

## تبارزایی مولکولی کمپلکس *Bromus pectinatus* (تیره گندمیان) بر اساس توالی‌های هسته‌ای ITS و ETS و کلروپلاستی *matK*

### Molecular phylogeny of *Bromus pectinatus* complex (Poaceae) based on the nrDNA ITS and ETS and plastid *matK* sequences

اکرم نصیری<sup>۱</sup>، شاهرخ کاظم پوراوصالو<sup>۱\*</sup>، بهنام حمزه<sup>۲</sup>، جفری ام. سرلا<sup>۳</sup>، راجر دی بول<sup>۴</sup>

۱- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- معاون رئیس و گیاه‌شناس، بخش تحقیقات و کلکسیون‌های موزه طبیعت کانادا، اتاوا، انتاریو، کانادا

۴- مدیر عملیاتی بانک نمونه تنوع ملی کانادا و آزمایشگاه تنوع زیستی مولکولی، موزه طبیعت کانادا، اتاوا، انتاریو، کانادا

Nasiri A<sup>1</sup>, Kazempour-Osaloo SH<sup>\*1</sup>, Hamzeh'ee B<sup>2</sup>, M. Saarela J<sup>3</sup>, D. Bull R<sup>4</sup>

1- PhD Graduated, Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

3- Vice-president and Botanist, Research and collections Services, Canadian Museum of Nature, Ottawa, Ontario, Canada

4- Head of Operations, National Biodiversity Cryobank of Canada, Laboratory of Molecular Biodiversity, Canadian Museum of Nature, Ottawa, Ontario, Canada

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: skosaloo@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۰۳)

#### چکیده

تبارزایی کمپلکس *Bromus pectinatus* از بخشه *Bromus* و خاستگاه دورگه‌ای بین بخشه‌ای آن‌ها با استفاده از داده‌های کلروپلاستی *matK* و ترکیب داده‌های هسته‌ای ETS و ITS مورد بررسی قرار گرفت. ۳۷ تاکسون شامل سه برون گروه (*Hordeum marinum*, *Triticum turgidum*, *Littledalea*) و ۳۴ تاکسون از سرده *Bromus* به‌عنوان درون گروه انتخاب شدند. روابط تبارزایی بین گونه‌ای با استفاده از استنباط بیزی و روش بیشینه درست‌نمایی بازسازی شدند. در این مطالعه بخشه‌های *Bromus* و *Genea* در درختان هسته‌ای و کلروپلاستی چندنیایی هستند. داده‌های مولکولی هسته‌ای و کلروپلاستی در ارتباط با بخشه‌های *Bromus* و *Genea* به‌علت جایگاه گونه‌های *B. gedrosianus* و *B. pulchellus* از کمپلکس *B. pectinatus* و گونه‌های *B. oxyodon* و *B. sewerzowii* ناسازگار هستند و از خاستگاه دورگه‌ای این گونه‌ها بین دو بخشه *Bromus* و *Genea* پشتیبانی می‌کند. درختان مولکولی از خاستگاه دورگه‌ای کمپلکس *B. pectinatus* از گونه *B. japonicus* به‌دلیل قرارگیری آن‌ها در کلادهای مجزا حمایت نمی‌کند. ارتباط میان گونه‌های *B. sterilis* و *B. tectorum* با کمپلکس *B. pectinatus* بر اساس داده‌های کلروپلاستی تأیید می‌شود.

#### واژه‌های کلیدی

کمپلکس *Bromus pectinatus*

دورگ‌گیری

تبارزایی

داده‌های مولکولی

از اوراسیا هم حاصل دخالت انسان است (Stebbins 1981). به طوری که تعداد زیادی از تاکسون‌های این بخش با شروع آنتروپوسن، حدوداً از ۱۰۰۰۰ سال پیش، در نتیجه تأثیر بشر تکامل پیدا کرده‌اند (Scholz 2008).

اعضای بخش *Bromus* با داشتن سنبلچه‌های تخم مرغی، دوکی، بیضوی یا سر نیزه‌ای، در بخش بالا به تدریج باریک و بسته، بدون سیخک یا در هر پوشینه دارای ۵-۱ (به ندرت ۶) سیخک از سایر بخش‌های *Bromus* متمایز می‌شوند (Naderi and Rahiminejad 2015). گونه‌های این بخش از نظر ریخت‌شناسی به همدیگر شبیه هستند و معمولاً تمایز آن‌ها دشوار است. بر همین اساس، طبقه‌بندی زیربخشه‌ای متعددی برای آن پیشنهاد شده است. به نظر می‌رسد گونه‌های تتراپلوئید این بخشه آلپولی‌پلوئید هستند و خاستگاه درون بخشه‌ای فرضی آن‌ها بر اساس مطالعات سرولوژی (Smith 1972)، ایزوآنزیم و آلوزیم (Ainouche et al. 1995; Oja 2007; Oja and Jaaska 1998; Oja 2007) هسته‌ای (Ainouche and Bayer 1997; Ainouche et al. 1999) آشکار شده است.

کمپلکس *Bromus pectinatus* مجموعه‌ای پیچیده از گونه‌های تتراپلوئید است که از نظر ریخت‌شناسی وضعیتی بینابین بخش‌های *Bromus* و *Genea* را نشان می‌دهد (Scholz 1981; Sales 1993; Saarela et al. 2007). این کمپلکس را مجموعه‌ای شامل شش گونه *B. pectinatus* Tunb., *B. pulchellus* Fig. & De Not. (*B. tythanthus* Neviski, *B. sinicus* (Hack.) Täckh.), *B. rechingeri* Melderis, *B. gedrosianus* Pénzes, *B. tibetanus* H.Scholz & *B. pseudojaponicus* H.Scholz معرفی نمود و شرح کاملی از صفات افتراقی و توزیع جغرافیایی را همراه با کلید شناسایی برای آن‌ها ارائه کرد. وی الگوی تنوع‌یابی اعضای این گروه را دارای ماهیت مشبک دانسته و با در نظر گرفتن خاستگاه آمفی دیپلوئیدی بین بخشه‌ای ارائه شده توسط (Stebbins 1956, 1981)، تشابهات آن‌ها با گونه‌های مختلف غیرمرتبط را در ارتباط با خاستگاه دورگه (احتمالاً چند نیایی) این گروه در نظر گرفت. (2015) Naderi and Rahiminejad این کمپلکس را به علت نبود مرز مشخص در تشکیل تعداد رگه‌های پوشینه به چهار گونه *B. gedrosianus* و *B. pulchellus*, *B. tibetanus*, *B. pectinatus*

