

بررسی تنوع DNA کلروپلاستی و روابط فیلوژنتیکی میان ۲۸ گونه درمنه ایران

الهه احدی دولت‌سرا^۱، سید علی رضا سلامی^{۲*}، مجید شکرپور^۳، محمدرضا نقوی^۴ و ابوذر سورنی^۵

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، استادیار، استاد و دانشجوی سابق دکتری،

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۰/۲۱)

چکیده

۳۴ گونه از جنس درمنه در ایران گزارش شده است که از لحاظ پراکنش، تراکم و پوشش مهم‌ترین جنس‌های گیاهی در کشور محسوب می‌شوند. از آنجا که هنوز سیستم کلی و جامعی برای طبقه‌بندی و فیلوژنی آن ارائه نشده است، در این پژوهش سعی شد تا با بررسی تنوع کلروپلاستی و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های درمنه و مقایسه آن‌ها با گونه‌های دیگر موجود در جهان، مسیر تکاملی آن‌ها شناسایی و قرابت ژنتیکی آن‌ها مشخص شود تا از این طریق بتوان کمکی به حفظ این گنجینه ارزشمند ژنتیکی کرد. در این پژوهش چندشکلی در مناطق غیر کدشونده دی.ان.ا. کلروپلاستی در ۲۸ گونه درمنه ایران مطالعه شد. ابتدا، ۱۳ جفت آغازگر عمومی دی.ان.ا. کلروپلاستی برای تکثیر بررسی شد و با توجه به درجه تکثیر آغازگرها، شش جفت آغازگر (PB, BD, Ic2, CS, trnL-F, B2B3) برای مطالعه نهایی انتخاب شد. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط سه آنزیم برشی MseI و TaqI و EcoRI هضم شدند در نتیجه از ۱۴ ترکیب آغازگر-آنزیم استفاده شده، ۱۰ ترکیب حالت چندشکلی نشان دادند. نتایج نشان داد *A. melanolepis*, *A. austriaca*, *A. incana*, *A. armeniaca* و *A. tournifortiana* و *A. turanica*, *A. oliveriana* از الگوی نواری متفاوت تری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار بودند. قرارگیری این گونه‌ها در گروه‌های هاپلوئیدی خاص به صورت منفرد نشان می‌دهد که این دسته از گونه‌های درمنه واگرایی بیشتری در بخش ژنوم کلروپلاست نسبت به سایر گونه‌ها دارند. نتایج حاصل از توالی‌یابی ناحیه trnL-F پس از تجزیه تبار زایشی نهایی براساس ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌شده و به روش ماکزیمم پارسیمونی و بیشترین شانس برای بررسی روابط فیلوژنتیکی استفاده شد. نتایج آنالیز پارسیمونی اطلاعات ناحیه trnL-F توپولوژی مشابهی را نسبت به گونه‌ها و دودمان بررسی شده در دیگر مطالعات نشان داد. نتایج نشان داد که دو گونه *A. turanica* و *A. spicigera* فاصله زیادی با دیگر گونه‌های درمنه دارند. این مطالعه آشکارا مشخص کرد که ناحیه trnL-F دی.ان.ا. کلروپلاستی به‌تنهایی در این سطح مفید نیست و نیاز است برای بررسی‌های تکمیلی آینده از ناحیه‌های جدید ژنوم استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آنالیز پارسیمونی، تنوع کلروپلاستی، درمنه، روابط فیلوژنتیکی، ناحیه trnL-F.

مقدمه

در میان تیره‌های گیاهی، تیره گل کاسنی (Compositae) به‌علت داشتن گونه‌هایی با صفات و اختصاصات مهم دارویی و غذایی از اهمیت وافری برخوردارند. در ایران تا کنون ۳۴ گونه درمنه جمع‌آوری شده است. شناسایی مورفولوژیکی گیاهان این جنس دشوار است. این موضوع به‌ویژه در بهار زمانی که برای مصارف دارویی جمع‌آوری می‌شوند، حائز اهمیت است. به‌علاوه برگ‌ها بسته به ناحیه گیاه و مرحله نمو بسیار متفاوت‌اند (Kazemi et al., 2009). تاکنون مطالعات زیادی در خصوص ارزیابی صفات مورفولوژیک، فیلوژنی، سیتوژنتیک و ارزیابی مولکولی با نشانگرهای ژنتیکی مختلف گونه‌های جنس درمنه انجام شده است اما هیچ اطلاعاتی درخصوص بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی گونه‌های درمنه ایران با استفاده از روش PCR-RFLP وجود ندارد.

