

## The Genetic Relationships among Species of *Derderianum* Group and Related Species in the Genus *Allium* Evidenced by SRAP Markers in Iran

Bahareh Borjian Borujeni <sup>1</sup>, Hojjatollah Saeidi <sup>2\*</sup>, Azadeh Akhavan Roofgar <sup>3</sup>

<sup>1</sup> M. S. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor Research Department of Natural Resources, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran

### Abstract

In this study, a total of 35 samples belonging to 9 species of the genus *Allium* sect. *Acanthoprason* were evaluated. The samples were analyzed using 6 SRAP primer combinations that showed 78 bands. The obtained data were then analyzed using NTSYS-pc software, Jaccard, Dice coefficients, and Neighbor Joining clustering method. The results showed that all samples of each species were mainly grouped, which supports the taxonomic classification based on morphology. Regarding the high genetic similarities, geographic distribution and previous studies, *A. derderianum* and *A. alamutense* can be considered as close related species. Also the results showed a close relationship between *A. hamedanense* and *A. materculae*. Based on the results of this study, the taxonomic status of the section in Iran needs to be revised. Indeed, SRAP can be useful in distinguishing the species in the closely related species. As the species of *Acanthoprason* are endemic to Iran and it is critical to have programs for protection of the species.

**Key words:** *Derderianum* Alliance, Sect. *Acanthoprason*, Onion, Molecular Systematics.

\* ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

## بررسی روابط ژنتیکی بین گونه‌ای گروه *derderianum* و گونه‌های مرتبط در سرده *Allium* در ایران

بهاره برجیان بروجنی<sup>۱</sup>، حجت‌الله سعیدی<sup>۲\*</sup>، آزاده اخوان روفیگر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد سیستماتیک گیاهی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> استادیار بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

### چکیده

در مطالعه حاضر، ۳۵ نمونه از ۹ گونه *Allium* از بخش *Acanthoprason* با نشانگر مولکولی SRAP بررسی شدند. در PCR با استفاده از شش جفت پرایمر SRAP در همه نمونه‌ها ۷۸ باند مشاهده شد. سپس داده‌های حاصل با نرم‌افزار NTSYS-pc و با استفاده از ضرایب دایس و جاکارد و روش Neighbor Joining تحلیل شدند. نتایج مطالعه ماهیت تاکسونومیک اغلب گونه‌ها را تأیید می‌کند. بر اساس نتایج مطالعه حاضر دو گونه *A. derderianum* و *A. alamutense* با یکدیگر قرابت ژنتیکی نشان می‌دهند و خویشاوند نزدیک دانسته می‌شوند. همچنین دو گونه *A. materculae* و *A. hamedanense* قرابت ژنتیکی بیشتری در قیاس با سایر گونه‌ها دارند. نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده ضرورت بازنگری بخش *Acanthoprason* در ایران است؛ علاوه بر این، مطالعه حاضر نشان می‌دهد SRAP نشانگر مناسبی برای بررسی تاکسونومی گونه‌های گیاهی نزدیک است. گونه‌های متعلق به این بخش به دلیل انحصاری بودن در ایران دارای ارزش زیادی برای تعیین جایگاه حفاظتی هستند.

