

تبارزایی جنس گل فراموشم مکن (*Myosotis*, Boraginaceae) بر اساس توالی هسته‌ای nrDNA ITS

محبوبه شرافتی^۱، شاهرخ کاظم‌پور اوصالو^{۱*}، مریم خوش‌سخن مظفر^۲، شکوه اسماعیل بگی^۱ و نسیم سعادت^۱
^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

چکیده

جنس گل فراموشم مکن (*Myosotis*) یکی از جنس‌های زیرتیره Boragioideae از تیره Boraginaceae است. این جنس دارای ۱۰۰ گونه است که در نواحی معتدله نیم کره شمالی و جنوبی پراکنده‌اند. این جنس دارای دو مرکز تنوع در جهان است: غرب اوراسیا و زلاندنو. تاکنون در ایران ۱۵ گونه از این جنس شناسایی شده است. گیاهانی علفی یک‌ساله یا چندساله و گُرک‌دار هستند که ویژگی اصلی آنها داشتن فندقه‌های تخم‌مرغی صاف و براق و بدون تزیینات قهوه‌ای یا سیاه‌رنگ است. در پژوهش حاضر، ۵۸ نمونه (شامل ۵۶ گونه درون‌گروه و دو گونه *Echiochilon persicum* و *fruticosum* به عنوان برون‌گروه) برای بازسازی روابط فیلوژنی مطالعه شد. ناحیه ITS هسته‌ای ریبوزومی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. برای بازسازی روابط فیلوژنی، تحلیل‌های فیلوژنی با روش بیشینه صرفه‌جویی تعبیه شده در نرم‌افزار PAUP، روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار Mr Bayes و روش بیشینه درست‌نمایی با استفاده از برنامه RaxmlGUI انجام شد. تحلیل داده‌ها با روش بیشینه صرفه‌جویی، ۱۰۰۰۰ درخت با کوتاه‌ترین طول، برابر با ۷۸۶ گام، با شاخص پایداری یا ثبات (CI) ۰/۴۸۲، شاخص گروه‌پذیری یا ابقا (RI) برابر با ۰/۷۷۰ ایجاد کرد، تحلیل‌های فیلوژنی توالی nrDNA ITS نشان داد که جنس *Myosotis* متشکل از ۶ تبار A، B، C، D، E و F است. سیستم رده‌بندی زیرجنسی (زیرجنس‌های *Myosotis* و *Strophostoma*) حمایت می‌شود. اما سیستم رده‌بندی بخشه‌ای (بخشه‌های *Myosotis* و *Exarrhena*) حمایت نمی‌شود. گونه‌های یک‌ساله، در بین گونه‌های دو یا چند ساله قرار گرفتند و در سراسر درخت پراکنده شده‌اند. گونه‌های ایرانی و جنوب غربی آسیا نیز در سراسر درخت بین گونه‌های مختلف از سایر نقاط جهان پراکنش دارند و تک تبار نیستند.

واژه‌های کلیدی: *Myosotis* nrDNA ITS، تیره گاوزبان، تبارزایی، ایران

جنس و ۱۶۰۰ گونه با مرکز پراکنش در اوراسیا در دنیا

مقدمه

دارد. جنس *Myosotis* (گل فراموشم مکن) یکی از

تیره گاوزبان (*Boraginaceae* s.str.) حدوداً ۱۰۰

جنس‌های زیرتیره Boraginoideae از تیره Boraginaceae است. موقعیت قبیله ای این جنس با توجه به طبقه‌بندی‌های مختلف متفاوت است. در فلورهای منطقه‌ای از جمله فلور ایران جنس *Myosotis* جزو قبیله Eritrichieae است (Khatamsaz, 2002). در فلورا ایرانیکا (Riedl, 1967) و فلور شوروی سابق (Popov, 1953) و بر اساس پژوهش‌های Chase و Langstrom (1953) این جنس در قبیله Myosotideae قرار گرفته است. هرچند از نظر داشتن عدد پایه کروموزمی ۱۲ به تعدادی از اعضای قبیله Eritrichieae نزدیک است اما به دلیل وجود فندقه‌های صاف و بدون تزیینات و دانه گرده با ۸ شیار ناجور (Khatamsaz, 2001) همچنین، با توجه به داده‌های مولکولی وابستگی *Myosotis* به قبیله Eritrichieae بعید است (Khoshsokhan Mozaffar et al., 2013). قبیله Myosotideae با تنها جنس خود یعنی *Myosotis* با داشتن میوه صاف و بدون تزیینات، گروهی تک‌تبار را تشکیل داده است (Khoshsokhan Mozaffar et al., 2013). جنس *Myosotis* دارای ۱۰۰ گونه است که در نواحی معتدله نیمکره شمالی و جنوبی پراکنده شده است (Winkworth et al., 2002). این جنس دو مرکز تنوع دارد: غرب اوراسیا و زلاندنو. تاکنون در ایران برای جنس *Myosotis* ۱۵ گونه شناسایی شده است که اغلب در نواحی معتدل و مرطوب از جمله نواحی شمالی ایران می‌رویند (Khatamsaz, 2002). گونه‌های دو یا چند ساله شامل: *M. alpestris* Schmidt & Serg، *M. asiatica* Schizchک & Serg، *M. lithospermifolia* Schultz، *M. ceaspitosa* (Willd) Hornem، *M. olympica* Boiss. subsp. *demavendica* (Bornm. ex Vest.) Riedl و *M. palustris* (L.) Ehrh ex Hoffm و *M. anomala* Riedl، گونه‌های یک‌ساله شامل: *M. propinqua* Fisch. & Mey ex *M. koelzii* Riedl، *M. pseudopropinqua* M. Pop، *M. ramosissima* Rochel ex Schultes و *M. sparsiflora* Mikan، *M. refracta* Boiss و *M. stricta* Link هستند. در فلورا ایرانیکا (Riedl, 1967)، فلور ایران (Khatamsaz, 2002) و فلور شوروی سابق (Popov, 1953)، این جنس به دو زیرجنس *Myosotis* و *Strophiosoma*، مشتمل بر گونه‌های یک‌ساله، دو ساله و چند ساله تقسیم شده است که وجه تمایز آنها در نوع گل‌آذین، ضخیم شدن یا نشدن دمگل در محل اتصال به کاسه و وجود یا فقدان زایده سفیدرنگ در محل ناف فندقه است. همچنین، برای زیرجنس *Myosotis* سه سری به نام‌های *Arvenses*، *Palustres* و *Silvatica* ارایه شده است که هر سری گونه‌هایی را شامل می‌شود. اما زیرجنس *Strophiosoma* بدون واحدهای تحت جنس است. این زیرجنس در ایران شامل چهار گونه: *M. propinqua*، *M. anomala*، *M. pseudopropinqua* و *M. sparsiflora* است.

