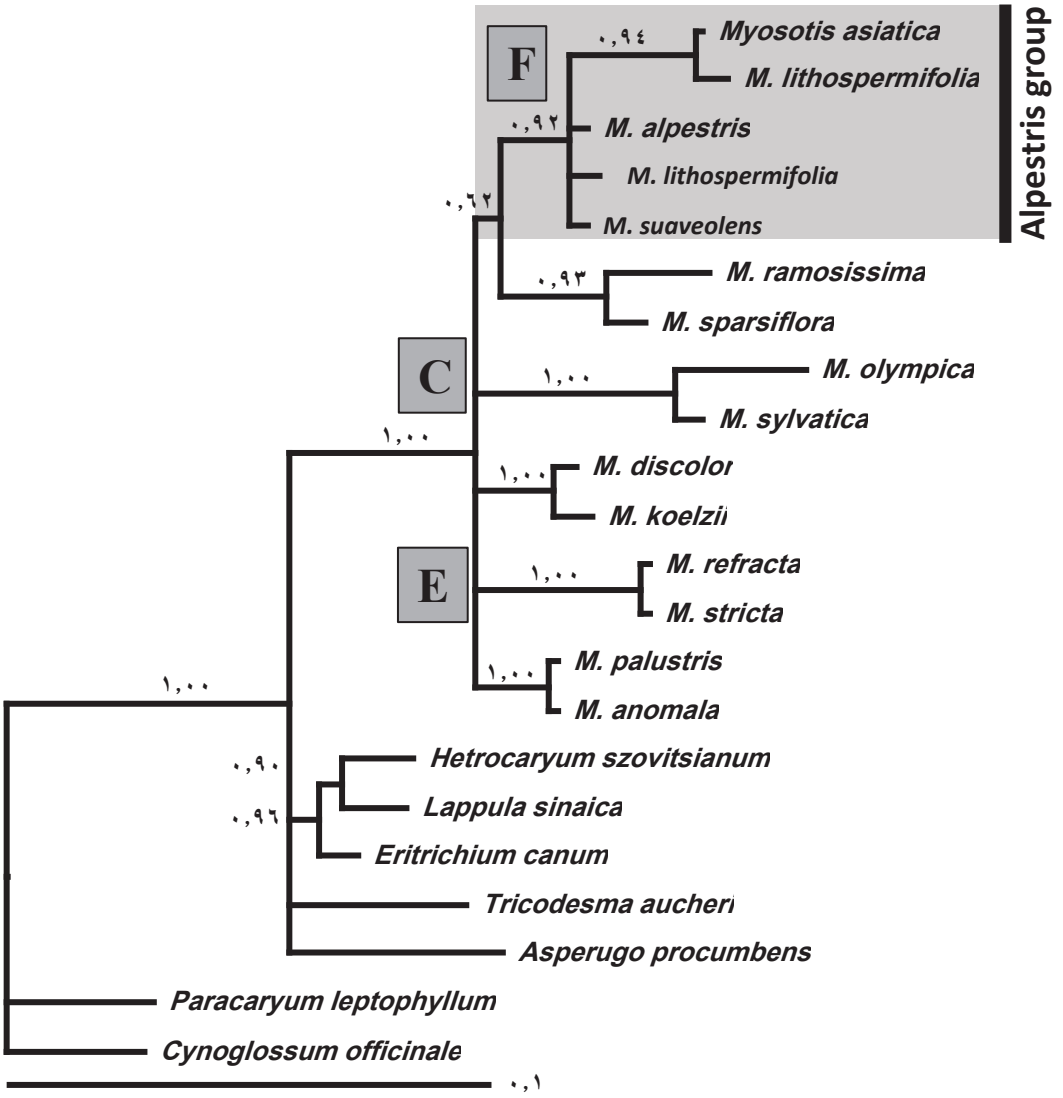
داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی rpl۳۲-trnL

ماتریس همردیف سازی شده توالی کلروپلاستیrpl32-trnLمربوط به ۲۲ تاکسون مورد آنالیز، ماتریسی به طول ۱۰٦۹ جایگاه نوکلئوتیدی ایجاد کرد. از میان نوکلئوتیدهای آنالیز شده، ۱۲۸جایگاه به لحاظ پارسیمونی،

اطلاعاتی یا informative و۹۴۱جایگاه غیر اطلاعاتی یا uninformative بودند.

