

جغرافیای زیستی گونه‌های *Lycium* (Solanaceae) و فیلوژنی گونه‌های *Lycium* در دنیای قدیم بر اساس توالی ناحیه *ITS* از nrDNA و *trnL-F* از cpDNA

نجمه آزادی چگینی^{۱،۲*}، وحیده ناظری^۱، عبد الحمید شوشتری^۱ و شاهرخ کاظم پور اوصالو^۳

^۱ کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی

^۲ کرمان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ماهان

^۳ تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم گیاهی

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۶

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۴

چکیده

جنس گرگ تیغ یا دیوخار (*Lycium*) از تیره Solanaceae، زیر تیره Solanoideae و طایفه Lycieae با بیش از صد گونه گیاهی، عمدتاً در مناطق خشک و نیمه خشک جهان پراکنش دارد. اکثر مطالعات فیلوژنی و جغرافیای زیستی جنس *Lycium* بر اساس گونه های آمریکای شمالی و جنوبی و برخی از گونه های دنیای قدیم انجام شده است. در این تحقیق، برای مطالعه روابط فیلوژنی *Lycium* های دنیای قدیم و همبستگی جغرافیای زیستی گونه های دنیای جدید و قدیم، گونه های ایران در کنار بسیاری از گونه های دنیای جدید و دنیای قدیم و بر اساس دو ژن *trnL-F* (کلروپلاستی) و ژن *ITS* (هسته ای) بررسی شدند. بررسی های انجام شده بر اساس توالی نواحی مشخص شده نشان می دهد گونه های دنیای قدیم بر خلاف برخی مطالعات پیشین یک مجموعه چند نیا را تشکیل می دهند. از طرفی جنس *Lycium* ابتدا در دنیای جدید (آمریکای جنوبی) به وجود آمده، سپس به آفریقا و از آنجا به یوراسیا انتقال یافته است. مسیر بعدی نقل و انتقالات از آفریقای جنوبی و یوراسیا به استرالیا می باشد. بر اساس نتایج این تحقیق استرالیا نقطه نهایی نقل و انتقالات جنس *Lycium* می باشد.

واژه های کلیدی: *Lycium*، *ITS*، *trnL-F*، جغرافیای زیستی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۷۳۸۸۹۱۷، پست الکترونیکی: Chegin_2004@yahoo.com

مقدمه

تاکسونهای دنیای قدیم را نشان دادند. آنها مسیر پراکنش این جنس را از آمریکا به سمت آفریقا، و از آنجا به سمت یوراسیا و استرالیا تعیین کردند (شکل ۷- الف) (۶). میلر با مطالعه توالی *ITS1* و *ITS2* و ۶ تاکسون از دنیای قدیم از مجموع ۳۴ تاکسون بررسی شده، چند نیا بودن *Lycium* های دنیای قدیم را نشان داد (۱۰). برای حل نتایج متناقض، میلر و فوکودو خواهان بررسی تعداد بیشتری از تاکسونها شدند (۶ و ۱۰). لوین و میلر با بررسی ۴۸ تاکسون و ژنهای کلروپلاستی *trnT-trnF* و ژن هسته ای *GBSSI*، با استناد به اینکه از تمام گونه های دنیای قدیم در

جنس *Lycium* با شش گونه در ایران، به اسامی دیوخار، گرگ تیغ، کام تیغ، آسه و سریم خوانده می شود (۱). در سالهای اخیر به روابط فیلوژنی در طایفه Lycieae توجه زیادی شده است. الم استد و همکاران بر اساس داده های حاصل از cpDNA از یک گونه *Grabowskia* و ۵ گونه *Lycium* (۲ گونه از دنیای جدید و ۳ گونه از دنیای قدیم) گونه های دنیای قدیم را تک نیا معرفی کردند (۱۲). فوکودو و همکاران با بررسی ژنهای کلروپلاستی *matK* و فاصله اندازه های بین ژنی *trnL-trnF* و اینترون *trnL* و ۱۲ گونه از *Lycium* های دنیای قدیم، مجدداً تک نیا بودن

مطالعه خود استفاده کرده‌اند، مجدداً *Lycium* های دنیای قدیم را تک‌نیا معرفی کردند (۸).

جدول ۱- گونه‌های مورد استفاده در مطالعه روابط فیلوژنی *Lycium* بر اساس داده‌های توالی *ITS1* و *ITS2*