Schwab و Grau (۱۹۸۲) بر اساس ریخت‌شناسی گرده و ویژگی‌های میکروسکوپی کلالة و جام گل در طبقه‌بندی *Myosotis* تجدید نظر کردند و آن را به دو بخش تقسیم نمودند: *Myosotis* و *Exarrhena* مرکز تنوع بخش *Myosotis* در نیمکره شمالی و بخش *Exarrhena* در نیمکره جنوبی است. اما گروه کوچکی از تاکسون‌ها به نام گروه *Discolor* که مربوط به اوراسیا است در بخش *Exarrhena* قرار می‌گیرد. زیرا ریخت‌شناسی گرده آنها ارتباط نزدیکی با تاکسون‌های نیمکره جنوبی دارد. بنابراین، بخش *Exarrhena* خود دارای دو گروه به نام‌های *Austral* و *Discolor* است.

جنس‌های زیرتیره Boraginoideae از تیره Boraginaceae است. موقعیت قبیله ای این جنس با توجه به طبقه‌بندی‌های مختلف متفاوت است. در فلورهای منطقه‌ای از جمله فلور ایران جنس *Myosotis* جزو قبیله Eritrichieae است (Khatamsaz, 2002). در فلورا ایرانیکا (Riedl, 1967) و فلور شوروی سابق (Popov, 1953) و بر اساس پژوهش‌های Chase و Langstrom (1953) این جنس در قبیله Myosotideae قرار گرفته است. هرچند از نظر داشتن عدد پایه کروموزمی ۱۲ به تعدادی از اعضای قبیله Eritrichieae نزدیک است اما به دلیل وجود فندقه‌های صاف و بدون تزیینات و دانه گرده با ۸ شیار ناجور (Khatamsaz, 2001) همچنین، با توجه به داده‌های مولکولی وابستگی *Myosotis* به قبیله Eritrichieae بعید است (Khoshsokhan Mozaffar et al., 2013). قبیله Myosotideae با تنها جنس خود یعنی *Myosotis* با داشتن میوه صاف و بدون تزیینات، گروهی تک‌تبار را تشکیل داده است (Khoshsokhan Mozaffar et al., 2013). جنس *Myosotis* دارای ۱۰۰ گونه است که در نواحی معتدله نیمکره شمالی و جنوبی پراکنده شده است (Winkworth et al., 2002). این جنس دو مرکز تنوع دارد: غرب اوراسیا و زلاندنو. تاکنون در ایران برای جنس *Myosotis* ۱۵ گونه شناسایی شده است که اغلب در نواحی معتدل و مرطوب از جمله نواحی شمالی ایران می‌رویند (Khatamsaz, 2002). گونه‌های دو یا چند ساله شامل: *M. alpestris* Schmidt & Serg، *M. asiatica* Schizchک & Serg، *M. lithospermifolia* Schultz، *M. ceaspitosa* (Willd) Hornem، *M. olympica* Boiss. subsp. *demavendica* (Bornm. ex Vest.) Riedl و *M. palustris* (L.) Ehrh ex Hoffm و *M. anomala* Riedl، گونه‌های یک‌ساله شامل: *M. propinqua* Fisch. & Mey ex *M. koelzii* Riedl، *M. pseudopropinqua* M. Pop، *M. ramosissima* Rochel ex Schultes و *M. sparsiflora* Mikan، *M. refracta* Boiss و *M. stricta* Link هستند. در فلورا ایرانیکا (Riedl, 1967)، فلور ایران (Khatamsaz, 2002) و فلور شوروی سابق (Popov, 1953)، این جنس به دو زیرجنس *Myosotis* و *Strophiosoma*، مشتمل بر گونه‌های یک‌ساله، دو ساله و چند ساله تقسیم شده است که وجه تمایز آنها در نوع گل‌آذین، ضخیم شدن یا نشدن دمگل در محل اتصال به کاسه و وجود یا فقدان زایده سفیدرنگ در محل ناف فندقه است. همچنین، برای زیرجنس *Myosotis* سه سری به نام‌های *Arvenses*، *Palustres* و *Silvatica* ارایه شده است که هر سری گونه‌هایی را شامل می‌شود. اما زیرجنس *Strophiosoma* بدون واحدهای تحت جنس است. این زیرجنس در ایران شامل چهار گونه: *M. propinqua*، *M. anomala*، *M. pseudopropinqua* و *M. sparsiflora* است.

