

بررسی تبارزایی لیسوم‌های دنیای قدیم براساس توالی ناحیه ITS و

trnL-trnF

نجمه آزادی چگینی*^۱، وحیده ناظری^۲، شاهرخ کاظم‌پور اوصالو^۳، عبدالحمید
نمکی شوشتری^۴

۱-۴-۲، به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار، استادیار، بخش زیست‌شناسی،
دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان و مرکز بین‌المللی علوم و
تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ماهان
۳- استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
تهران

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

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۵- تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۱۶)

چکیده

بررسی روابط تبارزایی طایفه لیسبه از تیره سیب‌زمینی به‌ویژه جنس لیسوم از موضوعات جالب تحقیق در سال‌های اخیر بوده است. حضور گیاهان دو جنسی در این جنس، بررسی تکاملی آن را از اهمیت ویژه‌ای برخوردار کرده است. تبارزایی لیسوم‌های امریکای شمالی و جنوبی و برخی از گونه‌های دنیای قدیم بررسی شده‌اند. در این پژوهش، با استفاده از گونه‌های ایران در کنار بسیاری از گونه‌های دنیای جدید و دنیای قدیم، روابط فیلوژنی لیسوم‌های دنیای قدیم تعیین گردید. پیش از این در برخی از بررسی‌های انجام شده لیسوم‌های دنیای قدیم تک نیا و در برخی دیگر چند نیا معرفی شده‌اند. اما بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، بر اساس تعداد تاکسون‌های زیاد و توالی دو ژن هسته‌ای و کلروپلاستی، گونه‌های دنیای قدیم یک مجموعه چند نیا را تشکیل می‌دهند. ضمن اینکه گونه‌های ایران نیز تک نیا نمی‌باشند

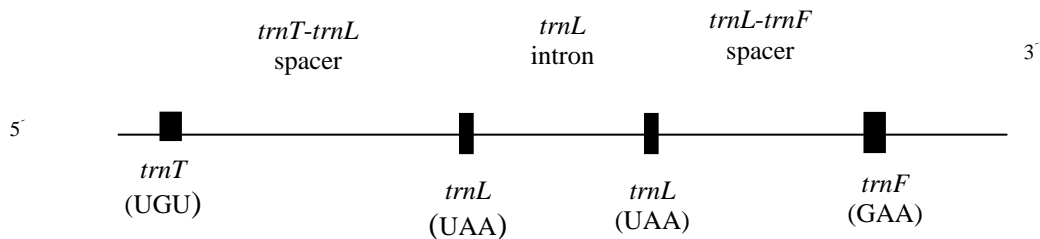
واژه‌های کلیدی

تبارزایی،
لیسوم،
دنیای قدیم،
ITS
trnL-trnF

مقدمه

لیسیم در دنیای قدیم بوده و پیشنهاد کردند که برای حل این مشکل تعداد تاکسون‌های بیشتری باید مورد مطالعه قرار گیرند. لوین و میلر (۲۰۰۵) با بررسی ۴۸ گونه از لیسیم، نشان دادند که لیسیم‌ها در دنیای قدیم بطور مشخص تک نیا هستند. توالی ناحیه *trnL-trnF* معمولاً از دو توالی کلروپلاستی غیرکد شونده تشکیل شده است: اینترون *trnL* و فاصله انداز بین ژنی *trnL-trnF* (شکل ۱). این قطعه از DNA در مطالعه روابط تبارزایی در سطح درون گونه‌ای یا بین گونه‌ای به علت سرعت سریع تکامل و تنوع گسترده جهت تخمین زمان واگرایی^۶ گونه‌ها در یک دودمان کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۰).

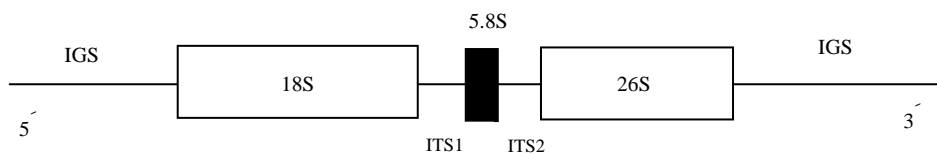
لیسیم^۱ در زبان فارسی به اسامی دیوخار، گرگ‌تیغ، کام‌تیغ، آسه و سریم خوانده می‌شود. در ایران شش گونه از این جنس گزارش شده است (۱). در سال‌های اخیر به روابط تبارزایی^۲ در طایفه لیسیه^۳ توجه زیادی شده است. الم استد و همکاران (۱۹۹۹) بر اساس داده‌های حاصل از cpDNA^۴ از یک گونه گرابوسکیا^۵ و ۵ گونه لیسیم نشان دادند که گونه‌های دنیای جدید و دنیای قدیم تک نیا نیستند. فوکودو و همکاران (۲۰۰۱) روابط تکاملی بین ۲۳ گونه لیسیم را با استفاده از داده‌های حاصل از توالی ژن‌های *trnT-trnF* و *matK* از cpDNA بررسی کردند. فوکودو و همکاران (۲۰۰۱) و میلر (۲۰۰۲) مخالف تک نیا بودن گونه‌های