*Bromus* L. به عنوان تنها سرده‌ی قبیله *Bromeae* از تیره *Poaceae* شامل حدود ۱۶۵ گونه یک‌ساله تا چند ساله است (Soreng et al. 2017) که به طور وسیعی در مناطق معتدله و کوهستانی جهان انتشار دارد (Saarela et al. 2014). برخی گونه‌های این سرده دارای ارزش علوفه‌ای بوده، تعدادی از آن‌ها در بازسازی مراتع مورد استفاده قرار می‌گیرند و تعدادی زیادی از آن‌ها به عنوان علف هرز مزارع شناخته شده‌اند. این سرده شامل مجموعه پیچیده‌ای از آرایه‌ها از نظر تاکسونومی و تاریخچه نام‌گذاری است و شناسایی تعدادی زیادی از گونه‌ها به علت شباهت‌های زیاد ریخت‌شناسی مشکل است (Saarela et al. 2007). سطوح متنوع پلوئیدی  $2n = 14-112$  بر پایه  $x=7$  برای این سرده معرفی شده است و دورگ‌گیری بین گونه‌های نقش مهمی در تکامل تعداد زیادی از گونه‌های آن ایفا می‌کند (Stebbins 1981). اعضای *Bromus* چندین بار در آرایه‌های مختلفی در سطح بخشه، زیرسرده و یا سرده‌های مجزا رده بندی شده‌اند (Smith 1970; Saarela et al. 2007) و بر اساس آخرین مطالعات آرایه‌شناختی انجام شده، این سرده دربردارنده ۹ بخشه در جهان است (Naderi and Rahiminejad 2015; Saarela et al. 2014; Llamas and Acedo 2019).

بخشه *Bromus* شامل ۴۰-۳۰ گونه دیپلوئید و تتراپلوئید یک‌ساله بومی آسیا و اروپا است (Saarela et al. 2007) که اغلب آن‌ها محدود به زیستگاه‌های آشفته و یا در ارتباط با گندمیان زراعی است (Scholz 1970). بسیاری از گونه‌های این بخشه علف‌های هرز مهاجمی هستند که به طور گسترده در سایر مناطق جهان پراکنش یافته‌اند (Saarela et al. 2007). برخی از گونه‌های این بخشه اخیراً کمیاب هستند و یا منقرض شده‌اند.

گونه‌های بخشه *Bromus* به عنوان پیشرفته‌ترین بخشه از جنس *Bromus* احتمالاً در طول دوره پلیستوسن همراه با گونه‌های بخشه *Genea* Dumort. از گونه‌های ابتدایی اما متفاوت بخشه *Bromopsis* Dumort. اشتقاق یافته‌اند و خاستگاه و مرکز تنوع آن‌ها مرکز و جنوب غرب آسیا معرفی شده است. فعالیت‌های بشر مانند کشاورزی و چرای دام نقش تعیین کننده‌ای در تکامل این بخشه داشته است و به احتمال زیاد، حضور اعضای آن در خارج

روابط تبارزایی کمپلکس *B. pectinatus* و خویشاوندانش پردازد.

### مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر به بازسازی موقعیت تبارزایی کمپلکس *Bromus pectinatus* بر اساس داده‌های حاصل از توالی‌یابی قطعات هسته‌ای و کلروپلاستی پرداخته شد. به این منظور، نمونه‌های هرباریوم‌های موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور<sup>۳</sup> (TARI)، دانشگاه اصفهان<sup>۴</sup> (HUI) و موزه طبیعت کانادا<sup>۵</sup> (CAN) مورد بررسی قرار گرفتند و در مجموع ۳۴ تاکسون معرف ۳۳ گونه از *Bromus* برای انجام تحلیل تبارزایی انتخاب شدند و سه تاکسون *Hordeum marinum* Huds. و *Triticum turgidum* L. از قبیله Triticeae و *Littledalea alaica* (Korsh.) و Petrov ex Kom. از قبیله Littledaleae بر اساس مطالعات پیشین (Saarela et al. 2007) به‌عنوان برون گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

DNA کل ژنوم از برگ‌های خشک شده نمونه‌های هرباریومی استخراج شد. روش استخراج بر مبنای روش (Doyle and Doyle 1987) CTAB و با استفاده از کیت استخراج DNA گیاهی (Exgene TM Plant SV mini) در دانشگاه تربیت مدرس و با استفاده از کیت‌های استخراج تولید شده بر اساس اصلاح پروتکل ارائه شده توسط Alexander et al. (2007) در آزمایشگاه تنوع زیستی مولکولی موزه طبیعت کانادا انجام شد.

کاهش دادند و حضور دو گونه آخر را برای فلور ایران پذیرفتند. اگرچه این کمپلکس به‌طور رسمی در بخشه *Bromus* قرار می‌گیرد اعضای آن برخی وابستگی‌های ریخت‌شناسی را با اعضای بخشه *Genea* نشان می‌دهند (Scholz 1981). به طوری که گونه‌های آن با داشتن پوشینه<sup>۱</sup>‌های بیرونی که به سمت رأس مخروطی هستند و پوشینه<sup>۲</sup>‌های درونی که ریخت‌شناسی حدوسط دو بخشه را نشان می‌دهند از نظر ریخت‌شناسی مشابه گونه‌های بخشه *Genea* هستند (Smith 1972; Scholz 1981; Stebbins 1981; Sales 1993). رابطه نزدیک بین *B. pectinatus* و بخشه *Genea* به‌وسیله داده‌های ایزوزیم (Oja 2007) و ساختار رویان‌شناختی (Kosina 1996) تایید شده است. داده‌های ایزوزیم نشانگر طبیعت آلوتراپلوئیدی گونه *B. pectinatus* است، به طوری که چندین هتروزیم نشان می‌دهد که *B. pectinatus* ممکن است نتیجه دورگه‌گیری بین گونه دیپلوئید *B. Thunb. japonicus* از بخشه *Bromus* و گونه دیپلوئید *B. tecturum* L. از بخشه *Genea* باشد (Sales 1993; Oja 2007). شرح ارائه شده از *B. pectinatus* (Scholz 1981; Sales 1993) به توانمندی رویشی آن اشاره دارد که ممکن است به دلیل ماهیت تتراپلوئید آن باشد (Oja 2007).

