

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

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Chegini_2004@yahoo.com

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

بررسی روابط تبارزایی طایفه لیسیه 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

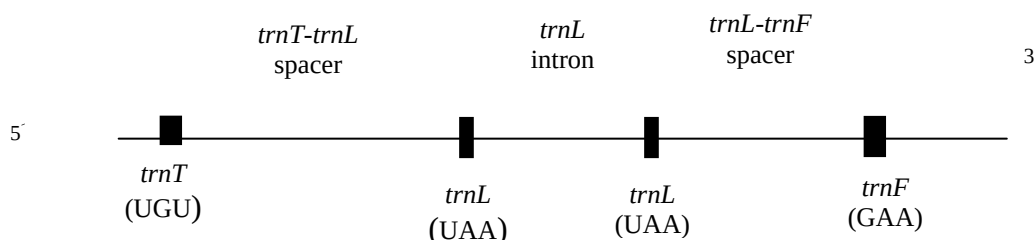
واژه‌های کلیدی

لیسوم ،
دنیای قدیم ،
ITS
trnL-trnF

مقدمه

لیسیوم^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^۱ توجه زیادی شده است. الم استد و همکاران (۱۹۹۹) بر اساس داده‌های حاصل از cpDNA^۳ از یک گونه گرابوسکیا^۴ و ۵ گونه لیسوم نشان دادند که گونه‌های دنیای جدید و دنیای قدیم تک نیا نیستند. فوکودو و همکاران (۲۰۰۱) روابط تکاملی بین ۲۳ گونه لیسوم 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

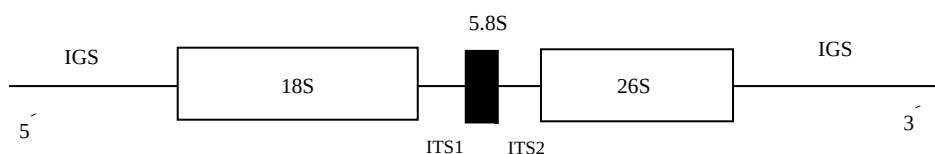
لیسیوم در دنیای قدیم بوده و پیشنهاد کردند که برای حل این مشکل تعداد تاکسون‌های بیشتری باید مورد مطالعه قرار گیرند. لوین و میلر (۲۰۰۵) با بررسی ۴۸ گونه از لیسوم، نشان دادند که لیسوم‌ها در دنیای قدیم بطور مشخص تک نیا هستند. توالی ناحیه *trnL-trnF* معمولاً از دو توالی کلروپلاستی غیرکد شونده تشکیل شده است: 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^۵ گونه‌ها در یک دودمان کاربرد گسترده‌ای دارد (۱۰).



شکل ۱- نمایش شماتیک ساختار ژن‌های *trn*

پشت‌سر 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*^۱ از ژن‌های ریپوزومی 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 S و ۱۸ و ۲۶S هستند تکثیر می‌شود. همچنین تکامل سریعی را



شکل ۲- نمایش شماتیک ساختار rDNA در ژنوم گیاهان

^۱ *Lycium*

^۲ Phylogeny

^۳ *Lycieae*

^۴ Chloroplast DNA

^۵ *Grabowskia*

^۶ Divergence

در این پژوهش جهت بررسی دقیق تبارزایی گونه‌های لیسوم در دنیای قدیم از دو ژن مختلف هسته‌ای و کلروپلاستی و تعداد تاکسون‌های زیاد استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش نمونه‌های جمع‌آوری شده از رویشگاه‌های طبیعی در ایران و نمونه‌های هرباریومی مورد بررسی قرار گرفت. گونه آتروپا بلادونا^۱ و برخی از گونه‌های جنس نولانا^۲ نیز به عنوان برون گروه^۳ در نظر گرفته شد (۳، ۶). توالی ژن‌ها در دو ناحیه مورد مطالعه برای گونه‌های غیر از گونه‌های ایران از بانک ژن استخراج گردید. در مجموع ۳۷ تاکسون برای ناحیه ITS و ۵۱ تاکسون برای ناحیه *trnL-trnF* مطالعه شدند.