خویشاوندی و بازسازی درخت فیلوژنی، نمونه‌های موجود در هر بار یوم دانشگاه تربیت مدرس و نمونه‌هایی از هر بار یوم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور (TARI) استفاده شد. از فلور ایران (Khatamsaz, 2002) به عنوان مرجع اصلی و در کنار آن از فلورا ایرانیکا (Reidl, 1967) و فلور شوروی سابق (Popov, 1953) برای شناسایی نمونه‌های هر بار یومی استفاده گردید. در مجموع، ۵۸ تاکسون (۴۷ گونه از جنس *Myosotis*، ۴ گونه از قبیله *Eritricheae* و ۵ گونه از قبیله *Cynoglosseae* و دو گونه تاکسون‌های درون گروه هستند و دو گونه *E. persicum* و *Echiochilon fruticosum* به عنوان برون گروه) استفاده شدند (Khoshsokhan Mozaffar et al., 2013). تاکسون‌های بررسی شده در مطالعه حاضر در جدول ۱ ارایه شده‌اند. برخی تاکسون‌های استفاده شده در تحلیل به دلیل منحصر بودن به برخی از نقاط جهان با استفاده از داده‌های Winkwort و همکارانش (۲۰۰۲) از بانک ژن انتخاب شدند.

اعضای گروه Austral شامل گونه‌های: *M. exarrhena*، *M. australis*، *M. albosericea* و *M. rakiura* و اعضای گروه Discolor شامل گونه‌های: *M. discolor*، *M. congesta*، *M. abyssinica* و *M. persoonii* می‌شود (Grau and Schwab, 1982)؛ Winkwort et al., 2002). مطالعات مولکولی که تاکنون در مورد جنس *Myosotis* انجام شده است توسط Winkwort و همکارانش (۲۰۰۲) با استفاده از توالی هسته‌ای nrDNA ITS و سه توالی کلروپلاستی *ndhF* و *matK* و *trnK-psbA* بوده است.

در پژوهش حاضر، از توالی هسته‌ای nrDNA ITS استفاده شده است و اهداف آن الف) تعیین تک تبار بودن واحدهای فرو جنسی *Myosotis*، ب) بررسی تک تبار بودن گونه‌های یک‌ساله این جنس و ج) بررسی روابط خویشاوندی گونه‌های جنس *Myosotis* در ایران است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری تاکسون‌ها: برای بررسی روابط

جدول ۱- گونه‌های مطالعه شده در تحلیل تبارزایی توالی‌های nrDNA ITS

GenBank Accession NO	منبع نمونه	نام تاکسون
AB989066	ایران: گرگان، پارک جنگلی به جنوب تنگه راه، وندلیو و همکاران (TARI, 11033)	<i>Myosotis ramosissima</i> Rochel ex Schultes
AY092923	ایران: (Winkwort et al., 2002)	
AB989070	ایران: آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، جمزاد و همکاران (TARI, 70250)	<i>M. lithospermifolia</i> (Willd) Hornem
AB989069	ایران: آذربایجان، منطقه حفاظت شده ارسباران، اسدی و معصومی (TARI, 20218)	
AB989072	ایران: آذربایجان، راضی به گرمی، مظفریان و نوروزی (TARI, 34770)	<i>M. anomala</i> Riedl
AB989073	ایران: گیلان، اسالم به خلخال، بالای سفید پشته، وندلیو و اسدی (TARI, 18543)	
AB989075	ایران: آذربایجان، رونه‌مارک و فروغی (TARI, 19881)	
AB989076	ایران: مازندران، جنوب رامسر، غرب جواهرده، رونه‌مارک و معصومی (TARI, 20778)	<i>M. sparsiflora</i> Mikan

