

بررسی تبارشناسی ژن کلروپلاستی matK برخی از گونه‌های متعلق به قبیله

Mentheae از تیره نعناع با تاکید بر گیاه دارویی

Zhumeria majdae Rech. F. & Wendelbo.

حامد خدایاری^{۱*}، الهام خلیلی^۲، فروغ سنجریان^۳ و یونس عصری^۴

^۱استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۲دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۳استادیار گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

^۴دانشیار پژوهش بخش گیاه‌شناسی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۰۲ : تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۲

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی موقعیت تاکسونومیکی و تبارزایی قبیله Mentheae با تاکید بر گیاه دارویی مورخوش با نام علمی *Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo. با استفاده از توالی‌یابی ژن کلروپلاستی matk می‌باشد، گیاه مورخوش متعلق به تیره نعناع و از گونه‌های انحصاری استان هرمزگان می‌باشد. در طب سنتی از عصاره گیاه مورخوش جهت درمان ناراحتی‌های گوارشی، اسهال، نفخ، دل درد، تشری معده، سوزش معده، رفع سرماخوردگی، سردرد و التیام زخم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق از نمونه‌های گیاهی، استخراج DNA صورت گرفت و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بررسی مولکولی قطعه ای از ژن matk به روش PCR-Sequencing، تکثیر و توالی‌یابی گردید. برای بازسازی روابط فیلوژنی، تحلیل توالی DNA با استفاده از نرم‌افزار FINTCH TV و تحلیل‌های فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار PAUP انجام گرفت. در آنالیز کلاودوگرام، سه درخت به طول ۲۰ گام و شاخص‌های آماری ضریب سازگاری (Ci; Consistensive index) برابر با ۰/۹۵۰ و ضریب نگهداری (Retention index; Ri) برابر با ۰/۹۶۳ مشاهده گردید. نتایج حاصل از تحلیل‌های فیلوژنتیکی توالی matK نشان داد که قبیله Mentheae متشکل از ۳ تبار تک‌نمای مجزا شامل زیر طایفه‌های *Salviinae*، *Menthinae* و *Nepetinae* است و گیاه مورخوش همراه با *Salvia aegyptiaca* یک گروه خواهری را در زیرطایفه *Salviinae* تشکیل می‌دهد. نتایج حاصل از این مطالعه با داده‌های حاصل از مطالعات قبلی با استفاده از صفات ریزریخت شناسی بذر و دانه گرده، در ارتباط با جایگاه جنس *Zhumeria* در بین سایر جنس‌های قبیله Mentheae مطابقت دارد.

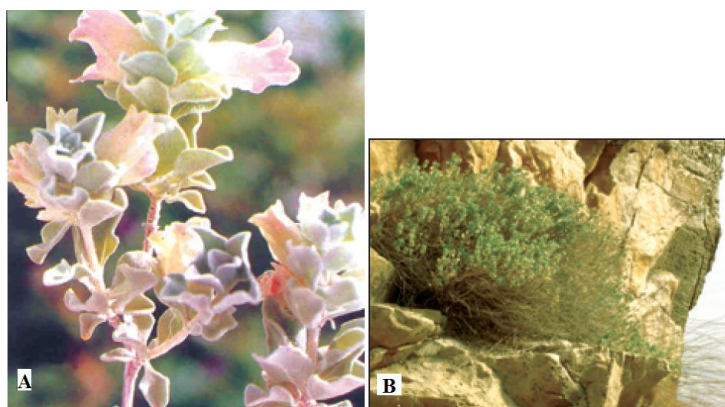
واژه‌های کلیدی: تبارشناسی، توالی‌یابی DNA، Lamiaceae، مورخوش، *Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo. ژن matK

*نویسنده مسئول: khodayari.h@lu.ac.ir

مقدمه

Endl., Nepetinae (Dumort.) Coss. and Germ. و Menthinae (Dumort.) Endl. تقسیم شود (Harley et al., 2004). جنس *Zhumeria* Rech. f. and amp; *Z. majdae* Rech. f. تنها یک گونه به نام *Z. majdae* Rech. f. and amp; در دنیا و ایران دارد که متعلق به قبیله *Mentheae* است (Drew and Sytsma, 2012). این گیاه به صورت بوته‌ای پایا، دو پایه، بن چوبی و سخت، سبز متمایل به سفید یا خاکستری، بسیار معطر و با ساقه‌های خردار و کرکینه پوش و به ارتفاع ۵۰ سانتیمتر است (Rechinger, 1989). این گونه آشکارا یک جنس باقی مانده از دوران‌های زمین شناسی گذشته (relict) به شمار می‌رود (Soltanipour et al., 2004) (شکل ۱).