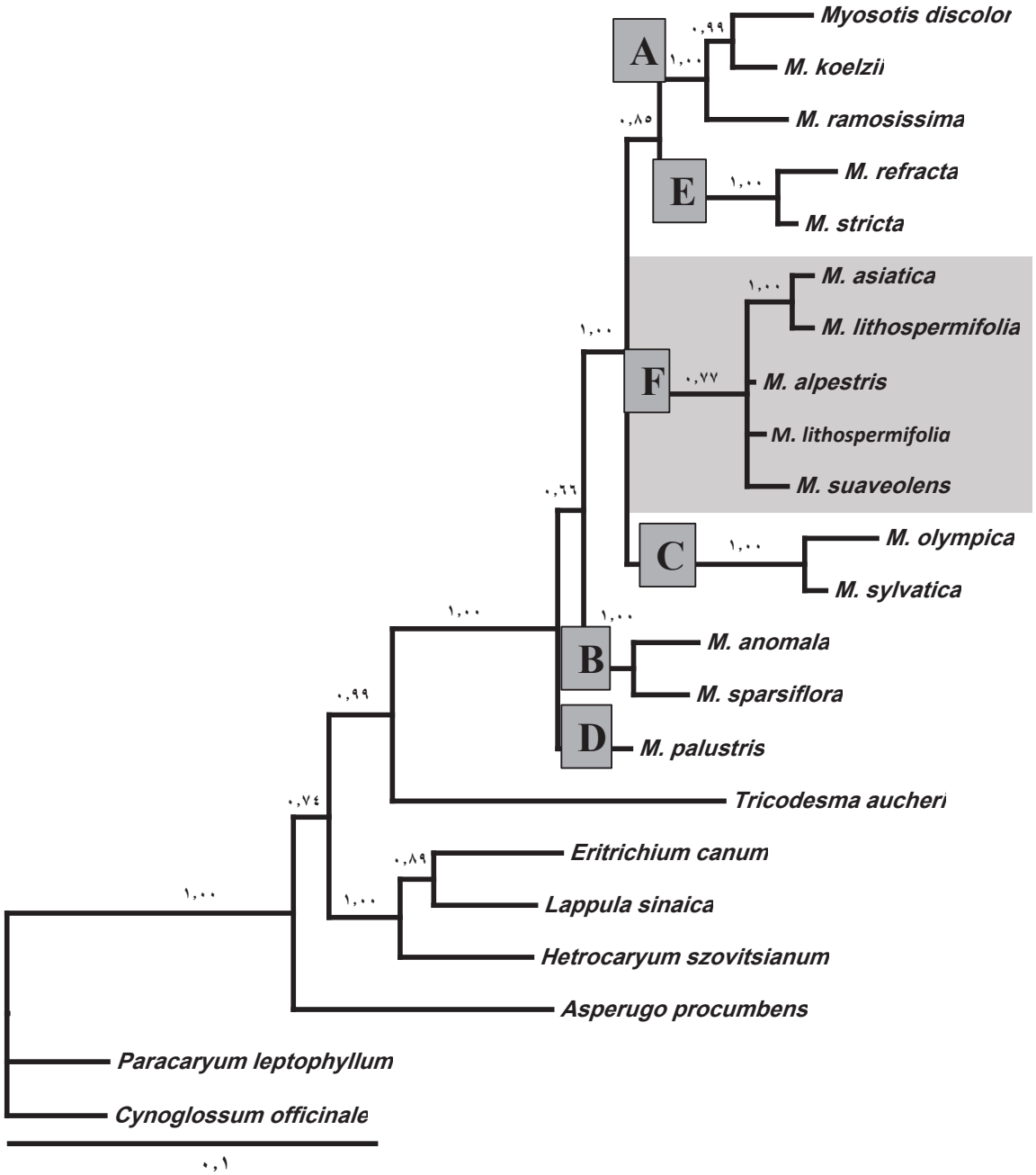
آنالیز ماکزیمم پارسیمونی منجر به تولید شش کوتاهترین درخت شد که درخت توافقی آنها ۱۹۱ گام طول داشت و شاخص‌های آماری آن CI= ۰/۷۵۹ (شاخص پایداری Consistency Index) وRI= ۰/۸۱۶(شاخص نگهداری Retention Index) می‌باشد.