از آنجا که کشور ایران ژرم‌پلاسم بسیار غنی دارد، در این پژوهش سعی شده است با بررسی تنوع کلروپلاستی و روابط فیلوژنتیکی گونه‌های درمنه و مقایسه آن‌ها با گونه‌های دیگر موجود در جهان مسیر تکاملی آن‌ها با شناسایی و قرابت ژنتیکی آن‌ها مشخص شود و در صورت امکان فرم‌های هاپلوتایپی خاص برای برخی گونه‌های ایران شناسایی شود تا از این طریق بتوان کمکی به حفظ این گنجینه ارزشمند ژنتیکی کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گونه‌ها و کشت آن‌ها

پس از تهیه بذر ۲۸ گونه مختلف درمنه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (جدول ۱)، کشت این بذور تحت شرایط مناسب گلخانه انجام شد. نمونه‌های برگ با استفاده از ازت مایع منجمد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج دی.ان.ا نگهداری شد.

استخراج دی.ان.ا

استخراج دی.ان.ا با استفاده از روش تغییر یافته Pirttila et al. (2001) (استفاده از زغال فعال در مرحله اضافه کردن بافر برای حذف ترکیبات فنلی و اسات پتاسیم در بین دو مرحله شست‌وشو با کلروفورم ایزوآمیل الکل) انجام گرفت. کمیت و کیفیت دی.ان.ا با استفاده از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ادرصد تعیین شد.

در دهه گذشته اجرای برنامه‌های کاربردی با استفاده از تکنیک‌های جدید مولکولی افزایش یافته است. نشانگرهای مولکولی کمک شایانی در شرح و توصیف واگرایی جمعیت (Avisé, 1994) و ساختار جمعیت (Hamza, 2005) به پژوهشگران کرده است، به‌طوری‌که استفاده از آن‌ها به‌سرعت در حال افزایش است. از جفت آغازگرهای طراحی شده از ژنوم کلروپلاستی می‌توان در تحقیقات ژنتیک مولکولی گیاهان، تکامل و بررسی‌های اکولوژیک بهره گرفت. ژنوم کلروپلاستی عمدتاً متشکل از SSC، LSC و توالی‌های تکراری معکوس است. با توجه به اینکه میزان حفاظت‌شدگی ناحیه LSC کمتر از نواحی دیگر ژنوم کلروپلاستی است، می‌توان از آن به‌منظور مطالعه سطوح پایین‌تر تاکسونومی در گیاهان استفاده کرد و بیشتر تمایل بر این است که از آغازگرهای طراحی شده بر مبنای این نواحی استفاده شود.

ناحیه trnL-F از نواحی مهم در ژنوم کلروپلاست است که در پژوهش‌های زیادی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی میان گونه‌های گیاهی استفاده شده است. سطح بالایی از مطالعات ارتباط میان سیانوباکتری‌ها، جلبک‌ها و گیاهان، در نتیجه ارزیابی تاریخچه تکاملی اینترون trnL (Borsch et al., 2003)، روابط نهان‌دانگان و همچنین تکامل مولکولی ناحیه trnL-F گیاهان را تحت پوشش قرار می‌دهد (Quandt et al., 2004). یکی از فضائل اینترون trnL و به‌طور کلی، گروه یک اینترون‌ها، ساختار موزاییک عناصر حفاظت‌شده (توالی راهنمای داخلی، P، Q، R و S) و عناصر ساختار دوم مشترک است که برای پیرایش صحیح و مناطق کمتر فشرده با اندازه متغیر پراکنده میان P، Q، R و S ضروری‌اند (Cech, 1990; Cech et al., 1994). تا کنون فعالیت خودپیرایشی اینترون trnL در گیاهان گزارش نشده است (Simon et al., 2003). فقدان فعالیت خودپیرایشی ممکن است منجر به کاهش محدودیت در واگرایی توالی اینترون شود، و نرخ واگرایی بالاتر توالی در پلاستید در مقایسه با سیانوباکتری‌ها را به همراه داشته باشد (Besendahl et al., 2000). از زمان معرفی آن توسط Taberlet et al. (1991)، اینترون trnL و ناحیه trnL-F برای پژوهش‌ها در سطوح مختلف طبقه‌بندی در نظر گرفته شده‌اند.

