فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۱ ص.۵۹-۴۷

مقاله پژوهشی

تبارزایی مولکولی سرده *Linaria* (بارهنگیان) بر مبنای توالی‌های هسته‌ای ریبوزومی (ITS)

نفیسه یوسفی محمود*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران.

* (نویسنده مسئول مکاتبات): nafiyousefi@yahoo.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

چکیده

سرده *Linaria* با حدود ۱۵۰ گونه بزرگترین سرده طایفه Antirrhineae است. این سرده به وضوح چالش‌های اساسی در مسیر رده‌بندی طبیعی دارد و بنابراین به تحقیقات جدی‌تر و کامل‌تر نیازمند است. هدف این رساله تلاش برای حل مشکلات موجود با استفاده دانش سازگان‌شناسی مولکولی است. در این پژوهش، تحلیل تبارزایشی نمایندگانی از سرده *Linaria* بر مبنای توالی‌های هسته‌ای ریبوزومی (ITS) ارائه شده است. از تحلیل بیشینه صرفه‌جویی و استنباط بیزی، درخت‌هایی حاصل شده است که تقریباً با هم همخوانی دارند. یافته‌های ما، نشان داد که *Linaria-Nuttallanthus* تک‌تبار است و از هفت بخشه *Pelisserianae*، *Lectoplectron*، *Macrocentrum*، *Versicolores*، *Supinae*، *Diffusae* و *Linaria* تشکیل شده است. بخشه *Linaria* توسعه یافته و گونه‌های بخشه *Speciosae* و تعدادی از اعضای بخشه *Diffusae* را در بر گرفته است. لازم است تا مفهوم جدیدی برای بخشه *Diffusae* با محدود کردن آن، تنها به گونه‌های یک‌ساله با دانه‌های بدون بال که سلول‌های پوسته دانه آن‌ها دیواره عمودی اندکی برجسته تا فرورفته همراه با دیواره افقی محدب دارند و در سطح زگیل‌دار هستند، پیشنهاد گردد.

کلیدواژه‌ها: بارهنگیان، *Linaria*،*Nuttallanthus*، توالی ریبوزومی هسته‌ای ITS.

مقدمه

سرده *Linaria* با ۱۵۰ گونه نماینده بزرگترین سرده از طایفه Antirrhineae از بارهنگیان است [۱]؛ البته این سرده همراه با تعداد کمی از سرده‌های دیگر در گذشته در گل‌میمونیان قرار می‌گرفت، اما به تازگی به تیره بارهنگیان در مفهوم وسیع انتقال یافته است [۲ و ۳]. این سرده شامل گیاهان علفی یک‌ساله یا چندساله با ساقه‌های چند شکلی است که در مکان‌های شنی و خشک، زمین‌های زیر کشت و شیب‌های صخره‌ای دیده می‌شوند [۴، ۵ و ۶]. اعضای این سرده در سرتاسر نیمکره شمالی پراکنش دارند و مرکز پراکنش اصلی آن‌ها در نواحی مدیترانه‌ای است. اکثر گونه‌های آن در اروپا، جنوب‌غربی آسیا و شمال آفریقا یافت می‌شوند [۱، ۲، ۳ و ۷].

تقسیم‌بندی سرده *Linaria* دو مسیر مجزا را دنبال می‌کند. اولین تقسیم‌بندی بر اساس حضور یا عدم حضور بال احاطه کننده در دانه بوده‌است. بر این اساس دومورتیر [۸] دو بخشه *Lycorrhinum* (گونه‌های واجد دانه‌های بدون بال) و

Leontorrhinum (گونه‌های واجد دانه های بال‌دار) را درون سرده *Linaria* تشخیص داد. در حالی که بواسیه [۹] این گروه‌ها را به ترتیب *Oblongae* و *Discoideae* نامید. ویانو [۱۰ و ۱۱] فرض کرد که گونه‌های بال‌دار و بدون بال دو دودمان تکاملی خواهری را تشکیل می‌دهند. اما جدایی گونه¬ها بر این اساس هرگز واضح نبوده¬است. دومین سیستم بر اساس خصوصیات رویشی و زایشی گسترده‌تری است. چاوانز [۱۲] پنج گروه را درون شرح کنونی *Linaria* تشخیص داد. این گروه‌ها توسط بنتام [۱۳] نامگذاری شدند. به دنبال این تقسیم‌بندی بنتام، وتشتاین [۱۴] شش بخشه را درون سرده *Linaria* در نظر گرفت که بعدها اساس تقسیم‌بندی والدز [۱۵]، ویانو [۱۰ و ۱۱] و ساتن [۱۶] شد. از بین سیستم‌های رده‌بندی، رده‌بندی ساتن [۱۶] امروزه به طور گسترده‌ای پذیرفته شده است. بر این اساس ۱۵۰ گونه سرده *Linaria* در هفت بخشه قرار گرفته‌اند. سه بخشه *Linaria*، *Pleisserianae* و *Supinae* شامل گونه‌هایی با دانه‌های صفحه‌ای و معمولاً بال‌دار است، در حالی که چهار بخشه *Diffusae*، *Speciosae*، *Macrocentrum* و *Versiolores* شامل گونه‌های غیر صفحه‌ای بدون بال است.

تعداد کمی از گونه‌های سرده *Linaria* (با دانه‌های بال‌دار) که بومی دنیای جدید هستند از گذشته در سرده‌های مختلف شرح داده شده‌اند. به طوری که بر اساس فقدان کام جام توسعه یافته، توسط Desfontaines [۱۷] در سرده *Anarrhinum* قرار می‌گرفتند. بنتام [۱۳] و وتشتاین [۱۴] آن‌ها را جزئی از بخشه *Versicolores* و پنل [۱۸ و ۱۹]، والدز [۱۵] و فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] به عنوان بخشه مجزای *Lectoplectron* در نظر گرفتند. سرانجام ساتن [۱۶] این سه گونه امریکای شمالی و یک گونه امریکای جنوبی را بر اساس ویژگی‌های گل و دانه به سرده جدید *Nuttallanthus* انتقال داد.

تاکنون چندین مطالعه تبارزایشی بر روی سرده *Linaria* صورت گرفته است به‌طوری‌که وارگاس و همکارانش [۲۱] با مطالعه توالی ریبوزومی هسته‌ای ITS بر روی هشت گونه از سرده *Linaria*، به نمایندگی از هفت بخشه، نشان دادند که این سرده یک گروه قاعده‌ای تک‌تبار در طایفه Antirrhineae است. فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] تبارزایی سرده *Linaria* را با استفاده از ۹۷ گونه از این سرده با توالی‌های ریبوزومی هسته‌ای ITS بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سرده *Linaria* یک گروه تک‌تبار، با پنج شاخه اصلی، را درون طایفه Antirrhineae تشکیل می‌دهد. رحمانی و همکارانش [۲۲] تبارزایی مولکولی ۳۷ گونه *Linaria* در ایران را با استفاده از توالی‌های ریبوزومی هسته‌ای ITS بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که دو بخشه *Macrocentrum* و *Versicolores* تک‌تبار هستند، در حالی که تک‌تبار بودن بخشه‌های *Linaria*، *Diffusae*، *Supinae* و *Speciosae*، بر اساس این مطالعه حمایت نشد. رحمانی و همکارانش [۲۳] تبارزایی مولکولی ۷۰ گونه *Linaria* در ایران را توسط توالی *rpl32-trnL* بررسی کردند. نتایج حاصل از این مطالعه کاملاً با نتایج حاصل از مطالعه قبل همپوشانی داشت.