GenBank Accession NO	منبع نمونه	نام تاکسون
AY092930	یونان (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	
AB989060	ایران: خراسان، منطقه حفاظت شده گولول سرانی، اسدی و معصومی (TARI, 50507)	<i>M. refracta</i> Boiss.
AY092928	ایران: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	
AB989074	ایران: مازندران، رامسر، پابو (TARI, 25601)	<i>M. propinqua</i> Fisch. & Mey ex Ledeb
AB989059	ایران: سمنان، منطقه حفاظت شده توران، فرایتاگ و مظفریان (TARI, 28893)	<i>M. stricta</i> Link
AY092907	استرالیا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	
AB989071	ایران: آذربایجان، غرب ارومیه، روستای سیلوانا، رونه‌مارک و فروغی (TARI, 19592)	<i>M. alpestris</i> Schmidt
AY092909	استرالیا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. australis</i> R. Br
AB989057	ایران: مازندران، جنوب رامسر، کوه خشه چال، اسدی و معصومی (TARI, 51212)	<i>M. olympica</i> Boiss. subsp. <i>demavendica</i> (Bornm. ex Vest.) Riedl
AB989068	ایران: مازندران، سیاه بیسه، خاتمساز و رحمانپور (TARI, 69233)	
AB758315	ایران: (TARI) (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>M. asiatica</i> Schizchk & Serg
AY092913	یونان: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. cadmea</i> Boiss.
AY092916	یونان: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. congesta</i> Shuttlew
AY092917	اسپانیا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. debilis</i> Pomel
AY092918	آلپی ماریتیم (مرز فرانسه-ایتالیا): (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. decumbens</i> Host
AY092920	استرالیا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. exarrhena</i> F.Muell
AY092922	یونان: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. incrassata</i> Guss
AY092914	زلاندنو: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. laxa</i> Lehm. ssp. <i>caespitosa</i>
AY092925	ایالات متحده آمریکا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. macrosperma</i> Engelm
AY092936	ایالات متحده آمریکا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. verna</i> Nutt
AY092937	اتیوپی: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. vestergrenii</i> Stroh
AY092927	اسپانیا: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. persoonii</i> Rouy
AY092929	زلاندنو: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. rakiura</i> L.B. Moore
AY092931	آلمان: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. rehsteineri</i> Wartm. ex Reut
AY092934	آفریقای جنوبی: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. semiamplexicaulis</i> DC.
AY092935	زلاندنو: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	
AB989064	استرالیا: باغ گیاه‌شناسی ملبورن، کاظم‌پور اوصالو (هرباریوم دانشگاه تربیت مدرس، 2011-8)	<i>M. sylvatica</i> Ehrh. Ex Hoffm
AB989065	ایران: همدان، کوه الوند، ۲۵۰۰-۳۳۰۰ متر، مظفریان (TARI, 64964)	
AY092904	اتیوپی: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	
AB989062	مراکش: پودلش (TARI, 45580)	<i>M. abyssinica</i> Boiss.
AY092905	زلاندنو: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. albosericea</i> Hook. F.

GenBank Accession NO	منبع نمونه	نام تاکسون
AY092908	آلمان: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. arvensis</i> (L.) Hill
AB989067	ایران: کرمانشاه، پابو (TARI, 25599)	<i>M. koelzii</i> Riedl, Oster. Bot
AB989077	ایران: گیلان، غرب بندر انزلی، رشینگر (TARI, 39622)	<i>M. caespitosa</i> Schultz
AB989058	ایران: مازندران، جنوب غربی رامسر، جواهرده، رونه‌مارک و معصومی (TARI, 20749)	<i>M. palustris</i> (L.)
AY092919	زلاندنو: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>M. discolor</i> Pers.
AB989061	فرانسه: راست (TARI, 13449)	
AB989063	تاجیکستان: کالتکینا (TARI, sn.)	<i>M. suaveolens</i> Waldst. Et Kit
AY092902	زلاندنو: (Winkworth <i>et al.</i> , 2002)	<i>Myosotidium hortensia</i> (Decne) Baill
AY837597	پرتغال: کارباجال و سرانو (SANT, 50019)	<i>Omphalodes linifolia</i> Moench
AB758298	ایران: (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Heterocaryum szovitsianum</i> Fisch. & Mey
AB758308	ایران: (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Lappula sinaica</i> DC.
AB758294	آلمان: (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Eritrichium cannum</i> (Benth) Kitam.
AB989056	ایران: آذربایجان، ارومیه، سیلوانا، برده‌سو، صیامی (TARI, 327)	<i>Paracaryum leptophyllum</i> Boiss.
AB758319	ایران: (FUMH) (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Trichodesma aucheri</i> DC.
AB758292	ایران: (TARI) (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Cynoglossum officinale</i> L.
AB758293	ایران: (TARI) (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Echiochilon persicum</i> (Burm.f.) Johnst.
AJ555908	مصر: (Langstrom and Oxelman, 2003)	<i>Echiochilon fruticosum</i> Desf.
AB758290	ایران: (Khoshokhan Mozaffar <i>et al.</i> , 2013)	<i>Asperugo perocumbens</i> L.

اما ناحیه ITS پس از پردازش ریپوزوم ترجمه نمی‌شود و به همین علت کمتر تحت فشار عملکردی است و سرعت بالای تکاملی، این ناحیه را برای بررسی روابط فیلوژنتیکی مناسب کرده است (Alvarez and Wendel, 2003).