تاکنون مطالعه جامعی بر روی اعضای این کمپلکس به‌منظور نشان دادن روابط تبارزایی این مجموعه و جایگاه درست آن درون بخشه و در ارتباط با سایر بخشه‌ها صورت نگرفته است. مطالعه حاضر می‌کوشد با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی هسته‌ای و کلروپلاستی و استفاده از دامنه گسترده‌تری از گونه‌ها به بازسازی

<sup>3</sup> Research Institute of Forests and Rangelands

<sup>4</sup> University of Isfahan

<sup>5</sup> Canadian Museum of Nature

<sup>1</sup> Lemma

<sup>2</sup> Palea

جدول ۱- اطلاعات مربوط به آرایه‌های مورد مطالعه در تحلیل تبارزایی. توالی آرایه‌هایی که توسط نگارنده به دست آمده با علامت "✓"؛ توالی‌هایی که از بانک ژن گرفته شده است با علامت "\*" و توالی‌هایی که موجود نیست با علامت "×" نشان داده شده است.

Species	Collection information	ITS	ETS	matK
<i>Bromus alopecuroides</i> subsp. <i>caroli-henrici</i> (Greuter) P.M.Sm.	Jordan; 28 Aug. 2001; Keane Rk007 (From seed; cultivated by keane in Berkshire, UK.); CAN 589846	✓	✓	✓
<i>Bromus arvensis</i> L.	Germany: accession 06-116-74-74 Botanischer Garten Oldenburg; 2011; Alonso 344; LEB C618	*	*	×
<i>Bromus briziformis</i> Fisch.	Iran: Mazandran, Kelardasht, Rodbarak; 10 June 1973;	✓	✓	✓

& C.A.Mey.	Fotovat s.n.; TARI 10180			
<i>Bromus carinatus</i> Hook. & Arn.	USA: California; 2006; Peterson 19700; CAN	*	*	×
	Canada: British Columbia, 4 mi SW of Hwy 37 on road towards New Aiyansh along Cranberry River; 21 July 2004; 04-PMP-18689; CAN 3524087	×	×	*
<i>Bromus catharticus</i> Vahl	Spain; Acedo 23	*	*	×
	South Korea: Gwangyang-si, Jeollanam-do; 10 May 2012; HCCN-PJ008548-PB-11	×	×	*
<i>Bromus danthoniae</i> Trin. var. <i>danthoniae</i>	Iran: Yazd, Taft, after Sanij village, Shir kuh mountain; 16 May 2010; Naderi 1026; HUI 22966	✓	✓	✓
<i>Bromus danthoniae</i> Trin. var. <i>pauciaristatus</i> Naderi	Iran: Kurdistan, Sanandaj, Zaleh station. 19 May 1986, Fattahi & khaledian s.n.; TARI 1192	✓	✓	✓
<i>Bromus diandrus</i> Roth	Morocco: Nador, Beni Chiker; 2010; Chrték & Doc̃kalová; LEB	*	*	×
	Canada: British Columbia, Vancouver Island, Island View Park, S of Hwy. 17 between Sidney and Victoria, along coast; 4 June 2007; 07-JMS-0847; CAN 590484	×	×	*
<i>Bromus erectus</i> Huds.	Spain; Acedo et al. 224	*	*	×
	United Kingdom: Somerset, North (6)	×	×	*
<i>Bromus gedrosianus</i> Pézèzes	Iran: Sistan, Zabol, alfalfa field; 30 Jan. 1965; Valizadeh & Ramak Maassoumi s.n.; TARI 36	✓	✓	✓
<i>Bromus gracillimus</i> Bunge	Tajikistan: Pamir; 1958; Tolmatcheva; CAN	*	*	×
<i>Bromus grossus</i> Desf. ex DC.	Austria: Wien; 27 June 1925; Seiller s.n.; W2015-0007797	✓	✓	✓
<i>Bromus hordeaceus</i> L.	Spain: Badajoz, Calera de León; 2011; Acedo, Vázquez, Alonso and Llamas 109; LEB	*	*	×
	Canada: British Columbia, Vancouver Island, Thetis Lake Regional Park, just N of Hwy. 1, N of Langford; 4 June 2007; 07-JMS-0859; CAN 590505	×	×	*
<i>Bromus inermis</i> Leyss.	Russia: Buryatiya Republic, Kyakhtinskii Raion; 2010; Chepinoga 28355; LEB	*	*	×
	W6 21403	×	×	*
<i>Bromus japonicus</i> Thunb.	Iran: Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad, road intrance of Yasuj to Eq̃lid, before Chenar spring, in forest's marigin river; 5 May 2011; Naderi 1018; HUI 22972	✓	✓	✓
<i>Bromus kalmii</i> A.Gray	USA: accession of unknown origin acquired in Everwilde Farm; 2013; Acedo 332; LEB	*	*	×
	Canada: Quebec, Montreal, Island of Montreal, Jardin Botanique de Montreal, Jardin alpin; 08 June 2012; Francois Lambert; MT00179369	×	×	*
<i>Bromus lanceolatus</i> Roth	Iran: Khuzestan, Kazerun, Famur Rural District, Qaleh-ye Narenji; 7 Mar. 2010; Naderi 1132; HUI 22955	✓	✓	✓
<i>Bromus madritensis</i> L.	Iran: Tehran, 84 km from Tehran to Qom; 18 May 1974; Amin & Bazargan s.n.; TARI 18217	✓	✓	✓
<i>Bromus oxyodon</i> Schrenk	Iran: Razavi Khorasan, Shirvan, ca. 45 N. of Shirvan, Golool and Sarany protected area (EG3); 26 May 1984; Assadi & Maassoumi s.n.; TARI 50508	✓	✓	✓
<i>Bromus pectinatus</i> Thunb.	South Africa; Aizpuru et al. LM6093	*	*	×
<i>Bromus pseudobrachystachys</i> H.Scholz	Iran: Fars, Kazerun, Ghal'eh Narenji, Narges-Zar; 6 May 2011; Naderi 1001; TARI 96189	✓	✓	×
<i>Bromus pulchellus</i> Fig. & De Not.	Iran: Sistan and Baluchestan, Zahedan, 30 km Zahedan to Zabol; 4 Apr. 1983; Mozafarian s.n.; TARI 42671	✓	✓	✓
<i>Bromus pumilio</i> (Trin.) P.M.Sm.	Armenia; Nersesyan 50-2004	*	*	×
	-	×	×	*