در درخت حاصل پس از دو گونه برون گروه، شاخه‌ای شامل *Tricodesma aucheri* DC. وچهار گونه *Asperugo procumbens* L.، *Eritrichium canum*، DC. *Lappula sinaica* و *Hetrocaryum szovitsianum* Fisch. & Mey از *Cynoglosseae* s. lat . 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 آنالیزداده‌های کلروپلاستی rpl۳۲-trnLبا روش Bayesian. اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده احتمال ثانویه (Posterior Probability) و مربع خاکستری نشان دهنده‌ی 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 شاخه ای با مجموعه گونه‌های گروه A و B، یعنی



شکل ۲: درخت فیلوژنی حاصل از آنالیزداده‌های 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.

M. ramosissima و *M. sparsiflora* جای گرفته است. در نهایت گروه F با گونه‌های *M. asiatica*، *M. alpestris*، *M. suaveo-lens* و دو نمونه از گونه‌ی *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، شاخه‌ای با حمایت با لا قرار گرفته که گونه‌های *Asperugo procumbens*، *Tricodesma aucheri*، مجموعه‌ی سه گونه‌ی *Eritrichium canum- Lappula sinaica- Heterocaryum szovitsianum* و گونه‌های جنس *Myosotis* به صورت پلی‌تومی قرار گرفته‌اند. در این درخت همانند درخت حاصل از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی فقط گروه‌های C، E و F با احتمال ثانویه بالا، تک تبارند و گونه‌های مربوط به گروه-های A، B و D به صورت پراکنده در کلادوگرام مشاهده می‌شوند.

داده‌های حاصل از توالی ترکیبی cpDNArpl32-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.

داده‌های حاصل از این آنالیز، ۱۸ کوتاهترین درخت ایجاد کرد. در درخت توافقی به طول ۷۴۷ گام ضرایب آماری CI= ۰/۵۷۲ و RI= ۰/۶۷۰ می‌باشند.شاخه‌بندی داده‌های ترکیبی به روش MP تاحدی با کلادوگرام حاصل از داده‌ی کلروپلاستی به همین روش متفاوت می‌باشد، به این صورت که گونه‌ی Tricodesma aucheri، خواهر با مجموعه‌ی اعضای قبیله‌ی *Myosotideae* است. همچنین تمام گروه‌های A تا F در این کلادوگرام تک تبار می‌باشند. در کلادوگرام حاصل از آنالیز بایسینیز روابط به خوبی حل شده‌اند. گونه‌ی *Tricodesma aucheri* گروه خواهری با گونه‌های *Myosotis* است و تمام پنج گروه این جنس با حمایت قوی تک تبارند (شکل ۲).