از آنجایی که تعداد قابل توجهی از گونه‌های سرده *Linaria* و خویشاوندان آن در طایفه Antirrhineae در ایران رویش دارند و از سوی دیگر، رده‌بندی‌های درون سرده‌ای سرده *Linaria*، هنوز به درستی حل نشده‌است، انجام یک مطالعه سازگان‌شناسی مولکولی در این گروه با منظور نمودن تعداد زیادی گونه ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاکده‌ای از سرده *Linaria* از هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران، هرباریوم دانشگاه مونیخ و هرباریوم مونیخ مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های شناسایی نشده بوسیله Flora Iranica [۲۴] مورد شناسایی قرار گرفتند. علاوه بر نمونه‌های هرباریومی ذکر شده، مجموعه کامل تصاویر نمونه‌های موجود در هرباریوم باغ گیاهشناسی سلطنتی ادینبورگ و هرباریوم موزه تاریخ طبیعی وین نیز مطالعه شدند (جدول ۱).

نمونه‌های برگ گونه‌های منتخب از سرده *Linaria*، جهت تهیه توالی‌های DNA مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند. انتخاب گونه‌ها، از همه بخشه‌ها، بر اساس رده‌بندی ساتن [۱۶] صورت گرفت.

نمایندگانی از سرده‌های *Antirrhinum*، *Chelone* و *Tetranema* به عنوان برون گروه انتخاب شدند. این انتخاب بر اساس مطالعات وارگاس و همکارانش [۲۱]، رامان [۲۵] و فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] صورت‌گرفت. توالی‌های مربوط به سرده‌های برون گروه از بانک ژن اقتباس شدند.

برای انجام مطالعات مولکولی، از توالی ریبوزومی هسته‌ای ITS (ITS1-5.8s rDNA-ITS2) در گروه مورد مطالعه، استفاده شد. به طور کلی ۲۳۱ توالی از سرده *Linaria* و دو توالی نماینده یک گونه از *Nuttallanthus* برای استخراج DNA انتخاب و یا از بانک ژن برداشت شدند. آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ لیست شده‌اند.

جدول ۱: فهرست گونه‌های استفاده شده جهت ایجاد درخت تکاملی سرده *Linaria* بر اساس نشانگر ریبوزومی هسته‌ای ITS

Taxon	Locality	Collector	Vocher	Gen Bank accession numbers ITS
Outgroup				
Antirrhinum graniticum Rothm. a	Spain, Madrid	-	99540 (VAL)	AY731283
A. australe Rothm. a	Spain, Granada	-	36940 (VAL)	AY731273
Chelone glabra L. a	USA, Massachusetts	-	1779237 (UC)	HQ652976
Tetranema roseum (M. Martens & Galeotti) Standl. & Steyerm a	USA, Connecticut	-	s.n.	AY492121
Ingroup				
Nuttallanthus				
Nuttalanthus texanus (Scheele) D.A. Sutton *a*	-	-	52991 (UTEP)	AY878113
Linaria				
Sect. *Macrocentrum*				
Linaria chalepensis (L.) Mill. a	Iran, Tehran	J. Vaezi	19266	**KT031855**
L. chalepensis b	-	-	495681 (MA)	JQ814497
Sect. *Pelisserianae*				
L. triornithophora (L.) Cav. a	-	-	617622 (MA)	AY731248
L. triornithophora b	Spain, Cáceres, Puerto de Perales	M. Fernandez-Mazuecos	18MF07 (MA)	JX481083
Sect. *Versicolores*				
Subsect. *Versicolores*				
L. algarviana Chav. a	Portugal, Algarve	J. Fdez Casas et al.	FC2202 (M)	**KT031854**
L. algarviana b	Portugal, Cabo de Sao Vicente	M. Fernandez-Mazuecos	11MF09 (MA)	JX481086
L. bipartita (Vent.) Willd. a	Afghanistan	D. Podlech	28709 (M)	**KT031878**
L. bipartita b	Marokko, De Safi	D. Podlech	49573 (MSB)	**KT031879**
L. bipartita c	Morocco, Rabat	S.L. Jury & R.G. Wilson	18558 (RNG)	JX481094
L. clementei Haens. ex Boiss. a	Spain, Malaga	M. Nydegger	36574 (MSB)	**KT031880**
L. clementei b	Spain, Malaga	M. Fernandez-Mazuecos et al.	7MF08 (MA)	JX481089
L. clementei c	Spain, Malaga	M. Fernández-Mazuecos & J. Ramírez	24MF09 (MA)	KC994570
L. gattefossei Maire & Weiller	-	-	AQ2025	KC994571
L. gharbensis Batt. & Pitard a_1	Spain, Huelva	M. Fernández-Mazuecos et al.	7MF09 (MA)	JQ814503
L. gharbensis a_2	Spain, Huelva	M. Fernandez-Mazuecos et al.	7MF09 (MA)	JX481100
L. hellenica Turrill a	-	-	-	**KT031861**
L. hellenica b	Greece, Kambos	-	s.n. (ATH)	JX481102
L. imzica Gomiz	Morocco, Jbel Imzi	F. Gomiz	s.n. (MA)	KC878736
L. incarnata (Vent.) Spreng. a	Spain, Avila	H. Merxmueller & W. Gleisner	26661 (M)	**KT031863**
L. incarnata b	-	-	9MF09 (MA)	KC878742
L. incarnata c	-	J.L. Perez Chiscano	s.n.	KC878743
L. maroccana Hook. f.	Morocco, Marrakech – Tizi-n-Test	S.L. Jury et al.	14209 (RNG)	JX481097
L. multicaulis (L.) Mill. subsp. *multicaulis*	Italy, Sicily	I. Alvarez et al.	IA1622 (MA)	JX481098
L. multicaulis subsp. *galioides* (Ball) D.A. Sutton	Morocco, Yagour	A. Kool et al.	904 (RNG)	KC994575
L. multicaulis subsp. *aurasiaca*	Tunisia, El Kesra	Davis & Lamond	57154 (RNG)	KC994573

