

ارزیابی روابط خویشاوندی کمپلکس *Festuca-Lolium* در ایران با استفاده از ردیف خوانی ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* ژنوم کلروپلاستی

سهیلا رئیسی چهارزی^۱، مجید شریفی تهرانی^۱ و حجت‌اله سعیدی^{۱*}
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
^۲ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

کمپلکس *Festuca-Lolium* به گروهی از آرایه‌های دارای خویشاوندی نزدیک در دودمان *Festuca* و خویشاوندان آن گفته می‌شود که در برگیرنده گونه‌هایی از دو جنس *Lolium* و *Festuca* است. اعضای این کمپلکس را گونه‌های دگرگشن جنس *Lolium* و گونه‌های زیرجنس *Schedonorus* از جنس *Festuca* تشکیل می‌دهند. در پژوهش حاضر، با استفاده از ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه *trnH-psbA* ژنوم کلروپلاستی، روابط ۶ گونه متعلق به این کمپلکس در ایران بررسی شد. مطابق نتایج حاصل از این تحلیل، جنس *Lolium s.s.*، آرایه‌ای تک‌نیا است. همچنین، خوشه حامل *Lolium* و گونه‌های متعلق به *F. gigantea* + *Schedonorus* *Festuca* subgen. یعنی *Lolium sensu Darbyshire* را نیز می‌توان، تک‌نیا در نظر گرفت. این نتایج، انتقال *Festuca* subgen. *Schedonorus* به جنس *Lolium* و معرفی ترکیبات جدیدی مانند *Lolium arundinaceum* یا *L. pratense* توسط *L. pratense* در *Darbyshire* را مورد حمایت قرار می‌دهد. همچنین، ترادف‌های نوکلئوتیدی *trnH-psbA* از انتقال اخیر آرایه *Festuca gigantea* از *Festuca* subgen. *Drymenthele* به *Festuca* subgen. *Schedonorus* sect. *Plantynia* حمایت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ایران، تبارشناسی، ژنوم کلروپلاستی، کمپلکس *Festuca-Lolium*، *trnH-psbA*

مقدمه

هستند (Palmer, Clayton and Renvoize, 1986)؛
1987؛ Judd et al., 1999). جنس *Festuca* و
آرایه‌های خویشاوند نزدیک آن، یکی از دودمان‌های
اصلی زیرتیره Pooideae به نام Festucoids را تشکیل
می‌دهند. مطالعه تکاملی این آرایه‌ها، به دلیل اهمیت
اکولوژیک و اقتصادی آنها همواره مورد توجه بوده

کمپلکس *Festuca-Lolium* را می‌توان گروهی از
آرایه‌های متعلق به دو جنس *Lolium* L. و *Festuca* L.
با خویشاوندی نزدیک و گونه‌هایی از جنس *Vulpia*
C.C.Gmelin دانست که متعلق به تیره Poaceae،
زیرتیره Pooideae، قبیله Poeae و زیرقبیله Loliinae

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

کروموزومی و تلاقی‌های مصنوعی را تأیید می‌کرد (Barker and Stace, 1984, 1986). در بررسی‌های ریخت‌شناختی انجام شده روی گونه‌های زیرجنس *F. pratensis*، *Schedonorus* (P.Beauv.) Peterm. *F. arundinacea* با گونه‌های دگرگشن *Lolium* یک گروه اصلی را تشکیل دادند (Catalan, 2006)؛ گروه باریک برگ نه تنها شامل دودمان‌های چند نیای *Vulpia* است بلکه احتمالاً شش جنس یک‌ساله مدیترانه‌ای شامل: *Cutandia* Willk.، *Ctenopsis* De Not.، *Narduroides* Rouy، *Micropyrum* Link. و *Psilurus* Trin. و *Wangenheimia* Moench را نیز در بر می‌گیرد (Catalan et al., 2004).

وضعیت تاکسونومی و پراکنش آرایه‌های کمپلکس *Festuca-Lolium* در ایران، به طور عمده به پژوهش‌های Bor (۱۹۷۰) و Alexeev (۱۹۷۹) باز می‌گردد. با استناد به منبع فلورا ایرانیکا (Bor, 1970) جنس *Festuca* در گستره جغرافیایی فلور ایران دارای ۱۲ گونه است که از این تعداد، ۹ گونه (غیر بوم‌زاد) در ایران رویش دارند. مطالعه تاکسونومی جنس *Festuca* در ایران و کشورهای مجاور توسط Alexeev (۱۹۷۹) نشان داد که ۲۹ گونه از جنس *Festuca* (شامل ۶ گونه بوم‌زاد) در ایران وجود دارد (Bor, 1970؛ Alexeev, 1979)، در حالی که Hosseini (۲۰۱۳) و Hosseini و همکاران (۲۰۱۳b) تعداد گونه‌های این جنس را ۱۹ گونه شامل ۱۲ گونه باریک برگ و ۷ گونه پهن برگ گزارش کرده‌اند. Hosseini و همکاران (۲۰۱۳a) در بررسی صفات تشریحی برگ گونه‌های *F. bornmuelleri* (Hack.) V.I.Krecz. & Bobr. و *F. ovina* subsp. *kotschy* Hack. ex Boiss