بحث

مقایسه‌ی نتایج حاصل از داده‌های کلروپلاستی و ترکیبی با روش‌های آنالیزی مختلف

در درخت حاصل از توالی کلروپلاستی trnLUAG- rpl32 از ۶ کلاد A-F ذکر شده، سه کلاد C، E و F مشابه با نتایج قبلی تک تبارند. اما گروه‌های A، B و D تک تبار نیستند. در آنالیز ترکیبی nrDNAITS و cpDNA rpl32، ۶ گروه مذکور کاملا مطابق با نتایج Winkworth 2002 و شرافتی ۱۳۹۳ تک تبار می‌باشند. همچنین گونه‌ی *Trichodesma aucheri* مشابه با دو پیشینه‌ی ذکر شده گروه خواهری با قبیله‌ی

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 (1991), Soltis & Kuzoff 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 Khoshsokhan et al. (2013), Weigend et al. (2010), Sherafati et al. (2014) نشان داده شده بود. بر اساس داده‌های حاصل از توالی هسته‌ایITS(شرافتی و همکاران ۱۳۹۳) و همچنین داده‌های ترکیبی nrDNAITS و cpDNA rpl32، در این تحقیق، برای جنس *Myosotis*، ٦ زیرکلاد جدا شد. همانطور که گفته شد این جنس دارای دو زیر جنس به نام *Strophiostoma*و *Myosotis*ودو بخشه به نام *Myosotis* و *Exarrhena* است. در نتایج به دست آمده هم بر اساس توالی کلروپلاستی و هم ترکیبی، گونه‌های مربوط به .subgen *Strophiostoma* در میان اعضای .subgen *Myosotis* قرار گرفته‌اند، بنابراین هیچکدام از زیرجنس‌های ذکر شده تک تبار نمی‌باشند. همچنین تنها گونه-ی 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. refrecta* و *M. stricta*، *M. discolor* (جدول ۱) در تمامی کلادوگرام‌های به دست آمده، در سرتاسر پراکنده شده گروهی تک تبار را تشکیل نمی‌دهند.

گروه Alpestris

در فلور اروپا ٤١ 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 فشرده، جام کوتاه‌تر از کاسه با حاشیه صاف، فندقه‌ها بیش از ۲ میلی‌متر، تخم مرغی با نوک کند، سیاه، براق ، با ناحیه اتصال وسیع و معمولا 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 ٤ گونه‌ی *M. alpestris*، *M. asiatica*، *M. suaveolens* و *M. lithospermifolia* 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-trnlUAG به طور جداگانه و همچنین داده‌های حاصل از تر کیب 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.

نتیجه‌گیری

با توجه به آنالیزهای صورت گرفته با استفاده از توالی کلروپلاستیrpl32-trnlUAG و توالی ترکیبی-nrDNAITS-cpDNArpl32 trnlUAG ،جنس *Myosotis* با ۱۵ گونه در ایران تک تبار می‌باشد. همچنین زیر جنس‌های *Myosotis* و *Strophiostoma* گروه تک تباری را در دو آنالیز فوق نشان نمی‌دهند. گونه*M. discolor* از بخشه‌ی *Exarrhena* در بین اعضای بخشه*Myosotis* قرار گرفته و هیچکدام از این بخشه‌ها تک تبار نمی‌باشند. گونه‌های یک ساله نیز در سراسر کلادوگرام-های حاصله پخش شده و تک تبار نمی‌باشند. آنالیز حاصل از توالی کلروپلاستی تک تباری تنها گروه‌های C، E و F را نشان داد اما ترکیب توالی هسته‌ای و کلروپلاستی نشان داد هر شش گروه A-B-C-D-E-Fتک تبار هستند. در این تحقیق بر اساس داده-های مولکولی، گروه F به عنوان یک گروه تک تبار درفلور ایرانبا نام "Alpestris" با گونه‌های *M. suaveolens*، *M. alpestris*، *M. asiatica* و *M. Lithospermifolia* معرفی می‌گردد. این گروه قبلا در فلور اروپا بر اساس تمایزات مورفولوژیکی، تحت همین نام مجزا شده بود.

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.

منابع

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., Oskoueiyan, 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*: Aphylogenetic 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., BuckleyT.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 Drück- 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. Khoshsokhan, M., Kazempour Osaloo, S., Esmaelbegi, S. and Saadati, N. (2014) Molecular phylogeny of the genus *Myosotis* (Boraginacea) 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*: Phylogenic 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 genomehistory 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.