Taxon	Provenance and source	GenBank accession
<i>Lycium andersonii</i> A. Gray	Baja California, Mexico	AF238988
<i>Lycium berlandieri</i> Dunal	Pima County, Arizona, U.S.A	AF238989
<i>Lycium brevipes</i> Benth.	Baja California Sur, Mexico	AF238991
<i>Lycium cestroides</i> Schltldl.	South America	AY028134, AY028152
<i>Lycium pallidum</i> Miers	Pinal County, Arizona, U.S.A.	AF238986
<i>Lycium parishii</i> A. Gray	Pima County, Arizona, U.S.A.	AF238990
<i>Lycium torreyi</i> A. Gray	Mohave County, Arizona, U.S.A.	AF238992
<i>Lycium carolinianum</i> Walter	Kleberg County, Texas, U.S.A.	AY028133, AY028151
<i>Lycium exsertum</i> A. Gray	Pinal County, Arizona, U.S.A.	AF238994
<i>Lycium fremontii</i> A. Gray	Pinal County, Arizona, U.S.A.	AF238995
<i>Lycium sandwicense</i> A. Gray	Hawaii (cultivated at WAIM)	AY028142, AY028160
<i>Lycium shockleyii</i> A. Gray	Mineral County, Nevada, U.S.A.	AF238987
<i>Lycium chilense</i> Bertero	San Luis, Argentina	AY028137, AY028155
<i>Lycium ciliatum</i> Schltldl.	Cordoba, Argentina	AY028136, AY028154
<i>Lycium californicum</i> Nutt. ex Gray	Pima County, Arizona, U.S.A.	AF238993
<i>Lycium cooperi</i> A. Gray	Mohave County, Arizona, U.S.A.	AF238984
<i>Lycium macrodon</i> A. Gray	Pinal County, Arizona, U.S.A.	AF238983
<i>Lycium puberulum</i> A. Gray	Brewster County, Texas, U.S.A.	AF238985
<i>Lycium australe</i> F. Muell.	Australia	AY028131, AY028149
<i>Lycium barbarum</i> L.	Asia (cultivated in Michigan, U.S.A.)	AY028132, AY028150
<i>Lycium ferocissimum</i> Miers	Africa (cultivated at STRY)	AY028139, AY028157
<i>Lycium shawii</i> Roem. & Schult.	Africa	AY028143, AY028161
<i>Lycium tenue</i> Willd.	Cape Province, South Africa	AY028144, AY028162
<i>Lycium tetrandum</i> Thunb.	West Coast National Park, South Africa	AYO28145, AY028163
<i>Grabowskia boerhaaviaefolia</i> Schltldl.	El Alto, Cabo Blanco, Peru	AF238981
<i>Grabowskia duplicata</i> Arnott	Buenos Aires, Argentina	AF238982
<i>Lycium depressum</i> Stocks	Ravar, Kerman, Iran	1197*
<i>Lycium depressum</i> Stocks	Zehkalot, Kerman, Iran	1186 *
<i>Lycium shawii</i> Roem. & Schult.	jungle, Hormozgan, Iran	1213 *
<i>Lycium ruthenicum</i> Murray	Saleh Abad, Razavi khorasan	1204 *
<i>Lycium edgeworthii</i> Dun.	Jiroft, Kerman, Iran	1209 *
<i>Lycium kopetdagi</i> Pojark.	Bojnord, North khorasan	1220 *
<i>Lycium dasystemum</i> Pojark.	Sange laki, Baft, Kerman, Iran	1181 *
<i>L. x sangelakia</i> Nazeri & Azadi	Sange laki, Baft, Kerman, Iran	1182 *
Outgroups		
<i>Atropa belladonna</i> var. <i>lutea</i> L.	Worldwide (cultivated at BIRM)	AY028129, AY028147
<i>Nolana arenicola</i> I. M. Johnst.	Peru	AB019294,

Nolana mollis (Philippi) I. M. Johnst.¶ Chile AB019954
AB019314, AB0199

* شماره ها مربوط به شماره هرباریومی نمونه‌های دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد که در این پژوهش بررسی شده‌اند.

جدول ۲- گونه‌های مورد استفاده در مطالعه فیلوژنی *Lycium* بر اساس داده‌های توالی trnL-F

Taxon	Provenance and source	GenBank accession
<i>Lycium barbarum</i> L.	Ning-xia Hui-zu Zi-zhi-qu, China	AB036572, AB036601
<i>Lycium barbarum</i> L.	Cult. Michigan, U.S.A	DQ124566
<i>Lycium chinense</i> Mill.	Yamagata pref., Japan	AB036579, AB036608
<i>Lycium europaeum</i> L.	Tohoku Univ., Japan	AB036581, AB036610
<i>Lycium australe</i> F. Muell.	Tohoku Univ., Japan	AB036571, AB036600
<i>Lycium afrum</i> L.	Cape Prov., South Africa	AB036563, AB036592
<i>Lycium cinereum</i> Thumb.	Cape Prov., South Africa	AB036566, AB036595
<i>Lycium ferocissimum</i> Miers	Cape Prov., South Africa	AB036582, AB036611
<i>Lycium pilifolium</i> C. H. Wright	Cape Prov., South Africa	AB036564, AB036593
<i>Lycium prunus-spinosa</i> Dunal	Cape Prov., South Africa	AB036562, AB036591
<i>Lycium schizocalyx</i> C. H. Wright	Cape Prov., South Africa	AB036565, AB036594
<i>Lycium villosum</i> Schinz	Cape Prov., South Africa	AB036567, AB036596
<i>Lycium americanum</i> Jacq.	Sata Marter, Netherlands Antilles	AB036569, AB036598
<i>Lycium andersonii</i> A. Gray	California, Mono County, U.S.A	AB036570, AB036599
<i>Lycium barlandieri</i> Dunal ssp. <i>berlandieri</i>	Nuevo Leon, Mexico	AB036574, AB036602
<i>Lycium californicum</i> Nutt. ex A. Gray	Isla Guadalupe, Mexico	AB036575, AB036604
<i>Lycium carolinianum</i> Walt. var. <i>carolinianum</i>	Florida, Monroe County, U.S.A	AB036576, AB036605
<i>Lycium pallidum</i> Miers	Nevada, San Miquel County, U.S.A	AB036584, AB036613
<i>Lycium ameghinoi</i> Speg.	Patagonia, Argentina	AB036568, AB036597
<i>Lycium cestroides</i> Schlecht.	Dept. of Tarija, Bolivia	AB036578, AB036607
<i>Lycium elongatum</i> Miers	Catamarca Prov., Argentina	AB036580, AB036609
<i>Lycium morongii</i> Britton	Ruta Prov., Argentina	AB036583, AB036612
<i>Lycium sandwicense</i> A. Gray	Hawaiian Island, Kaua I, U.S.A	AB036586, AB036615
<i>Lycium brevipes</i> Benth.	Benth. Mexico	DQ124569
<i>Lycium ciliatum</i> Schldl.	Argentina	DQ124577
<i>Lycium chilense</i> Bertero	Bertero, Argentina	DQ124575
<i>Lycium cooperi</i> A. Gray	Arizona, U.S.A	DQ124579
<i>Lycium exsertum</i> A. Gray	Pinal county, Arizona, U.S.A	DQ124583
<i>Lycium fremontii</i> A. Gray	Pinal county, Arizona, U.S.A	DQ124585
<i>Lycium macrodon</i> A. Gray	Arizona, U.S.A	DQ124592
<i>Lycium pallidum</i> Miers	Arizona, U.S.A	DQ124596