است (Catalan et al., 2004). جنس *Festuca* در بر گیرنده بیش از ۵۰۰ گونه با انتشار وسیع در همه قاره‌ها به غیر از قطب جنوب است (Watson and Dallwitz, 1994) و حدود ۱۰ تا ۱۲ گونه برای این جنس در ایران گزارش شده است (Bor, 1970؛ Parsa, 1950). نتایج مطالعات تبارشناختی، تک‌نیا بودن *Festuca* و خویشاوندان آن را تأیید می‌کند. با وجود این، جنس *Festuca* یک ترکیب همسویی بزرگ و بخشی از دودمان‌هایی جدا اما مرتبط به هم است که جنس‌های *Lolium*، *Vulpia* و چند جنس دیگر در آن قرار می‌گیرند (Catalan et al., 2004). شواهد زیادی، همسویی بودن دو جنس *Festuca* و *Vulpia* را تأیید می‌کند. اگر چه جنس *Lolium* آرایه‌ای تک‌نیا است، با وجود این، خط تکاملی آن وسیع‌تر از آن است که تنها در بر گیرنده جنس *Lolium* باشد. مطالعات تبارشناختی *Festuca* در مفهوم وسیع‌تر آن بر اساس تحلیل داده‌های RFLP کلروپلاستی (Darbyshire and Warwick, 1992) و ترادف‌های ITS ریبوزومی (Gaut et al., 2000؛ Charmet et al., 1997)؛ Catalan et al., 2002؛ Torrecilla and Catalan, 2006, 2007) برخی گونه‌های *Lolium* و *Vulpia* را درون جنس *Festuca* قرار می‌دهند. در بررسی‌های Catalan و Torrecilla (۲۰۰۲) دو دودمان مجزا درون *Festuca* قابل تشخیص است که فستوکای پهن برگ (*F. arundinacea* Schreb.)، *F. gigantea* (L.) Vill. و *F. pratensis* Huds. و فستوکای باریک برگ (*F. ovina* L. و *F. rubra* L.) نامیده می‌شوند. این مطالعات همچنین نزدیکی *Lolium* به گروه اول و نزدیکی *Vulpia* به گروه دوم را نشان داد که یافته‌های پیشین بر اساس تحلیل‌های

رسیده است (Catalan, 2004؛ Catalan *et al.*, 2004).
 2006. گونه‌های مهم مرتعی و علوفه‌ای همچون:
F. arundinacea و *F. pratensis* در این زیرجنس
 قرار دارند و تاکنون دو رگه‌های طبیعی و مصنوعی
 متعددی از آنها و گونه‌های دگرگشن جنس *Lolium*
 گزارش شده است. ترکیب ویژگی‌های مطلوب موجود
 در گونه‌های مزبور در جنس *Festuca* (از جمله:
 مقاومت به کم آبی، سرما و آفات) و گونه‌های مختلف
 جنس *Lolium* که در بالا اشاره شد، یکی از اهداف
 پژوهشگران اصلاح گیاهان علوفه‌ای بوده است. بدین
 منظور، مطالعه تنوع ژنتیکی نهفته در ذخایر ژنتیکی این
 گیاهان و روابط خویشاوندی بین آنها به منظور انتخاب
 ژنوتیپ‌های مناسب همواره مورد توجه محققان قرار
 داشته است (Humphries, 1980؛ Thomas *et al.*,
 2003؛ Majidi *et al.*, 2006).

توالی‌های DNA کلروپلاستی و توالی‌های ITS
 ریبوزومی هسته‌ای از جمله منابع مهم ایجاد داده برای
 استنباط تبارشناسی گیاهان است که در سال‌های اخیر به
 وفور برای مطالعه روابط خویشاوندی بین گونه‌ها
 استفاده شده است (Baldwin, 1992؛ Baldwin *et al.*,
 1995؛ Alvarez and Wendel, 2003). با توجه به
 اهمیت اقتصادی برخی از گونه‌های کمپلکس
Festuca-Lolium و وجود پیچیدگی‌های
 تاکسونومیک موجود در این مجموعه، هدف از
 پژوهش حاضر ارزیابی روابط بین گونه‌های درون
 کمپلکس مذکور در ایران با استفاده از مترادف
 نوکلئوتیدی نواحی بین ژنی *trnH-psbA* بوده است.