شکل ۱- نمایش شماتیک ساختار ژن‌های *trn*

گذاشته‌اند که استفاده آنها را در سطح جنس و گونه مناسب کرده است. ضمن اینکه بطور گسترده توسط تاکسونومیست‌ها استفاده می‌شوند و توالی‌های زیادی در بانک ژن جهت مقایسه وجود دارد. با توجه به موارد ذکر شده این ناحیه در مطالعات تبارزایی کاربرد فراوانی دارد (۵).

نواحی *ITS* از ژن‌های ریبوزومی هسته‌ای (شکل ۲)، در بازسازی تبارزایی نهاندانگان (در سطح گونه و جنس)، جلبک‌ها و سرخس‌ها بسیار باارزش هستند. ناحیه *ITS* در تمام گیاهان و قارچ‌ها با استفاده از آغازگرهایی که مکمل ژن‌های حفظ شده ۱۸S و ۲۶S هستند تکثیر می‌شود. همچنین تکامل سریعی را پشت‌سر

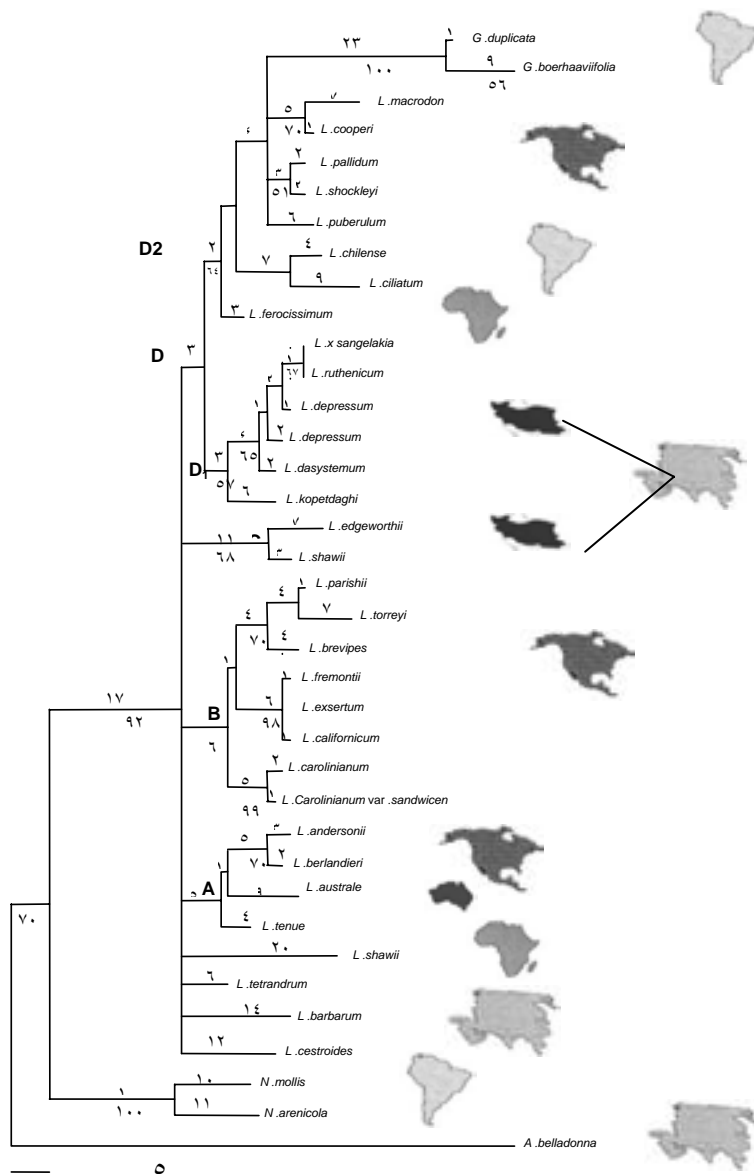


شکل ۲- نمایش شماتیک ساختار rDNA در ژنوم گیاهان

¹ *Lycium*
² Phylogeny
³ *Lycieae*
⁴ Chloroplast DNA
⁵ *Grabowskia*
⁶ Divergence

Lycium x sangelakia RCGTTTCAACCCCGGG-GACCCGCGCGGG-GGGGTGTTTGGCCCCCTCG 80
Lycium dasystemum GCGTTTCAACACCTGG-GAGCCGCGCGGG-CGGAGTGCTTCGGCCCCCTCG 80
Lycium kopetdaghi GCTTTTCAACACAGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGAGTCCTTCGGCCTCTCG 80
Lycium edgeworthii GCTTTTCAACACAGGG-GGACCCGCGCGGG-CGGAGTGCTTCGGCCT-TCG 79
Lycium shawii GCGTTTCAACACCGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG 80
Lycium australe ACGTTTGAACACTGGG-GGGCCGCGCGGG-CGGGGAGCTTCGGCCCCCTCG 71
Lycium tenue GCGTTTAAACTGGG-GAGCCGCGCGGA-CGGGGTGCTTCGGCCCCCTCG 80
Lycium cestroides GCGTTTCAACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG 78
Nolana arenicola ACGTTTAAACCCCGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG 80

شکل ۳- بخش از توالی همردیف شده در ناحیه ITS در جنس های لسیوم، گرابوسکیا، آتروپا و نولانا (بخش پررنگ شده مربوط به گونه های ایران است)



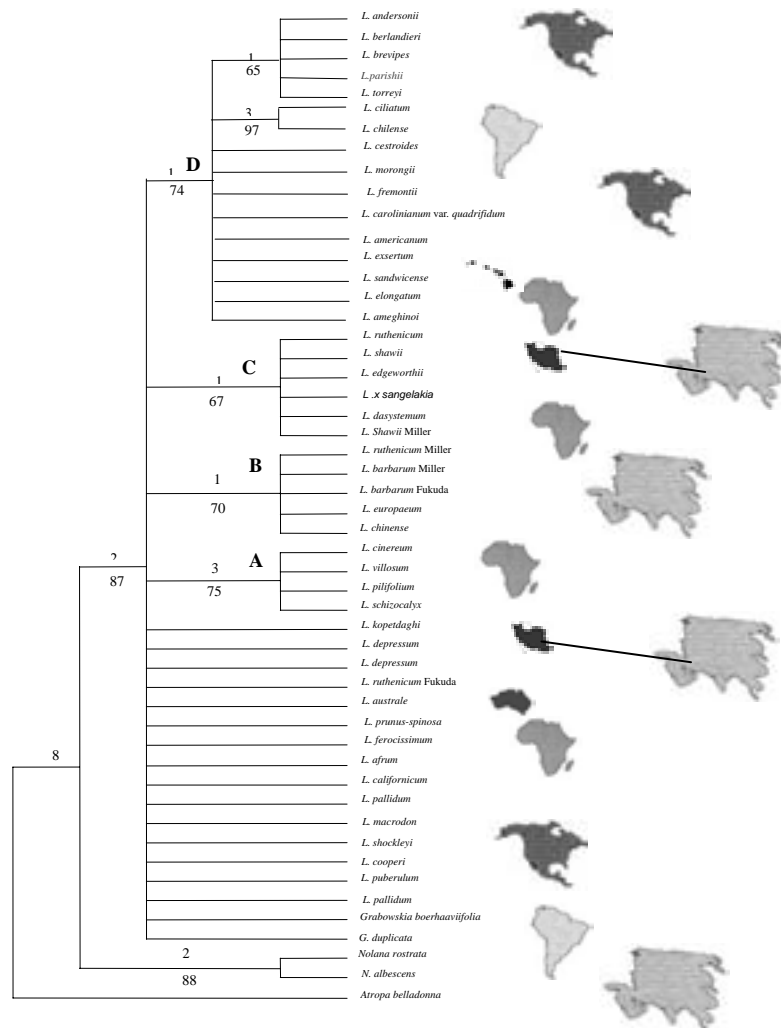
شکل ۴- درخت توافقی حاصل از ۶ درخت با حداکثر پارسیمونی (با طول ۲۶۱ گام، $CI=0/487$ و $RI=0/671$) برای توالی *ITS1* و *ITS2* در جنس *Lycium* و *Grobowskia*. *Nolana* spp. و *Atropa belladonna* به عنوان برون گروه استفاده شدند. عدد بالای هر شاخه طول شاخه و عدد پایین آن مقدار بوتسترپ با ۱۰۰ تکرار را نشان می دهد. مقادیر $<50\%$ نشان داده نشده است. مناطق جغرافیایی نیز در سمت راست نشان داده شده است.