<i>Bromus ramosus</i> Huds.	Bulgaria; Aedo et al	*	*	×
	G: G. Besnard 342004	×	×	*
<i>Bromus rechingeri</i> Melderis	Iran: Zahedan, 18 km SE Zahedan; 9 Apr. 1969; Babakhanlou s.n.; TARI 9465	✓	✓	✓
<i>Bromus rigidus</i> Roth	Iran: Alonso 347	*	*	×
	South Korea: Wando, Jeollanam-do; 28 May 2013; HCCN-PJ008548-PB-383	×	×	*
<i>Bromus rubens</i> L.	Iran: Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad, Gachsaran, 35 km Gachsaran to Noor Abad; 17 Apr. 2010; Naderi 1116; HUI 22947	✓	✓	✓
<i>Bromus scoparius</i> L.	Iran: Azarbaijan, SW of Rezaiyeh, Silvana valley, along the road SE of Dizeh; 25 May 1976; Ronemark & Forughi s.n., TARI 19846	✓	✓	✓
<i>Bromus secalinus</i> L.	Germany: accession 07-104-07-74 Botanischer Garten Oldenburg; 2011; Alonso 339; LEB	*	*	×
	United Kingdom: Cardiganshire; 08 Oct. 2000	×	×	*
<i>Bromus sewerzowii</i> Regel	Kazakhstan: Zhambyl; 4 June 1967; Demina, O. Gerbarii Flory SSSR 4930; W1972-0018335	✓	✓	✓
<i>Bromus squarrosus</i> L.	Spain: León, Llombera; 2010; Llamas & Acedo 43; LEB	*	*	×
	Canada: British Columbia, W of Osoyoos, 1.3 km up Richter Mountain Road; 19 June 2006; 06-JMS-0628; CAN 590361	×	×	*
<i>Bromus sterilis</i> L.	Iran: Lorestan, ca. 40 km W Khorramabad, Tang-e Tir; 5 May 1975; Wendelbo & Assadi s.n.; TARI 16558	✓	✓	✓
<i>Bromus tectorum</i> L. subsp. <i>tectorum</i>	Iran: Fars, Dasht-e Arzhan; 18 Apr. 2010; Naderi 1100; HUI 22952	✓	✓	✓
<i>Bromus vulgaris</i> (Hook.) Shear	USA: California, 10.2 mi NW of Philo on Hwy. 128 towards Albion at Navarro Redwoods State Park; 5 Aug. 2006; Peterson et al. 19695; CAN-593921	*	*	*
<i>Hordeum marinum</i> Huds.	Spain: Zamora, Villafáfila; 2012; Acedo & Llamas 263; LEB	*	*	×
	BCC 2006	×	×	*
<i>Littledalea alaica</i> (Korsh.) Petrov ex Kom.	-	*	×	×
	China; deposited at School of Life Science, Qinghai Normal University	×	×	*
<i>Triticum turgidum</i> L.	Spain; Llamas, Acedo & Alonso 95.2010; LEB	*	*	×
	cultivar TA2836	×	×	*

قطعات توسط شرکت MacroGen تعیین توالی شدند. محصولات PCR تولید شده در آزمایشگاه تنوع زیستی مولکولی موزه طبیعت کانادا با دستگاه توالی‌یاب ABI مدل 3500xL موجود در آزمایشگاه توسط نویسنده اول با استفاده از پرایمرهای مشابه توالی‌یابی شدند.

توالی‌های به دست آمده از نشانگرهای هسته‌ای ITS, ETS و کلروپلاستی *matK* با استفاده از نرم‌افزار Geneious 11.1.5 (Kearse et al. 2012) جمع‌بندی و هم‌ردیف‌سازی شدند. آنالیز روابط تبارزایی هر سه مجموعه داده به روش استنباط بیزی (BI) در نرم‌افزار MrBayes 3.2.7a (Ronquist et al. 2012)

به منظور انجام واکنش PCR، توالی‌های هسته‌ای ITS4 و ITS5m (Sang et al. 1995) و آغازگرهای ETS و nrDNA (White et al. 1990) و آغازگرهای RETS-B3F و RETS-B4F (Alonso et al. 2014) و 18S-R (Starr et al. 2003) تکثیر شدند. برای تکثیر ژن کد کننده کلروپلاستی *matK* آغازگرهای *matK*-BF و *matK*-AF (Ooi et al. 1995) و *trnK*-2R (Johnson and Soltis 1994) به کار گرفته شدند. محصولات PCR تولید شده در دانشگاه تربیت مدرس به منظور توالی‌یابی از طریق شرکت پیشگام به کشور کره جنوبی ارسال و با استفاده از همان پرایمرهای استفاده شده در تکثیر

ترکیبی داده‌های هسته‌ای و کلروپلاستی تهیه نشد و بازسازی درختان هسته‌ای و کلروپلاستی به‌طور مجزا انجام شد. بررسی اجمالی کلادها و روابط گروه‌های خواهری، تفاوت عمده‌ای بین توپولوژی درخت‌های به‌دست آمده از BI و ML نشان نداد. بنابراین بررسی روابط با تمرکز بیشتر بر روی درختان BI دارای روابط حل شده‌تر صورت گرفت.