به منظور تکثیر توالی‌های ITS nrDNA از آغازگرهای AB101F و AB102R (Douzery *et al.*, 1999) یا آغازگرهای ITS4 (White *et al.*, 1990) و ITS1F (Navajas-Pérez *et al.*, 2005) استفاده شد. برنامه PCR برای تکثیر قطعه به شرح زیر بود: واسرشت‌سازی اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، (واسرشت‌سازی ثانویه با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال با دمای ۵۳ درجه

استخراج، تکثیر و توالی‌یابی DNA: استخراج DNA

از نمونه‌های گیاهی با روش Doyle and CTAB (Doyle and Doyle, 1987) با اندکی تغییر انجام شد. سپس، DNA استخراج شده با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. در مطالعه حاضر، یک ناحیه از توالی DNA به نام ITS (Internal Transcribed Spacer) یا ناحیه فاصله‌گذار رونویسی‌شونده درونی که بخشی از DNA ریپوزومی هسته است، استفاده شد. درون این ناحیه، نواحی کدگذار بسیار حفاظت شده (5.8S nrDNA و 18S nrDNA و 26S nrDNA) به همراه نواحی غیر کدگذار (ITS و ETS) قرار دارند. نواحی ITS1 و ITS2 در بالغ شدن و پردازش ریپوزوم نقش مهمی دارند.

(consensus tree) حاصل از هر یک از تحلیل‌های مذکور، تحلیل بوت‌استرپ (Felsenstein, 2004) انجام شد. تعداد تکرارها در تمامی تحلیل‌های بوت‌استری برای برابر با ۱۰۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد. بیشینه درختان ذخیره شده به ازای هر تکرار در تمامی موارد ۱۰۰ درخت انتخاب شد.

روش بی‌زین: این روش بر مدل‌های تکاملی متمرکز شده، تمامی مکان‌های جانشینی را بررسی می‌کند. برای تحلیل داده‌های حاصل، مدل‌های تکاملی توسط برنامه MrModeltest نسخه ۲/۳ (Nylander, 2004) بر اساس معیار اطلاعاتی (Akaike AIC Information Critrion)، مدل جانشینی نوکلئوتید GTR+I+G برای داده‌ها انتخاب شد. تحلیل داده‌های ۴/۰۰۰/۰۰۰ نسل تکرار شد. هر ۱۰۰ نسل یک درخت نمونه برداری شد. سپس ۲۵ درصد درختان سوزانده شد. (Potential Scale Reduction Factor) PSRF (Gelman and Rubin, 1992)، واریانس بین دو اجرا و درون دو اجرا را با هم مقایسه می‌کند و اگر این مقدار برابر ۱ باشد به این معناست که نمونه برداری مناسبی برای توزیع احتمالات ثانویه وجود داشته است. همگرایی زنجیره‌ها بر اساس مقدار PSRF برابر با ۱ بود در نهایت، از درختان باقی مانده برای مشاهده یک درخت اجماعی ۵۰ درصد استفاده شد.

روش بیشینه درست‌نمایی: در تکامل، جهش‌های نقطه‌ای رویدادهای تصادفی هستند. بنابراین، به طور کلی، احتمال یافتن یک جهش در طول یک شاخه از درخت فیلوژنی را می‌توان با استفاده از چارچوب بیشترین درست‌نمایی محاسبه کرد. هدف از به کار بردن روش بیشینه درست‌نمایی دستیابی به فیلوژنی، تعیین توپولوژی درخت، طول شاخه‌ها و مؤلفه‌های

سانتیگراد به مدت یک دقیقه، بسط اولیه با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲/۵ دقیقه (۳۷ تا ۴۰ تکرار، بسط ثانویه با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. برای اطمینان از وجود DNA تکثیر شده، پس از انجام PCR، محصولات حاصل الکتروفورز شدند. محصولات با تک باند قوی و بدون کشیدگی، جهت تعیین توالی به کشور کره جنوبی فرستاده شدند.

تحلیل فیلوژنی: برای تحلیل داده‌های مولکولی کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی توسط نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷/۰/۹/۰ (Hall, 1999) مشاهده شدند و توالی‌های مورد نظر با فرم فستا توسط برنامه CLUSTAL (Larkin *et al.*, 2007) و نرم‌افزار MUSCLE نسخه ۴/۰ (Edgar, 2004) هم‌ردیف‌سازی و نقاط مبهم نیز به صورت چشمی تنظیم شدند. داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده موجود در ماتریس، با روش بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) تعبیه شده در نرم‌افزار PAUP* 4.b10 (Swofford, 2002) روش Bayesian توسط نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۱۲ (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) و روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) با نرم‌افزار raxmlGUI نسخه ۱/۱ (Silvestro and Michalak, 2012) تحلیل شدند.