مواد و روش‌ها

۲۱ نمونه جمعیتی متعلق به فستوکای پهن برگ

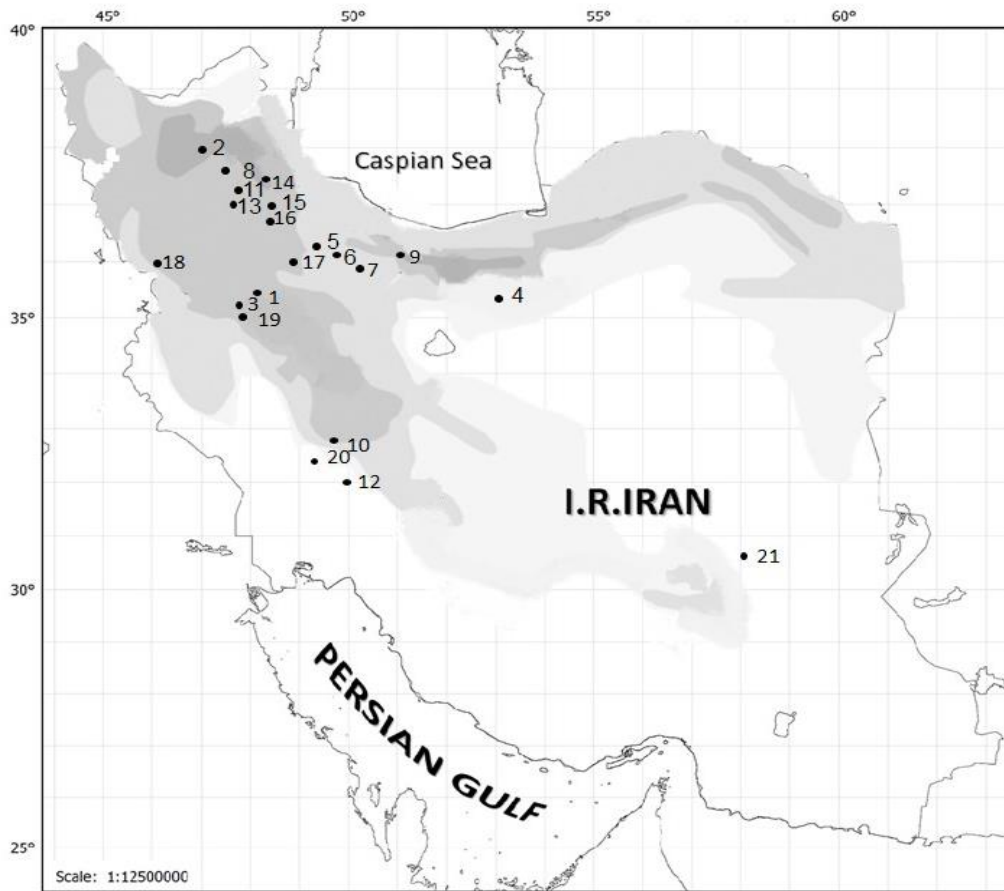
مترادف نمودند و چنین نتیجه گرفتند که گونه‌های
F. ovina (Hack.) *F. pinifolia* Bornm. و
F. heterophylla Lam. در ایران وجود ندارند. جنس
Lolium بر اساس فلورا ایرانیکا (Bor, 1970) دارای ۶
 گونه و بر اساس برخی منابع دیگر، دارای ۵ گونه در
 ایران است (Mirjalili *et al.*, 2003؛ Bor, 1970؛
 Oshib nataj *et al.*, 2011). جنس *Vulpia* نیز با ۴
 گونه غیر بوم‌زاد در برخی رویشگاه‌های نسبتاً خشک
 ایران حضور دارد (Bor, 1970). جنس *Lolium* در دنیا
 ۸ گونه دارد که بومی مناطق اروپایی، مدیترانه‌ای و
 غرب آسیا هستند (Terrell, 1968). گونه‌های این
 جنس بر اساس سیستم تولید مثلی در دو گروه
 دسته‌بندی می‌شوند (Jenkin and Thomas, 1939).
 گروه اول شامل گونه‌های خودگشن همچون:
L. remotum Shrank و *L. temulentum* L. است که
 در اروپا و نواحی مدیترانه‌ای گسترش زیادی دارند و
L. persicum Boiss. & Hohen. که محدود به نواحی
 غرب آسیا شده است (Jenkin and Thomas, 1939).
 ارتباط خویشاوندی نزدیک گونه *L. temulentum* بر
 اساس شواهد ریخت‌شناختی با گونه *L. persicum*
 اثبات شده است به طوری که بر اساس نظر Terrell
 (۱۹۶۶) منشأ این دو گونه از یک نیای مشترک است.
 گروه دوم شامل گونه‌های مهم دگرگشن با ارزش
 علوفه‌ای بالا همچون: *L. multiflorum* Lam.،
L. perenne L. و *L. rigidum* Gaud است که به
 راحتی در طبیعت با یکدیگر تلاقی نموده، دو رگه‌هایی
 با درجات مختلف زایایی به وجود می‌آورند (Jenkin,
 1954؛ 1960؛ Naylor). پیش از این، روابط
 خویشاوندی نزدیک گروه دگرگشن جنس *Lolium* با
 زیرجنس *Schedonorus* در جنس *Festuca* به اثبات

Festuca-Lolium (Bor, 1968, 1970). موقعیت مجموعه *Festuca-Lolium* ابتدا بر اساس داده‌های موجود در بانک ژن و داده‌های این مطالعه نسبت به سایر گروه‌های خویشاوند موجود در تیره غلات سنجیده شد که در این مورد گونه *Brachyelytrum erectum* (Schreb.) P.Beauv. عنوان برون گروه استفاده شد. برای بررسی قرابت گونه‌ها درون کمپلکس *Festuca-Lolium* گونه *V. myuros* به عنوان برون گروه انتخاب شد. پراکنش گونه‌های کمپلکس *Festuca-Lolium* در ایران بر اساس نمونه‌های مطالعه شده در پژوهش حاضر (جدول ۱) در شکل ۱ ارایه شده است.

(*F. pratensis* و *F. gigantea*، *F. arundinacea*) فستوکای باریک برگ برگ (*F. ovina* L.) و (*F. sclerophylla* Boiss. ex Bisch.، *F. rubra* L.) گونه‌های دگرگشن *V. myuros* (L.) C.C. Gmel. (*L. rigidum* و *L. perenne*، *L. multiflorum* *Lolium* گونه خودگشن در جنس *Lolium* (*L. persicum*) و (*L. loliaceum* (Bory & Chaub.) و Hand.-Mazz. جمع آوری شده از نواحی مختلف رویش این گونه‌ها در ایران، بررسی شدند (جدول ۱، شکل ۱). تمامی نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود برای گیاهان ایران و عراق شناسایی شدند

جدول ۱- فهرست نمونه‌های گیاهی مطالعه شده و مشخصات محل نمونه‌برداری (نمونه‌ها توسط مجید شریفی تهرانی جمع آوری شده است).