تیره نعنا (Lamiaceae L.) یکی از بزرگترین خانواده‌های گیاهی با ۲۳۶ جنس و ۷۱۷۳ گونه می‌باشد. براساس ویژگی‌های دانه گرده دو زیرخانواده برای خانواده نعنا پیشنهاد شده است: *Lamioideae* و *Nepetoideae*. زیر خانواده *Nepetoideae* به چهار طایفه تقسیم شده است: *Elsholtzieae*, *Lavanduleae*, *Mentheae* و *Ocimeae* (Harley et al., 2004). قبیله *Mentheae* با ۷۳ جنس و حدود ۲۰۰۰ گونه بزرگترین قبیله این زیرخانواده است که دارای مقادیر بالایی از روغن‌های اساسی بوده و در سراسر جهان از ارزش دارویی بالایی برخوردارند (Walker and Sytsma, 2007). قبیله *Mentheae* خود می‌تواند به سه زیرطایفه (*Salviinae* (Dumort.))



شکل ۱: تصویر نزدیک (A) و دور (B) از گیاه دارویی مورخوش (*Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo.) در منطقه سرچاهان هرمزگان (برگرفته از Soltanipour et al., 2004).

زاد محمود، سیرمند و... در استان هرمزگان رویش دارد (Majrouhi, 2009).

گونه دارویی مورخوش از گیاهان دارویی پر مصرف و ارزشمند استان هرمزگان می‌باشد که در درمان بیماری‌های مختلف مصرف می‌شود و حتی به کشورهای حوزه خلیج فارس و دریای عمان به صورت سنتی صادر می‌شود. مردم استان هرمزگان از برگ گیاه مورخوش جهت درمان ناراحتی‌های

گیاه دارویی مورخوش، گونه انحصاری استان هرمزگان و ایران می‌باشد که تاکنون از هیچ نقطه دیگر کشور و جهان گزارش نشده است و در واقع یکی از مهمترین یافته‌های علم گیاه‌شناسی در جنوب غربی آسیا در سالهای اخیر به شمار می‌رود (Soltanipour et al., 2004). این گیاه از پراکنش بسیار محدودی برخوردار است و در مناطق قطب آباد و کوه‌های گنو، تنگ زاغ، سرچاهان، فینو، کوه

طول *matK* ORF در اکثر نهانندانگان تقریباً در حدود ۱۵۰۰ bp است (Liang and Hilu, 1996) و محصول پروتئینی ترجمه شده آن حدود ۵۰۰ آمینو اسید می‌باشد (Shinozaki et al., 1996). *matK* دارای دو ویژگی منحصر به فرد است که اهمیت آن در بیولوژی مولکولی و تکامل به دلیل نرخ تکامل تدریجی سریع و کارکرد مشهور آن به عنوان بالغ‌کننده ایترون‌های گروه دو می‌باشد (Noah and Lambowitz, 2003).

در این تحقیق روابط بین گونه‌ای در ۱۷ تاکسون متعلق به قبیله *Menthae* و رابطه آنها با جنس *Zhumeria* در ایران مورد ارزیابی قرار گرفته است. از آنجا که رویشگاه *Zhumeria majdae* محدود به بخشی از استان هرمزگان در ایران و جهان می‌باشد، مطالعات چندانی در زمینه فیلوژنی این گیاه انجام پذیرفته است. با توجه به عدم قطعیت فیلوژنی، مورفولوژی و تشریحی این گیاه و در دست نبودن درخت فیلوژنی مولکولی آن در این تحقیق به منظور روشن شدن موقعیت تاکسونومیکی دقیق این گیاه از لحاظ مولکولی، توالی‌های ژن حفاظت شده *matK* در این گونه و گونه‌هایی از جنس‌های نزدیک به آن جمله *Salvia*، *Thymus*، *Perovskia*، *Ziziphora* تکثیر شده و مورد توالی‌یابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

۱۷ گونه گیاهی متعلق به قبیله *Menthae* به همراه گونه *Ocimum basilicum* L. (به عنوان برون گروه) مورد استفاده قرار گرفت. برخی از نمونه‌ها از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/62997145 گرفته شده است (جدول ۱).