در درخت تبارزایی حاصل از داده‌های ترکیبی هسته‌ای ETS و ITS دو کلاذ با احتمال پسین بیزی بالا ( $PP=1/00$ ) از یکدیگر جدا شده‌اند. کلاذ قاعده‌ای در برگرنده گونه‌های *B. pumilio* Trin. P.M.Sm. از بخشه (*Boissiera* (Hochst. ex Steud.) Trin. P.M.Sm. و *Nevskiella* P.M.Sm. از بخشه *Bromus gracillimus* Bunge از بخشه *Tourney* (V.I. Krecz. & Vved.) است که با حمایت بالا ( $PP=1/00$ ) از یکدیگر جدا شده‌اند و کلاذ دیگر شامل گونه‌های سایر بخشه‌های جنس *Bromus* است. این کلاذ با احتمال پسین بالا ( $PP=1/00$ ) دارای دو زیر کلاذ است. زیر کلاذ اول در بردارنده اکثر اعضای بخشه *Bromus* است که در آن گونه *B. alopecurus* subsp. *Caroli-henrici* (Greuter) P.M.Sm. با حمایت بالا ( $PP=0/88$ ) از سایر اعضا جدا می‌شود. سپس *B. hordeaceus* L. با حمایت بالا ( $PP=1/00$ ) زیر کلاذ بعدی را با سایر اعضا تشکیل می‌دهد. در این زیر کلاذ *B. pulchellus* (متعلق به کمپلکس *B. pectinatus*) همراه با *B. sewerzowii* Regel, *B. briziformis* Fisch. and C.A.Mey. و دو وارسته گونه *Bromus danthoniae* var. *danthoniae* B. *danthoniae* Trin. را تشکیل می‌دهند که با حمایت بالا ( $PP=1/00$ ) از *B. gedrosianus* (متعلق به کمپلکس *B. pectinatus*) و *B. oxyodon* Schrenk جدا شدند.

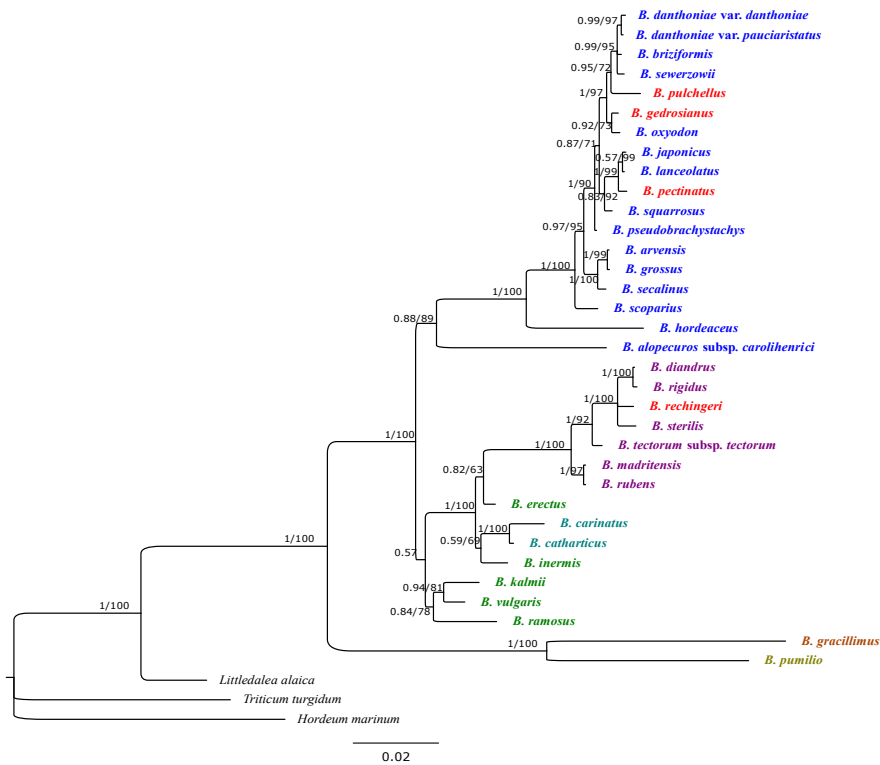
با استفاده از پایگاه اینترنتی CIPRES (<https://www.phylo.org>) انجام شد (Miller et al. 2010). برای پیدا کردن مناسب‌ترین مدل تکاملی مولکولی درخت BI از برنامه PartitionFinder2 بر اساس معیار اطلاعاتی AICc استفاده شد. مدل SYM+G برای داده‌های نواحی هسته‌ای رونویسی شونده درونی و بیرونی (ITS1, ITS2, ETS1) و مدل K80+I برای داده‌های نواحی کد کننده زیرواحدهای ریوزومی (18s, 5.8s, 26s) و GTR+I+G برای داده‌های *matK* در نظر گرفته شدند. روش پیشینه درست‌نمایی (ML) نیز از طریق نسخه اینترنتی بر خط IQ TREE (Nguyen et al. 2015) مورد تحلیل قرار گرفت و انتخاب مدل تکاملی آن از طریق سایت مربوطه انجام شد (Chernomor et al. 2016; Kalyaanamoorthy et al. 2017). آزمون اختلاف ناسازگاری طول درختان، ILD، (Farris et al. 1994) تعبیه شده در نرم‌افزار PAUP\* نسخه 4.0a 166 (Sowfford 2002) به‌منظور امکان ترکیب داده‌های هسته‌ای و کلروپلاستی استفاده شد. اطلاعات داده‌های مولکولی برای مجموعه داده‌های مجزا در جدول شماره ۲ ارائه شده است.