<i>Lycium ruthenicum</i> Murray	Eurasia, cult. Nijmegen	DQ124600
<i>Lycium ruthenicum</i> Murray.	Astrakhan Prov., Russia	AB036585, AB036614

ادامه جدول ۲- گونه‌های مورد استفاده در مطالعه روابط فیلوژنی *Lycium* بر اساس داده‌های توالی *tmL-F*

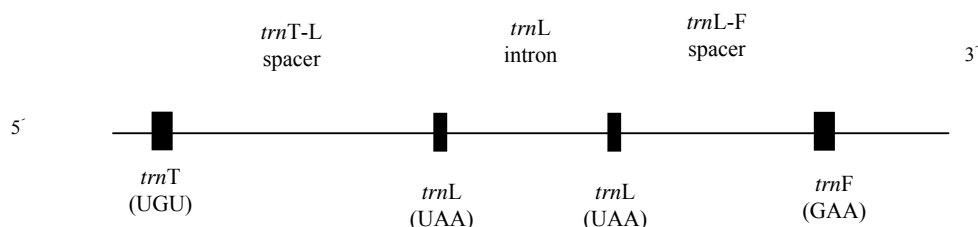
Taxon	Provenance and source	GenBank accession
<i>Lycium shawii</i> Roem. & Schult	Africa, cult. Strybing Arboretum and Botanical Gardens, BIRM	DQ124603
<i>Lycium parishii</i> A. Gray	Arizona, U.S.A	DQ124597
<i>Lycium puberulum</i> A. Gray	Texas, U.S.A	DQ124599
<i>Lycium shockleyii</i> A. Gray	Nevada, U.S.A	DQ124604
<i>Lycium torreyi</i> A. Gray	Arizona, U.S.A	DQ124611
<i>Grabowskia duplicata</i> Arnott	Argentina	DQ124555
<i>Grabowskia boerhaaviaefolia</i>	Argentina	DQ124554
<i>Lycium depressum</i> Stocks	Ravar, Kerman, Iran	1197*
<i>Lycium depressum</i> Stocks	Zehkalot, Kerman, Iran	1186 *
<i>Lycium shawii</i> Roem. &	Harra jungle, Hormozgan, Iran	1213 *
<i>Lycium ruthenicum</i> Murray	Saleh Abad, Razavi khorasan	1204 *
<i>Lycium edgeworthii</i> Dun.	Jiroft, Kerman, Iran	1209 *
<i>Lycium kopetdagi</i> Pojark.	Bojnord, North khorasan	1220 *
<i>Lycium dasystemum</i> Pojark.	Sange laki, Kerman, Iran	1181 *
<i>L. x sangelakia</i> Nazeri & Azadi	Sange laki, Kerman, Iran	1182 *
Outgroups		
<i>Atropa belladonna</i>		AJ577449
<i>Nolana albescens</i>	Dept. of Chanaral- Dept. of Capiano, Chile	AB036590, AB036618
<i>Nolana rostrata</i>	Dept. of Coquinbo, Chile	AB036589, AB036619

* شماره‌ها مربوط به شماره هر باربومی نمونه‌های دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد که در این پژوهش بررسی شده‌اند.

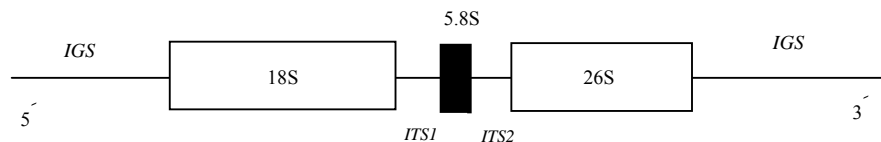
جلبکها و سرخسها بسیار بارز می باشد. ناحیه *ITS* در تمام گیاهان و قارچها با استفاده از آغازگرهایی که مکمل ژنهای حفظ شده *S 18* و *S 26* هستند تکثیر می شود. همچنین تکامل سریعی را پشت سر گذاشته‌اند که استفاده آنها را در سطح جنس و گونه مناسب کرده است. ضمن اینکه به طور گسترده توسط تاکسونومیستها استفاده می شوند و توالیهای زیادی در بانک ژن جهت مقایسه وجود دارد. با توجه به موارد ذکر شده این ناحیه در مطالعات فیلوژنی کاربرد فراوانی دارد (۹).