DNA ژنومی با استفاده از روش تغییر یافته CTAB^۴ (۲) استخراج گردید. سپس نواحی ژنومی ITS و *trnL-trnF* به ترتیب از ژنوم هسته‌ای^۵ و ژنوم کلروپلاستی^۶ پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش، با استفاده از آغازگرهای ۳'-AGGAGAAGTCGTAACAAG-۵' (برگشت) و ۳'-GTTTCTTTTCCTCCGCT-۵' (رفت) برای ناحیه ITS (۱۱)، طبق برنامه [۴۲۰s، ۷۲c، ۶۰s]؛ ۷۲c، ۴۰s، ۵۲c؛ ۵۰s، ۹۶c؛ ۱۵۰s، ۹۶c] و آغازگرهای ۳'-ATTGAAGTGGTGACACGAG-۵' (رفت) و ۳'-CGAAATCGTAGACGCTTACC-۵' (برگشت) برای ناحیه *trnL-trnF* (۹)، بر اساس برنامه [۴۸۰s، ۷۲c؛ ۹۰s]؛ ۷۲c، ۳۰s، ۳۰s

نتایج

از توالی هم‌ردیف شده ناحیه ITS (شکل ۳) ماتریسی به طول ۶۴۵ نوکلئوتید بدست آمد. طول خالص ماتریس برای این ناحیه ۶۳۰ نوکلئوتید بود که ITS1 ۲۵۰ و ITS2 ۲۲۴ نوکلئوتید را شامل می‌شدند. از مجموع ۶۳۰ نوکلئوتید ۹۳ نوکلئوتید (۱۴/۸٪) دارای ارزش تبارزایی بودند که در ناحیه ITS1 و ITS2 قرار داشتند. ناحیه ۵/۸S با ۱۵۵ نوکلئوتید به علت حفظ‌شدگی کامل فاقد ارزش تبارزایی می‌باشد. در نتیجه جستجوی کاوش ابتکاری با استفاده از داده‌های ITS1 و ITS2، ۶ درخت با حداکثر پارسیمونی بدست آمد که طول بهترین درخت ۲۶۱ گام با CI=۰/۴۸۷ و RI=۰/۶۷۱ می‌باشد (شکل ۴).

<i>Nolana mollis</i>	-----TCGAAACCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAAC 32
<i>Atropa belladonna</i>	-----TCGAAACCTGCATGGCAGAACGACCCGCGAAC 32
<i>Grabowskia boerhaaviifolia</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG 97
<i>Grabowskia duplicata</i>	GCGTTTCAACACTGGGAGAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCG 98
<i>Lycium californicum</i>	GCGTTTCAACACTGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGCTTCGGCCCCCTCG 96
<i>Lycium depressum</i>	ACGTTTAAACGCCGGG-GAGCCGCGCGGGTCGGGGTGCTTCGGCCCCCTCG 81
<i>Lycium ruthenicum</i>	ACGTTTCAACGCCGGG-GAGCCGCGCGGG-CGGGGTGTTTCGGCCCCCTCG 80

^۱ *Atropa belladonna*

^۲ *Nolana* spp.