## نتایج

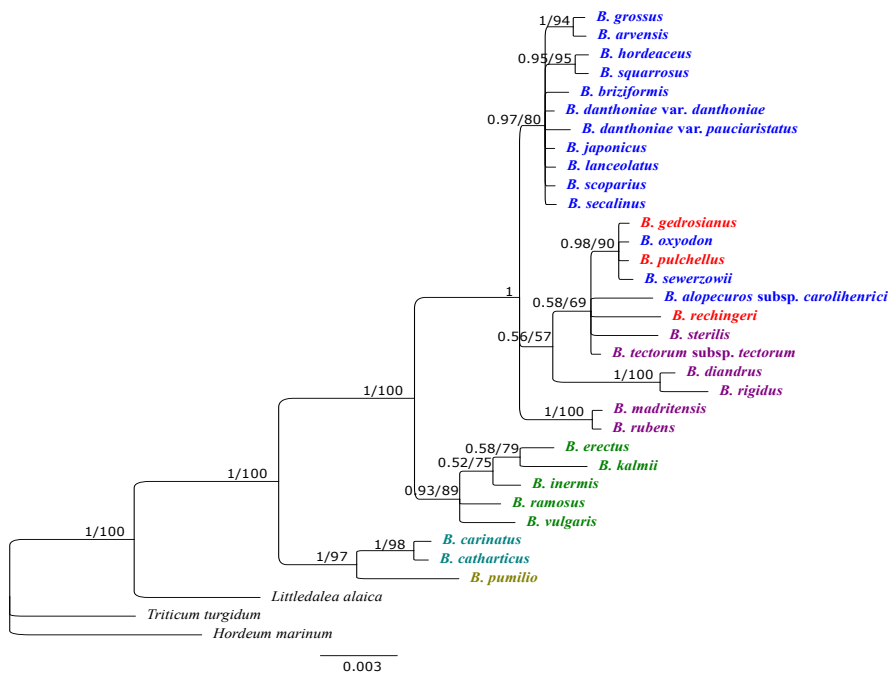
مشاهده بصری درختان هسته‌ای ITS و ETS (شکل ۱) با درخت کلروپلاستی *matK* (شکل ۲) حاکی از تفاوت توپولوژی درختان و عدم سازگاری در ترکیب داده‌ها است که عمدتاً مربوط به اعضای بخشه *Bromus* و *Genea* و موقعیت متفاوت کمپلکس *Bromus pectinatus* می‌باشد. همچنین نتیجه آزمون ILD به منظور ترکیب داده‌های هسته‌ای و کلروپلاستی ( $p<0.01$ ) با ناسازگاری جهت ترکیب داده‌ها مطابقت دارد. از این رو ماتریس

جدول ۲- آمار توصیفی تحلیل داده‌های مولکولی.

	nrDNA		cpDNA	Combined ITS-ETS
	ITS	ETS	matK	
Sequences (n)	37	36	34	37
Nucleotide sites	927	1136	1443	2063
GC content (%)	57.32	53.46	33.35	55.29
Parsimony-Informative Characters (PIC)	124	189	60	313
parsimony-uninformative characters	803	947	1383	1750
Conserved Characters	729	784	1308	1513
Variable Characters (VC)	192	336	117	528
CI of MPTs	0.669	0.685	0.823	0.674
RI of MPTs	0.888	0.850	0.930	0.866
Mean p-distance	0.067	0.057	0.014	0.074



شکل ۱- درخت حاصل از بازسازی روابط تبارزایی داده‌های ترکیبی هسته‌ای (ITS + ETS) بر اساس روش استنباط بیزی. مقدار احتمال پسین بیزی و درصد بوتسترپ بیشینه درست‌نمایی در بالای هر یک از شاخه‌ها نمایان است.



شکل ۲- درخت حاصل از بازسازی روابط تبارزایی داده‌های کلروپلاستی *matK* بر اساس روش استنباط بیزی. مقدار احتمال پسین بیزی و درصد بوتسترپ بیشینه درست‌نمایی در بالای هر یک از شاخه‌ها نمایان است.

داده‌های مولکولی هسته‌ای و کلروپلاستی این پژوهش در ارتباط با بخش‌های *Bromus* و *Genea* به علت جایگاه گونه‌های کمپلکس *B. pectinatus* و گونه‌های *B. oxyodon* و *B. sewerzowii* ناسازگارند. بر اساس ویژگی‌های حدوسط ریخت‌شناسی، Stebbins (1956, 1981) پیشنهاد کرد که کمپلکس *B. pectinatus* ممکن است آمفی دیپلوئید بین بخش‌های باشد که از طریق رخداد دورگه‌گیری بین گونه‌های بخش‌های *Bromus* و *Genea* ایجاد شده باشد. موقعیت ناسازگار این کمپلکس در درختان هسته‌ای و کلروپلاستی از این فرضیه حمایت می‌کند و نشان می‌دهد که ژنوم دهنده در تشکیل این کمپلکس احتمالاً از بخش‌های *Bromus* و *Genea* بوده است.

در درخت تبارزایی حاصل از داده‌های ریبوزومی هسته‌ای، بخش‌های *Bromus* و *Genea* به علت حضور *B. rechingeri* از کمپلکس *B. pectinatus* درون کلاد متعلق به اعضای بخش‌های *Genea*، چندنیایی هستند. در درخت تبارزایی داده‌های کلروپلاستی گونه‌های بخش‌های *Bromus* و *Genea* به صورت مخلوط با همدیگر قرار دارند که از خاستگاه دورگه‌ای کمپلکس *B. pectinatus* حمایت می‌کند. بر اساس نتایج حاصل از این درخت نیز، دو بخش *Bromus* و *Genea* چند نیا هستند که در تأیید مطالعات مولکولی پیشین است. داده‌های کلروپلاستی Saarela et al. (2019) Pourmoshir et al. همانند داده‌های (2007) از تک تباری بخش *Genea* به علت موقعیت گونه *Bromus pectinatus* حمایت نکرد. این گونه به خاطر داشتن گلچه‌هایی که به سمت رأس مخروطی می‌شوند از نظر ریخت‌شناسی مشابه با گونه‌های بخش *Genea* هستند و به عنوان دورگه بین بخش‌های که بین گونه‌های بخش‌های *Bromus* و *Genea* تولید شده است در نظر گرفته می‌شود.

Sales (1993) در بررسی آرایه‌شناختی بخش *Genea* دامنه پیوسته‌ای از تغییرات را بین بخش‌های *Bromus* و *Genea* از

دو گونه اخیر درون کلادی مجزا با حمایت (PP=0/92) قرار می‌گیرند. زیر کلاد دوم شامل اعضای بخش‌های *Bromopsis*، *Bromus* و *Ceratochloa* (P.Beauv.) Griseb. و *Genea* گونه *Bromus rechingeri* از کمپلکس *B. pectinatus* است. در این زیر کلاد، اعضای بخش *Bromopsis* درون دو زیرکلاد با حمایت (PP=0/58) قرار گرفتند. گونه‌های *B. catharticus* Vahl و *B. carinatus* Hook. & Arn. از بخش *Ceratochloa* با حمایت (PP=0/6) از گونه *B. inermis* Leyss. جدا شدند و *B. erectus* Huds. با حمایت (PP=0/83) گروه خواهری *B. rechingeri* و گونه‌های متعلق به بخش *Genea* را تشکیل می‌دهد.