گوارشی چون اسهال، نفخ، دل درد، ترشی معده، سوزش معده، رفع سرماخوردگی، سردرد و التیام زخم استفاده می‌کنند (Soltanipour et al., 2004). در اسانس برگ گیاه مورخوش ۲۲ ترکیب شناسایی شده که دو ترکیب لینالول و کامفور بیش از ۷۵ درصد حجم اسانس را تشکیل می‌دهند (Majrouhi, 2009). در آنالیز روغن اسانس به دست آمده از ساقه گیاه مورخوش تعداد ۸۵ ترکیب شیمیایی شناسایی شده است که دو ترکیب مانول (۳۷/۱) و سدرول ۶ (درصد) جزء ترکیبات شاخص به شمار می‌روند (Javidnia et al., 2006). همچنین گزارشی از اثر آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد قارچی آن ذکر شده است (Soltanipour et al., 2004).

توالی‌های DNA کلروپلاستی، منبع اولیه داده‌ها برای استنباط تبارشناسی گیاهان می‌باشد که شاید تنها رقیب توالی‌های ITS ریپوزومی هسته‌ای در سال‌های اخیر باشد (Alvarez and Wendel, 2003)، که در سطح ملکولی، برای تحقیقات تکاملی، اطلاعات پایه را فراهم می‌کند. توالی‌های نوکلئوتیدی *matK* و *rbcl* به عنوان دو جایگاه ژنی جهت آشکار کردن پلی مورفیسم بین گونه‌ای یا سطوح بالاتر پذیرفته شده‌اند. ناحیه DNA *matK* برای تمیز بسیاری از گونه‌های گیاهی به عنوان یک بارکد منفرد یا ترکیب با دیگر بارکدهای توالی‌یابی DNA در مطالعات زیادی بکار رفته است. *matK* به عنوان یک مارکر DNA قدرتمند و موثر برای تشخیص گونه‌ها به دلایل زیر استفاده می‌شود: تعیین توالی آن با کیفیت بالا، روش‌های آزمایشگاهی و توالی‌یابی آسان، و فقدان چند شکلی آلی یا کپی‌های پارالوگ در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای ژن *matK* درون ایترون ژن *trnK* قرار گرفته است (Hollingsworth et al., 2011).

جدول ۱: گونه‌های گیاهی مورد مطالعه و جایگاه آنها در سطح قبیله و زیرقبیله همراه با کدهای باربومی نمونه‌های مربوطه.

شماره نمونه جمعیتی بانک ژن	کشور منبع	زیرقبیله	قبیله	نام علمی آرایه
GU381737.1	سوئیس، ژنو	Menthinae	Mentheae	<i>Acanthomintha lanceolata</i> Curran.
FLAS 124322	ایالات متحده، جورجیا	Menthinae	Mentheae	<i>Conradina canescens</i> A. Gray.
HQ384495.1	ایالات متحده، واشینگتن	Menthinae	Mentheae	<i>Mentha spicata</i> L.
AY943528	ایالات متحده، فلوریدا	Menthinae	Mentheae	<i>Monarda fistulosa</i> L.
KJ204514.1	ژنو، سوئیس	Menthinae	Mentheae	<i>Origanum vulgare</i> L.
AY943536	ایالات متحده، دانشگاه فلوریدا	Menthinae	Mentheae	<i>Pogogyne floribunda</i> Jakerst.
KJ773052.1	ژنو، سوئیس	Menthinae	Mentheae	<i>Pycnanthemum virginianum</i> (L.) T.Durand & B.D.Jacks. ex B.L.Rob. & Fernald.
GU381740.1	ژنو، سوئیس	Menthinae	Mentheae	<i>Rhododon ciliatus</i> (Benth.) Epling.
AY943548	ایالات متحده، دانشگاه فلوریدا	Salviinae	Mentheae	<i>Salvia aegyptiaca</i> L.
TARI90719	ایران، تهران	Menthinae	Mentheae	<i>Satureja spicigera</i> (K.Koch) Boiss.
TARI78192	ایران، تهران	Menthinae	Mentheae	<i>Satureja sahendica</i> Bornm.
AY840173.1	ایالات متحده، دانشگاه فلوریدا	Menthinae	Mentheae	<i>Thymus serpyllum</i> L.
AY943539	ایالات متحده، دانشگاه فلوریدا	Nepetinae	Mentheae	<i>Agastache urticifolia</i> (Benth.) Kuntze.
AY840143.1	آلمان، مونیخ	Nepetinae	Mentheae	<i>Glechoma hederacea</i> L.
GU381731.1	ژنو، سوئیس	Salviinae	Mentheae	<i>Hoehnea epilobioides</i> Epling.
TARI50023	ایران، تهران	Salviinae	Mentheae	<i>Zhumeria majdae</i> Rech.f. & Wendelbo.
HQ902720.1	ترکیه، آنکارا	Menthinae	Mentheae	<i>Ziziphora taurica</i> M. Bieb.
KJ196365.1	سوئیس، ژنو	Ocimeae	Ocimeae	<i>Ocimum basilicum</i> L.