می‌باشند. در نتیجه کاوش ابتکاری با استفاده از داده‌های *trnL*-*trnF* و اینترون *trnL* یک درخت با حداکثر پارسیمونی به طول ۱۳ گام و $CI=1$ و $RI=1$ بدست آمد (شکل ۶). در درخت حاصل تاکسون‌های درون گروه توده پلی‌تومی چند شاخه‌ای را تشکیل می‌دهند که شامل ۱۷ شاخه تفکیک نشده و ۴ شاخه تفکیک شده می‌باشد.

در درخت توافقی بدست آمده، تاکسون‌های درون گروه، توده پلی‌تومی چند شاخه‌ای را تشکیل می‌دهند. گونه‌های دنیای قدیم (آسیا، اروپا، استرالیا و افریقا) شامل گونه‌های ایران در شاخه‌های مجزا از هم قرار گرفته‌اند. از توالی هم‌ردیف شده فاصله انداز بین ژنی *trnL-trnF* و اینترون *trnL* (شکل ۵)، نیز ماتریسی به طول ۹۲۳ نوکلئوتید بدست آمد، که از بین آنها ۱۳ نوکلئوتید (۱/۳٪) دارای ارزش تبارزایشی

<i>Grabowoskia boerhaaviifoli</i>	AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 70
<i>Grabowoskia duplicata</i>	AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 70
<i>Lycium macrodon</i>	AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 70
<i>Atropa belladonna</i>	AAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 76
<i>Lycium ruthenicum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 80
<i>Lycium edgeworthii</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 81
<i>Lycium kopetdaghi</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 82
<i>Lycium shawii</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 81
<i>Lycium depressum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 81
<i>Lycium depressum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 79
<i>Lycium dasystemum</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 82
<i>Lycium x sangelakia</i>	AA-TTCAGAGAAACCCTGGAATTAACAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAA 84
<i>Lycium andersonii</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTTTCAGAAAAAAAAGGATAGGT 138
<i>Lycium morongii</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTTTCAGAAAAAAAAGGATAGGT 138
<i>Lycium americanum</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTTTCAGAAAAAAAAGGATAGGT 138
<i>Lycium elongatum</i>	TCCTGTTTTCTGAAAACAACCAA----AGGTTTCAGAAAAAAAAGGATAGGT 138

شکل ۵- بخش از توالی هم‌ردیف شده در ناحیه *trnL-trnF* در جنس‌های لیسوم، گرابوسکیا، آتروپا (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-trnF* 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 می دهد. مقادیر $<50\%$ نشان داده نشده است. مناطق جغرافیایی نیز در سمت راست نشان داده شده است.

قدیم را تک نیا معرفی کرد. فوکودو و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی ژن های کلروپلاستی *matK* و فاصله اندازهای بین ژنی *trnL-trnF* و اینترون *trnL* و ۱۲ گونه از *Lycium* های دنیای قدیم مجدداً تک نیا بودن تاکسون های دنیای قدیم را نشان داد. اما میلر (۲۰۰۲) با مطالعه توالی *ITS1* و *ITS2* و ۶ تاکسون از دنیای قدیم از مجموع ۳۴ تاکسون، چندینا بودن لیسیموم های دنیای قدیم را نشان داد. لوین و میلر (۲۰۰۵) با بررسی ژن های کلروپلاستی *trnT-trnF* و ژن هسته ای *GBSSI*، با استناد به اینکه از تمام گونه های

بحث

نتایج بررسی های ما نشان می دهد که لیسیموم های دنیای قدیم یک گروه تک نیا را تشکیل نمی دهند، بلکه بصورت یک مجموعه چند نیا در کنار سایر گونه ها (گونه های دنیای جدید) قرار گرفته اند (شکل ۴ و ۶). این نتایج بر خلاف نتایجی است که الم استدر در سال ۲۰۰۰ بدست آورد. وی با بررسی تنها ۵ گونه از گرگ تیغ ها (۲ گونه از دنیای جدید و ۳ گونه از دنیای قدیم) و با استفاده از آنالیز جایگاه برش گیری در ژنوم کلروپلاستی، لیسیموم های دنیای

با وجود پراکنش گسترده جنس لیسیم در دنیا، واگرایی کمی در ژنوم کلروپلاستی آن وجود دارد (۷). در نتیجه تعداد صفات با ارزش از نظر تبارزایی کاهش یافته و بر نتیجه بررسی‌ها تأثیر می‌گذارد. در بررسی ژن *GBSSI* نیز از مجموع ۱۹۶۳ نوکلئوتید تنها ۱۴۰ نوکلئوتید دارای ارزش تبارزایی می‌باشد، در حالیکه در ژن *ITS* تقریباً ۱/۵ صفات با ارزش بوده و روابط بین تاکسون‌ها را به خوبی نشان می‌دهد (جدول ۱).