ردیف	نام نمونه	محل نمونه‌برداری و ارتفاع به متر	سطح پلوئیدی / تعداد کروموزوم	یک‌ساله/چندساله
۱	<i>Festuca arundinacea</i>	همدان، کیلومتر ۳ جاده همدان به تویسرکان، ۲۴۴۸	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۲	<i>F. pratensis</i>	اردبیل، دامنه سبلان، از صومعه زرین، ۲۱۸۷	دیپلوئید/ 2n= 28	چندساله
۳	<i>F. pratensis</i>	همدان، گنج نامه، ۲۱۹۶	دیپلوئید/ 2n= 28	چندساله
۴	<i>F. pratensis</i>	سمنان، نگارمن، ۲۰۵۰	دیپلوئید/ 2n= 28	چندساله
۵	<i>F. sclerophylla</i>	البرز، ۸ کیلومتر از گچسار بسمت کرج، ۲۱۰۰	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۶	<i>Lolium perenne</i>	البرز، بعد از سد چالوس، روستای مورود، ۱۸۵۰	دیپلوئید/ 2n= 14	چندساله
۷	<i>L. rigidum</i>	تهران، فیروزکوه، کیلومتر ۲ جاده سمنان، ۱۹۶۰	دیپلوئید/ 2n= 14	یک‌ساله
۸	<i>L. persicum</i>	اردبیل، ۱۰ کیلومتری خلخال از اردبیل، ۱۶۱۸	دیپلوئید/ 2n= 14	یک‌ساله
۹	<i>L. persicum</i>	مازندران، جنگل خیرود کنار، ۵۰۰	دیپلوئید/ 2n= 14	یک‌ساله
۱۰	<i>L. persicum</i>	کهگیلویه و بویراحمد، پایین سی سخت، ۱۷۹۰	دیپلوئید/ 2n= 14	یک‌ساله
۱۱	<i>Vulpia myuros</i>	اردبیل، کیلومتر ۳۵ جاده خلخال به اسالم، ۱۶۸۶	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۲	<i>V. myuros</i>	فارس، دشت ارژن، ۱۸۸۰	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۳	<i>F. gigantea</i>	اسالم به خلخال، ۱۰۰۰	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۴	<i>F. rubra</i>	گیلان، ۲۲ کیلومتر به خلخال از اسالم، ۱۷۵۰	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۵	<i>F. rubra</i>	اردبیل، کیلومتر ۳۵ جاده خلخال به اسالم، ۱۶۸۶	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۶	<i>F. rubra</i>	گیلان، ۲۲ کیلومتر به خلخال از اسالم، ۱۷۵۰	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۷	<i>F. ovina</i>	البرز، ارتفاعات بین رینه و پلور، ۲۳۴۳	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۸	<i>F. ovina</i>	کردستان، ۱۱۰ کیلومتری میروان از سنندج، ۱۸۸۵	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۱۹	<i>F. ovina</i>	همدان، ارتفاعات گنج نامه- الوند، ۲۲۹۴	دیپلوئید/ 2n= 42	چندساله
۲۰	<i>L. loliaceum</i>	کهگیلویه و بویراحمد، پایین سی سخت، ۱۷۹۰	دیپلوئید/ 2n= 14	چندساله
۲۱	<i>L. loliaceum</i>	کرمان، نزدیک گلومک، ۴۰ کیلومتری کرمان، ۱۸۷۰	دیپلوئید/ 2n= 14	چندساله



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی جمعیت‌های مطالعه شده از گونه‌های متعلق به کمپلکس *Festuca-Lolium* در ایران. شماره‌ها بر اساس ردیف نمونه‌های بررسی شده در جدول ۱ است.

مطالعه است (Kress et al., 2005).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از برنامه بهینه شده با آغازگر در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۸۰ ثانیه و در پایان به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام شد.

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر

نام قطعه	توالی نوکلئوتیدی آغازگر 5' ← 3'
<i>psbA</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C
<i>trnH</i>	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC

DNA کل ژنوم، از برگ‌های خشک شده هرباریومی

بر اساس روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987)، با اندکی تغییرات، استخراج شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام گرفت. به منظور انجام واکنش PCR برای ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* کلروپلاستی از آغازگر *trnH* (Tate and Simpson, 2003) و *psbA* (Sang et al., 1997)، استفاده شد که توالی آنها در جدول ۲ آمده است. کاربرد اخیر ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* به عنوان بارکد توانایی آن برای نشان دادن و تفکیک دقیق‌تر آرایه‌ها و به علت چند شکلی کمتر، عامل اصلی در انتخاب این ناحیه بین ژنی کلروپلاستی در این

شکل ۲ دیده می‌شود.