حصول DNA ژنومی کافی، مقدار ۳ مایکرولیتر از DNA حل شده در آب مقطر، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شده و در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید.

بعد از انجام PCR طبق شرایط و دمای واسرشت‌سازی (Tm) مناسب؛ قطعه ۸۳۰ جفت بازی برای *matK* حاصل گردید. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شده و در ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد.

برای بررسی قسمتی از ژن *matK* از آغازگرهای به کار برده شده توسط اولیورا و همکاران (Oliveira et al., 2007) استفاده گردید و آغازگرهای ذکر شده در سایت NCBI در قسمت primer-blast برای

جهت استخراج DNA از گیاه خشک شده، با استفاده از روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) از کیت peqGOLD Plant DNA Mini kit با شماره کاتالوگ A102010 استفاده گردید. برای این منظور مقدار ۱ تا ۱۰ گرم از گیاه خشک شده از هر گونه به صورت پودر یکنواختی برای استخراج آماده شد. DNA استخراج شده در فریزر -۲۰ تا زمان استفاده، نگهداری گردید.

بعد از استخراج و قبل از انجام هر آزمایشی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، غلظت DNA تعیین گردید. تا با توجه به غلظت آن بتوان مقدار مناسبی از آن را جهت آزمایشات مورد استفاده قرار داد. پس از استخراج DNA از هر گونه‌ی گیاهی، برای اطمینان از

اختصاصی بودن، کنترل شد، سپس به منظور توالی یابی به شرکت ژن فناوران سفارش داده شدند. آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی مولکولی ژن matk در این مطالعه، پرایمرهای زیر بودند:
 dic550R (5'-CATTTCGTTTAATTCGTCCGTG-3')
 dic470F (5'-AGTGCTCGATACGGGAAG-3')

مقادیر مواد مورد استفاده جهت آزمایشات تکثیر DNA به روش PCR در جدول ۲ آمده است. مخلوط نهایی در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر واکنش در نظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول ۲: مقادیر مورد نظر جهت آزمایشات تکثیر DNA به روش PCR

غلظت نهایی	مقادیر مواد مورد استفاده	نام مواد مورد استفاده
5.18 µl	5.18µl	ddH2O
1 X	5.2 µl	PCR Buffer (10X)
6.1 mM	8.0 µl	MgCl2 (50 mM)
2.0 mM	5.0 µl	dNTPs (10 mM)
28.0 Mµ	1 µl	Primer Forward (10 ^{pm} /µL)
28.0 Mµ	1 µl	Primer Reverse (10 ^{pm} /µL)
۴۰۰-۶۰۰ نانو گرم در میکرولیتر	1 µl	DNA
5.1 U	3.0 µl	Taq DNA Polymerase (5 ^U /µL)
25 µl	25 µl	Total volume

برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: برنامه PCR، مورد استفاده در دستگاه Teqnee Gradient

مرحله	زمان مورد نظر	دمای مورد استفاده (درجه سانتی گراد)	تعداد چرخه
Denaturation of DNA (واسرشت کردن)	۵ دقیقه	۹۵	۱
Denaturation of DNA (واسرشت کردن)	۱ دقیقه	۹۵	۳۵
Annealing (اتصال آغازگرها)	۱ دقیقه	۵۶	۳۵
DNA Polymerization (سازي DNA)	۱ دقیقه	۷۲	۳۵
DNA synthesis Extension (بسط DNA سازي)	۱۰ دقیقه	۷۲	۱

برنامه BLASTn در سایت www.ncbi.nih.gov انجام گردید. اختلافات نوکلئوتیدی محصول PCR نمونه‌های مختلف پس از بررسی در برنامه CLUSTALX2 مشخص گردید. برای بدست آوردن توالی مناسب، برخی از نمونه‌ها بیش از یکبار تعیین چینش شدند. کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نواحی کروپلاستی ابتدا به صورت چشمی تنظیم شد، سپس با استفاده از نرم‌افزار FinchTV Version 1.4 هم‌ردیف سازی شد و براساس روش برآورد