دنیای قدیم در مطالعه خود استفاده کرده‌اند، مجدداً لیسیم‌های دنیای قدیم را تک‌نیا معرفی کردند. این درحالی بود که آنها تنها از برخی از گونه‌های دنیای قدیم استفاده کرده بودند. بررسی کلی نتایج بدست آمده از ژن‌های کلروپلاستی و هسته‌ای نشان می‌دهد که ژن‌های کلروپلاستی به همراه ژن هسته‌ای *GBSSI* تک‌نیا بودن جنس لیسیم و ژن *ITS* چند نیا بودن آن را در دنیای قدیم نشان می‌دهند.

جدول ۱- مقایسه ژن‌های مورد استفاده در بررسی روابط تبارزایی جنس لیسیم

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 تبارزایی (جفت باز)	۱۴۰	۳۰	۱۰	۲۸	۱۳	۱۰۴	۹۳
درصد صفات با ارزش تبارزایی	۷/۱٪	۱/۸٪	۰/۸٪	۱/۸٪	۱/۳٪	۱۵/۹٪	۱۴/۸٪
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

utilization. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK.

8. Swofford DL. (2000). PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0b4a. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts.

9. Taberlet P, Gielly L, Pautou G & Bouvet J. (1991). Universal Primer for Amplification of Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.

10. Wang A, Yang M & Liu J. (2005). Molecular Phylogeny, Recent Radiation and Evolution of Gross Morphology of the Rhubarb genus *Rheum* (Polygonaceae) Inferred from Chloroplast DNA *trnL*-*F* Sequences. *Annals of Botany*. 96: 489-498.

11. Wen J & Zimmer EA. (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.

علاوه بر تعداد صفات با ارزش تعداد تاکسون های دنیای قدیم نسبت به کل تاکسون های مطالعه شده می تواند نقش تعیین کننده ای در نتیجه بررسی ها داشته باشد. در این پژوهش در بررسی ژن *trnL-trnF* علی رغم تعداد کم صفات دارای ارزش تبارزایی، به علت بکارگیری تعداد زیاد تاکسون از دنیای قدیم (تقریباً نیمی از تاکسون های دنیای قدیم)، همانند نتایج حاصل از ژن هسته ای *JTS*، چندینا بودن لیسوم ها در دنیای قدیم نشان داده شده است. هرچند روابط بین تاکسون ها در بخش های مختلف دنیای قدیم (یوراسیا، افریقا و استرالیا) و جدید بطور دقیق مشخص نشده است.

تشکر و قدردانی

از زحمات کلیه عزیزان در پژوهشکده علوم محیطی (مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی) بویژه دکتر باقی زاده، مهندس عبدلی نسب، مهندس فرهمند، مهندس ترکزاده و مسئولین محترم آزمایشگاه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می نمایم.

منابع

1. خاتم ساز، م. (۱۳۷۸). فلور ایران، تیره سیب زمینی. جلد ۲۴. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.
2. Doyle JJ & Doyle JL. (1987). A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Photochemical Bulletin*. 19 (1): 11-15.
3. Fukuda T, Yokoyama J & Ohashi H. (2001). Phylogeny and Biogeography of the Genus *Lycium* (Solanaceae) Inference from Chloroplast DNA Sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 19: 246-258.
4. Levin RA & Miller JS. (2000). Relationship within Tribe Lycieae (Solanaceae): Paraphyly of *Lycium* and Multiple Origins of Gender Dimorphism. *American Journal of Botany*. 92 (12): 2044-2053.
5. Linder CR, Moore LA & Jackson RB. (2000). A Universal Molecular Method for Identifying under Ground Plant Parts to Species. *Molecular Ecology*. 9: 1549-1555.
6. Miller JS. (2002). Phylogenetic Relationships and the Evolution of Gender Dimorphism in *Lycium* (Solanaceae). *Systematic Botany*. 27(2): 416-428.
7. Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L & Palmer JD. (1999). Phylogeny and Provisional Classification of the Solanaceae Based on Chloroplast DNA pp 111-137. In: Nee M, Symon DE, Lester RN, Jessop JP. (Ed.). *Solanaceae IV: advances in biology and*