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]

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

[۲]دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۰۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰٤/۰۲

چکیده

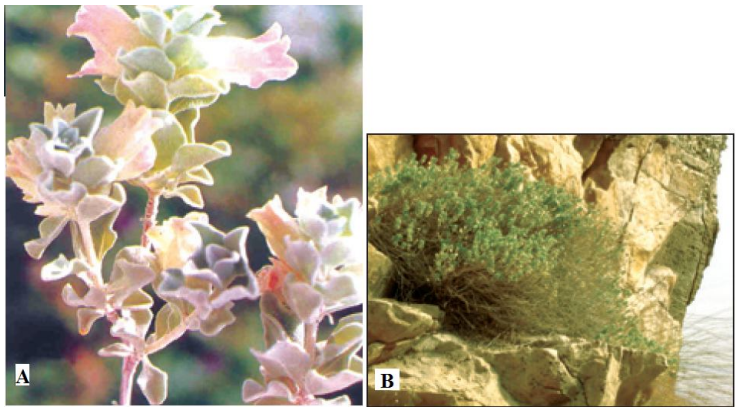
هدف از این تحقیق، بررسی موقعیت تاکسونومیکی و تبارزایی قبیله Mentheae با تاکید بر گیاه دارویی مورخوش با نام علمی *Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo. با استفاده از توالی‌یابی ژن کلروپلاستی matk می‌باشد، گیاه مورخوش متعلق به تیره نعناع و از گونه‌های انحصاری استان هرمزگان می‌باشد. در طب سنتی از عصاره گیاه مورخوش جهت درمان ناراحتی‌های گوارشی، اسهال، نفخ، دل درد، ترشی 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 TVو تحلیل‌های فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار PAUP انجام گرفت. در آنالیز کلادوگرام، 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 تک‌نیای 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، توالی یابی DNA، Lamiaceae، مورخوش .*Zhumeria majdae* Rech. F. & Wendelbo، ژن matK

*نویسنده مسئول: khodayari.h@lu.ac.ir

مقدمه

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.) Endl., Nepetinae (Dumort.) Coss. and Germ. و Menthinae (Dumort.) Endl. تقسیم شود (Harley et al., 2004). جنس *Zhumeria* Rech. f. and amp; Wendelbo تنها یک گونه به نام *Z.majdae* Rech. f. and Wendelbo 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 خزدار 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).



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).

گیاه دارویی مورخوش، گونه انحصاری استان هرمزگان و ایران می باشد 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 زادمحمود، 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

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 ٢٢ ترکیب شناسایی شده که دو ترکیب لینالول وکامفور بیش از ٧٥ درصد حجم اسانس را تشکیل می‌دهند (Majrouhi, 2009). در آنالیز روغن اسانس به دست آمده از ساقه گیاه مورخوش تعداد ٨٥ ترکیب شیمیایی شناسایی شده است که دو ترکیب مانول (٣٧/١) و سدرول ۶ (درصد) جزء ترکیبات شاخص به شمار می‌روند (Javidnia et al., 2006). همچنین گزارشی از اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد قارچی آن ذکر شده است (Soltanipour et al., 2004).

توالی‌های DNA کلروپلاستی، منبع اولیه داده‌ها برای استنباط تبارشناسی گیاهان می باشد که شاید تنها رقیب توالی‌های ITS ریبوزومی 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 به‌عنوان دو جایگاه ژنی جهت آشکار کردن پلی‌مورفیسم بین گونه‌ای یا سطوح بالاتر پذیرفته شده‌اند. ناحیه DNAای matK برای تمیز بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌عنوان یک بارکد منفرد یا ترکیب با دیگر بارکدهای توالی یابی DNA در مطالعات زیادی بکار رفته است. matK به‌عنوان یک مارکر DNA قدرتمند و موثر برای تشخیص گونه‌ها به‌دلایل زیر استفاده می‌شود: تعیین توالی آن با کیفیت بالا، روش‌های آزمایشگاهی و توالی‌یابی آسان، و فقدان چند شکلی آللی یا کپی‌های پارالوگ در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای ژن matK درون اینترون ژن trnK قرار گرفته است (Hollingsworth et al., 2011).