پس از انجام PCR، برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر و میزان خلوص آن، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و با رنگ اتیدیوم بروماید بررسی شدند. پس از اطمینان از صحت PCR و تکثیر قطعه مورد نظر، تک باندهای قوی و فاقد باند اضافی و کشیدگی (اسمیر) به سرویس تعیین توالی (شرکت پویا ژن گستر) فرستاده شدند تا توالی یابی روی آنها انجام گیرد. توالی نوکلئوتیدی کلیه محصولات PCR، تعیین گردید. مقایسه توالی‌های بدست آمده با بانک ژن، توسط

شد. کلیه کوتاهترین درختان به‌دست آمده از آنالیز، خلاصه شده و به‌صورت درخت مطلق مرکزی (*Strict consensus tree*) ارائه گردید. در ادامه، به‌منظور کاهش اثر هم‌پلازی (هم‌نمایی)، از روش وزن‌دهی مجدد صفات با استفاده از شاخص سازگاری یا *Consistency Index* استفاده شد (Farris, 2008). پس از سه دور وزن‌دهی مجدد، هیچ تغییری در شاخص‌های درختان به دست آمده، مشاهده نگردید. لذا پس از این مرحله، درخت مطلق مرکزی به روش بیشینه صرفه جویی محاسبه و ارائه شد. به‌منظور ارزیابی حدود اطمینان شاخه‌ها، از روش بوتسترپ (*bootstrap*) استفاده شد (Felsenstein, 1985).

نتایج

توالی محصولات PCR ژن *matk* در شکل زیر آورده شده است (شکل ۲).

```
TCTTTGCCCGTTGATGAAGTGACGATCTCCCTACCCTGTGAACCTTGAAGGCGCGACTGACCC
TGAAAGGGAATAAATGGAAAAATAGCATGTCGTATCAATGGAAAGTTCTGAGGATATTCAT
TcTATCCGATTGTTcCAAAACcTTCTTCGAATTCTTGAACAGAACAAAAGAAAGTTGGGTCCG
AATGAATAAATGGATAGGCGCCCTGCGGCTTCAATTAATTATTAGAAAAGAAAAAGCAACCG
GCTTCTGTTCTTAATTTGAACAATTTCCCGATCTAATTAGACGTTAAAAAAAATTAGTGCCCCG
ATACGGGAAGCACTTAAGTGGATTCTATTTTTTAAATGAATCCTAATTATTCACATTCTCTAT
TATGGAATGAAGATGTGTGTGTAAGAAAGCAGTATATTGATAAAGAAAGTTTTTTTCCGAA
ATCAAAAGAGCGATTGGGTCGAAAAAATAAAAGATTTCTAACCATCTTGTTATCCTATAACA
GGTTCACGGACGGATTAAATGAAATGAATGGAAAAAGAGAGGGTAGAGAATCTGTTGATAA
GTTTACTTGTCTCCGAGGTATCTATTTTACTAGAATACTTTGTTTTGACTGTATCGCACTATG
TATCATTTGATAACCCCGAATCTTCTACCTTTAATTCAAATCGAAATTCAAATGGAGAAAA
TCCAAAGATATTTACAGCTAAAGAGATCTCAACAACACGACTTCCTATATCCACTTATATTTT
AGGAGTATATTTATGTGTTTGCTCATAATCGTGCTTTGAATAGATCTATTTTGTGCGAAAAATC
TAGGTTATGACAATAA
```