توالی ناحیه *tmL-F* معمولاً از دو توالی کلروپلاستی غیرکدشونده تشکیل شده است: اینترون *tmL* و فاصله انداز بین ژنی *tmL-F* (شکل ۱). این قطعه از DNA در مطالعه روابط فیلوژنی در سطح درون گونه‌ای یا بین گونه‌ای به علت سرعت سریع تکامل و تنوع گسترده، جهت تخمین زمان واگرایی گونه‌ها در یک دودمان کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۷).

ناحیه *ITS* از ژنهای ریبوزومی هسته‌ای (شکل ۲)، در بازسازی فیلوژنی نهندانگان (در سطح گونه و جنس)،



شکل ۱- نمایش شماتیک ساختار ژن های trn



شکل ۲- نمایش شماتیک ساختار rDNA در ژنوم گیاهان

<i>Nolana mollis</i>	-----TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCCGGAAC	32
<i>Nolana mollis</i>	-----TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCCGGAAC	32
<i>Atropa belladonna</i>	-----TCGAAACCTGCATGGCAGAACGACCCCGGAAC	32
<i>Grabowskia boerhaaviifolia</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	97
<i>Grabowskia duplicata</i>	GCGTTTCAACACTGGGAGAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	98
<i>Lycium californicum</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	96
<i>Lycium depressum</i>	ACGTTTAAACGCCGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	81
<i>Lycium ruthenicum</i>	ACGTTTCAACGCCGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	80
<i>Lycium x sangelaki</i>	RCGTTTCAACCCCGGG-GACCCGCGCGGG-GGGGGTGCTTCGGCCCCCG	80
<i>Lycium dasystemum</i>	GCGTTTCAACACTGG-GAGCCGCGCGGG-CGGAGTGCTTCGGCCCCCG	80
<i>Lycium kopetdaghi</i>	GCTTTTCAACACAGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGAGTCTTCGGCCTCG	80
<i>Lycium edgeworthii</i>	GCTTTTCAACACAGGG-GGACCGCGCGGG-CGGAGTGCTTCGGCCT-TCG	79
<i>Lycium shawiil</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	80
<i>Lycium australe</i>	ACGTTTGAACACTGGG-GGGCCGCGCGGG-CGGGGAGCTTCGGCCCCCG	71
<i>Lycium tenue</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGA-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	80
<i>Lycium cestroides</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	78
<i>Nolana arenicola</i>	ACGTTTCAACCCCGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG	80

شکل ۳- بخش از توالی هم ردیف شده در ناحیه ITS در جنسهای *Lycium* و *Grobowskia* و *Nolana* spp. و *Atropa belladonna* (بخش پررنگ شده مربوط به گونه های ایران است)

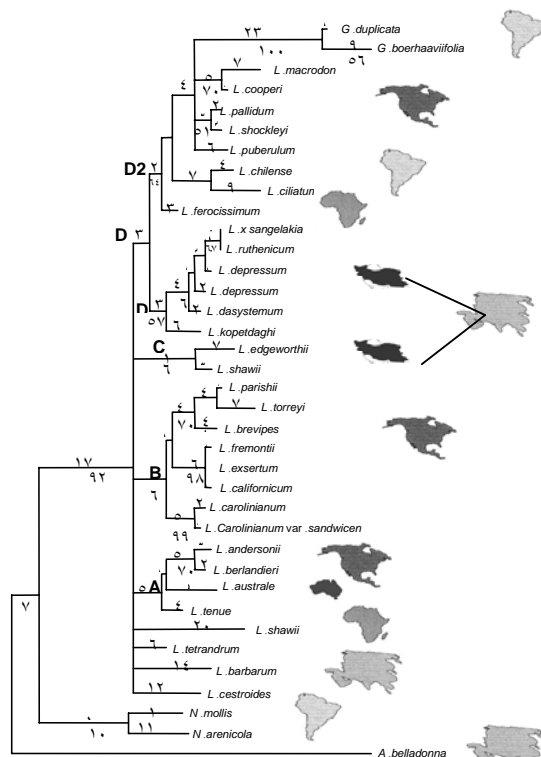
کرمان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بندرعباس و پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد بررسی و شناسایی شدند. از بین نمونه ها ۸ تاکسون مربوط به گونه های ایران، جهت تکثیر ژنهای مورد نظر انتخاب شدند. گونه آتروپا بلادونا و برخی از گونه های جنس نولانا نیز به عنوان برون گروه در نظر گرفته شد (۱۱، ۶). توالی ژنها در دو ناحیه مورد مطالعه برای گونه های غیر از گونه های ایران از بانک ژن استخراج گردید (جدول ۱ و ۲). در مجموع ۳۷ تاکسون برای ناحیه ITS و ۵۱ تاکسون برای

در این پژوهش جهت بررسی دقیق فیلوژنی گونه های *Lycium* در دنیای قدیم و تعیین مسیر پراکنش آنها، گونه های متعددی از دنیای قدیم و دنیای جدید با استفاده از دو ژن مختلف هسته ای و کلروپلاستی بررسی شدند.