طول matk ORF در اکثر نهاندانگان تقریباً در حدود ١٥٠٠ bp است (Liang and Hilu, 1996) و محصول پروتئینی ترجمه شده آن حدود ٥٠٠ آمینواسید 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 اینترون‌های گروه دو می باشد (Noah and Lambowitz, 2003).

در این تحقیق روابط بین گونه‌ای در ١٧ تاکسون متعلق به قبیله Mentheae 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 نپذیرفته است. با توجه به عدم قطعیت فیلوژنی، مورفولوژی و تشریحی این گیاه و در دست نبودن درخت فیلوژنی مولکولی آن در این تحقیق به‌منظور 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*، *Ziziphora*، *Perovskia*، *Thymus* تکثیر شده و مورد توالی یابی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

١٧ گونه گیاهی متعلق به قبیله Mentheae به همراه گونه *Ocimum basilicum* L. (به‌عنوان برون گروه) مورد استفاده قرار گرفت. برخی از نمونه‌ها از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/62997145گرفته شده است (جدول ١).

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

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

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 به‌صورت 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 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 بار گذاری شده و در ولتاژ ۱۰۰ ولت به‌مدت 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

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:

dic470F (5´-AGTGCTCGATACGGGAAG-3´)

dic550R (5´-CATTTCGTTTAATTCGTCCGTG-3´)

مقادیر مواد مورد استفاده جهت آزمایشات تکثیر DNA به روش PCR در جدول ٢ آمده است. مخلوط نهایی در حجم ٢٥ میکرولیتر برای هر واکنش در نظر گرفته شد (جدول ٢).

جدول ٢: مقادیر مورد نظر جهت آزمایشات تکثیر DNA به روش PCR

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

برنامه واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در جدول ٣ آورده شده است.

جدول ٣: برنامه PCR ، مورد استفاده در دستگاه Teqnee Gradient

تعداد چرخه	دمای مورد استفاده (درجه سانتی‌گراد)	زمان مورد نظر	مرحله
١	٩٥	٥ دقیقه	Denaturation of DNA (واسرشت کردن)
٣٥	٩٥	١ دقیقه	Denaturation of DNA (واسرشت کردن)
٣٥	٥۶	١ دقیقه	Anealing (اتصال آغازگرها)
٣٥	٧٢	١ دقیقه	DNA Polymerization (DNA سازی)
١	٧٢	١٠ دقیقه	DNA synthesis Extension (بسط DNA سازی)

پس از انجام PCR، برای اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر و میزان خلوص آن، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ١/٥ 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 برنامه BLASTn در سایتwww.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 کلروپلاستی ابتدا به‌صورت چشمی تنظیم شد، سپس با استفاده از نرم‌افزار FinchTV Version 1.4 هم‌ردیف سازی شد و براساس روش برآورد

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 بهینه سازی حالات صفات، به همراه تکنیک مبادله شاخه به روش دونیمه سازی درخت و اتصال مجدد (TBR) استفاده 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 همو پلازی (هم نمایی)، از روش وزن‌دهی مجدد صفات با استفاده از شاخص سازگاری یا Consistency Index استفاده شد (Farris, 2008). پس از سه دور وزن دهی 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. به منظور ارزیابی حدود اطمینان شاخه‌ها ، از روش بوتستراپ (bootstrap) استفاده شد (Felsenstein, 1985).