روش بیشینه صرفه‌جویی: برای تحلیل داده‌ها، از جستجوی ابتکاری (heuristic search) و روش تبادل شاخه‌ای (swapping)، دو نیمه سازی درخت و اتصال مجدد شاخه‌ها (tree bisection reconnection) و گزینه چندین درخت (MULTrees) با ۱۰۰ تکرار از random addition sequences و MaxTrees=۱۰۰۰۰ (بیشینه درختان ذخیره شده) استفاده گردید. برای تعیین حدود اطمینان کلادها در درخت مطلق مرکزی (strict)

جمله: *Heterocaryum*, *Eritrichium cannum* و *szovitsianum* و *Lappula sinaica* با حمایت ۹۵ درصد جدا شدند. به دنبال آن، کلادی شامل دو زیر کلاد است که با حمایت ۸۵ درصد از هم اشتقاق یافتند. یک زیر کلاد شامل: *Cynoglossum officinale* و *Paracaryum leptophyllum* از قبیله *Cynoglosseae* با حمایت ۱۰۰ درصد است و زیر کلادی دیگر که خود متشکل از دو شاخه است: *Tricodesma aucheri* و جنس *Myosotis*.

Myosotis خود متشکل از شش کلاد A تا F است که این شاخه‌بندی مشابه مطالعات Winkworth و همکاران (۲۰۰۲) است. کلاد B به عنوان پایه‌ای ترین دودمان شامل گونه‌های زیرجنس *Strophostoma* از جمله: *M. anomala*, *M. propinqua* و *M. sparsiflora* است. سایر گونه‌ها (از زیرجنس *Myosotis*) در سرتاسر درخت در پنج کلاد دیگر پراکنده‌اند (A, C, D, E و F). کلاد C شامل تاکسون‌های: *M. decumbens*, *M. arvensis* و *M. sylvatica* و *M. olympica* subsp. *demavendica* و *M. vestergreni*؛ کلاد F شامل گونه‌های: *M. alpestris*, *M. asiatica* و *M. lithospermifolia* و *M. suaveolens* و *M. semiamplexicaulis* کلاد D شامل: *M. palustris*, *M. debilis*, *M. ceaspitosa* و *M. rehsteineri*؛ کلاد A متشکل از گونه‌های: *M. congesta*, *M. cadmea*, *M. abyssinica*, *M. koelzii*, *M. incrassata*, *M. discolor* و *M. ramosissima*, *M. persoonii*, *M. macrosperma* و *M. verna* و گونه‌های زلاندنویی شامل: *M. exarrhena*, *M. australis*, *M. albosericea* و *M. rakiura* و کلاد E شامل گونه‌های *M. refracta* و *M. stricta* است.

الگوی تکاملی است که احتمال مشاهده توالی موجود را به بیشترین مقدار خود می‌رساند در این روش ابتدا توسط نرم‌افزار Mesquite نسخه ۲/۷۱ (Maddison and Maddison, 2011) و سپس توسط نرم‌افزار BioEdit نسخه ۷/۰/۹/۰ (Hall, 1999) داده‌ها از فرمت Nexus به فرمت Phylip تغییر یافتند و بر اساس معیار اطلاعاتی (AIC) مدل GTRGAMMAI برای داده‌ها در برنامه RaxmlGUI نسخه ۱/۱ (Silvestro and Michalak, 2012) انتخاب شد، سپس گزینه thorough bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار انتخاب شد و پس از مشخص نمودن برون گروه تحلیل انجام شد.

نتایج

ماتریس داده‌ها دارای ۵۸ گونه، دارای ۶۵۲ جایگاه نوکلئوتیدی است که از این میان، ۲۱۳ جایگاه از لحاظ بیشینه صرفه‌جویی اطلاع‌رسان (informative) و بقیه غیر اطلاعاتی (uninformative) بودند. تحلیل داده‌ها با استفاده از روش بیشینه صرفه‌جویی، ۱۰۰۰۰ درخت با کوتاه‌ترین طول، برابر با ۷۸۶ گام، با شاخص پایداری یا ثبات (CI) ۰/۴۸۲، شاخص گروه‌پذیری یا ابقا (RI) ۰/۷۷۰ و شاخص هموپلازی (HI) برابر با ۰/۵۱۸ ایجاد کرد. توپولوژی درخت حاصل از روش بیزین مشابه با روش‌های بیشینه درست‌نمایی و بیشینه صرفه‌جویی است. بنابراین، درخت حاصل از تحلیل بیزین نشان داده شده است (شکل ۱). پس از برون گروه، *Asperugo procumbens* نخستین شاخه پایه‌ای درون گروه‌ها را تشکیل می‌دهد. پس از آن کلادی شامل دو گونه: *Myosotidium* و *Omphalodes linifolia* Munich *hortensia* با حمایت ۸۹ درصد جدا می‌شود. سپس، کلادی شامل برخی جنس‌های قبیله *Eritrichieae* از



شکل ۱- درخت تبارزایی حاصل از تحلیل توالی هسته‌ای nrDNA ITS با استفاده از روش بیزین. اعداد روی شاخه‌ها به ترتیب از چپ به راست: حدود اطمینان، حاصل از روش بیشینه صرفه جویی (MP)، روش بیشینه درست‌نمایی (ML) و روش بیزین (PP). گونه‌های منتشره در ایران با * نشان داده شدند. گونه‌های یک‌ساله با حرف A نشان داده شده است. طبقه‌بندی زیرجنسی بر اساس فلورا ایرانیکا (Riedl, 1967) و فلور ایران (Khatamsaz, 2002) برای گونه‌های ایرانی: گونه‌های زیرجنس *Myosotis* با قلم سیاه پُر رنگ (در کلادهای A، C، D، E و F) و گونه‌های زیرجنس *Strophostoma* با قلم سیاه کم رنگ (در کلاد B) مشخص شده است. طبقه‌بندی بخشه‌ای بر اساس Schwab و Grau (۱۹۸۲): بخشه *Myosotis* با ستون سیاه، گروه *Exarrhena Austral* بخشه *Exarrhena* با ستون سفید و گروه *Discolor* با ستون خاکستری نشان داده شده است.