مواد و روشها

تعداد ۱۵۰ نمونه جمع آوری شده از رویشگاههای طبیعی در ایران (استانهای کرمان، خراسان رضوی و فارس) به همراه ۶۹ نمونه هرباریومی از هرباریومهای دانشگاه شهید باهنر کرمان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی

ناحیه *trmL-F* بررسی شدند.
 DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته CTAB (۵) استخراج گردید. سپس نواحی ژنومی *ITS* و *trmL-F* پس از بهینه سازی شرایط واکنش، با استفاده از آغازگرهای ۳-AGGAGAAGTCGTAACAAG ۵-(رفست) و ۳-GTTTCTTTTCCTCCGCT- ۵-(برگشت) برای ناحیه *ITS* (۱۸)، طبق برنامه [۷۲c، ۳۸؛ ۷۲c، ۶۰s؛ ۴۰s، ۵۲c؛ ۹۶c، ۱۵۰s؛ ۹۶c، ۵۰s؛ ۵۲c- ۳-ATTGAACTGGTGACACGAG- ۵-(رفست) و ۳-CGAAATCGTAGACGCTTACC- ۵-(برگشت) برای ناحیه *trmL-F* (۱۶)، بر اساس برنامه [۷۲c، ۴۰s؛ ۹۰s، ۹۰s؛ ۷۲c، ۳۰s؛ ۵۵c، ۳۰s؛ ۹۵c، ۳۰s] به روش PCR تکثیر شدند. محصولات PCR جهت تعیین توالی از طریق شرکت ژن فن آوران به کشور کره ارسال و ردیف بازهای آلی آنها در یک جهت تعیین گردید.



به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از تعیین توالی نواحی *ITS1*، *ITS2* و *trmL-F*، توالیهای به دست آمده به وسیله نرم افزار Bioedit به فرم Fasta درآمد، سپس همراه با توالی سایر گونه‌ها که از بانک ژن استخراج شده بودند با برنامه ClustalW هم‌ردیف شدند و در نهایت با نرم افزار Bioedit مورد ویرایش قرار گرفتند. تجزیه تبارزایشی نهایی براساس ماتریس داده‌های هم‌ردیف شده برای هر دو ژن مورد مطالعه، به صورت جداگانه با استفاده از نرم افزار PAUP* 4.0b4a (۱۵) با برنامه کاوش ابتکاری و با روش تبادل مجدد دو شاخه‌ای صورت گرفت. و در نهایت درخت توافقی مطلق به دست آمد. میزان حمایت هر شاخه بر روی درخت مطلق نیز با ۱۰۰ بار تکرار تعیین گردید.

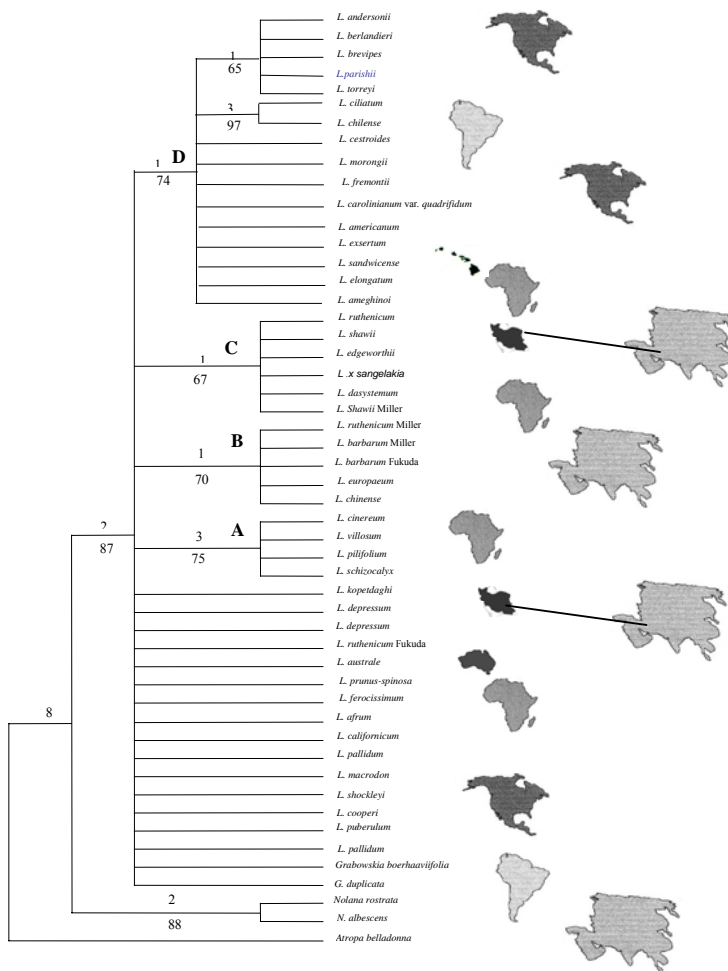
نتایج و بحث

از توالی هم‌ردیف شده ناحیه *ITS* (شکل ۳) ماتریسی به طول ۶۴۵ نوکلئوتید با طول خالص ۶۳۰ نوکلئوتید (۲۵۱

Grabowoskia boerhaaviifolia AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 70
Grabowoskia duplicata AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 70
Lycium macrodon AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 70

<i>Atropa belladonna</i>	AAATTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	76
<i>Lycium ruthenicum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	80
<i>Lycium edgeworthii</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	81
<i>Lycium kopetdaghi</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	82
<i>Lycium shawii</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	81
<i>Lycium depressum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	81
<i>Lycium depressum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	79
<i>Lycium dasystemum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	82
<i>Lycium x sangelakia</i>	AA-TTCAGAGAAACCCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA	84
<i>Lycium andersonii</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTCAGAAAAAAGGATAGGT	138
<i>Lycium morongii</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTCAGAAAAAAGGATAGGT	138
<i>Lycium americanum</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTCAGAAAAAAGGATAGGT	138
<i>Lycium elongatum</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTCAGAAAAAAGGATAGGT	138

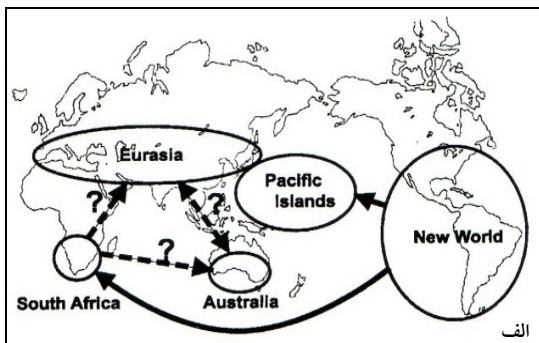
شکل ۵- بخش از توالی هم ردیف شده در ناحیه *trnL-trnF* در جنسهای *Lycium* و *Grobowskia* و *Atropa belladonna* (بخش پررنگ شده مربوط به گونه‌های ایران است)



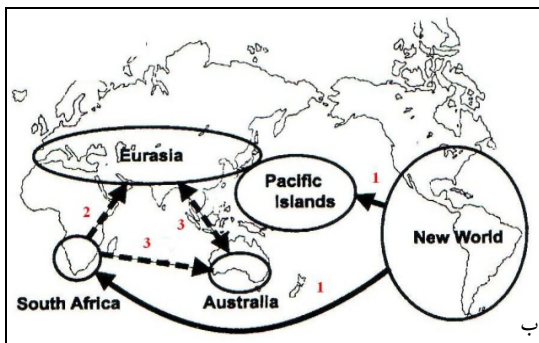
شکل ۶- درخت حداکثر پارسیمونی (با طول ۱۳ گام، $RI=1.0$ $CI=1$) برای توالی *trnL-F* در جنس *Lycium* و *Grobowskia* و *Nolana* spp. و *Atropa belladonna* به عنوان برون گروه استفاده شدند. عدد بالای هر شاخه طول شاخه و عدد پایین آن مقدار بوتسترپ با ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. مقادیر $>50\%$ نشان داده نشده است. مناطق جغرافیایی نیز در سمت راست نشان داده شده است.

در درخت توافقی به دست آمده، تاکسونهای درون گروه توده پلی‌تومی چند شاخه‌ای را تشکیل می‌دهند. گونه‌های مجزا قرار گرفته‌اند. دنیای قدیم (آسیا، اروپا، استرالیا و آفریقا) در کلادهای

آنجا به یوراسیا منتقل شده‌اند. (شکل ۷-ب). انتقال *Lycium* از هر دو منطقه یوراسیا و آفریقا به استرالیا صورت گرفته است. زیرا استرالیا دارای ۴ گونه است که فقط گونه *L. australe* بومی استرالیا و سه گونه دیگر آن بومی یوراسیا و آفریقا می‌باشد (*L. barbarum* بومی چین و آسیا، *L. afrum* و *L. ferocissimum* بومی آفریقا) (۷). از طرفی با توجه به تنوع کم گونه‌ها در استرالیا در مقایسه با یوراسیا با ۲۱ گونه (مجموع گونه‌های بومی و غیر بومی) (۱، ۲، ۴، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۹، ۲۰) و آفریقا با ۲۰ گونه (۶)، استرالیا نقطه نهایی نقل و انتقالات جنس *Lycium* می‌باشد.



الف



ب

شکل ۷-الف) مسیر پراکنش گونه‌های جنس *Lycium* بر اساس بررسیهای فوکودو و همکاران (ب) مسیر پراکنش گونه‌های جنس *Lycium* بر اساس بررسیهای حاصل از این پژوهش

نتایج حاصل از بررسی ژن *trnL-F* نیز با توجه به قرارگیری گونه‌های آفریقا همراه با گونه‌های آمریکای شمالی و آمریکای جنوبی در کلاد D (شکل ۶)، از روابط نزدیک بین گونه‌های آمریکا و آفریقا حمایت می‌کند و مجدداً مسیر انتقال از آمریکا به آفریقا را تأیید می‌کند.

از توالی هم ردیف شده فاصله‌انداز بین ژنی *trnL-F* و اینترون *trnL* (شکل ۵)، ماتریسی به طول ۹۲۳ نوکلئوتید با ۱۳ نوکلئوتید (۱/۳ درصد) دارای ارزش فیلوژنتیکی به دست آمد. در نتیجه کاوش ابتکاری با استفاده از داده‌های *trnL-F* و اینترون *trnL* یک درخت با حداکثر صرفه جویی به طول ۱۳ گام و $CI=1$ و $RI=1$ به دست آمد (شکل ۶). در درخت حاصل تاکسونهای درون گروه توده پلی‌تومی چند شاخه‌ای شامل ۱۷ شاخه تفکیک نشده و ۴ شاخه تفکیک شده را تشکیل می‌دهند.

ارتباط و نزدیکی گونه‌های دنیای قدیم و آمریکای شمالی با گونه‌های آمریکای جنوبی به عنوان منشاء جنس *Lycium* (۳) در کلاد D (شکل ۴) کاملاً مشهود است. ۵ گونه از ایران و یک گونه از آفریقا (گونه‌های دنیای قدیم) در یک کلاد بزرگ همراه با گونه‌های آمریکای جنوبی قرار گرفته‌اند.