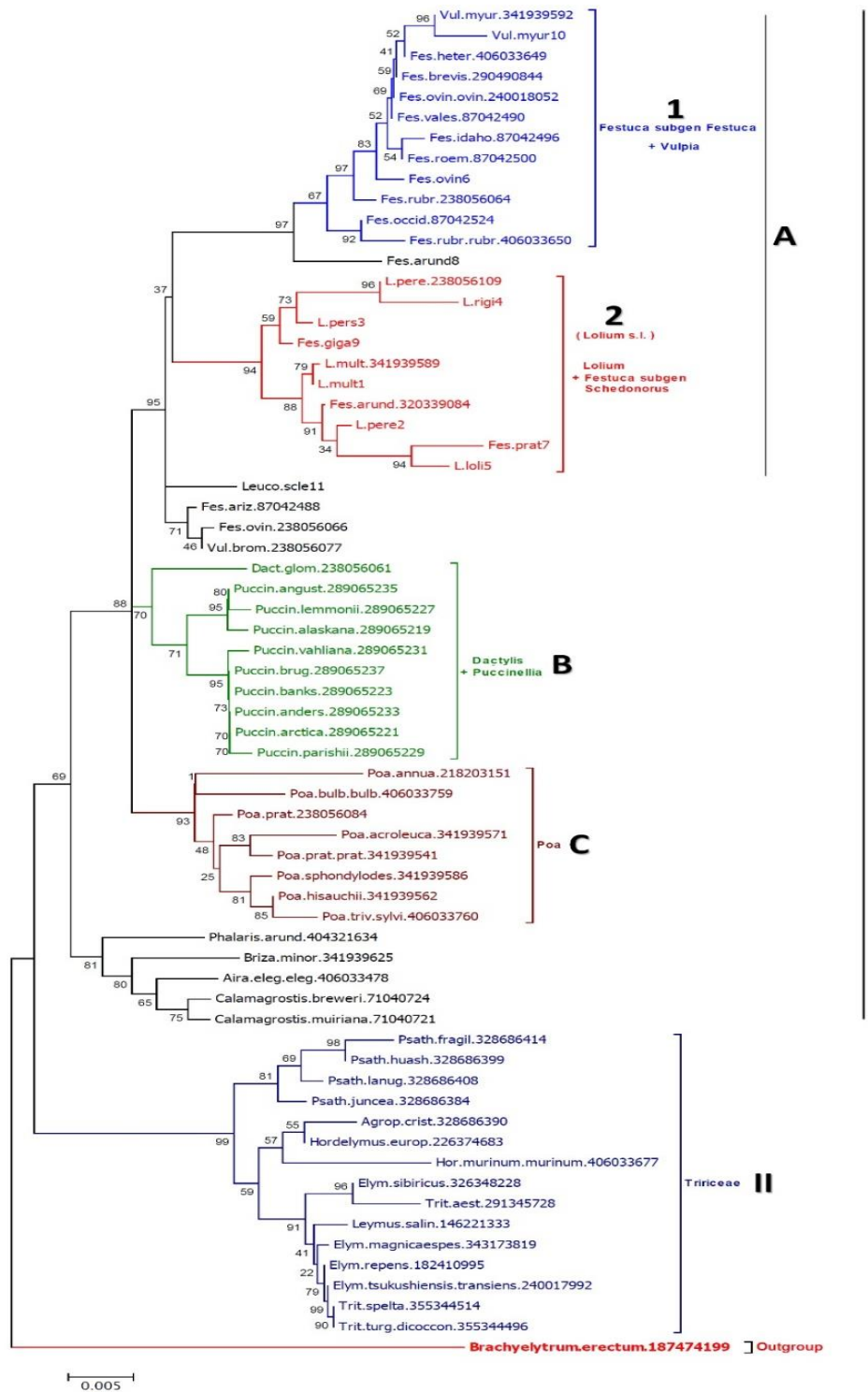
در این تبارنما، دو خوشه اصلی (I و II) دیده می‌شود و در قاعده، برون گروه مورد استفاده (*Brachyelytrum erectum*) دیده می‌شود. خوشه I به دو زیرخوشه تقسیم شده و یکی از این زیرخوشه‌ها خود به سه زیرخوشه دیگر تقسیم شده است که به صورت A، B و C نام‌گذاری شده‌اند. زیرخوشه A به دو زیرخوشه اصلی (۱ و ۲) تقسیم شده است که به ترتیب زیرخوشه ۱ شامل *Festuca* برگ ریز (شامل نمونه‌های *Festuca* subgen. *Festuca* و *V. myuros*) و زیرخوشه ۲ شامل جنس *Lolium* در مفهوم وسیع (یعنی *Lolium* s.s. + *Lolium* s.s.) است. جنس بومی *Festuca* subgen. *Schedonorus* (مترادف: *Leucopoa* Griseb.) با یک نماینده *F. sclerophylla* در قاعده به زیرخوشه A متصل می‌شود و نمونه‌های آمریکایی برگ ریز نیز در انتها به این مجموعه متصل شده‌اند. جنس‌های *Dactylis* و *Puccinellia* خویشاوندان نزدیک مدیترانه‌ای *Festuca* و خویشاوندان آن به شمار می‌روند و زیرخوشه B از خوشه اصلی I را تشکیل می‌دهند. این زیرخوشه همراه با خط تکاملی دوم در قبیله *Festuceae* (یعنی جنس *Poa* و خویشاوندان نزدیک آن) گروه‌های خواهری *Festuca* و خویشاوندان آن (شامل کمپلکس *Festuca-Lolium*) را تشکیل داده‌اند. خوشه I در قاعده، شامل تعدادی از نمونه‌های مربوط به *Briza* L. و *Calamagrostis* L. و سایر نمونه‌هایی است که با سایر خوشه‌ها گروه‌بندی نشده است، بلکه در قاعده خوشه اصلی I قرار می‌گیرند و از خوشه اصلی II که قبیله *Triticeae* را در بر می‌گیرد، جدا هستند.

پس از اطمینان از صحت PCR و تکثیر قطعه مورد نظر، تک باندهای قوی و فاقد باند اضافی و کشیدگی (اسمیر) برای تعیین توالی (شرکت فزا پژوه، تهران) ارسال و تعیین توالی گردید. آغازگر مورد استفاده برای توالی‌یابی، *trnH* بود. کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نواحی کلروپلاستی ابتدا به صورت چشمی تنظیم شد، سپس با نرم‌افزار MEGA5 (Tamura et al., 2011) و هم‌ردیف‌سازی و بر اساس روش نزدیکترین همسایه (NJ) بررسی و تحلیل شد (شکل ۲). میزان اعتبار خوشه‌بندی‌ها در تبارنما به روش بوت‌استرپ (۱۰۰۰ بار تکرار) سنجیده شد.

علاوه بر تعیین ترادف ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* کلروپلاستی در ۲۱ نمونه شامل گونه‌های متعلق به کمپلکس *Festuca-Lolium* در ایران، به منظور تعیین موقعیت نمونه‌های ایرانی نسبت به سایر گونه‌های درون این گروه و همچنین نشان دادن ارتباط این گروه با سایر گروه‌های خویشاوند در تیره *Poaceae*، ۵۵ ترادف مربوط به گونه‌های این مجموعه از دیگر نقاط جهان، موجود در بانک ژن NCBI، متعلق به جنس‌های: *Agropyron*، *Hordeum* L.، *Elymus* L.، *Dactylis* L.، Gaertn.، *Psathyrostachys* Fisch.، *Poa* L.، *Phalaris* L.، *Puccinellia* Parl. و *Triticum* L. نیز استفاده شد (شکل ۲).

مشاهدات و بحث

روابط خویشاوندی میان گونه‌های مطالعه شده در کمپلکس *Festuca-Lolium* و گروه‌های خواهری آن (خط تکاملی دوم در قبیله *Festuceae*؛ جنس *Poa*) و قبیله‌های نزدیک و وابسته به آن (*Triticeae*) که زمانی جنس *Lolium* در آن قرار داده شده بود، در تبارنمای



شکل ۲- تبارنمای NJ حاصل از تحلیل تبارشناختی ترادف های کلروپلاستی *trnH-psbA* متعلق به آرایه های کمپلکس *Festuca-Lolium* و سایر جنس های نزدیک در تیره Poaceae. برای تعیین موقعیت گونه های بررسی شده نسبت به گونه های غیر ایرانی و سایر جنس ها توالی های مربوط به سایر جنس های تیره Poaceae موجود در بانک ژن (NCBI) دریافت و در تحلیل وارد شده است. نمونه های ایرانی با اعداد ۱ تا ۱۱ و سایر نمونه ها با شماره دسترسی ۸-۹ رقمی در بانک ژن مشخص شده است.