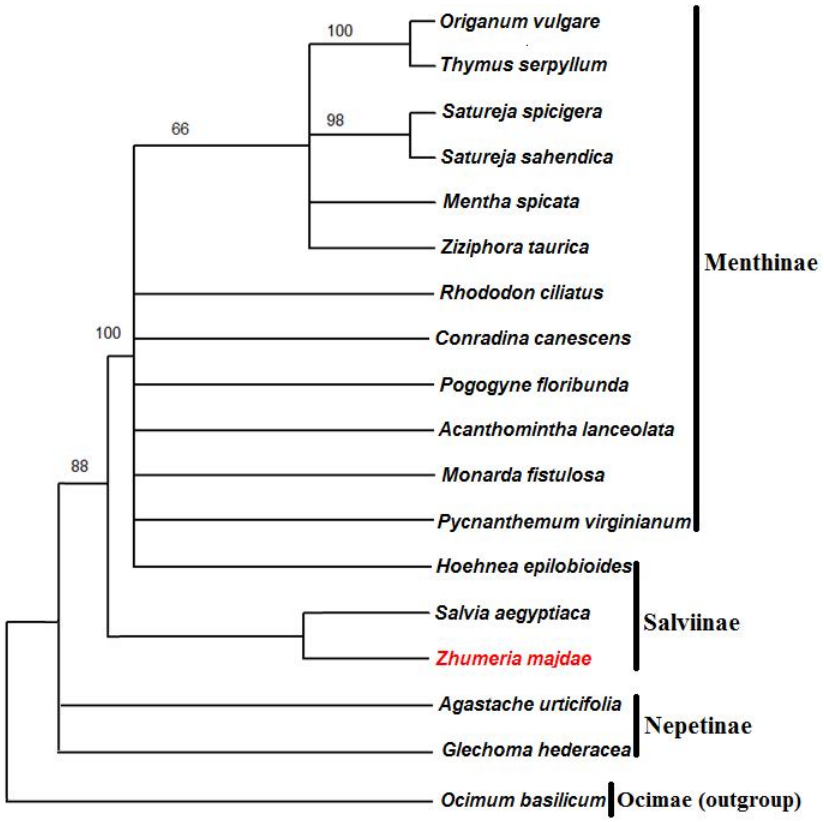
نتایج

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

TCTTTGCCCGTTGATGAAGTGACGATCTCCCTACCCTGTGAACTTGAAGGCGCGACTGACCC
TGAAAGGGAATAAATGGAAAAATAGCATGTCGTATCAATGGAAAGTTCTGAGGATATTCAT
TcTATCCGATTGTTcCAAAACcTTCTTCGAATTCTTGGAACAGAACAAAAGAAAGTTGGGTCG
AATGAATAAATGGATAGGCGCCCTGCGGCTTCAATTAATTATTAGAAAGAAAAAGCAACCG
GCTTCTGTTCTTAATTTGAACAATTTCCCGATCTAATTAGACGTTAAAAAAAATTAGTGCCCG
ATACGGGAAGCACTTAAGTGGATTCTATTTTTTTAATGAATCCTAATTATTCACATTCTCTAT
TATGGAATGAAGATGTGTGTGTAAAAGAAGCAGTATATTGATAAAGAAAGTTTTTTTCCGAA
ATCAAAAGAGCGATTGGGTCGAAAAAATAAAAGATTTCTAACCATCTTGTTATCCTATAACA
GGTTCACGGACGGATTAAATGAAATGAATGGAAAAAGAGAGGGTAGAGAATCTGTTGATAA
GTTTACTTGTCTCCGAGGTATCTATTTTTACTAGAATACTTTGTTTTGACTGTATCGCACTATG
TATCATTTGATAACCCCCGAATCTTCTACCTTTAATTCAAATCGAAATTCAAATGGAGAAAA
TCCAAAGATATTTACAGCTAAAGAGATCTCAACAACACGACTTCCTATATCCACTTATATTTC
AGGAGTATATTTATGTGTTTGCTCATAATCGTGCTTTGAATAGATCTATTTTGTCGGAAAATC
TAGGTTATGACAATAA

شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی ژن matk در *Zhumeria majdae* با شماره هرباریوم TARI50023

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 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.