بسیاری از گونه‌های *Lycium* با داشتن میوه‌های قرمز رنگ و آبدار به راحتی به وسیله پرندگان در مسافت‌های طولانی پراکنده می‌شوند. با توجه به اینکه تمام گونه‌های دنیای قدیم دارای سته آبدار هستند، بنابراین الگوی پراکنش آنها از آمریکا به دنیای قدیم به سهولت امکان‌پذیر می‌باشد (۳).

فوکودو و همکاران مسیر پراکنش جنس *Lycium* را از آمریکا به سمت آفریقا، و از آنجا به سمت یوراسیا و استرالیا تعیین کردند اما اینکه از آفریقا ابتدا به سمت استرالیا منتقل شده‌اند یا یوراسیا، یا اینکه از یوراسیا به استرالیا و یا بالعکس منتقل شده‌اند را به طور دقیق تعیین نکردند (شکل ۷-الف) (۶).

نتیجه بررسیهای ما بر اساس توالی‌یابی ژن *ITS*، با توجه به قرارگیری گونه *L. ferocissimum* (گونه بومی آفریقا) به عنوان گروه خواهری تاکسونهای دنیای جدید، و گونه‌های ایران (از دنیای قدیم) به عنوان گروه خواهری کلاد D2 (شامل گونه‌های آمریکا و آفریقا) نشان می‌دهد که *Lycium* ها ابتدا از دنیای جدید (آمریکای جنوبی) به آفریقا و از

همچنین نتایج بررسیهای تحقیق حاضر ما نشان می‌دهد که *Lycium* های دنیای قدیم یک گروه تک‌نیا را تشکیل نمی‌دهند، بلکه به صورت یک مجموعه چند نیا در کنار سایر گونه‌ها (گونه‌های دنیای جدید) قرار گرفته‌اند (شکل ۴ و ۶). این نتایج بر خلاف نتایجی است که الم استد (۲۰۰۰) به دست آورد. وی با بررسی تنها ۵ گونه از گرگ تیغها (۲ گونه از دنیای جدید و ۳ گونه از دنیای قدیم) و با استفاده از آنالیز جایگاه برش‌گیری در ژنوم کلروپلاستی، *Lycium* های دنیای قدیم را تک نیا معرفی کرد (۱۲). فوکودو و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی ژنهای کلروپلاستی *matK* و فاصله اندازه‌های بین ژنی *trnL-trnF* و ایترون *trnL* و ۱۲ گونه از *Lycium* های دنیای قدیم، مجدداً تک‌نیا بودن تاکسونهای دنیای قدیم را نشان داد. اما میلر (۲۰۰۲) با مطالعه توالی *ITS1* و *ITS2* و ۶ تاکسون از دنیای قدیم از مجموع ۳۴ تاکسون مورد مطالعه، چندنیا بودن *Lycium* های دنیای قدیم را نشان داد (۱۰). لوین و میلر (۲۰۰۵) با بررسی ژنهای کلروپلاستی *trnT-trnF* و ژن هسته‌ای

با وجود پراکنش گسترده جنس *Lycium* در دنیا، واگرایی کمی در ژنوم کلروپلاستی آن وجود دارد (۱۲). در نتیجه تعداد صفات با ارزش از نظر فیلوژنی کاهش یافته و بر نتیجه بررسیها تأثیر می‌گذارد. در بررسی ژن *GBSSI* نیز از مجموع ۱۹۶۳ نوکلئوتید تنها ۱۴۰ نوکلئوتید دارای ارزش فیلوژنتیکی می‌باشد، در حالی‌که در ژن *ITS* تقریباً ۱/۶ صفات با ارزش بوده و روابط بین تاکسونها را بخوبی نشان می‌دهد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه ژنهای مورد استفاده در بررسی روابط فیلوژنی *Lycium*

نام ژن	<i>GBSSI</i>	<i>trnT-trnF</i>	<i>matK</i>	<i>trnT-trnF+trnL intron</i>	<i>*trnL-trnF</i>	<i>ITS</i>	<i>ITS*</i>
طول ماتریکس (جفت باز)	۱۹۳۶	۱۶۹۱	۱۱۹۰	۱۵۲۶	۹۲۳	۶۳۳	۶۳۰
تعداد صفات با ارزش	۱۴۰	۳۰	۱۰	۲۸	۱۳	۱۰۴	۹۳
فیلوژنتیکی (جفت باز)							
درصد صفات با ارزش	۷/۱٪	۱/۸٪	۰/۸٪	۱/۸٪	۱/۳٪	۱۵/۹٪	۱۴/۸٪
فیلوژنتیکی							
تعداد کل تاکسون‌ها	۵۸	۵۸	۲۶	۲۶	۵۱	۳۴	۳۷
تعداد تاکسون‌های دنیای قدیم	۱۶	۱۶	۱۲	۱۲	۲۳	۶	۱۴

* ژنهای بررسی شده در این پژوهش

علاوه بر تعداد صفات با ارزش تعداد تاکسونهای دنیای قدیم نسبت به کل تاکسونهای مطالعه شده می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای در نتیجه بررسیها داشته باشد. در این پژوهش در بررسی ژن *trnL-trnF* علی‌رغم تعداد کم صفات دارای ارزش فیلوژنتیکی، به علت به کارگیری تعداد

زیاد تاکسون از دنیای قدیم (تقریباً نیمی از تاکسونهای دنیای قدیم)، همانند نتایج حاصل از ژن هسته ای *ITS*، چندنیا بودن *Lycium* ها در دنیای قدیم نشان داده شده است. هرچند روابط بین تاکسونها در بخشهای مختلف

دنیای قدیم (یوراسیا، افریقا و استرالیا) و جدید بطور دقیق مشخص نشده است.