(Pomel) D.A. Sutton				
L. onubensis Pau a	Spain, Huelva	V. Valcarcel & P. Vargas	5PV08 (MA)	KC878749
L. onubensis b	-	E. Sanchez-Gullon	s.n.	KC878751
L. pedunculata (L.) Chaz.	Spain, Cadiz	D. Podlech	54134 (MSB)	**KT031869**
L. pseudoviscosa Murb.	Tunisia, El Haouaria	P. Wilkin & E.J. Wellens	231 (RNG)	JX481099
L. salzmannii Boiss.	Spain, Malaga	M. Fernández-Mazuecos & J. Ramírez	19MF09 (MA)	JX481087
L. spartea a	Spain, Madrid	P. Vargas	101PV07 (MA)	JX481090
L. spartea (L.) Chaz. b	-	-	4MF08 (MA)	JQ814529
L. tenuis (Viv.) Spreng.	Libya, Tripoli	Davis & Boulos	50581 (RNG)	JX481096
L. tingitana Boiss. & Reuter	Algeria, El Macta	D.A. and S.J. Sutton	383 (RNG)	JX481092
L. viscosa Dum.Cours. subsp. *viscosa*	Spain, Huelva	M. Fernández-Mazuecos & J.L. Blanco	1MF09 (MA)	KC878755
L. viscosa subsp. *spicata* (Coutinho) D.A. Sutton	Spain, Jaen	M. Fernández-Mazuecos	49MF09(MA)	KC878756
L. weilleri Emb. & Maire	Morocco, Tirhmi	Mill. et al.	s.n. (RNG)	JX481093
Subsect. *Elegantes*				
L. elegans Munby a	-	-	55MF09 (1) (MA)	KC520977
L. elegans b	-	-	27MF08 (1) (MA)	KC520976
L. nigricans Lange a	Spain, Almeria	M. Fernández-Mazuecos	29MF09 (MA)	KC520972
L. nigricans b	Spain, Almeria	P. Vargas	3PV08 (MA)	JX481104
Sect. *Supinae*				
Subsect. *Supinae*				
L. aeruginea (Gouan) Cav. subsp. *nevadensis* (Boiss.) Malag. a	-	-	44JB09 (MA)	JQ814487
L. aeruginea subsp. *aeruginea* a	Spain, Granada	J.L. Blanco-Pastor	51JB09 (MA)	JQ814486
L. amoi Campo ex Amo a	-	-	37JB09 (MA)	KC625803
L. amoi b	Spain, Malaga	M. Fernández-Mazuecos et al.	30PV08 (MA)	**KT031883**
L. anticaria	Spain, Malaga	J.L. Blanco-Pastor	33JB09 (MA)	JQ814491
L. bubanii Font Quer	Spain, Huesca	M. Carrasco	609430 (MA)	JQ814538
L. caesia (Pers.) F.G. Dietr. a	Spain	A. Molina & J. Varela	sn. (RNG)	JX481105
L. caesia b	-	-	2009.12.111 (RNG)	KF623186
L. depauperata Lange ex Lange a	-	-	2009.12.157 (RNG)	JQ814499
L. depauperata b	Spain, Albacete	P.F. Cannon et al.	s.n. (RNG)	JX481107
L. glacialis Boiss. a	-	-	70JB09 (MA)	JQ814505
L. glacialis b	Spain, Granada	J.L. Blanco-Pastor	43JB09 (MA)	JQ814504
L. lilacina Lange a	-	-	2009.12.38 (RNG)	KF623194
L. lilacina b	Spain, Jaen	J.L. Blanco-Pastor	16JB12 (MA);	JX481156
L. oblongifolia (Boiss.) Boiss. & Reuter subsp. *oblongifolia*	Spain, Malaga	J.L. Blanco-Pastor	34JB09 (MA)	JQ814516
L. oblongifolia subsp. *haenseleri* (Boiss. & Reuter) Valdes a	-	E. Snchez-Gulln	s.n.	KF623197
L. platycalyx Boiss. a	Spain, Cadiz	S. Martın Bravo	5SMB08 (UPOS)	JQ814520
L. platycalyx b	Spain, Almeria	A.S. Zubizarrreta	27435 (M)	**KT031858**
L. polygalifolia Hoffmanns. & Link subsp. *polygalifolia*	-	-	2009.12.108 (RNG)	JQ814523
L. polygalifolia subsp. *lamarckii* (Rouy) D.A. Sutton	Portugal, Monte Gordo	J.L. Blanco-Pastor	33JB10 (MA)	JQ814522
L. polygalifolia subsp.	-	-	122145 (SEV)	KF623200

aguillonensis (Gracia Mart.) Castrov. & Lago				
L. saturejoides Boiss. a	Spain, Malaga	J.L. Blanco-Pastor	36JB09 (MA)	JQ814525
L. saturejoides b	-	-	31JB09 (MA)	KF623202
L. supina (L.) Chaz. a	-	-	13 (RNG)	KF623203
L. thymifolia (Vahl) DC.	France, Gironde	B. de Retz	303566 (MA)	JX481106
L. tristis Mill. subsp. *tristis*	-	-	105PJM04 (MA)	KC625801
L. tristis subsp. *mesatlantica* D.A. Sutton	-	-	11MF08 (MA)	KF623205
L. tristis subsp. *pectinata* Pau & Font Quer a	-	-	330561 (MA)	KF623206
L. verticillata Boiss. subsp. *cuartanensis* (Degan & Hervier) L. Saez & M.B. Crespo	2009.12.20	-	s.n. (RNG)	KF623188
Subsect. *Arvenses*				
Subsect. *Saxatile*				
L. alpina (L.) Mill. a	Spain, Huesca	S. Martın Bravo	571SMB05 (UPOS)	JQ814489
L. alpina b	-	-	145147 (VAL)	AY731243
L. amethystea (Vent.) Hoffmanns. & Link subsp. *amethystea*	Spain, Ciudad Real	R. Garcia Rio	712742 (MA)	JQ814490
L. amethystea subsp. *broussonetii* (Poir.) Malato-Beliz	-	-	10bisMF08 (MA)	KF623180
L. arenaria DC. a	France, Vende´e	F. De Raeve	s.n. (RNG)	JX481112
L. badalii Willk. a	Spain, Leon	M.F. Gardner & S.G. Gardner	2009.12.155 (RNG)	JQ814495
L. badalii b	-	-	81PV10 (MA)	KF623184
L. bipunctata (L.) Chaz. subsp. *bipunctata* a	Spain, Soria	A. Segura	2009.12.7 (RNG)	JQ814496
L. bipunctata subsp. *bipunctata* b	-	-	sn. (RNG)	KF623185
L. coutinhoi Valdes a	Portugal, Freixo-de-Espada	A. Teixeira	s.n. (MA)	JX481113
L. filicaulis Boiss. ex Leresche & Levier a	Spain, Leon	C.M. Romero Rodrıguez	789283 (MA)	JX481118
L. filicaulis b	-	-	769084 (MA)	JQ814500
L. glauca (L.) Cav. subsp. *olcadium* Valdes & D.A. Webb	-	-	2009.12.151 (RNG)	JQ814506
L. glauca subsp. *glauca* a	-	-	2009.12.148 (RNG)	KF623192
L. huteri Lange	Spain, Malaga	J.L. Blanco-Pastor	32JB09 (MA)	JX481111
L. munbyana Boiss. & Reuter	Spain, Huelva	J.L. Blanco-Pastor	21JB09 (MA)	JQ814515
L. oligantha Lange a	Spain, Alicante	L. Serra	753096 (MA)	JX481121
L. oligantha b	-	-	11483 (SEV)	KF623198
L. orbensis Carretero & Boira a	Spain, Alicante	J.L. Blanco-Pastor	4JB10 (MA)	JQ814518
L. orbensis b	-	-	3JB10 (MA)	KF623199
L. propinqua Boiss. & Reuter a	Spain, Bilbao	J.A. Alejandre	468162 (MA)	JQ814524
L. propinqua b	-	-	753221 (MA)	KF623201
L. saxatilis (L.) Chaz. a	-	-	94PV09 (MA)	JQ814526
L. saxatilis b	Spain, Madrid	P. Vargas	20PV09 (MA)	JX481115
Sect. *Diffusae*				
Sect. *Linaria*				
L. albifrons Spreng.	-	-	2010/12/07 (RNG)	JQ814488
L. capraria Moris & De Not.	Italy, Livorno	R.M. Baldini & L. Vivona	19526 (MSB)	**KT031857**
L. cretacea Fisch. ex Spreng.	Russia, Belgorod	V. Gladkova & T. Leonova	5845 (M)	**KT031851**
L. elymaitica (Boiss.) Kuprian.	Iran, Lurestan	J. Renz	48200 (MSB)	**KT031872**
L. fastigiata Chav.	Iran, Markazi	S. Zarre et al.	39468 (MSB)	**KT031871**
L. flava Desf.	-	-	00419551 (E)	JQ814501
L. genistifolia (L.) Mill. subsp. *confertiflora* (Boiss.) P.H. Davis	Turkey, Kahramanmaras	S. Zarre	87 (MSB)	**KT031860**