شکل ۳: تبارنمای حاصل از تحلیل تبارشناختی ترادف‌های کلروپلاستی matK، متعلق به آرایه‌های قبیله Mentheae وسایر 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 نعناع موجود در بانک ژن (NCBI) اخذ و در تحلیل وارد شده است. اعدادبالای شاخه‌ها ارزش‌های حدود اطمینان می باشند (ارزش‌های کمتراز 50 درصد نشان داده نشده‌اند).

نتایج حاصل نشان داد که طبق طبقه بندی بر اساس توالی این ژن، سه زیرطایفه متعلق به طایفه Mentheae از هم تفکیک شده و گیاه مورخوش با *Salvia aegyptiaca* یک گروه خواهری را در زیرطایفه Salviinae تشکیل می‌دهد. در کلادوگرام، سه خوشه تشکیل شده که خوشه ۱ (زیرطایفه Menthinae) 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 بر قرار کرده اند و با بوتستراپی 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*، *Pycnanthemum virginianum* و *Hoehnea epilobioides* با بوتستراپی معادل ۱۰۰ درصد به‌صورت پلی‌تومی در کنار هم قرار گرفته‌اند و بنابراین روابط بین آنها همچنان حل نشده باقی مانده است. خوشه دوم (زیرطایفه Salviinae) نیز شامل دوگونه *Zhumeria majdae* و *Salvia aegyptiaca* می‌باشد. خوشه سوم (زیرطایفه Nepetinae) هم دو گونه *Agastache urticifolia* و *Glechoma*

hederacea را در بر می‌گیرد. گونه *Ocimum basilicum* (از زیر طایفه Ocimae) به‌عنوان برون گروه می‌باشد.

بحث

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

همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود زیرخوشه اول از خوشه اول که شامل گونه‌های *Thymus serphyllum* و *Origanum vulgara* در مطالعات قبلی که توسط والکر وسیتسما (Walker and Sytsma, 2007) و در درخت مقایسه‌ای دقیقا 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 وسیتسما (Walker and Sytsma, 2007) براساس مطالعه‌ای که با استفاده از دو ناحیه از ژنوم کلروپلاستی trnL-F, psbA-trnH و یک ناحیه از ژنوم هسته ای (rDNA ITS) روی فیلوژنی مولکولی قبیله Mentheae انجام پذیرفته است، نشان دادند که گونه *Zhumeia majdae* با یکی از زیرخوشه‌های خوشه ۳ *Salvia* که شامل ۵ گونه از جنس *Salvia* (*S. trichocalycina*، *S. aegyptiacat*، *S. santoliniifolia*، *S. aristata* و *S. tetrodnta*) 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* مشخص شده است (Walker et al., 2004). همچنین در مطالعه‌ای که توسط مون و همکاران (Moon et al., 2009) براساس ویژگی‌های دانه گرده در قبیله Mentheae انجام شده، گونه *Zhumeria majdae* در کنار گونه‌های *Dorystaechas hastata*، *Meriandra bengalensis*، *Salvia glutinosa*، *S. eremostachya* و *Meriandra bengalensis* 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 دانه گرده 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 بی رویه گیاه مورخوش توسط افراد بومی و نداشتن اطلاعات علمی دقیق در مورد ارزش این گیاه واحتمال منقرض شدن آن بهتر است علاوه بر مطالعات فیلوژنی بیشتر راجع به منشاء و قرابت خویشاوندی، خاستگاه، تولید مثل و شرایط خاص رویش بیشتر مطالعه شود و تدابیری اتخاذ گردد که شرایط رشد بهتر و جلوگیری از انقراض آن

توسط دستگاهای ذیربط صورت گیرد. همچنین برای رده بندی این گیاه علاوه بر ژن matk می‌توان از ژن‌های کلرو پلاستی دیگر مانند trnaF-H و ژن‌های هسته‌ای 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).
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. Flroa 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.