**واژه‌های کلیدی:** اتحادیه *derderianum*، بخش *Acanthoprason*، پیاز، سیستماتیک مولکولی.

### مقدمه

(Phylogeny Group, 2016) سرده پیاز به خانواده

Allioideae Amaryllidaceae تعلق دارد و در زیرتیره

قرار می‌گیرد. این سرده در آخرین مطالعه‌ها به ۱۵

زیرسرده، ۵۷ بخش و ۶۰۰ گونه طبقه‌بندی شده است

(Gurushidze et al., 2008; World Checklist,

2013). منطقه ایرانی - تورانی یکی از مراکز اصلی

سرده *Allium* L. (پیاز) دارای ۶۰۰ گونه (World

Checklist, 2013) در جهان است؛ حدود ۱۲۶ گونه از

این سرده در ایران می‌رویند و ۳۰ گونه انحصاری ایران

هستند (Fritsch and Abbasi, 2013). بر اساس

آخرین طبقه‌بندی انجام شده (The Angiosperm

\* ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

می‌شوند. در مطالعه‌های انجام‌شده، نشانگر مولکولی یادشده برای تعیین تنوع ژنتیکی و روابط میان جمعیت‌ها به کار برده شده است (Budak et al., 2004). در مطالعه حاضر، از نشانگر مولکولی SRAP برای مطالعه تاکسونومی و روابط بین گونه‌ای اتحادیه *derderianum* و گونه‌های نزدیک به آن در بخشه *Acanthoprason* شامل گونه‌های *A. breviscapum* A. *egorovae* A. *derderianum* Regel, Stapf A. *alamutense* Razafard, M.V. Agab. & Ogan. A. *kurdistanicum* Zarre & R.M. Fritsch A. *materculae* Bordz. Maroofi & R.M. Fritsch و *A. minutiflorum* Regel استفاده شد.

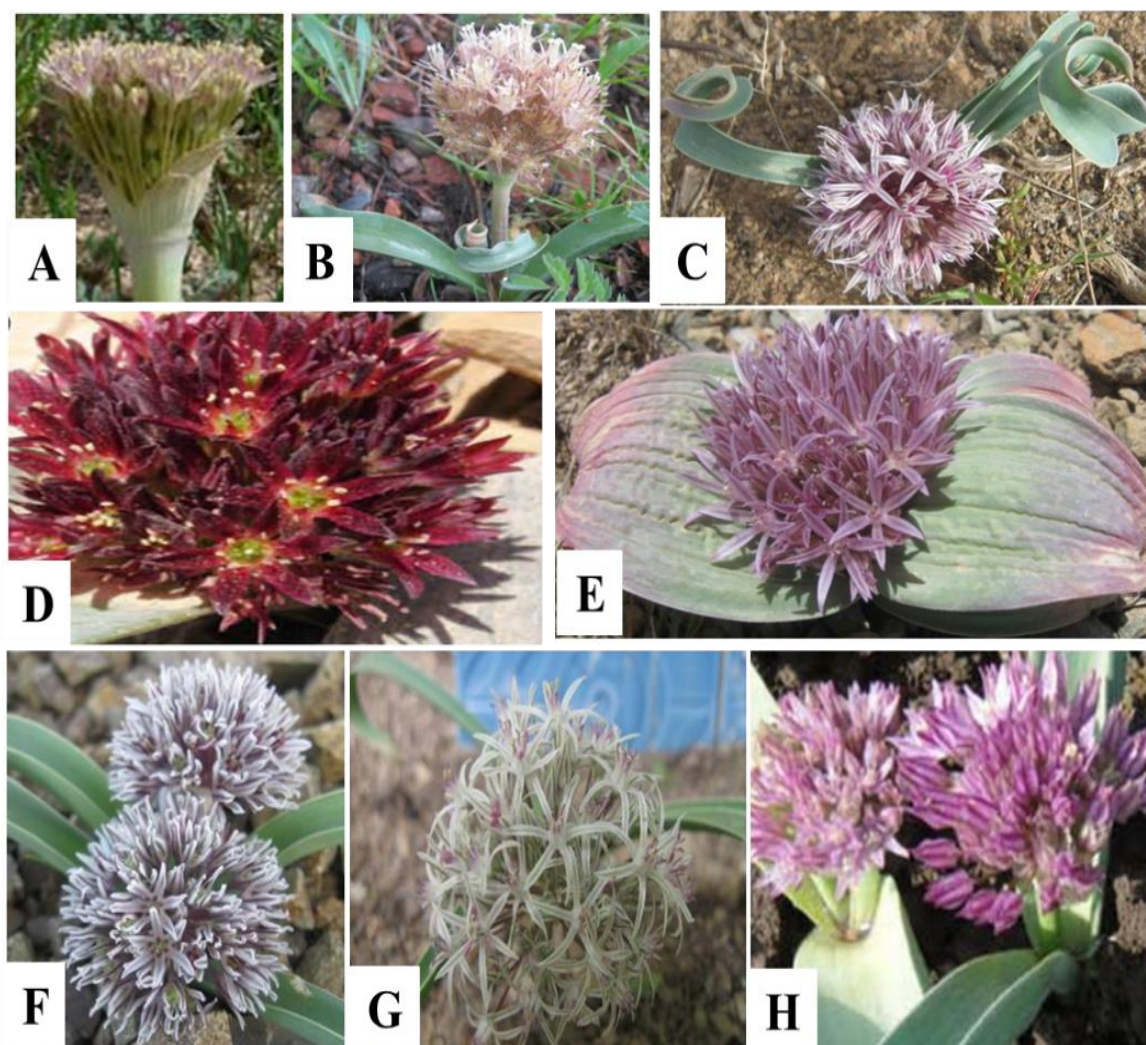
### مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ۳۵ نمونه از ۹ گونه بخشه *Acanthoprason* متعلق به اتحادیه *derderianum* و گونه‌های نزدیک به آن مطالعه شدند. نمونه‌های بررسی شده عبارتند از: *A. alamutense* (۳ نمونه)، *A. derderianum* (۴ نمونه)، *A. egorovae* (۴ نمونه)، *A. kurdistanicum* (۳ نمونه)، *A. hamedanense* (۵ نمونه)، *A. berrisapum* (۵ نمونه)، *A. minutiflorum* (۵ نمونه)، *A. graveolens* (۴ نمونه). اطلاعات مربوط به نمونه‌های مطالعه‌شده در جدول (۱) و تصاویر برخی گونه‌ها در شکل (۱) دیده می‌شوند.