Darbyshire (۱۹۹۳) مطابقاً دارد. دو نمونه از *F. ovina* که مترادف آنها از NCBI دریافت شده بود موقعیت متفاوتی را نشان دادند. یک نمونه (۲۴۰۰۱۸۰۵۲) در بین سایر گونه‌های زیرخوشه ۱ در خوشه A قرار گرفت در حالی که نمونه دیگر (۲۳۸۰۵۶۰۶۶) با قرار گرفتن در قاعده زیرخوشه ۲ موقعیت ابتدایی نشان داد. با توجه به این که این نمونه‌ها از نظر ریخت‌شناختی بررسی نشدند، در مورد صحت شناسایی این دو نمونه نمی‌توان قضاوت کرد، اما به هر حال در صورت صحت شناسایی نمونه‌ها، داده‌های مولکولی بر تنوع درون گونه‌ای یا حتی همسویا بودن این گونه دلالت دارد.

نکته جالب توجه دیگر موقعیت نسبتاً قاعده‌ای نمونه ایرانی گونه *V. myuros* در زیرخوشه ۱ است. موقعیت این نمونه که یک گونه باریک برگ شرف مدیترانه‌ای است، با موقعیت قاعده‌ای نمونه ایرانی گونه *F. arundinacea* قابل مقایسه است و اهمیت و لزوم توجه بیشتر به وجود برخی تنوعات در مترادف‌های نوکلئوتیدی در این ناحیه از ژنوم را نشان می‌دهد. این موضوع با کاربرد اخیر ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* به عنوان بارکد مولکولی و توانایی آن برای نشان دادن و تفکیک دقیق‌تر آرایه‌ها سازگار است (Kress et al., 2005). با این وجود به نظر می‌رسد این ناحیه بین ژنی در تیره Poaceae نسبت به سایر گروه‌های گیاهی، چندشکلی کمتری دارد (Ian et al., 2007)، گرچه بیان آن در قالب اعداد و به طور آماری، به داده‌های بیشتری نیاز دارد.

آن چه از این مترادف‌های نوکلئوتیدی می‌توان استنباط نمود این است که جنس *Lolium* s.s.، آرایه‌ای تک‌نیا است (Darbyshire, 1993؛ Sharifi-Tehrani,

روابط خویشاوندی در زیرخوشه A نشان می‌دهد که موقعیت جنس *Lolium* s.l. (شامل زیرجنس *Schedonorus* از جنس *Festuca*، یعنی تاکسون‌های پهن برگ *Festuca* نزدیک به تاکسون‌های دگرگشن *Lolium*) در آن با حمایت بوت‌استرپ ۹۴ درصد تثبیت شده است. در این بخش از تبارنما گونه *F. gigantea* نیز قرار گرفته است. بنابراین، مترادف‌های نوکلئوتیدی *trnH-psbA* نیز همانند سایر مترادف‌های نوکلئوتیدی هسته‌ای و کلروپلاستی که پیش از این مطالعه شده‌اند (Sharifi-Tehrani, 2008؛ Catalan et al., 2007) طبقه‌بندی *F. gigantea* در *F. gigantea* subgen. *Schedonorus* sect. *Plantynia* (Dumort.) را در برابر انتقال آن به زیرجنس *V. Drymenthele* Krecz. & Bobrov. مورد حمایت قرار می‌دهد (شکل ۲). در این گروه، نکته قابل توجه قرار گرفتن نمونه *F. arundinacea* ایرانی در موقعیت بینایی خوشه‌های ۱ و ۲ است. محل صحیح این نمونه بایستی در کنار گونه خویشاوند نزدیک آن یعنی *L. multiflorum* و *L. perenne* و *F. pratensis* باشد، جایی که نمونه غیر ایرانی این گونه (*F. arundinacea*) به طور صحیح قرار گرفته است. مطالعه دقیق جزئیات مترادف این نمونه و تعیین مترادف مجدد آن با استفاده از نمونه‌های بیشتر از جمعیت‌های ایرانی ممکن است وجود بازآرایی‌های ژنومی در این ناحیه ویژه از کلروپلاست را آشکار سازد چرا که موقعیت این گونه در سایر تبارنما‌های که پیش از این گزارش شده است بر اساس نواحی *trnL-F* و *trnT-L* و ITS صحیح بود. زیرخوشه ۲ از انتقال گونه‌های زیرجنس *Schedonorus* (شامل *F. gigantea*) به جنس *Lolium* s.l. حمایت می‌کند که با نظر

تصحیح شد اما روابط خویشاوندی بین این قبیله‌ها هنوز موضوع جالبی برای مطالعه است. آنچه از خوشه اصلی II پیداست، وجود سه زیرخوشه: (*Triticum + Elymus*)، (*Psathyrostachys* و (*Hordeum + Agropyron*) (Nevski ex Roshev.) نوع روابط بین جنسی در این گروه را نشان می‌دهد.

جمع‌بندی

بر اساس مشاهدات حاصل از پژوهش حاضر، استنباط ما از روابط طبیعی و خویشاوندی اعضای کمپلکس *Festuca-Lolium* در ایران عبارت است از: الف) نمونه‌های پهن برگ *F. arundinacea* و *F. pratensis* در زیرجنس *Schedonorus* روابط نزدیکی را نشان می‌دهند.