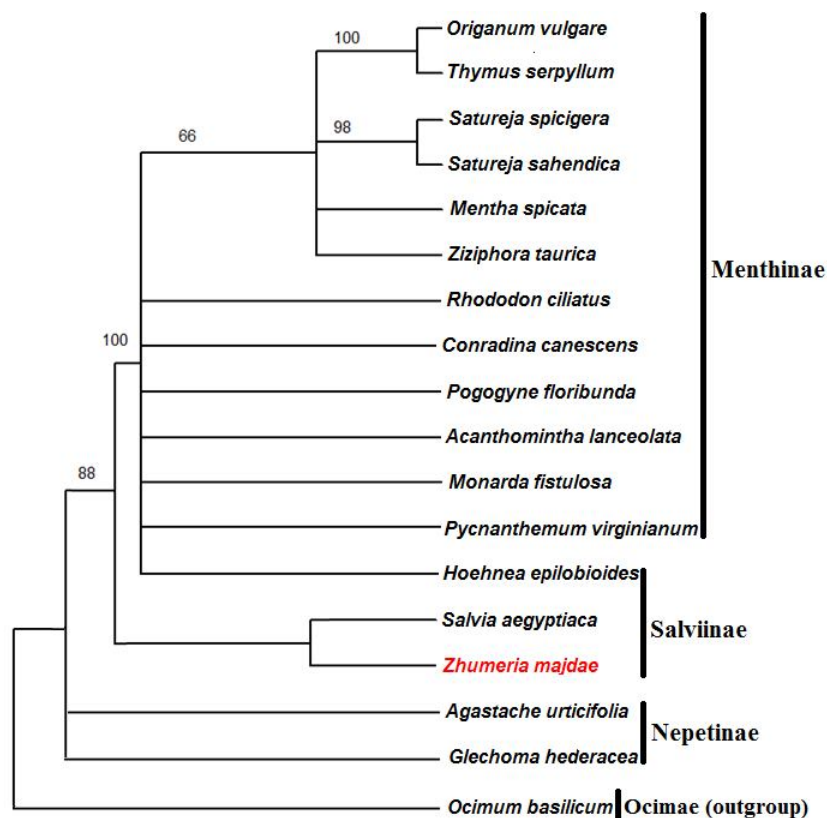
شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی ژن *matk* در *Zhumeria majdae* با شماره هر بار یوم TARI50023

صفت می‌باشد که تعداد ۸۱۳ صفت غیراطلاعاتی (*Uninformative*) و ۱۷ صفت اطلاعاتی (*Informative*) می‌باشند. در شکل ۳، درخت مطلق مرکزی با ارزش حدود اطمینان روی هر شاخه مشاهده می‌شود.

درست‌نمایی بیشینه (*Maximum likelihood*) مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. محاسبات آماری فوق و رسم دندروگرام‌ها با استفاده از نرم‌فزارهای رایانه‌ای *Clustalx2* و *Paup* انجام شد.

توالی‌های بدست آمده با نرم‌افزارهای کامپیوتری مورد مقایسه قرار گرفته است و درخت فیلوژنی مولکولی این گیاهان با استفاده از روش بیشینه صرفه جویی (*Maximum Parsimony*) رسم شد. ابتدا همه صفات به صورت هم وزن (*equal weighting*) وارد آنالیز شدند. کلیه صفات وارد شده، از نظر بیشینه صرفه جویی، حاوی اطلاعات بودند. تنظیمات مراحل مختلف آنالیز بدین صورت بود که از روش جستجوی اکتشافی (*Heuristic*) با روش افزایش گام به گام و تصادفی با ۱۰۰۰ تکرار و روش بهینه‌سازی حالات صفات، به همراه تکنیک مبادله شاخه به روش دو نیمه سازی درخت و اتصال مجدد (*TBR*) استفاده

در آنالیز کلادوگرام (شکل ۳)، سه درخت به طول ۲۰ گام و شاخص‌های آماری ضریب سازگاری (*Ci*; *Consistensive index*) برابر با ۰/۹۵۰، ضریب نگهداری (*Ri*; *Retention index*) برابر با ۰/۹۶۳ می‌باشد. ماتریکس داده‌ها دارای ۱۸ گونه و ۸۳۰



شکل ۳: تبارنمای حاصل از تحلیل تبارشناختی ترادف‌های کلروپلاستی matK متعلق به آرایه‌های قبیله Menthae و سایر جنس‌های نزدیک در خانواده Lamiaceae با استفاده از روش آنالیز پارسیمونی. برای تعیین موقعیت گونه‌های بررسی شده نسبت به گونه‌های غیر ایرانی و سایر جنس‌ها توالی‌های مربوط به سایر جنس‌های خانواده نعنای موجود در بانک ژن (NCBI) اخذ و در تحلیل وارد شده است. اعداد بالای شاخه‌ها ارزش‌های حدود اطمینان می‌باشند (ارزش‌های کمتر از 50 درصد نشان داده نشده‌اند).