تکامل *Allium* است (Gurushidze et al., 2008; Fritsch and Abbasi, 2013). کشور ایران با داشتن ۷ زیرسرده، ۲۹ بخشه و ۱۲۶ گونه از سرده *Allium* یکی از مراکز مهم تنوع آن به حساب می‌آید. زیرسرده *Melanocrommyum* ۲۵ تاکسون و ۱۷۰ گونه دارد (Fritsch, 2012). گونه‌های دو بخشه *Astroprason* و *Acanthoprason* در این زیرسرده عمدتاً انحصاری ایران هستند. بخشه *Acanthoprason* شامل ۷ اتحادیه *haemanthoides* *austroiranicum* *akaka* *materculae* *derderianum* *ubipetrense* و *minutiflorum* (Fritsch and Abbasi, 2013) است که بیشتر گونه‌های آن در ایران می‌رویند. این بخشه از نظر تنوع زیستی و پراکنش گونه‌ها در ایران دارای اهمیت ویژه‌ای است؛ به طوری که بیشتر گونه‌های گزارش شده از آن بومی ایران هستند و این کشور مرکز درخور توجه پیدایش و تنوع این گونه‌ها است. این بخشه از نظر تاکسونومیک پیچیده و تفکیک گونه‌ها بر اساس صفت‌های ریخت‌شناسی بسیار دشوار است؛ بنابراین نیاز به استفاده از داده‌های مولکولی برای تشخیص و بررسی گونه‌ها احساس می‌شود. این بخشه در مطالعه‌های پیشین (Akhavan et al., 2015; Fritsch and Abbasi, 2013) با استفاده از داده‌های حاصل از توالی‌های ITS و ISSR مطالعه شده است. نخستین بار Li و Quiros (۲۰۰۱) نشانگر مولکولی SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) را معرفی کردند؛ در این روش، توالی‌های کددهنده ژنوم با پرایمرهای ۱۷ تا ۱۹ نوکلئوتیدی هدف‌گیری

جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی و هرباریومی مربوط به گونه‌های *Allium* مطالعه شده در بخش *Acanthoprason*