L. genistifolia subsp. *dalmatica* (L.) Mare & Petitm. a	Germany, Bayern	F. Schuhwerk	05/212 (M)	**KT031859**
L. genistifolia a	Iran, Mazandaran	Wendelbo & A.A. Maassoumi	20889 (TARI)	KJ747028
L. grandiflora Desf.	Iran, Azarbaijan	A. Ghahreman	17432	**KT031873**
L. lineolata Boiss.	Iran, Tehran	J. Vaezi	19268	**KT031882**
L. loeselii Schweigger	-	-	791644 (MA)	JQ814511
L. meyeri Kuprian.	-	-	764400 (MA)	JQ814512
L. nivea Boiss. & Reuter a	Spain, Toledo	C. Aedo	611701 (MA)	JX481155
L. nurensis Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	Iran, Bakhtiari	V. Mozaffarian	54589 (TUH)	**KT031875**
L. odora (Bieb.) Fischer	-	-	00419545 (E)	JQ814517
L. peloponnesiaca Boiss. & Heldr. a	-	-	778352 (MA)	JQ814519
L. peloponnesiaca b	Greece, Mount Olympus	P. Vargas	58 (MA)	JX481148
L. purpurea (L.) Mill. a	Italy, United Kingdom, Norwich (cultivated)	M. Ferna´ndez-Mazuecos	74MF09 (MA)	JX481147
L. repens (L.) Mill. a	-	-	595943 (MA)	AY731246
L. repens b	Spain, Cuencia	M. Fernández-Mazuecos	54MF09 (MA)	JX481144
L. thibetica Francher	-	-	00292244 (E)	JQ814531
L. triphylla Mill.	-	-	797461 (MA)	JQ814532
L. unaiensis Patzak	Afghanistan	D. Podlech	18807 (MSB)	**KT031850**
L. ventricosa Cosson & Bal.	-	-	807960 (MA)	JQ814534
L. vulgaris Mill. a	-	-	-	AF513874
L. vulgaris b	-	-	-	AY492109

*** شناسه بانک ژنی توالی‌های تولید شده در این مطالعه به صورت ضخیم نشان داده شده‌اند.**

جدول ۲: توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

Region	Primer name	Sequence (5′–3′)	References
ITS	Leu1	GTC CAC TGA ACC TTA TCA TTT AG	وارگاس و همکاران [۲۶]
	ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	وایت و همکاران [۲۷]
	ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	وایت و همکاران [۲۷]
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	وایت و همکاران [۲۷]

با استفاده از کیت NucleoSpin، استخراج DNA از نمونه‌های برگ خشک انجام و مطابق جدول ۳ محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تهیه شد. برنامه‌های بکار رفته جهت تکثیر قطعات هسته‌ای در جدول ۴ ارائه شده‌اند

جدول ۳: محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

PCR Master Mix	
	ITS
Primer forward	0.1
Primer reverse	0.1
10XTP buffer“neu”	5
10XTP buffer	-
dNTPs (2.0 Mm)	4
Taq DNA Polymerase	1
DNA template	1
BdH20	35.8
BSA	0.5
DMSO	2.5

با استفاده از روش Cycle sequencing، محصولات موفق حاصل از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ABI 3730 48 capillary sequencer (Applied Biosystems) تعیین توالی شدند.

تمامی مراحل ذکر شده، در آزمایشگاه تبارزایی مولکولی مؤسسه گیاه‌شناسی دانشگاه مونیخ تحت نظر خانم تانیا ارنست، تکنسین آزمایشگاه، انجام شد.

الکتروفروگرام‌های به دست آمده با نرم افزار Bioedit [۲۸] مشاهده، ویرایش و به صورت نوشتاری در آمدند، سپس توالی مربوط به آغازگر، از ابتدای توالی‌ها حذف شد. به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده در بانک اطلاعات ژن با نرم‌افزار بلاست (BLAST: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) جستجو انجام می‌گرفت. ردیف‌خوانی توالی‌ها، با نرم‌افزار MUSCLE انجام شد [۲۹] سپس بهترین فایل‌ها توسط نرم‌افزار Mesquite V.1.12 [۳۰] بررسی و تصحیح نهایی گردیدند.

تحلیل‌های تبارزایشی به دو روش استنباط بیزی و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی انجام شد.

نهایتاً درخت‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای FigTree v.1.3.1 [۳۱] و TreeGraph 2 [۳۲] مشاهده و به وسیله نرم افزار Adobe photoshop CS5 جهت ارائه گرافیکی آماده گردیدند.

نتایج

مدل‌های تکاملی انتخاب شده توسط برنامه jModelTest [۲۲]، نتایج تحلیل بیشینه صرفه‌جویی شامل تعداد صفات غیر متغیر، تعداد صفات اطلاعاتی، ضریب سازگاری و ضریب گروه‌پذیری در جدول ۵ نشان داده شده‌اند.

شکل ۱ درخت حاصل از تحلیل استنباط بیزی را برای نشانگر ITS نشان می‌دهد. به دلیل سطح بالای سازگاری بین درخت حاصل از استنباط بیزی و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی، نتایج حاصل فقط روی درخت استنباط بیزی به تفصیل بررسی می‌شود.