^۳ Out group

^۴ Cetyl Trimethyl Amonium Bromid

^۵ nrDNA

^۶ cpDNA

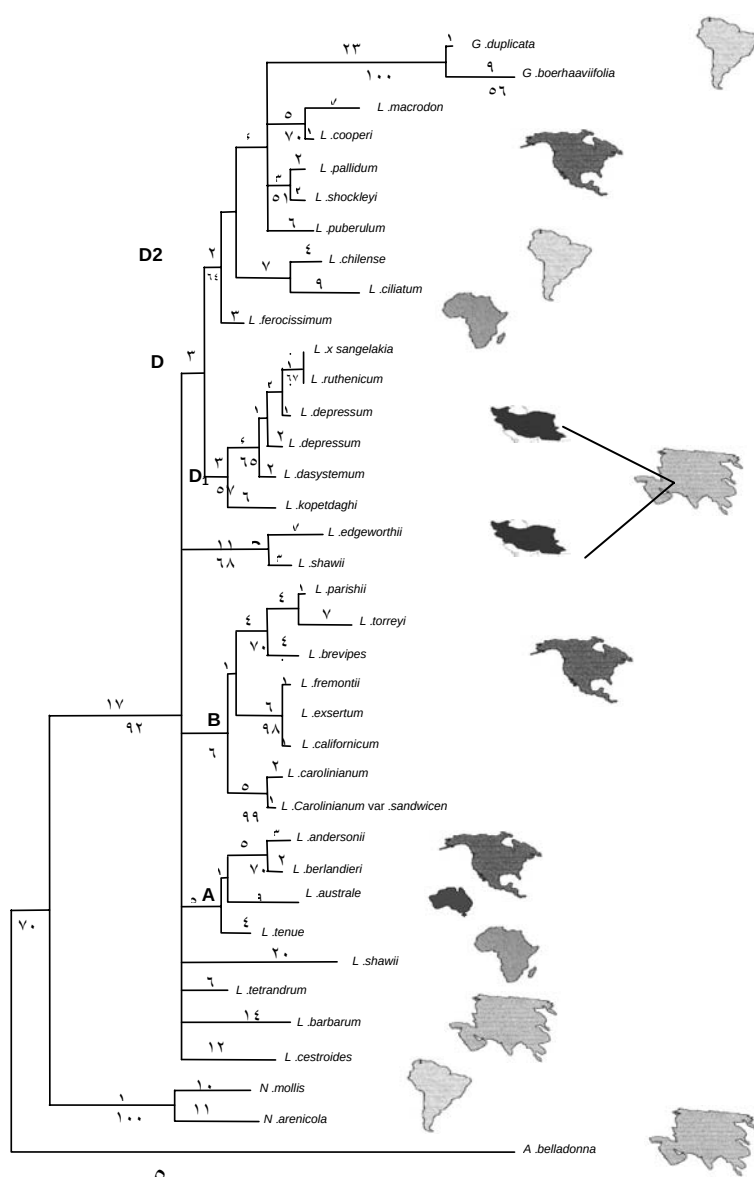
^۷ Phylogenetic

^۸ Consistency Index

^۹ Retention Index

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

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



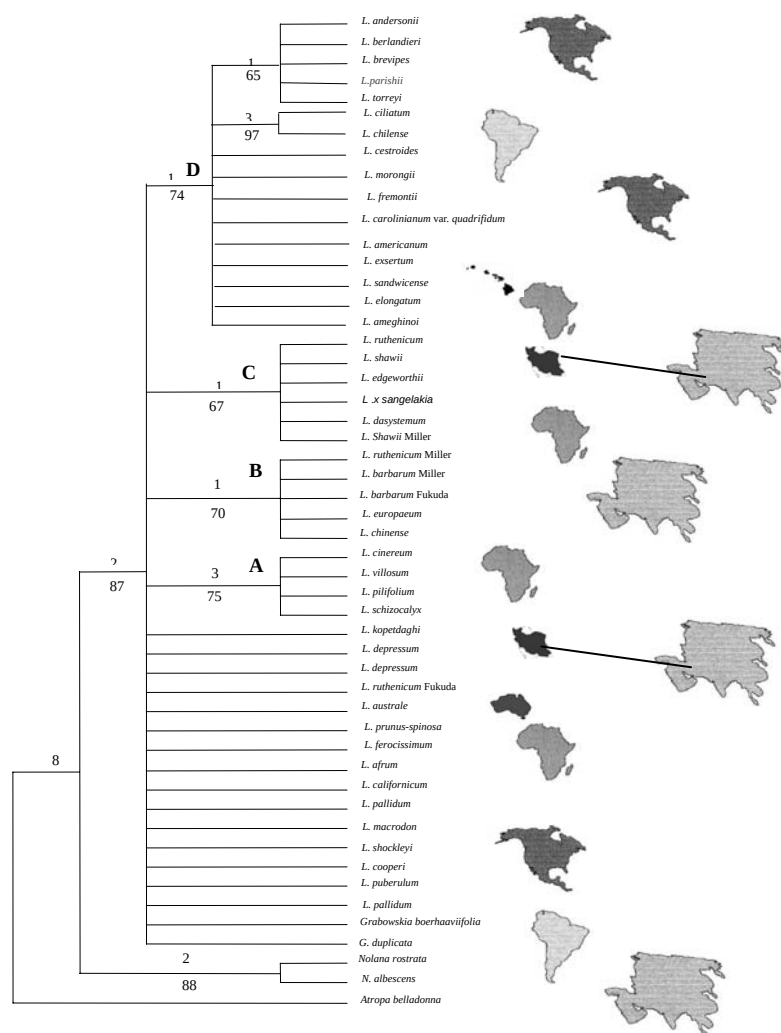
شکل ۴- درخت توافقی حاصل از ۶ درخت با حداکثر پارسیمونی (با طول ۲۶۱ گام، $CI=0.487$ و $RI=0.671$) برای توالی *ITS1* و *ITS2* در جنس *Lycium* و *Grobowskia*. *Nolana* spp. و *Atropa belladonna* به عنوان برون گروه استفاده شدند. عدد بالای هر شاخه طول شاخه و عدد پایین آن مقدار بوتسترپ با ۱۰۰ تکرار را نشان می دهد. مقادیر $<50\%$ نشان داده نشده است. مناطق جغرافیایی نیز در سمت راست نشان داده شده است.