در درخت حاصل از روابط تبارزایی داده‌های *matK* گونه‌های *Bromus* درون دو کلاد اصلی با حمایت بالا (PP=1/00) قرار گرفتند. گونه *B. pumilio* به همراه دو گونه *B. catharticus* و *B. carinatus* با حمایت بالا (PP=1/00) کلاد قاعده‌ای درخت را تشکیل می‌دهند. کلاد دیگر دارای دو زیر کلاد است. زیر کلاد اول دربردارنده نمایندگان بخش *Bromopsis* است که با حمایت بالا (PP=1/00) از اعضای بخش‌های *Genea* و *Bromus* جدا شده اند. زیر کلاد دوم شامل سه زیر کلاد با روابط حل نشده است که به صورت یک پلی‌تومی کنار همدیگر قرار می‌گیرند. آرایه‌های *B. tectorum* subsp. *tectorum* و *B. sterilis* L. از بخش *Genea* و گونه‌های *B. rechingeri* (کمپلکس *Bromus pectinatus*) و *B. alopecurus* subsp. *Caroli-henrici* از بخش *Bromus* متعلق به یک پلی‌تومی با حمایت پایین (PP=0/58) هستند که از زیر کلاد دربردارنده چهار گونه *B. pulchellus* و *B. gedrosianus* (کمپلکس *B. pectinatus*) و *B. oxyodon* و *B. sewerzowii* از بخش *Bromus* که با حمایت بالا (PP=0/98) کنار همدیگر قرار گرفته‌اند، جدا شده‌اند. سایر گونه‌های نماینده بخش *Bromus* درون زیرکلاد دوم با حمایت بالا (PP=0/97) قرار گرفتند که اکثر آن‌ها جزئی از یک پلی‌تومی بوده و به صورت حل نشده کنار همدیگر قرار می‌گیرند. تنها گونه‌های *B. hordeaceus* و *B. squarrosus* L. با حمایت بالا (PP=0/95) و گونه‌های *B. grossus* Desf. ex DC. و *B. arvensis* L. با حمایت بالا (PP=1/00) از یکدیگر جدا شده‌اند. زیر کلاد سوم شامل دو گونه

### بحث



نشان نمی‌دهد و قرارگیری آن‌ها در کلادهای مجزا و دور از همدیگر در درخت کلروپلاستی خاستگاه دورگه‌ای اعضای این کمپلکس از گونه *B. japonicus* را تأیید نمی‌کند.

قرارگیری گونه‌های *B. gedrosianus* و *B. pulchellus* از کمپلکس *B. pectinatus* درون کلاد خواهری اعضای بخشه *Genea* در درخت کلروپلاستی از پیوستگی ژنی اعضای این کمپلکس با بخشه *Genea* و خاستگاه دورگه‌ای بین بخشه‌ای آن‌ها حمایت می‌کند. موقعیت گونه *B. rechingeri* به‌عنوان تنها نماینده متعلق به بخشه *Bromus* درون بخشه *Genea* در درخت هسته‌ای و دور از سایر اعضای کمپلکس *B. pectinatus* و قرارگیری آن در بیرون و قاعده کلاد این کمپلکس در کنار گونه‌های متعلق به بخشه *Genea* در درخت کلروپلاستی نشان دهنده خاستگاه زود هنگام احتمالی این گونه دورگه نسبت به سایر اعضای کمپلکس در جریان تکامل مشبک و تغییر ژن‌های آن در راستای جابجایی به سمت والد متعلق به بخشه *Genea* می‌باشد. از سوی دیگر، حضور گونه‌های تتراپلوئید *B. oxyodon* و *B. sewerzowii* درون کلاد اعضای کمپلکس *B. pectinatus* در درخت کلروپلاستی گواه خاستگاه دورگه‌ای بین بخشه‌ای این دو گونه و پیدایش آن‌ها در مسیری مشابه با کمپلکس *B. pectinatus* است.

#### سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از رساله دکتری نویسنده اول می‌باشد که بخشی از آن با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است و بخشی از آن دستاورد دوره فرصت مطالعاتی نویسنده اول در موزه طبیعت کانادا است. نویسندگان از متصدیان هرباریوم موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، هرباریوم دانشگاه اصفهان و موزه طبیعت کانادا که امکانات لازم جهت دسترسی به نمونه‌های گیاهی را فراهم نمودند کمال تشکر را دارند.

طریق کمپلکس *B. pectinatus* گزارش کرد و قرار گرفتن آن را در بخشه *Bromus* به‌خاطر داشتن سنبلیچه‌های گوه‌ای<sup>۱</sup> که ویژگی افتراقی بخشه *Genea* است و همچنین ارتباط نزدیک آن با اعضای *Genea* مورد تردید قرار داد. وی این کمپلکس را با بخشه *Bromus* از طریق *B. japonicus* و با بخشه *Genea* از طریق *B. tecturum* s.l. به دلیل ایجاد مرز مبهم بین دو بخشه و مورد تردید قرار دادن ماهیت آرایه‌شناختی آن‌ها مرتبط دانست. (Oja and Jaaska 1998) با حمایت از فرضیه تشابهات بخشه‌های *Bromus* و *Genea* (Scholz 1981; Sales 1993)، تجزیه و تحلیل تبارزایی از تنوع ایزوآنزیمی را انجام دادند که به قرارگیری دو دیپلوئید بخشه *Genea*، *B. sterilis* و *B. tectorum* در میان دیپلوئیدهای بخشه *Bromus* منجر شد. (Oja 2007) از الکتروفورز ایزوزیم برای مطالعه خاستگاه *Bromus pectinatus* استفاده کرد و با تأکید بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی حد واسط این گونه بین *B. japonicus* و *B. tectorum* از ماهیت آلوتتراپلوئیدی *B. pectinatus* و موقعیت آن بین بخشه‌های *Bromus* و *Genea* پشتیبانی کرد و از طریق چندین هتروزیم، منشأ آن را چند برابر شدن مجموعه کروموزومی<sup>۲</sup> یک دورگه میان *B. japonicus* و *B. tectorum* دانست.