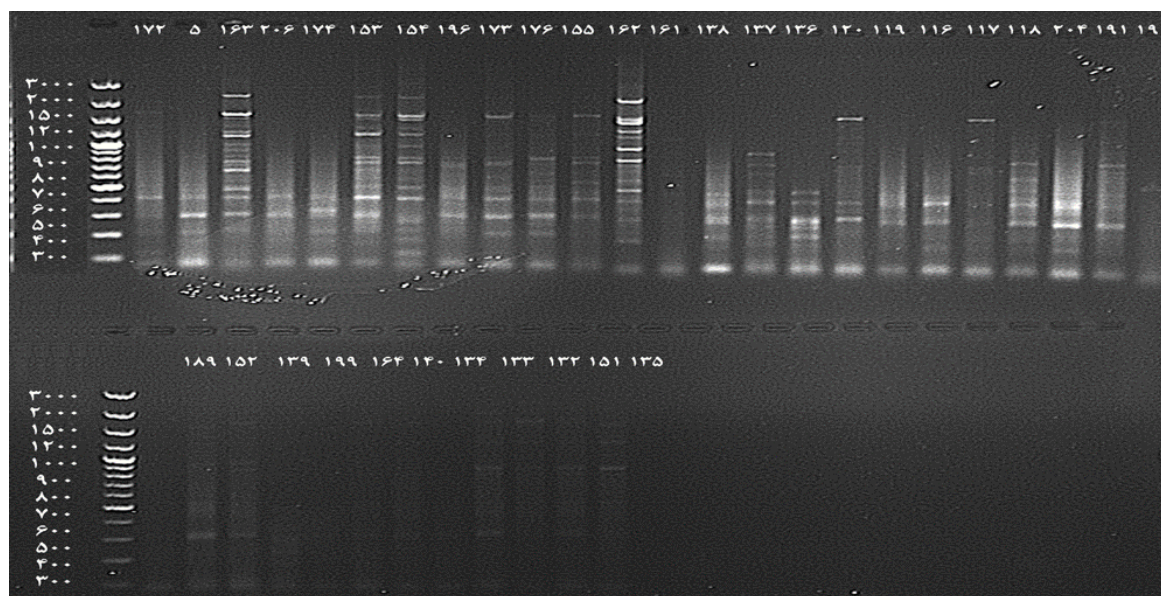
اتحادیه	شماره هرباریومی	تاریخ جمع آوری	ارتفاع (متر)	طول و عرض جغرافیایی	محل جمع آوری، جمع آوری کننده	گونه
<i>derderianum</i>	19454 (HUI)	۸۹/۰۳/۰۶	2450	N 34° 45' 56" E 48° 26' 01"	همدان (گنجانمه)، سعیدی و اخوان	<i>A. breviscapum</i>
<i>derderianum</i>	19491 (HUI)	۹۰/۰۳/۰۹	2400	N 38° 38' 23" E 45° 54' 82"	آذربایجان شرقی (مرند، زنوز، کوه کمر)، سعیدی و اخوان	<i>A. egorovae</i>
<i>derderianum</i>	19456 (HUI)	۸۹/۰۳/۱۰	2525	N 38° 49' 15" E 46° 49' 89"	آذربایجان شرقی (ارسباران، پیغان چای)، سعیدی و اخوان	<i>A. egorovae</i>
<i>minutiflorum</i>	19458 (HUI)	۸۹/۰۳/۰۶	2450	N 34° 45' 56" E 48° 26' 01"	همدان (سد اکباتان)، سعیدی و اخوان	<i>A. hamedanense</i>
<i>derderianum</i>	19459 (HUI)	۸۹/۰۳/۰۷	2251	N 36° 03' 29" E 45° 59' 12"	کردستان (سقز)، سعیدی و اخوان	<i>A. kurdistanicum</i>
<i>materculae</i>	19460 (HUI)	۹۰/۰۳/۰۹	2000	N 38° 19' 86" E 45° 48' 51"	آذربایجان شرقی (مرند، پیام (پام))، سعیدی و اخوان	<i>A. materculae</i>
<i>materculae</i>	TAX6903 6887 (GAT)	۹۰/۰۳/۱۶	1950	N 38° 19' E 45° 48'	آذربایجان شرقی (مرند، پیام)، زارع	<i>A. materculae</i>
<i>derderianum</i>	19497 (HUI)	۹۰/۰۳/۱۲	2915	N 36° 24' 56" E 50° 47' 12"	مازندران (گرمارود به سمت تنکابن)، سعیدی و اخوان	<i>A. derderianum</i>
<i>derderianum</i>	19550 (HUI)	۹۰/۰۳/۱۲	2915	N 36° 26' 62" E 50° 48'	مازندران (گرمارود به تنکابن)، سعیدی و اخوان	<i>A. derderianum</i>
<i>minutiflorum</i>	1223 (TARI)	۷۴/۰۳/۰۱	2200	N 32° 39' 37" E 51° 19' 70"	اصفهان (قمیشلو)، یوسفی	<i>A. minutiflorum</i>
<i>derderianum</i>	19500 (HUI)	۹۰/۰۳/۱۲	1905	N 36° 28' 79" E 50° 26' 98"	قزوین (الموت)، سعیدی و اخوان	<i>A. alamutense</i>
<i>derderianum</i>	TAX6866 (GAT)	۹۱/۰۲/۰۸	1700	N 36° 20' E 50° 12'	قزوین (الموت، کنار دریاچه اوان)، راضی فرد	<i>A. alamutense</i>
<i>derderianum</i>	TAX6869 (GAT)	۹۵/۰۲/۲۱	3100	N 36° 29' E 50° 2'	قزوین (معلم کلایه)، جمزاد IPK Taxonomic Allium Reference collection	<i>A. alamutense</i>
<i>materculae</i>	۱۹۴۵۷ (HUI)	۹۰/۰۳/۰۵	1860	N 34° 15' 73" E 49° 45' 52"	مرکزی (اراک، ویسمه)، سعیدی و اخوان	<i>A. graveolens</i>