در درخت توافقی بدست آمده، تاکسون‌های درون گروه، توده پلی‌تومی چند شاخه‌ای را تشکیل می‌دهند. گونه‌های دنیای قدیم (آسیا، اروپا، استرالیا و آفریقا) 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

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.

<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، $RI=10$ $CI=1$) برای توالی *trnL-trnF* در جنس *Lycium* و *Grobowskia* و *Nolana* spp. *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.

بحث

قدیم را تک نیا معرفی کرد. فوکودو و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی ژن‌های کلروپلاستی *matK* و فاصله اندازه‌های بین ژنی *trnL-trnF* و اینترون *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، چندینا بودن لیسوم‌های دنیای قدیم را نشان داد. لوین و میلر (۲۰۰۵) با بررسی ژن‌های کلروپلاستی *trnT-trnF* و ژن هسته‌ای *GBSSI*، با استناد به اینکه از تمام گونه‌های

نتایج بررسی‌های ما نشان می‌دهد که لیسوم‌های دنیای قدیم یک گروه تک نیا را تشکیل نمی‌دهند، بلکه بصورت 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 استدر سال ۲۰۰۰ بدست 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، لیسوم‌های دنیای

دنیای قدیم در مطالعه خود استفاده کرده‌اند، مجدداً لیسوم‌های 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 لیسوم و ژن *ITS* چند نیا بودن آن را در دنیای قدیم نشان می‌دهند.

با وجود پراکنش گسترده جنس لیسوم 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 ۱/۶ صفات با ارزش بوده و روابط بین تاکسون‌ها را به خوبی نشان می‌دهد (جدول ۱).

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

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 *trn* L-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 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 تبارزایی، به علت بکارگیری تعداد زیاد تاکسون از دنیای قدیم (تقریباً نیمی از تاکسون‌های دنیای قدیم)، همانند نتایج حاصل از ژن هسته‌ای *ITS*، چندینا بودن لیسوم‌ها در دنیای قدیم نشان داده شده است. هرچند روابط بین تاکسون‌ها در بخش‌های مختلف دنیای قدیم (یوراسیا، آفریقا و استرالیا) و جدید بطور دقیق مشخص نشده است.

تشکر و قدردانی

از زحمات کلیه عزیزان در پژوهشکده علوم محیطی (مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی) بویژه دکتر باقی‌زاده، مهندس عبدلی‌نسب، مهندس فرهمند، مهندس ترکزاده و مسئولین محترم آزمایشگاه علوم گیاهی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی می‌نمایم.

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*