بحث

تحلیل تبارزایی توالی هسته‌ای ITS نشان می‌دهد که سیستم طبقه‌بندی زیرجنسی *Strophostoma* و *Myosotis* (Riedl, 1967, Popov, 1953؛ Khatamsaz, 2002) مورد حمایت قرار می‌گیرد. اما سیستم طبقه‌بندی بخشه‌ای *Myosotis* و *Exarrhena* (Grau and Schwab, 1982) حمایت نمی‌شود. به بیان دیگر، زیرجنس‌ها هر کدام کلادی جدا را تشکیل می‌دهند و تک تبار هستند اما بخشه‌ها تک تبار نیستند (شکل ۱). وجه تمایز زیرجنس *Strophostoma* از زیرجنس *Myosotis*، در داشتن گل آذین خوشه‌ای، ضخیم شدن دمگل در محل اتصال به کاسه گل و داشتن زایده سفید رنگ در محل ناف فندقه است. بر اساس داده‌های مولکولی حاضر، زیر کلاد B به عنوان پایه‌ای‌ترین دودمان خواهر سایر کلادهای جنس *Myosotis* مربوط به زیرجنس *Strophostoma* است که روابط شاخه‌ها در این زیر کلاد به صورت پلی تومی و حل نشده باقی مانده است. در این کلاد، همه اعضای این زیرجنس قرار می‌گیرند. توپولوژی و گروه‌بندی درخت حاصل از پژوهش حاضر تقریباً مشابه با نتایج حاصل از مطالعات Winkworth و همکاران (۲۰۰۲) است. با این تفاوت که کلادی به نام F شامل گونه‌های: *M. lithospermifolia*، *M. asiatica*، *M. alpestris*، *M. suaveolens* و *M. semiamplexicaulis* گروه خواهری سایر گونه‌های زیرجنس *Myosotis* است. گونه‌های زیرجنس *Myosotis* در سرتاسر درخت پراکنده شده و در پنج زیر کلاد A، C، D، E و F قرار گرفته‌اند. بخشه *Exarrhena* متشکل از گروه *Discolor* از اوراسیا (*M. congesta*، *M. abyssinica*)، *M. personii* و *M. discolor* و گروه *Austral* شامل

گونه‌های زلاندنو (*M. australis*، *M. alboericea*)، *M. rakiura* و *M. exarrhena* به همراه برخی گونه‌های اوراسیایی از جمله *M. koelzii* (انحصاری ایران)، *M. ramosissima* و *M. incrassata* از بخشه *Myosotis* در کلاد A قرار گرفته است. *M. personii* گونه‌ای اوراسیایی و متعلق به گروه *Discolor* است و با حمایت بسیار بالا به عنوان خواهر گونه‌های زلاندنویی است، این گونه بر اساس نتایج حاصل از مطالعات Winkworth و همکاران (۲۰۰۲) نیز نزدیکترین خویشاوند اوراسیایی به گونه‌های زلاندنویی و نیمکره جنوبی است. در نتایج حاصل از پژوهش حاضر اعضای گروه *Austral* از بخشه *Exarrhena* دارای یک نیای مشترک است در نتیجه گروهی تک تبار هستند. اما اعضای گروه *Discolor* شامل گونه‌های: *M. congesta*، *M. abyssinica*، *M. personii* و *M. discolor* تک تبار نیست. در پژوهش حاضر، کلاد C همانند کلاد C در مطالعات Winkworth و همکاران (۲۰۰۲) است. با این تفاوت که *M. olympica* subsp. *demavendica* که جزو زیرجنس *Myosotis* و انحصاری ایران است نیز در جوار اعضای این کلاد قرار گرفته است. همان طور که ذکر شد در کلاد B تنها اعضای زیرجنس *Strophostoma* قرار دارند. برخلاف یافته‌های Winkworth و همکاران (۲۰۰۲)، *M. propinqua* در کنار *M. alpestris* و *M. lithospermifolia* قرار نمی‌گیرد. این دو گونه به همراه *M. suaveolens* (گونه‌ای رویش یافته در تاجیکستان)، *M. asiatica* و *M. semiamplexicaulis* جزو کلاد F هستند. بر اساس فلور شوروی سابق (Popov, 1953) و فلور اروپا (Grau and Merxmuller, 1972) اعضای کلاد F، به

درخت و در کنار گونه های مختلف جنس *Myosotis* از سایر نقاط جهان قرار گرفتند. بر این اساس، گونه های *Myosotis* ایرانی تک تبار نیستند. علاوه بر آن، گونه های یک ساله ایرانی شامل: *M. koelzii*، *M. refracta*، *M. ramosissima*، *M. propinqua*، *M. stricta* و *M. sparsiflora* گروهی تک تبار را تشکیل نمی دهند و در میان سه کلاد A، B و E پراکنده شده اند. البته به غیر از *M. refracta* و *M. stricta* که در کلاد E گروه خواهری یکدیگر هستند و با حمایت بالا از سایر کلادها جدا شده و با هم کلاد E را تشکیل دادند.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر علی اصغر معصومی و جناب آقای دکتر مصطفی اسدی به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه های هرباریوم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور برای مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می شود.