شکل ۱- تصاویر برخی گونه‌های *Allium* متعلق به بخش *Acanthoprason* مطالعه شده؛ A. *graveolens*. B. *materculae*. C. *derderianum*. D. *hamedanense*. E. *kurdistanicum*. F. *egorovae*. G. *breviscapum*. H. *alamutense*.

۱۰۰ نانوگرم DNA انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد نمایان و باهم مقایسه شدند (شکل ۲). در نهایت، هفت جفت نشانگر مولکولی SRAP برای تعیین روابط ژنتیکی بین گونه‌های مطالعه شده استفاده شدند. در جدول (۲) نشانگرهای SRAP و توالی‌های آنها مشاهده می‌شود.

DNA استخراج شده در مطالعه‌های پیشین (Akhavan *et al.*, 2015) در پژوهش حاضر استفاده شد. پس از اطمینان یافتن از کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز، ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم از آن برای انجام PCR استفاده شد. PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میلی‌لیتر آمپلی‌کن، ۵ پیکومول از هر پرایمر و ۵۰ تا



شکل ۲- ژل آگارز محصول PCR برای ۳۵ نمونه مربوط به نشانگر Em4Me2

جدول ۲- توالی نشانگرهای SRAP استفاده شده در مطالعه حاضر (باند در جفت نشانگر Em2 و Me2 مشاهده نشد)

نشانگر SRAP $T_m=35^{\circ}c$	تعداد باند	توالی پرایمر (5' → 3')
Em2	-	GACTGCGTACGAATTTGA
Me2	-	TGAGTCCAAACCGGATA
Em2	۱۲	GACTGCGTACGA ATT T GC
Me4	۱۲	TGAG TCCAAACCGGACC
Em3	۱۴	GACTGCGTACGAATTGAC
Me3	۱۴	TGAGTCCAAACCG GACC
Em1	۱۲	GACTGCGTACGAATT AAT
Me1	۱۲	TGAGTCCAAACCGGATA
Em3	۱۴	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	۱۴	TGAGTCCAAACCGGACC
Em4	۱۳	GACTGCGTACGAATTTGA
Me2	۱۳	TGAGTCCAAACCGGATA
Em4	۱۳	GACTG CGTACG AATTGA
Me4	۱۳	TGAGTCCAAACCGGACC

داده شده است). روابط بین نمونه‌های مطالعه شده با

استفاده از روش خوشه‌بندی اتصال همسایه (Neighbor

Joining) تعیین و روی شکل (۳) نشان داده شد.