منابع

- ۷- خاتم ساز، م. (۱۳۷۸). فلور ایران، تیره سیب زمینی. جلد ۲۴. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.
- 8- Baytop, A. (1987). *Lycium* in Davis, P. H (ed.) Flora Turkey and the Aegean Island. Edinburgh: Univ Press. 6: 445-449.
- 9- Bernardello, L.M. (1987). Comparative Floral Morphology in Lycieae (Solanaceae). *Brittonia*. 39(1): 112-129.
- 10- Boissier, E. (1879). *Lycium* in Flora Orientalis. The Netherland. 4: 288-29.
- 11- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Photochemical Bulletin*. 19 (1): 11-15.
- 12- Fukuda, T., Yokoyama, J. and Ohashi, H. (2001). Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae) Inference from Chloroplast DNA Sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 19: 246-258.
- 13- Haegi, L. (1976). Taxonomic Account of *Lycium* (Solanaceae) in Australia. *Aust. J. Bot.* 24: 669-679.
- 14- Levin, R.A. and Miller, J.S. (2000). Relationship within Tribe Lycieae (Solanaceae): Paraphyly of *Lycium* and Multiple Origins of Gender Dimorphism. *American Journal of Botany*. 92 (12): 2044-2053.
- 15- Linder, C.R, Moore, L.A and Jackson, R.B. (2000). A Universal Molecular Method for Identifying under Ground Plant Parts to Species. *Molecular Ecology*. 9: 1549-1555.
- 16- Miller, J.S. (2002). Phylogenetic Relationships and the Evolution of Gender Dimorphism in *Lycium* (Solanaceae). *Systematic Botany*. 27(2): 416-428.
- 17- Nasir, E and Ali, S. I. (1985). *Lycium* in Flora of Pakistan. Islamabad. 168: 31-39.
- 18- Olmstead, R.G., Sweere, J.A., Spangler R.E., Bohs, L. and Palmer, J.D. (1999). Phylogeny and Provisional Classification of the Solanaceae Based on Chloroplast DNA. In: Nee, M., Symon, D.E, Lester, R.N. and Jessop, J.P. [eds.], Solanaceae IV: advances in biology and utilization. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK. 111-137.
- 19- Pojarkova, A.J. (1955). *Lycium* in B. K. Shishkin & E. G. Bobrov (eds.) Flora of the USSR. Moskva- Leningrad. 22: 86-96.
- 20- Schönbeck-Temesy, E. (1972). *Lycium* in Rechinger, K. H (ed.) Flora Iranica. Gras. 100: 29-39.
- 21- Swofford, D.L. (2000). PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b4a. Sinauer Associates Sunderland, Massachussts
- 22- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991). Universal Primer for Amplification of Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.
- 23- Wang, A., Yang, M. and Liu, J. (2005). Molecular Phylogeny, Recent Radiation and Evolution of Gross Morphology of the Rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) Inferred from Chloroplast DNA *trn* L-F Sequences. *Annals of Botany*. 96: 489-498.
- 24- Wen, J. and Zimmer, E.A. (1996). Phylogeny and Biogeography of *Panax* L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 6(2): 167-177.
- 25- Zhi-Yun, Z., An-Ming, L. and D'Arcy, W. G. (1994). *Lycium*. In Raven, P. H and Wu, Z. Y. (eds.) Flora of China. Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden. 17: 301-304
- 26- Zohary, M. and Feinbrun-Dothan, N. (1978). *Lycium* In Flora Palaestina. Jerusalem Academic Press. Israel. 159-267.

Biogeography of *Lycium* L. (Solanaceae) and Phylogeny of Old world Taxa Based on Sequences of nrDNA (ITS) and cpDNA (*trn*L-F)

Azadi Chegini N.^{1,2}, Nazeri V.¹, Shoushtari A.^{1,2}, and Kazempour Osaloo Sh.³

¹ Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

² International Center for Sciences & High Technology and Environmental Sciences, Kerman, I.R. of IRAN

³ Plant Biology Dept., Faculty of Biology Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

More than 100 species of genus *Lycium*, in family Solanaceae, subfamily Solanoideae and tribe Lycieae are distributed in the arid and semi-arid regions of the world. Phylogenetic and biogeographic studies have mostly been based on South and North American species and some other species in old world. In this research for determining phylogeny of Old world taxa and biogeographic relationships between Old and New world taxa, Iranian species have been studied beside the most of species in New and Old world based on the two genes *trnL-F* (from chloroplast) and *ITS* (from nucleus). The results based on the sequencing of these regions indicated that in contrast to some previous reports, the Old world species were polyphyletic group. Genus *Lycium* appeared in new world (Southern American) and then they were transferred to Southern Africa and from that place were distributed to Eurasia. They were transferred from Southern Africa and Eurasia to Australia. According to this investigation, it can be concluded that Australia is the end area of *Lycium* dispersal

Keywords: *Biogeography, Lycium, ITS, trnL-F*