غیر از گونه *M. semiamplexicaulis*، با داشتن ویژگی هایی نظیر: ریزوم های کوتاه و متعدد، ریشه های بلند و گوشتی، ساقه ها اغلب با گُرک های خشن، کاسه دارای گُرک های متراکم، لوله جام کوتاه تر از کاسه و با فندقه هایی بیش از ۲ میلی متر سیاه و براق که با داشتن شیار جانبی به دو قسمت تقسیم می شود، گروهی از گونه های نزدیک به یکدیگر به نام گروه *M. alpestris* را تشکیل می دهند. *M. semiamplexicaulis* (رویش یافته در آفریقا) بر اساس ویژگی های دانه گرده و ویژگی های میکروسکوپی کلاله و جام گل، ارتباط نزدیکی با گروه *M. alpestris* نشان می دهد (Grau and Schwab, 1982). در تحقیق حاضر نیز همچون یافته های Winkworth و همکاران (۲۰۰۲)، این گونه ارتباط نزدیکی با اعضای این گروه دارد و در کلادی مشترک با اینها قرار گرفته است (F).

بنابراین، می توان نتیجه گرفت که گونه های جنوب غربی آسیا از جمله گونه های ایرانی در سرتاسر

منابع

- Alvarez, I. and Wendel, J. F. (2003) Ribosomal ITS sequence and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Douzery, E. J. P., Linder, H. P., Pridegeon, A. M., Kurzwil, H., Kores, P. and Chase, M. W. (1999) Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* 86: 887-899.
- 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.
- Gelman, A. and Rubin, D. B. (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science* 7: 457-511.
- 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. (2001) Pollen morphology of Iranian Boraginaceae family and its taxonomic significance. The Iranian Journal of Botany 9: 27-40.
- 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).
- Khoshokhan 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.
- Navajas-Pérez, R., de la Herrán, R., López González, G., Jamilena, M., Lozano, R., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M. and Garrido-Ramos, M. A. (2005) The evolution of reproductive systems and sex-determination mechanisms within *Rumex* (Polygoveae) inferred from nuclear and chloroplastial sequences data. Molecular Biology and Evolution 22: 1929-1939.
- Nylander, J. A. A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- 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.
- 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.
- Silvestro, D. and Michalak, I. (2012) RAXMLGUI: a graphical front-end for RAXML. Organisms Diversity and Evolution 12: 335-337
- Swofford, D. L. (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). version 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- White, J., Bruns, T., Loe, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications. (Eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.) 315-322. 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.

Molecular phylogeny of the genus *Myosotis* (Boraginaceae) based on nrDNA ITS sequences

Mahboubeh Sherafati ¹, Shahrokh Kazempour Osaloo ^{1*}, Maryam Khoshokhan Mozaffar ²,
Shokouh Esmailbegi ¹ and Nasim Saadati ¹

¹ Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

Abstract

Myosotis, forget-me-not, is one of the genera of Boraginaceae-Boraginoideae. This genus consists of about 100 species distributed predominantly in the temperate zones of both hemispheres. *Myosotis* has two centers of diversity-one in western Eurasia and the other in New Zealand. In Iran, 15 species of this genus has been identified. *Myosotis* species are small tiny perennial and annual plants characterized by smooth nutlets. In this study, 58 accessions (including 56 taxa as ingroups and two taxa *Echiochilon persicum* and *E. fruticosum* as outgroups) were included for the phylogenetic analyses using nrDNA ITS sequence data. Phylogenetic analyses were performed using maximum parsimony approach as implemented in PAUP* software, Bayesian inference using Mr Bayes program and Maximum Likelihood method using raxmlGUI program. The heuristic search of the MP analysis resulted in 10000 shortest trees of 786 steps length with a consistency index (CI) = 0.482 and a retention index (RI) = 0.770 (excluding uninformative characters). In the trees resulting from maximum parsimony, Bayesian and maximum likelihood methods, *Myosotis* was monophyletic and composed of six distinct monophyletic clades (A-F). In contrast to the sectional classification system (sections *Myosotis* and *Exarrhena*), the subgeneric classification system (subgenera *Myosotis* and *Strophlostoma*) for the genus are supported. Annual species did not form a monophyletic group, instead, they were dispersed among biennials and perennials across the tree. Likewise, the species growing in Iran and southwest Asia were scattered across the tree among other species of the genus.

Key words: nrDNA ITS, *Myosotis*, Boraginaceae, Phylogeny, Iran

* skosaloo@modares.ac.ir