#### مشاهده‌ها

باند‌های مشاهده شده برای کل افراد بررسی شده

۷۸ باند بود؛ ۱۲ باند برای نشانگر Em1Me1، ۱۲ باند

#### تحلیل داده‌ها

برای هر محصول PCR، حضور یا نبود باند روی ژل

آگارز به ترتیب با ۱ و صفر مشخص و وارد جدول خام

داده‌ها شد. میزان شباهت بین تاکسون‌ها با استفاده از

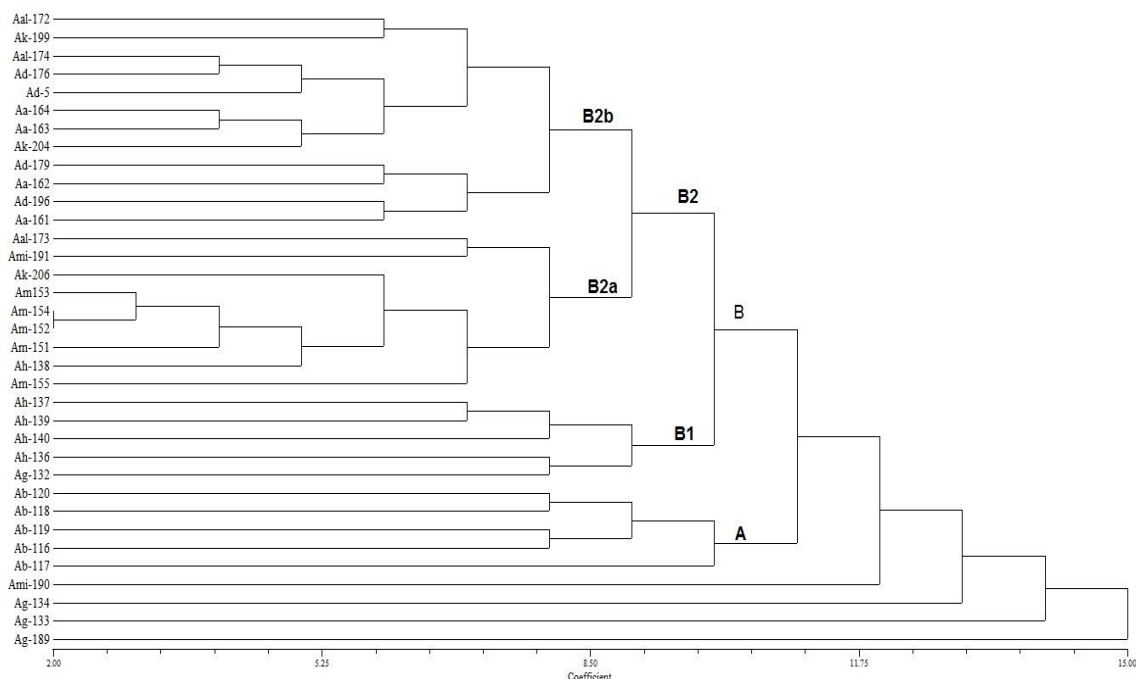
ضرایب تشابه جاکارد (Jaccard, 1912) و دایس

(Dice, 1945) در نرم‌افزار NYSYS-pc (Rohlf,

2000) محاسبه شد (تنها نتایج ضریب جاکارد نشان

برای Em4ME4 که همگی چندشکل بودند و اندازه باندها بین ۳۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز بود.

برای Em2Me4، ۱۴ باند برای Em3Me3، ۱۴ باند برای Em3Me4، ۱۳ باند برای Em4Me2 و ۱۳ باند



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌های SRAP برای ۳۵ نمونه از ۹ گونه مختلف *Allium* متعلق به بخش *Acanthoprason* با استفاده از روش NJ و بر اساس ضریب تشابه جاکارد؛ Ak= *A. kurdistanicum*, Ah= *A. hamedanense*, Aa= *A. egorovae*, Ag= *A. graveolens*، Ab= *A. breviscapum* و Aal = *A. alamutense*، Ami= *A. minutiflorum*، Ad= *A. derderianum*، Am= *A. materculae*

*A. alamutense* و *A. derderianum*، *A. egorovae* است که به شکل پراکنده قرار گرفته‌اند. به‌طور کلی سه خوشه اصلی در دندروگرام حاصل از داده‌های SRAP مشاهده می‌شود: در خوشه اول با توجه به زیرخوشه‌ها، گونه‌های *A. alamutense* و *A. derderianum* قرابت دارند، در خوشه دوم گونه‌های *A. hamedanense* و *A. materculae* و در خوشه سوم گونه‌های *A. breviscapum* و *A. graveolens* قرار دارند.