سرده *Linaria* s.l. (شامل *Linaria* و *Nuttallanthus*) یک گروه تک‌تبار در طایفه Antirrhineae است. در این سرده هفت شاخه *Versicolores*، *Lectoplectron*، *Pelisserianae*، *Macrocentrum*؛ شامل دو زیرشاخه *Versicolores* و *Elegantes*، *Supinae*، *Diffusae* و *Linaria*؛ شامل اعضای بخشه‌های *Linaria*، *Speciosae* و برخی از اعضای بخشه *Diffusae*. گونه‌های *L. chalepensis*، *L. triornithophora* و *N. texanus* به عنوان نمایندگان بخشه‌های *Macrocentrum*، *Pelisserianae* و *Lectoplectron* قاعده‌ای‌ترین درجه‌های سرده را تشکیل می‌دهند.

جدول ۴: برنامه‌های طراحی شده جهت تکثیر قطعات هسته‌ای

Marker	Initial Denaturation (°C)	Cycles (°C)	Denaturation (°C)	Anneling (°C)	Extention (°C)	Final Extention (°C)
			Taq Polymerase			
ITS	5 min (94)	40	30 s (94)	30 s (54)	1 min 15s (72)	10 min (72)
Phusion Polymerase						
	98 (1 min)	35	98 °C (30 s)	53.5 (1 min)	72 (1 min)	72 °C (10 min)

جدول ۵: مدل‌های تکاملی انتخابی برای تحلیل BI، اختصاصات توالی‌ها و اطلاعات آماری تحلیل بیشینه صرفه‌جویی بر اساس نشانگر ITS بر روی سرده *Linaria*

	ITS
Number of accessions	140
AIC model choice	GTR+I+G
Aligned length (bp)	660
Parsimony-informative characters (bp)	217
Consistency index	0.506
Retention index	0.869
Tree length	983

شکل ۱: درخت تبارزایی حاصل از استنباط بیزی داده‌های ITS سرده *Linaria*. اعداد پایین شاخه‌ها نشان‌دهنده بوت‌استرپ در تحلیل بیشینه صرفه‌جویی و اعداد بالای شاخه‌ها نشان‌دهنده احتمال پسین در استنباط بیزی است که بر روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده‌اند.

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده، *Linaria* s.l. یک گروه تک‌تبار در طایفه Antirrhineae است. تک‌تبار بودن سرده *Linaria* بر اساس صفات مولکولی، برای نخستین بار توسط وارگاس و همکارانش [۲۱] با مطالعه هشت گونه از سرده *Linaria* به نمایندگی از هفت بخشه رده‌بندی ساتن [۱۶] پیشنهاد شد. همچنین تک‌تبار بودن این سرده توسط فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] با مطالعه ۹۷ گونه و رحمانی و همکارانش [۳۳] با مطالعه ۳۷ گونه بر اساس ITS، گوزمن و همکارانش [۳۴] با مطالعه ۴۲ گونه بر اساس ITS و *ndh*F و رحمانی و همکارانش [۲۳] با مطالعه ۷۰ گونه بر اساس *rpl32-trnL* اثبات شده است.

علاوه بر این، تک‌تبار بودن سرده *Linaria* بر اساس ویژگی‌های دیگری چون عدد کروموزومی پایه x=6 و یک سری از خصوصیات ریخت‌شناسی که در هیچ سرده دیگری در طایفه Antirrhineae یافت نمی‌شود مثل حضور ساقه‌های زیرلپه‌ای، برگ‌های کامل بی‌دمبرگ با رگبندی پنجه‌ای، گل‌آذین خوشه و گل‌های مهمیزدار نیز حمایت شده‌است [۱۵ و ۱۶].

در رابطه با رده‌بندی فروسرده‌ای *Linaria*، در درخت گونه‌ای ما هفت شاخه اصلی به شرح زیر وجود دارد:

شاخه *Macrocentrum*

در قسمت بیرونی شاخه‌های اصلی، گونه *L. chalepensis* مدیترانه‌ای به عنوان نماینده بخشه دو گونه‌ای *Macrocentrum* قاعده‌ای‌ترین درجه سرده *Linaria* را تشکیل داده است، که این امر مدیترانه‌ای بودن خاستگاه سرده را پیشنهاد می‌کند.

اعضای بخشه *Macrocentrum* (*L. chalepensis* و *L. armeniaca*) دارای یک سری ویژگی‌های غیر عادی هستند که در سرده *Linaria* منحصربه‌فرد یا نادر است؛ به این صورت که در این گونه‌ها لوب پشتی کاسبرگ کوتاه‌تر از چهار لوب شکمی است. این ویژگی باعث شد ساتن [۱۶] این دو گونه را از بخشه *Versicolores* جدا کند (این گونه‌ها قبلاً توسط بنتام [۱۳] در بخشه *Versicolores* قرار می‌گرفتند). ویژگی ذکر شده در هیچ یک از گونه‌های سرده *Linaria* یافت نمی‌شود اما در سرده *Holzneria* که بر اساس اطلاعات تبارزایی DNA هسته‌ای و کلروپلاستی خویشاوند نزدیک سرده *Linaria* است [۳۵] نیز دیده می‌شود. دومین ویژگی وجود ضمائم کوچک جانبی در قاعده میله بساک است که یک ویژگی منحصربه‌فرد درون طایفه Antirrhineae است و سومین ویژگی داشتن دانه‌هایی با شش شیار طولی است که در سایر بخشه‌های *Linaria* دیده نمی‌شود.

تک‌تبار بودن این گروه توسط رحمانی و همکارانش [۳۳] و فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] با استفاده از توالی‌های ITS و رحمانی و همکارانش [۲۳] با استفاده از توالی‌های *rpl32*، حمایت شده است.

شاخه *Pelisserianae*

دومین درجه قاعده‌ای سرده *Linaria*، نماینده بخشه *Pelisserianae* است. تک‌تبار بودن این بخشه کوچک، همچنین، در مطالعات تبارزایی مولکولی قبلی *Linaria* مانند رحمانی و همکارانش [۲۳]، فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] و رحمانی و همکارانش [۳۳] حمایت شده است. بخشه *Pelisserianae* شامل دو گونه *L. triornithophora* و *L. pelisseriana* است که بواسطه داشتن خصوصیات متفاوتی چون حالت، اندازه، و شکل گل‌ها و برگ‌ها از بقیه گونه‌های سرده *Linaria* متمایز است. این گونه‌ها قبلاً توسط بنتام [۱۳] در بخشه *Grandes* (=بخشه *Linaria*) قرار می‌گرفتند، اما وتشتاین [۱۴] آن‌ها را به بخشه *Arvenses* انتقال داد. والدز [۱۵] نخستین کسی بود که این گونه‌ها را بر اساس ریخت‌شناسی و ساختار دانه و پوشینه مجدداً جدا کرد و بخشه *Pelisserianae* را با دو گونه ذکر شده بالا شرح داد. در حالی که دانه‌ها در سایر گونه‌های بال‌دار *Linaria* در جوانب فشرده شده‌اند، در گونه‌های *L. pelisseriana* و *L. triornithophora* به صورت پشتی شکمی فشرده شده‌اند [۱۶]. این الگوی عجیب نمو دانه در هیچ جای دیگری در سرده *Linaria* یافت نمی‌شود و به نظر می‌رسد که یک صفت پیشرفته مشترک برای بخشه *Pelisserianae* باشد.