نتایج پژوهش حاضر ارتباط خویشاوندی نزدیک میان اعضای کمپلکس *B. pectinatus* و بخشه *Genea* را نشان می‌دهد و خاستگاه و ارتباط تکاملی آن‌ها را تأیید می‌کند. حضور گونه‌های *B. sterilis* و *B. tectorum* در کلاد دربردارنده کمپلکس *B. pectinatus* در درخت کلروپلاستی، از نتایج بررسی‌های پیشین و ارتباط میان آن‌ها حمایت می‌کند. علی‌رغم تشابهات معرفی شده بین کمپلکس *B. pectinatus* و *B. japonicus* (Oja 2007) و احتمال ارتباط رگه‌ای میان آن‌ها در مطالعات پیشین، نتایج داده‌های هسته‌ای ارتباط معنی‌داری را بین گونه‌های ذکر شده

<sup>1</sup> cuneiform spikelets

<sup>2</sup> polyploidization

## منابع

- Ainouche M, Misset M-T, Huon A (1995) Genetic diversity in Mediterranean diploid and tetraploid *Bromus* L. (section *Bromus* Sm.) populations. *Genome* 38:879-888.
- Ainouche ML, Bayer RJ (1997) On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Genome* 40:730-743.
- Ainouche ML, Bayer RJ, Gourret J-P, Defontaine A, Misset M-T (1999) The allotetraploid invasive weed *Bromus hordeaceus* L. (Poaceae): Genetic diversity, origin and molecular evolution. *Folia Geobotanica* 34:405-419.
- Alexander PJ, Rajanikanth G, Bacon CD, Bailey CD (2007) Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns. *Molecular Ecology Notes* 7:5-9.
- Alonso A, Bull RD, Acedo C, Gillespie LJ (2014) Design of plant-specific PCR primers for the ETS region with enhanced specificity for tribe Bromeae and their application to other grasses (Poaceae). *Botany* 92:693-699.
- Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ (2016) Terrace aware data structure for phylogenomic inference from supermatrices. *Systematic Biology* 65:997-1008.
- Doyle J, Doyle J (1987) Arapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Johnson LA, Soltis DE (1994) matK DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany* 19: 143-156.
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TK, von Haeseler A, Jeremiin LS (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods* 14:587-589.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649.
- Kosina R (1996) Embryo morphology in the genus *Bromus* (Poaceae). *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41:563-576.
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34:772-773.
- Llamas F, Acedo C (2019) Typification of eight current and seven related names and a new section in the genus *Bromus* (Bromeae, Pooideae, Poaceae). *PhytoKeys* 121:53-72.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). IEEE, New Orleans, LA, USA, 1-8.
- Naderi R, Rahiminejad MR (2015) A taxonomic revision of the genus *Bromus* (Poaceae) and a new key to the tribe Bromeae in Iran. *Annales Botanici Fennici* 52:233-248.
- Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32:268-274.
- Oja T (1998) Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities in the section *Bromus* of the grass genus *Bromus* (Poaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 26:403-413.
- Oja T (2007) Preliminary isozyme evidence on the hybrid origin and diploid progenitors of *Bromus pectinatus* (Poaceae). *Aliso* 23:468-471.
- Oja T, Jaaska V (1998) Allozyme diversity and phylogenetic relationships among diploid annual bromes (*Bromus*, Poaceae). *Annales Botanici Fennici* 35:123-130.
- Ooi K, Endo Y, Yokoyama J, Murakami N (1995) Useful primer designs to amplify DNA fragment of the plastid gene matK from angiosperm plants. *Journal of Japanese Botany* 70:328-331.
- Pourmoshir Z, Amirahmadi A, Naderi R (2019) An overview of the phylogenetic relationships of *Bromus pumilio* (Poaceae) and allies based on nrDNA ITS and trnL-F sequences. *Iranian Journal of Botany* 25:1-10.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck J (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542.
- Saarela JM, Peterson PM, Keane RM, Cayouette J, Graham SW (2007) Molecular phylogenetics of *Bromus* (Poaceae: Pooideae) based on chloroplast and nuclear DNA sequence data. *Aliso* 23:450-467.
- Saarela JM, Peterson PM, Valdes-Reyna J (2014) A taxonomic revision of *Bromus* (Poaceae: Pooideae: Bromeae) in Mexico and Central America. *Phytotaxa* 185:1-147.
- Sales F (1993) Taxonomy and nomenclature of *Bromus* sect. *Genea*. *Edinburgh Journal of Botany* 50:1-31.
- Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:6813-6817.
- Scholz H (1970) Zur Systematik der Gattung *Bromus* L. Subgenus *Bromus* (Gramineae) (On the Systematics of the Genus *Bromus* L. Subgenus *Bromus* (Gramineae)). *Willdenowia*: 139-159.
- Scholz H (1981) *Bromus-pectinatus*-Komplex (Gramineae) im Nahen und Mittleren Osten. *Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 102: 471-495.
- Scholz H (2008) Some comments on the genus *Bromus* (Poaceae) and three new species. *Willdenowia* 38:411-422.

Smith P (1970) Taxonomy and nomenclature of the brome-grasses (*Bromus* L. s.l.). Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 30:361-375.

Smith P (1972) Serology and species relationships in annual bromes (*Bromus* L. sect. *Bromus*). Annals of Botany 36:1-30.

Soreng RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Teisher JK, Clark LG, Barbera P, Gillespie LJ, Zuloaga FO (2017) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. Journal of Systematics and Evolution 55:259-290.

Starr JR, Harris SA, Simpson DA (2003) Potential of the 5' and 3' ends of the intergenic spacer (IGS) of rDNA in the Cyperaceae: new sequences for lower-level phylogenies in sedges with an example from *Uncinia* Pers. International Journal of Plant Sciences 164:213-227.

Stebbins GL (1956) Cytogenetics and evolution of the grass family. American Journal of Botany 43:890-905.

Stebbins GL (1981) Chromosomes and evolution in the genus *Bromus* (Gramineae). Botanische Jahrbucher fur Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie 102:358-379.

Swofford DL (2002) PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Ed.) PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, California, USA, 315-322.