دو خوشه اصلی A و B در دندروگرام حاصل از داده‌های SRAP مشاهده می‌شوند. تمام ۵ فرد *A. breviscapum* در خوشه A قرار دارند. خوشه B به دو خوشه فرعی B1 و B2 تقسیم می‌شود که B1 شامل ۴ فرد از گونه *A. hamedanense* و ۱ فرد از گونه *A. graveolens* و B2 شامل دو زیرشاخه B2a و B2b است؛ B2a شامل ۵ فرد از گونه *A. materculae*، ۱ فرد از *A. hamedanense*، ۱ فرد از *A. kurdistanicum*، ۱ فرد از *A. minutiflorum* و ۱ فرد از *A. alamutense* است و B2b گروه ناهمگنی متشکل از گونه‌های *A. kurdistanicum*

## بحث و نتیجه‌گیری

در بین گونه‌های *Allium* اعضای بخشه *Acanthoprason* گروه تقریباً همگنی از نظر ریخت‌شناسی تشکیل می‌دهند (Fritsch, 2012). صفت‌های ریخت‌شناسی مانند حاشیه و رنگ برگ، شکل و رنگ گل آذین و گل‌پوش و اندازه میله پرچم همراه با نتایج مولکولی برای تفسیر این سرده و تاکسون‌های متعلق به آن در مطالعه‌های پیشین به کار برده شده‌اند (Gurushidze et al., 2008)؛ بر اساس مطالعه‌ها و پژوهش‌های جدید تنها صفت‌های ریخت‌شناسی برای تعیین مرز دقیق گونه‌ها کافی نیستند (Fritsch, 2012; Fritsch and Abbasi, 2013; Akhavan et al., 2015). افراد گونه *A. hamedanense* در دندروگرام حاصل از داده‌های SRAP کنار هم قرار گرفته‌اند که احتمالاً از قرابت مکانی نمونه‌ها ناشی می‌شود زیرا همه از یک مکان نمونه‌برداری شده‌اند. برای قضاوت دقیق‌تر درباره تنوع وراثتی این گونه، نمونه‌برداری از مناطق رویشی دیگر در صورت وجود و با تعداد بیشتر لازم است. نمونه‌های مطالعه‌شده *A. minutiflorum* در دندروگرام پراکنده‌اند و این امر ممکن است از تنوع وراثتی زیاد درون این گونه که هنوز در صفت‌های ریخت‌شناسی آشکار نشده است ناشی شده باشد؛ هرچند هم‌اکنون همه افراد این جمعیت به یک گونه تعلق دارند. افراد گونه *A. graveolens* در دندروگرام نزدیک به هم قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده تنوع وراثتی کم درون این گونه است و نشان می‌دهد حتی جدایی جغرافیایی زیاد مؤثر نبوده است. روابط درون‌گونه این گونه در تمام دندروگرام‌های ترسیم‌شده بر اساس ضرایب مختلف یکسان نیست (نشان داده نشده است). بر اساس داده‌های

SRAP، *A. derderianum* و *A. alamuntense* که هر دو تقریباً به یک منطقه جغرافیایی تعلق دارند با یکدیگر گروه‌بندی می‌شوند که قرابت ژنتیکی این دو گونه را نشان می‌دهد. در مطالعه‌های اخوان و همکاران (منتشرنشده) بر اساس توالی ITS نیز دو گونه یادشده همسانی ژنتیکی زیادی دارند؛ بر اساس این و برخی صفت‌های ریخت‌شناسی مانند طول پرچم نسبت به طول گل‌پوش، شکل برگ و رنگ میله پرچم پیشنهاد می‌شود این دو، یک گونه هستند و گونه *A. alamuntense* مترادف *A. derderianum* در نظر گرفته می‌شود؛ همچنین علاوه بر تفاوت آنها در رنگ گل‌پوش و موج‌دار بودن برگ باید قرابت ژنتیکی ناشی از جریان ژنی احتمالی بین دو گونه در یک منطقه جغرافیایی در نظر گرفته شود.