شاخه *Lectoplectron*

N. texanus گروه خواهری بخشه *Pelisserianae* با حمایت شاخه‌ای بالا می‌باشد. از نظر ریخت‌شناسی، دانه‌های *Nuttallanthus* شیاردار هستند که این ویژگی تنها در

بخشه *Macrocentrum* دیده می‌شود. همچنین ریخت‌شناسی گل در *Nuttallanthus* تا حدودی شبیه به گونه‌های بخشه *Macrocentrum* و برخی از گونه‌های بخشه *Versicolores* است. بنابراین، ما بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و نتایج تبارزایی مولکولی، *Nuttallanthus* را به عنوان یک بخشه مجزا (*Lectoplectron*) پیشنهاد می‌کنیم. این موقعیت قبلاً هم توسط والدز [۱۵]، پنل [۱۸ و ۱۹] و فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] پیشنهاد شده بود. بنتام [۱۳] و وتشتاین [۱۴] این گونه‌ها را جزئی از بخشه *Versicolores* قرار داده بودند. اما ساتن [۱۶] این گونه‌های امریکایی را بر اساس داشتن دانه منشوری با چهار تا هفت شیار، لوب شکمی جام گل بسیار بزرگتر از لوب پشتی، کام جام بسیار کم توسعه یافته و مهمیز بسیار کوچک یا عدم وجود مهمیز به عنوان سرده *Nuttallanthus* در نظر گرفت.

شاخه *Versicolores*

شاخه *Versicolores* یک شاخه تک‌تبار در سرده *Linaria* است. خود این شاخه شامل دو زیرشاخه *Versicolores* و *Elegantes* است. از نظر ریخت‌شناسی، اعضای بخشه *Versicolores* دارای خامه تقسیم شده با نواحی کلاله‌ای گسسته هستند [۱۶]. این ویژگی می‌تواند به عنوان صفت پیشرفته مشترک مورد توجه قرار بگیرد که در هیچ جای دیگری در سرده *Linaria* و حتی طایفه Antirrhineae وجود ندارد. در حالی که خامه دو شاخه در اکثر گونه‌های این بخشه دیده می‌شود اما فرو رفتگی کلاله در گونه‌های *L. nigricans* و *L. elegans* کم عمق‌تر است ویانو [۱۰ و ۱۱] این دو گونه را بر اساس ریخت‌شناسی دانه و کلاله به عنوان یک بخشه مجزا در نظر گرفت، در حالی که ساتن [۱۶] آن‌ها را در بخشه *Versicolores* به عنوان زیر بخشه *Elegantes* قرار داد. طبیعی بودن بخشه *Versicolores*، بوسیله الگوی خاص تکوین دانه‌رست نیز حمایت شده است [۳۶]. تک‌تبار بودن این بخشه، همچنین، در مطالعات مولکولی قبلی سرده *Linaria* [۲۰، ۲۳ و ۳۳] حمایت شده‌است.

شاخه *Supinae*

شاخه *Supinae* یک شاخه تک‌تبار در سرده *Linaria* است. این بخشه شامل گیاهان یک‌ساله و چندساله است که از سایر بخشه‌های سرده *Linaria* بواسطه داشتن دانه‌های بال‌دار که از جوانب فشرده شده‌اند و درون پوشینه گرد به شکل افقی مرتب شده‌اند قابل تشخیص است [۱۶]. طبیعی بودن بخشه *Supinae* توسط بلانکو-پاستور و همکارانش [۳۷] با استفاده از ترکیب توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی حمایت شده است. با این وجود در سایر مطالعات مولکولی *Linaria* مانند رحمانی و همکارانش [۲۳]، رحمانی و همکارانش [۳۳] و فرناندز-مازوکوز و همکارانش [۲۰] تک‌تبار بودن این گروه حمایت نشده است. این شاخه در مطالعه بلانکو-پاستور و همکارانش [۳۷]، بر اساس ترکیب توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی، به سه زیرشاخه *Supinae*، *Arvenses* و *Saxatile* تقسیم شده است. همچنین والدز [۱۵] بر اساس اندازه جام‌گل و شکل بال دانه، *Arvenses* را به عنوان یک بخشه مجزا معرفی کرد و بقیه اعضای *Supinae* را بر اساس شکل زیستی و شکل بال دانه به دو زیربخشه Amethystea (گیاهان یک‌ساله با دانه‌هایی با بال ضخیم) و Saxatile (گیاهان یک‌ساله یا چندساله با دانه‌هایی با بال نازک) تقسیم کرد. ساتن [۱۶] نیز این بخشه را بر اساس شکل کاسبرگ در حالت میوه، شکل پوشینه، شکل دانه و ضخامت بال دانه به سه زیربخشه *Trimerocalyx* (کاسبرگ در حالت میوه سه بخشی؛ لوب شکمی به صورت یک دندانه کوچک بین دو لوب دیگر)، *Supinae* (کاسبرگ در حالت میوه پنج بخشی؛ لوب شکمی بیش از چهار برابر لوب‌های پشتی، پوشینه بیضی تا تخم‌مرغی و دانه صفحه‌ای و دارای بال ضخیم) و *Saxatile* (کاسبرگ در حالت میوه پنج بخشی، لوب شکمی بیش از چهار برابر لوب‌های پشتی، پوشینه کروی و دانه غیر صفحه‌ای با بال نازک) تقسیم کرده است. در مطالعه حاضر بر اساس توالی ITS جداسازی بخشه *Supinae* به زیر بخشه‌ها صورت نگرفت.

شاخه *Diffusae*

برای نخستین بار چاوانز [۱۲] بر اساس خصوصیات گل و برخی صفات رویشی اعضای بخشه *Diffusae* را به عنوان یک گروه غیر رسمی معرفی کرد. بنتام [۱۳] این گروه را رسمی و نام *Diffusae* را بدون مشخص کردن رتبه برای آن در نظر گرفت.