بر قرار کرده اند و با بوتسترایی معادل ۶۶ درصد با زیرخوشه دارای یک جد مشترک می‌باشند. زیرخوشه دوم از خوشه ۱ نیز شامل گونه‌های *Rhododon ciliatus* و *Conradina canescens*، *Pogogyne floribunda*، *Acanthomintha lanceolata*، *Monarda fistulosa* و *Hoehnea epilobioides* با بوتسترایی معادل ۱۰۰ درصد به صورت پلی‌تومی در کنار هم قرار گرفته‌اند و بنابراین روابط بین آنها همچنان حل نشده باقی مانده است. خوشه دوم (زیرطایفه Salviinae) نیز شامل دو گونه *Salvia aegyptiaca* و *Zhumeria majdae* می‌باشد. خوشه سوم (زیرطایفه Nepetinae) هم دو گونه *Agastache urticifolia* و *Glechoma*

نتایج حاصل نشان داد که طبق طبقه بندی بر اساس توالی این ژن، سه زیرطایفه متعلق به طایفه Menthae از هم تفکیک شده و گیاه مورخوش با *Salvia aegyptiaca* یک گروه خواهری را در زیرطایفه Salviinae تشکیل می‌دهد. در کلا دوگرام، سه خوشه تشکیل شده که خوشه ۱ (زیرطایفه Menthae) خود ایجاد سه زیرخوشه نموده است بطوریکه گونه‌های *Origanum vulgare* و *Thymus serpyllum* با BS=100% تشکیل یک زیرخوشه واحد و گونه‌های *Satureja spicigera* و *S. sahendica* با BS=98% نیز یک زیرخوشه را تشکیل می‌دهند؛ همچنین گونه‌های *Mentha spicata* و *Ziziphora tenuior* رابطه نزدیکی با گونه‌های بالا

می‌باشد، رابطه خواهری دارد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

یک خط دودمانی در درون قبیله *Mentheae* شامل جنس‌های *Lepechinia*, *Melissa*, *Salvia*, *Dorystaechas*, *Meriandra*, *Zhumeria*, *Perovskia* and *Rosmarinus* (Walker et al., 2004). همچنین در مطالعه‌ای که توسط مون و همکاران (Moon et al., 2009) براساس ویژگی‌های دانه‌گرده در قبیله *Mentheae* انجام شده، گونه *Zhumeria majdae* در کنار گونه‌های *Dorystaechas hastata*، *Meriandra bengalensis*، *Salvia glutinosa*، *S. eremostachya* و *Melissa officinalis* قرار گرفته است.

در بررسی تشریح و مورفولوژی پرچم در سرده‌های قبیله *Mentheae* که توسط والکر و همکاران (Walker et al., 2004) انجام شده، *Zhumeria majdae* دارای نوع ویژه‌ای از پرچم (نوع L) و نزدیک به خوشه ۳ *Salvia* قرار گرفته است، که تاییدی بر نتایج مطالعات ما می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط مون و همکاران (Moon et al., 2009) براساس شکل دانه‌گرده در قبیله *Mentheae* انجام شده *Zhumeria majdae* در کنار گونه‌های جنس *Salvia* در زیرطایفه *Salviinae* قرار گرفته است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت کامل دارد.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به مصرف بی‌رویه گیاه مورخوش توسط افراد بومی و نداشتن اطلاعات علمی دقیق در مورد ارزش این گیاه و احتمال منقرض شدن آن بهتر است علاوه بر مطالعات فیلوژنی بیشتر راجع به منشاء و قربات خویشاوندی، خاستگاه، تولید مثل و شرایط خاص رویش بیشتر مطالعه شود و تدابیری اتخاذ گردد که شرایط رشد بهتر و جلوگیری از انقراض آن

hederaceae را در بر می‌گیرد. گونه *Ocimum basilicum* (از زیر طایفه *Ocimae*) به‌عنوان برون‌گروه می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر جهت تعیین قربات ژنتیکی گیاه مورخوش با سایر اعضا قبیله *Mentheae* توالی ژن حفاظت شده *matK* در گیاهان متعلق به قبیله مذکور مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که طبق طبقه‌بندی براساس توالی این ژن، گیاه مورخوش یا *Zhumeria majda* با *Salvia aegyptiacal* یک گروه خواهری را تشکیل می‌دهد که با نتایج بدست آمده توسط والکر و سیتسما (Walker and Sytsma, 2007) مطابقت دارد.

همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود زیرخوشه اول از خوشه اول که شامل گونه‌های *Thymus serpyllum* و *Origanum vulgara* در مطالعات قبلی که توسط والکر و سیتسما (Walker and Sytsma, 2007) و در درخت مقایسه‌ای دقیقاً یکسان در آمده‌اند. در خوشه ۲ شکل ۳ گونه *Mentha spicata* با گونه *Ziziphora tenour* رابطه نزدیکی برقرار کرده است. دو گونه *Satureja spicigra* و *S. sahendica* که تنها گونه دوم انحصاری ایران است، با هم یک زیرخوشه تشکیل داده‌اند.

والکر و سیتسما (Walker and Sytsma, 2007) براساس مطالعه‌ای که با استفاده از دو ناحیه از ژنوم کلروپلاستی *trnL-F*, *psbA-trnH* و یک ناحیه از ژنوم هسته‌ای (rDNA ITS) روی فیلوژنی مولکولی قبیله *Mentheae* انجام پذیرفته است، نشان دادند که گونه *Zhumeria majdae* با یکی از زیرخوشه‌های خوشه ۳ *Salvia* که شامل ۵ گونه از جنس *Salvia* (*S. aegyptiacat*, *S. trichocalycina*، *S. tetradnta* و *S. aristata santoliniifolia* S.

11. Moon, H.K., Vinckier, S., Smets, E., Huysmans, S. 2009. Palynological evolutionary trends within the tribe Mentheae with special emphasis on subtribe Menthinae (Nepetoideae: Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160: 211–231.
12. Noah, J.W., Lambowitz, A.M. 2003. Effects of maturase binding and Mg²⁺ concentration on group II intron RNA folding investigated by UV-cross-linking. *Biochemistry* 42: 12466-12480. *Nucl Acids Symp Ser*, 41:95–98.
13. Oliveira, L., Huck, R.B., Gitzendanner, M.A., Judd, W.S., Soltis, D.E., Soltis, P.S. 2007. Molecular Phylogeny, biogeography, and systematics of *Dicerandra* (Lamiaceae), a genus endemic to the south eastern United States. *American Journal of Botany*, 94(6): 1017–1027.
14. Rechinger, K.H. 1989. *Flora Iranica*. Lamiaceae family. Akademische Druck. U. Verlagesans- talt publication. 150: 479 p.
15. Shinozaki, K. et al. 1996. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO Journal*, 5: 2043–2049.
16. Soltanipour, M.A., Rezaei, M.B., Moradshahi, A. 2004. Study on antimicrobial effects of essential oil of *Zhumeria majdae* Rech. F. and Wendelbo. *Iran Journal. Med. Aromatic Plants*, 20(3): 277-289 (In Persian).
17. Walker, J.B., Sytsma, K.J. 2007. Staminal evolution in the *Genus Salvia* (Lamiaceae): Molecular Phylogenetic evidence for multiple origins of the Staminal Lever. *Annals of Botany*, 100: 375–391.
18. Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J., Wink, M. 2004. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American journal Botany*, 91: 1115–1125.
- توسط دستگاهای ذیربط صورت گیرد. همچنین برای رده بندی این گیاه علاوه بر ژن *matK* می توان از ژنهای کلرو پلاستی دیگر مانند *trnaF-H* و ژنهای هسته ای مانند *rDNA* که نقش بسزایی در مطالعات فیلوژنی دارند استفاده کرد.

References

1. Alvarez, I., Wendel, J.F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434.
2. Drew, B.T., Sytsma, K.J. 2012. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American journal of botany*, 99(5): 933-953.
3. Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-25.
4. Farris, J.S. 2008. The retention index and rescaled consistency index. *Cladistics* 5(4): 417 - 419.
5. Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative methods. *The American Naturalist*, 125(1): 1-15.
6. Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev A.L. 2004. "Labiatae," in the families and genera of vascular plants. New York, NY publication, 275 p.
7. Hollingsworth, P. M., Graham, S.W., Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *Plos One*, 6: 92-102.
8. Javidnia, K., Moein, M., Ayatollahi, M.R. 2006. Constituents of stem oil of *Zhumeria majdae* Rech. from Iran. *Journal of Essential oil Research*, 18: 91-92.
9. Liang, H., Hilu, K.W. 1996. Application of the *matK* gene sequence to grass systematics. *Canadian Journal of Botany*, 74: 125–134.
10. Majrouhi, A.A. 2009. Research of changes in quantities and qualities of leaf volatile oils of *Zhumeria majdae* Rech. f. and Wendelbo. in different stages of growth. *Journal of Medicinal Plants*, 4(29): 107-113 (In Persian).