ب) بین گونه‌های *F. arundinacea* و *F. pratensis* و با گونه‌های دگرگشن *Lolium* (*L. multiflorum*) (*L. rigidum* *L. perenne*) قرابت نسبی وجود دارد در حالی که گونه خودگشن جنس *Lolium* (*L. persicum*) از این گروه جدا است که این نتایج با قرابت فنتیکی گونه‌ها در بررسی‌های ریخت‌شناختی (Catalan, 2006؛ Sharifi-Tehrani, 2008) هماهنگ است.

پ) خویشاوندی نزدیکی بین نمونه‌های مربوط به گونه *V. myuros* با تاکسون‌های باریک برگ (*F. rubra*) وجود دارد.

ت) نتایج این تحقیق از طبقه‌بندی *F. gigantea* در *Festuca* subgen. *Schedonorus* sect. *Plantynia* جای انتقال آن به زیرجنس *Drymenthele* حمایت می‌کند.

ث) جنس *Lolium* تک‌نیا است.

ج) قرابت نزدیکی بین خوشه حامل *Lolium* و

(2008). همچنین، خوشه حامل *Lolium* و گونه‌های متعلق به (*Festuca* subgen. *Schedonorus* + *F. gigantea*) یعنی *Lolium sensu Darbyshire* را نیز می‌توان تک‌نیا در نظر گرفت. این نتایج، انتقال *Festuca* subgen. *Schedonorus* به جنس *Lolium* و معرفی ترکیبات جدیدی مانند *L. arundinaceum* یا *L. pratense* توسط Darbyshire (۱۹۹۳) را مورد حمایت قرار می‌دهد. این ترکیب‌های جدید بایستی بیشتر بررسی شود تا به طور رسمی مورد تأیید قرار گیرند. گرچه برخی از صفات ریخت‌شناسی گل‌آذین (گل‌آذین سنبله، وجود تنها یک پوشه) با ادغام جنس *Festuca* در جنس *Lolium* مخالف است؛ با این وجود، برخی از صفات ریخت‌شناختی نظیر: گوشوارک‌های هلالی‌شکل پهنک برگ در زیرجنس‌های *Schedonorus* و *Lolium* سین آپومورفی محسوب می‌شوند و در هیچ گروه مرتبگی یافت نمی‌شود و بنابراین از ترکیب فوق حمایت می‌کنند. در بررسی‌های ریخت‌شناختی انجام شده نیز گونه‌های *Lolium* با یکدیگر گروه‌بندی شدند و گونه‌های زیرجنس *Schedonorus* (*F. arundinacea* و *F. pratensis*) نیز با گونه‌های دگرگشن *Lolium* یک گروه اصلی را تشکیل می‌دهند (Catalan, 2006؛ Sharifi-Tehrani, 2008). شایان ذکر است که نمونه‌های تکراری مربوط به هر گونه موقعیتی مانند نمونه اصلی داشته که با یافته‌های ریخت‌شناختی نمونه‌ها هماهنگ است.

جنس‌ها و گونه‌های قبیله Triticeae با داشتن صفات ریخت‌شناختی مشابه با برخی از *Festuca*‌ها و خویشاوندان آن، به ویژه گونه‌هایی از جنس *Lolium* محلی برای طبقه‌بندی آنها به شمار می‌رفتند. این طبقه‌بندی نادرست بعدها توسط Nevski (۱۹۳۴)

سپاسگزاری گونه‌های متعلق به (*Festuca* subgen. *Schedonorus* + *F. gigantean*) وجود دارد و از طبقه‌بندی جنس *Lolium* توسط Darbyshire (۱۹۹۳) یعنی *Lolium* sensu Darbyshire حمایت می‌کند.

نگارندگان از حمایت‌های مالی و همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

- Alexeev, E. (1979) Genus *Festuca* L. Florae Iranicae et territoriorum confinium. Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii 16: 7-35.
- Alvarez, I. and Wendel, J. F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Baldwin, B. G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(1): 3-16.
- Baldwin, B. G., Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. and Donoghue, M. J. (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Barker, C. M. and Stace, C. A. (1984) Hybridization in the genera *Vulpia* and *Festuca* (Poaceae): the characteristics of artificial hybrids. *Nordic Journal of Botany* 4: 289-302.
- Barker, C. M. and Stace, C. A. (1986) Hybridization in the genera *Vulpia* and *Festuca* (Poaceae): meiotic behaviour of artificial hybrids. *Nordic Journal of Botany* 6: 1-10.
- Bor, N. L. (1968) *Lolium*. In: Flora of Iraq (Eds. Townsend C. C., Guest, E. and Al-Rawi, A.) 9: 90-99. Ministry of Agriculture, Baghdad.
- Bor, N. L. (1970) Gramineae. In: Flora Iranica (Ed. Rechinger, K. H.) 70: 71-573. Akademische Druk-U. Verlagsanstalt, Graz.
- Catalan, P. (2006) Phylogeny and evolution of *Festuca* L. and related genera of subtribe Loliinae (Poeae, Poaceae). In: Plant genome: biodiversity and evolution (Eds. Sharma, A. K. and Sharma, A.) 255-303. Science Publishers, Enfield (New Hampshire).
- Catalan, P., Torrecilla, P., Rodriguez, J. A. L. and Olmstead, R. G. (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poeae, Pooideae) inferred from ITS and *trnL-F* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 517-541.
- Catalan, P., Torrecilla, P., Rodriguez, J. A. L., Muller, J. and Stace, C. (2007) A systematic approach to subtribe Loliinae (Poaceae: Pooideae). *Aliso* 23: 380-405.
- Charmet, G., Ravel, C. and Balfourier, F. (1997) Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 1038-1046.
- Clayton, W. D. and Renvoize, S. A. (1986) Genera graminum: grasses of the world. *Kew Bulletin, Additional Series* 13: 1-389.
- Darbyshire, S. J. (1993) Realignment of *Festuca* subgenus *Schedonorus* with the genus *Lolium* (Poaceae). *Novon* 3: 239-243.
- Darbyshire, S. J. and Warwick, S. I. (1992) Phylogeny of North-American *Festuca* (Poaceae) and related genera using chloroplast DNA restriction site variation. *Canadian Journal of Botany* 70:

2415-2429.

- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry* 19: 11-15.
- Gaut, B. S., Tredway, L. P., Kubik, C., Gaut, R. L. and Meyer, W. (2000) Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 224: 33-53.
- Hosseini, S. Z., Rahiminejad, M. R. and Saeidi, H. (2013a) Leaf anatomical structure of Iranian narrow-leaved species of the genus *Festuca* L. (Poaceae, Poaeae). *Iranian Journal of Botany* 10(1): 86-93.
- Hosseini, S. Z., Rahiminejad, M. R., Saeidi, H. and Assadi, M. (2013b) Taxonomic study of *Festuca* L. subgenus *Schedonorus* (P. Beauv.) Peterm. in Iran. *Taxonomy and Biosystematics* 5(16): 69-74.
- Hosseini, Z. (2013) Taxonomy of the genus *Festuca* L. in Iran. PhD thesis, University of Isfahan, Isfahan, Iran (in Persian).
- Humphries, C. J. (1980) *Lolium*. In: *Flora Europea* (Eds. Tutin, T. G., Heyward, V. H., Burgess, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb, D. A.) 5: 153-154. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ian, G., Whipple, Mary, E., Barkworth and Bradley, S. B. (2007) Molecular insights into the taxonomy of *Glyceria* (Poaceae: Meliceae) in North America. *American Journal of Botany* 94(4): 551-557.
- Jenkin, T. J. (1954) Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses *Lolium rigidum* sense, Ampl. with other *Lolium* species. *Journal of Genetics* 52: 252-281.
- Jenkin, T. J. and Thomas, P. T. (1939) Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses. III. *Lolium loliaceum* and *L. rigidum*. *Journal of Genetics* 37: 255-286.
- Judd, W., Campbell, C. S., Kellogg, E. A. and Stevens, P. F. (1999) *Plant systematics; a phylogenetic approach*. Sinauer Association, Massachusetts.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weight, L. A. and Janzen, D. H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8369-8374.
- Majidi, M. M., Mirlohi, A. F. and Sayed-Tabatabaei, D. E. (2006) AFLP analysis of genetic variation in Iranian fescue accessions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(10): 1869-1876.
- Mirjalili, A., Aryavand, A. and Assadi, M. (2003) Study of distribution and morphological variation on the genus *Lolium* in Iran. *Pajouhesh and Sazandegi* 59: 40-47 (in Persian).
- Naylor, B. (1960) Species differentiation in the genus *Lolium*. *Heredity* 15: 219-233.
- Nevski, S. A. (1934) *Lolium*. In: *Flora of the USSR* (Eds. Komarov, V. L., Rozhevits, R. Y. and Shishkin, B. K.). Translation for the National Science Foundation and the Smithsonian Institution. Isreal Program for Scientific Translations.
- Oshib nataj, M., Keshavarzi, M., Shekarchi, H. and Akbarzade, M. (2011) A phenetic study of the genus *Lolium* from Poaceae family in Iran. *Taxonomy and Biosystematics* 3(6): 1-16.
- Palmer, J. D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic use of chloroplast DNA variation. *The American Naturalist* 130: S6-S29.
- Parsa, A. (1950) *Festuca*. In: *Flore de l' Iran* (Ed. Parsa, A.) 5: 736-745. Publication du Ministere de L'education, Museum de Histoire Naturelle de Tehran, Tehran.
- Sang, T., Crawford, D. J. and Stuessy, T. F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution

- and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136.
- Sharifi-Tehrani, M. (2008) Systematic study and phylogenetic analysis of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) in Iran based on morphological characters and molecular approaches. PhD thesis, University of Isfahan, Isfahan, Iran (in Persian).
- Tamura, K., Daniel, P., Nicholas, P., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tate, J. A. and Simpson, B. B. (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723-737.
- Terrell, E. E. (1966) Taxonomic implications of genetics in ryegrass (*Lolium*). *Botanical Review* 32: 38-164.
- Terrell, E. E. (1968) A taxonomic revision of the genus *Lolium*, Technical Bulletin No. 1392. Agricultural Research Services, United States Department of Agriculture, Washington.
- Thomas, H. M., Morgan, W. G. and Humphreys, M. W. (2003) Designing grasses with a future - combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica* 133: 19-26.
- Torrecilla, P. and Catalan, P. (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany* 27: 241-251.
- Watson, L. and Dallwitz, M. J. (1994) The grass genera of the world. Retrieved from <http://delta-intkey.com/grass>. On: 23 May 2014.

Relationships of *Festuca-Lolium* complex in Iran assessed using *trnH-psbA* sequences

Soheila Raeisi Chehrazi ¹, Majid Sharifi-Tehrani ² and Hojjatollah Saeidi ^{1*}

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

The *Festuca-Lolium* complex refers to a group of closely related taxa within the festucoids clade, including outbreeding species of the genus *Lolium* and the species of the genus *Festuca* subgenus *Schedonorus*. In this study, relationships among 6 species of *Festuca-Lolium* complex were assessed using *trnH-psbA* sequences. Based on the results of this study *Lolium* is monophyletic. Also, a cluster including *Lolium* and *Festuca* subgen. *Schedonorus* and *F. gigantea* can be monophyletic. The results support transferring *Festuca* subgen. *Schedonorus* into the genus *Lolium* as a new combination that was proposed by Darbyshire. The *trnH-psbA* sequences support transferring *Festuca gigantea* from *Festuca* subgen. *Drymenthele* into *Festuca* subgen. *Schedonorus* sect. *Plantynia*.

Key words: Iran, Phylogeny, cpDNA, *Festuca-Lolium* complex, *trnH-psbA*

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