بعدها وتشتاین [۳۸] برای این گروه رتبه بخشه را در نظر گرفت. والدز [۱۵] پیشنهاد کرد که *Diffusae* یک گروه چندتبار است و ساتن [۱۶] آن را به عنوان یک گروه از گونه‌های غیر همگن معرفی کرد. در مطالعه ما برخی از گونه‌های بخشه *Diffusae* یک گروه تک‌تبار در سرده *Linaria* را تشکیل می‌دهند، در حالی که بقیه گونه‌ها در شاخه دیگری قرار گرفته‌اند (شاخه *Linaria*). هر دو گروه از گونه‌های غالباً یک‌ساله (به استثنای *L. decipiens*) با دانه‌های بال‌دار تشکیل شده‌اند. بنابراین تک‌تبار بودن بخشه *Diffusae* در مطالعه ما همانند مطالعات مولکولی قبلی سرده *Linaria*مانند رحمانی و همکارانش [۲۳]، رحمانی و همکارانش [۳۳] و فرناندز- مازوکوز و همکارانش [۲۰] حمایت نشده است. سه گونه بخشه *Diffusae* (*L. albifrons*، *L. flava*، *L. triphylla*) با حمایت شاخه‌ای بالا در شاخه *Linaria* قرار گرفته‌اند و از سایر گونه‌های این بخشه جدا شده‌اند. این سه گونه با داشتن سلول‌های پوسته دانه با دیواره عمودی برجسته و دیواره افقی فرورفته و بدون زگیل قابل تشخیص هستند. این در حالی است که در بقیه اعضای بخشه *Diffusae*، سلول‌های پوسته دانه دیواره عمودی اندکی برجسته تا فرورفته همراه با دیواره افقی محدب دارند که در سطح زگیل‌دار هستند [۱۶].

شاخه *Linaria*

همانند مطالعات تبارزایی مولکولی قبلی سرده *Linaria*، مانند رحمانی و همکارانش [۲۳]، رحمانی و همکارانش [۳۳] و فرناندز-مازوکوزو همکارانش [۲۰]، نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که اعضای بخشه‌های *Linaria*، *Speciosae* و برخی از گونه‌های بخشه *Diffusae* یک شاخه تک‌تبار را تشکیل می‌دهند. گونه‌های بخشه *Diffusae* و *Speciosae* شباهت‌هایی مانند دانه‌های بدون بال، لوب پشتی کاهش نیافته کاسبرگ و خامه ساده دارند. علی‌رغم این شباهت‌ها، اعضای بخشه *Diffusae* اساساً گیاهانی یک‌ساله با ساقه‌های زایای بالارونده یا خوابیده روی زمین هستند، در حالی که اعضای بخشه *Speciosae* گیاهانی چندساله با ساقه‌های زایای ایستاده هستند.همچنین، شباهت‌های ریخت‌شناسی در خصوصیات شکل رویشی، ساقه، برگ، گل، و پوشینه در بخشه‌های *Linaria* و *Speciosae* وجود دارد که ساتن [۱۶] به آن‌ها اشاره کرده است. به علاوه دورگه‌های فراوان بین گونه‌های این دو بخشه شاهد دیگری است که نشان دهنده خویشاوندی نزدیک این دو گروه می‌باشد [۱۶]. تفاوت اصلی بین بخشه‌های *Linaria* و *Speciosae* حضور دانه‌های بال‌دار در بخشه *Linaria* و دانه‌های بدون بال در بخشه *Speciosae* است. به طور کلی به نظر می‌رسد که این دو بخشه با هم خویشاوندی نزدیکی دارند، و تحلیل‌های تبارزایی ارائه شده در این مطالعه و مطالعات قبلی [۸، ۲۰ و ۳۳] نیز شواهد کافی برای حل کردن ارتباطات بین این آرایه‌ها را فراهم نمی‌کند.

در کل سرده *Linaria* s.l. از جنبه آرایه‌شناسی بسیار پیچیده است، زیرا تعداد ویژگی‌های ارزشمند ریخت‌شناسی که در رده‌بندی آن به کار آید، بسیار کم است. مشکل اصلی این سرده این است که برخی بخشه‌های معرفی شده برای آن تک‌تبار نیستند و تعیین گروه‌های طبیعی در درون سرده نیز همچنان در هاله‌ای از ابهام قرار دارد و در انتظار بازسازی اساسی بر پایه داده‌های مولکولی است. بخشه‌های *Macrocentrum*، *Lectoplectron*، *Pelisserianae*، *Versicolores* و *Supinae* تک‌تبار هستند. لازم است که یک مفهوم جدید برای بخشه *Diffusae* با محدود کردن آن تنها به گونه‌های یک‌ساله با دانه‌های بدون بال که سلول‌های پوسته دانه آن‌ها دیواره عمودی اندکی برجسته تا فرورفته همراه با دیواره افقی محدب دارند و در سطح زگیل‌دار هستند، پیشنهاد گردد. اصلاح اساسی باید برای بخشه *Linaria* با توسعه دادن آن جهت در بر گرفتن گونه‌های بخشه *Speciosae* و برخی از گونه‌های بخشه *Diffusae* اعمال گردد. بر اساس مطالعات ما همانند مطالعات تبارزایی مولکولی قبلی بخشه *Versicolores* را می‌توان به زیر بخشه‌هایی تقسیم کرد، اما به دلیل حمایت شاخه‌ای پایین و محدودیت صفات ریخت‌شناسی واضح، چنین تقسیم‌بندی‌ای را نمی‌توان برای بخشه بزرگ *Linaria* انجام داد.

در این مطالعه، روابط بین گونه‌ای در درخت تکاملی حاصل از داده‌های مولکولی تا حد زیادی حل نشده باقی مانده، که این امر نشان‌دهنده این است که نشانگر استفاده شده در این پژوهش، تنوع ژنتیکی کافی نداشته است. بنابراین بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی دیگر به همراه افزودن نشانگرهای کلروپلاستی کارآمد و

همچنین استفاده از ژن‌های تک‌نسخه و یا کم‌نسخه هسته‌ای ممکن است تا اندازه‌ای سبب بهبود روابط درون سرده‌ای شود. چنانچه مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که برای ساخت درخت‌های تکاملی استفاده از ترکیب داده‌های کلروپلاستی و هسته‌ای مناسب تر است [۳۹ و ۴۰].

منابع

[1] Segarra JG, Mateu I. Levels of allozyme diversity in closely related Toadflaxes (*Linaria*, Plantaginaceae) and their correspondence with the breeding systems of the species. Conserv Genet 2007; 8: 373-383

[2] Albach DC, Martinez- Oetega MM, Fisher MA and Chase MW. A new classification of the tribe Veroniceae, problems and a possible solution. Taxon 2004; 53: 429-452

[3] An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot J Linn Soc 2003; 141: 399-43.