بر اساس اطلاعات ریخت‌شناسی و مولکولی به نظر می‌رسد *A. minutiflorum* دارای قرابت کمتری با سایر گونه‌های بخشه *Acanthoprason* است و تنوع ژنتیکی زیادی دارد؛ بنابراین، نمونه‌برداری وسیع و مطالعه بهتر برای تعیین روابط ژنتیکی این گونه ضروری است.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهند احتمالاً تحلیل‌های SRAP روش مؤثری برای تعیین روابط بین گونه‌های نزدیک است. بخشی از گروه‌های ایجادشده در دندروگرام مطالعه حاضر با مطالعه‌های پیشین (Akhavan et al., 2015) هماهنگی دارند و به‌طور کلی استفاده از این نشانگر برای تشخیص گونه‌های نزدیک پیشنهاد می‌شود. مزیت نشانگر SRAP در مقایسه با داده‌های حاصل از توالی ITS، گروه‌بندی بهتر و آسان‌تر و مقرون‌به‌صرفه بودن آن است.



جمع‌آوری نمونه از نواحی مختلف جغرافیایی به‌طور دقیق بازنگری شود و سایر بخشه‌ها و زیرسرده‌های آن در ایران به‌طور وسیع مطالعه شوند. از آنجاکه اغلب گونه‌های بخشه *Achantoprason* در ایران انحصاری و محدود به ناحیه جغرافیایی خاص (بوم‌زاد) هستند امکان بررسی دقیق‌تر از نظر جایگاه حفاظتی وجود دارد؛ از این‌رو، داشتن برنامه‌های وسیع برای محافظت در مکان یا در بانک ژن این گونه‌ها ضروری است.

باتوجه به اینکه تاکنون هیچ مطالعه‌ای به تعیین بارکد مشخص برای سرده *Allium* منجر نشده است، مطالعه‌های مولکولی بیشتر با استفاده از مجموعه‌ای از نشانگرها به‌ویژه قطعه‌های دارای سرعت تکاملی بیشتر مانند *ycf1* و یا برخی ژن‌های تک‌نسخه‌ای قابل‌استفاده به‌عنوان نشانگرهای مرز گونه‌ای ضروری است. باتوجه به اهمیت خوراکی، دارویی و حفاظتی سرده *Allium* و جایگاه ویژه ایران در تنوع این سرده پیشنهاد می‌شود تاکسونومی سرده یادشده در ایران با

### منابع

- Akhavan, A., Saeidi, H., Rahiminejad, M. R., Zarre S., Blattner, F. R. and Fritsch, R. M. (2015) Interspecific relationships in *Allium* subgenus *Melanocrommyum* sections *Acanthoprason* and *Asteroprason* (Amaryllidaceae) revealed using ISSR markers. *Systematic Botany* 40(3): 706-715.
- Budak, H., Shearman, B., Gaussoin, R. E. and Dweika, I. M. (2004) Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of turfgrass species. *Horticultural Science* 39(5): 955-958.
- Dice, Lee R. (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 (3): 297-302.
- Fritsch, R. M. (2012) Illustrated key to the sections and subsections and brief general circumscription of *Allium* subg. *Melanocrommyum*. *Phyton* 52: 1-37.
- Fritsch, R. M. and Abbasi, M. (2013) A taxonomic review of *Allium* subgen. *Melanocrommyum* in Iran. *IPK Gatersleben, Gatersleben*.
- Gurushidze, M., Fritsch, R. M. and Blattner, F. R. (2008) Phylogenetic analysis of *Allium* subgenus *Melanocrommyum* infers cryptic species and demands a new sectional classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 997-1007.
- Jaccard, P. (1912) The distribution of the flora in the alpine zone. *New Phytologist* 11: 37-50.
- Li, G. and Quiros, C. F. (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 455-461.
- Rohlf, F. (2000) NTSYS. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Software, New York.
- The Angiosperm Phylogeny Group (2016) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.
- World Checklist of Selected Plant Families (2013) Kew, Facilitated by the Royal Botanic Gardens. Retrieved from <http://apps.kew.org/wcsp>. On 30 April 2013.