[4] Davis PH, *Linaria* Mill. In: Davis, PH, editores. Flora of Turkey and east Aegean islands. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1978. P 654-672

[5] Rocio J, Inmaculada F, Pastor J. Morphological and anatomical studies of *Linaria* species from south-west Spain: fruits. Ann Bot 1999; 84: 21-31

[6] Segarra JG, Mateu I. Taxonomic study of *Linaria depauperata* and *L. supina* complexes in eastern Spain. Ann Bot 2001; 87: 157-177

[7] Hong DY. The distribution of Scrophulariaceae in the holarctic with special reference to the floristic relationships between eastern Asia and eastern north America. Ann Missouri Bot Gard 1983; 70: 701-712

[8] Dumortier B. Florula Belgica. Tournaic; 1827

[9] Boissier E. Flora orientalis. Geneva: AH Georg; 1879

[10] Viano J. Les linaires a` graines apte`res du bassin me´diterrane´en occidental. 1. Linaria sect. Versicolores. Candollea 1978a; 33: 33-88

[11] Viano J. Les Linaires a` graines apte`res du bassin me´diterrane´en occidental. 2. *Linaria* sect. *Elegantes*, *Bipunctatae*, *Diffusae*, *Speciosae*, *Repentes*. Candollea 1978b; 33: 209-267

[12] Chavannes E. Monographie des Antirrhinees. Paris: Lausanne; 1833

[13] Bentham G, Ordo CXLII Scrophulariaceae. In de Candolle A, editor. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. Paris: Victoris Masson; 1846. P 186-586

[14] Wettstein R, Scrophulariaceae. In Engler A, Prantl K, editors. Die natürlichen Pflanzenfamilien. Wilhelm Engelmann: Leipzig; 1895. P 39-107

[15] Valdes B. Revision de las especies europeas de *Linaria* con semillas aladas. Seville: Universidad de Sevilla; 1970a

[16] Sutton DA. A revision of the tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae). Oxford: oxford university press; 1988

[17] Desfontaines R. Flora atlantica. Paris: LG Desgranges; 1798

[18] Pennell FW. Scrophulariaceae of the local flora. Torreya 1919; 19: 143-152

[19] Pennell FW. The Scrophulariaceae of eastern temperate north America. Acad Nat Sci Phila Monogr 1935;1: 1-650

[20] Fernández-Mazuecos M, Blanco- Pastor JL, Vargas P. A phylogeny of Toadflaxes (*Linaria* Mill.) based on nuclear internal transcribed spacer sequences: systematic and evolutionary consequences. Int J Plant Sci 2013b; 174 (2): 234-249

[21] Vargas P, Rossello JA, Oyama R, Guemes, J. Molecular Evidence for naturalness of genera in the tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae) and three independent evolutionary lineages from the New World and the Old. Plant Syst Evol 2004; 249: 151-172

[22] Posada D. JModelTest: phylogenetic model averaging. Molec Biol Evol 2008; 25: 1253-1256

[23] Rahmani A, Nejadsattari T, Hamdi MM, Mehregan I, Assadi M. Phylogenetic study of *Linaria* (Plantaginaceae) based on chloroplastic DNA sequences from Iran. New Cell Mol Biotechnol J 2015; 5 (17): 41-50

[24] Podlech D, Iranshahr M, Scrophulariaceae III: tribe Antirrhineae. In: Rechinger KH, editores. Flora Iranica. Vienna; 2005. Vol. 179

[25] Raman S. The trichomes on the corolla of the Scrophulariaceae-VII. tribe Cheloneae. Beitr Biol Pftanzen 1990; 65: 223-234

[26] Vargas P, Baldwin BG, Constance L. Nuclear ribosomal DNA evidence for a western north American origin of Hawaiian and south American species of Sanicula (Apiaceae). Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1998; 95: 235-240

[27] White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T, editors. PCR protocols, A guide to methods and applications. Academic Press; 1990. P 315-322

[28] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 1999; 41: 95-98

[29] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 2004; 32: 1792-1797
[30] Maddison WP. Gene trees in species trees. Syst Biol 1997; 46: 523-536
[31] Rambaut A. FigTree V1. 3.1: Tree figure drawing tool. 2009; Available from: http://tree. bio. ed. ac. uk/software/figtree
[32] Stöver BC, Müller KF. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC bioinformatics 2010; 11, Available from: http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/7
[33] Rahmani A, Nejadsatari T, Hamdi MM, Mehregan I, Assadi M. A phylogenetic analysis of *Linaria* (Plantaginaceae) species from Iran based on ITS sequence data. Eur J Exp Biol 2014; 4 (3): 127-134
[34] Guzmán B, Gomez JM, Vargas, P. Bees and evolution of occluded corollas in Snapdragons and relatives (Antirrhineae). Plant Ecol Evol Syst 2015; 17: 467-475
[35] Yousefi N, Zarre SH, Heubl G. Molecular phylogeny of the mainly Mediterranean genera *Chaenorhinum*, *Kickxia* and *Nanorrhinum* (Plantaginaceae, tribe Antirrhineae), with focus on taxa in the flora Iranica region. Nordic J Bot 2016; 34: 455-463
[36] Champagnat M. Recherches de morphologie descriptive et experimentale sur le genre *Linaria*. Ann Sci Nat (Bot) 1961; 12: 1-170
[37] Blanco-Pastor JL, Vargas P, Pfeil BE. Coalescent simulations reveal hybridization and incomplete lineage sorting in Mediterranean *Linaria*. PLoS ONE 2012; 7 (6): e39089
[38] Wettstein R, Scrophulariaceae. In Engler A, Prantl K, editors. Die natürlichen pflanzenfamilien. Wilhelm Engelmann: Leipzig; 1891. P 39-107
[39] Zhang X, Deng T, Moore MJ, Ji Y, Lin N, Zhang H. Plastome phylogenomics of Saussurea (Asteraceae: Cardueae). BMC Plant Biol 2019; 19 (1):1-10
[40] Xiao TW, Xu Y, Jin L, Liu TJ, Yan HF, Ge XJ. Conficting phylogenetic signals in plastomes of the tribe Laureae (Lauraceae). Peer J 2020; 8: e10155

Molecular phylogeny of *Linaria* (Plantaginaceae) based on nuclear ribosomal (ITS) sequences

Yousefi Mahmood N.*

Department of Microbiology, Faculty of Science, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

* (Corresponding author): nafiyousefi@yahoo.com

Received: February 2022 Accepted: September.2022

Abstract

Linaria Mill.with 150 spp. constitutes the largest genus of the tribe Antirrhineae. This genus clearly has the main challenges in the normal classification and so needs to more serious and complete research. The goal of this research is trying to solve existing problem using molecular systematic tool. In this research, a phylogenetic analysis of representatives from *Linaria* has been presented based on nuclear ribosomal (ITS) sequences. From Maximum Parsimony and Bayesian analyses nearly congruent trees are produced. Our results indicate that *Linaria-Nuttallanthus* is monophyletic group and comprising of seven sections of *Pelisserianae, Lectoplectron, Macrocentrum*, *Versicolores, Supinae, Diffusae* and *Linaria*. *Linaria* is expanded to include sect. *Speciosae* and some members of sect. *Diffusae*. It is necessary to propose a new concept for sect. *Diffusae* by restricting it only to those annual species with wingless seeds that are covered by testa cells with slightly elevated to sunken anticlinal walls plus convex periclinal walls papillate on surface.

Keywords: Plantaginaceae, *Linaria*, *Nuttallanthus*, nr DNA ITS.