جدول ۱. اسامی گونه‌های درمنه بررسی شده (ترتیب شماره‌گذاری منطبق با ترتیب نمونه‌ها در الکتروفورز است) به همراه اطلاعات جغرافیایی، پراکنش و محل جمع‌آوری

ارتفاع	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	استان	نام گونه
۲۲۶۱	۴۴۰۶۲۶/۳	۳۹۲۲۴۲/۴	آذربایجان غربی	<i>Artemisia armeniaca</i>
۱۹۲۸	۴۴۴۱۵۴/۱	۳۸۴۰۳۵/۴	آذربایجان غربی	<i>A. incana</i>
۶۰۱	۵۳۰۰۳۱/۹	۳۶۰۷۱۷/۶	مازندران	<i>A. fragrans</i>
-	-	-	-	<i>A. austriaca</i>
۱۱۷۸	۵۳۰۰۲۳/۸	۳۵۵۶۵۷/۶	مازندران	<i>A. spicigera</i>
-	-	-	-	<i>A. haussknechtii</i>
-	-	-	-	<i>A. turcomanica</i>
۲۴۵۴	۵۲۰۶۵۴/۷	۳۵۵۲۴۴/۰	مازندران	<i>A. chamaemelifolia</i>
۱۵۴۳	۴۷۰۰۲۳/۱	۳۸۵۰۵۶/۹	آذربایجان شرقی	<i>A. marschalliana</i>
۱۰۳۷	۵۷۲۵۴۹/۴	۳۷۲۹۱۹/۰	خراسان	<i>A. kopetdaghensis</i>
۱۲۰۴	۵۸۰۵۸۴/۰	۳۶۰۲۱۴/۰	سمنان	<i>A. sieberi</i>
۱۲۹۳	۴۷۵۸۲۳/۶	۳۸۵۷۱۴/۹	اردبیل	<i>A. campestris</i>
۱۰۶۴	۴۷۴۹۱۶/۳	۳۷۲۱۰۱/۶	آذربایجان غربی	<i>A. scoparia</i>
۶۵۰	۵۵۵۳۵۶/۹	۳۷۴۴۲۲/۷	گلستان	<i>A. annua</i>
۶۵۳	۵۳۰۴۱۲/۲	۳۶۰۴۵۳/۴	مازندران	<i>A. absinthium</i>
۲۴۵۴	۵۲۰۶۵۴/۷	۳۵۵۲۴۴/۰	مازندران	<i>A. vulgaris</i>
۱۹۱	۵۵۵۴۴۳/۵	۳۷۵۳۳۷/۴	گلستان	<i>A. diffusa</i>
-۱۷	۵۳۰۸۰۰/۱	۳۶۴۸۵۷/۶	مازندران	<i>A. tschernieviana</i>
۱۰۳۷	۵۷۲۵۴۹/۴	۳۷۲۹۱۹/۰	خراسان	<i>A. khorassanica</i>
-	-	-	-	<i>A. dracuncululus L</i>
-	-	-	-	<i>A. selengensis Turcz</i>
-	-	-	-	<i>A. capillaris</i>
۲۰۶۵	۵۵۲۰۴۰/۶	۳۶۴۹۱۳/۵	سمنان	<i>A. tournefortiana</i>
۱۲۵۶	۵۷۵۴۳۳/۸	۳۷۲۹۳۲/۴	خراسان	<i>A. turanica</i>
۱۰۳۳	۵۶۵۵۴۲/۶	۳۷۵۵۴۶/۳	خراسان	<i>A. oliveriana</i>
۳۵۵۵	۴۷۵۱۲۹/۰	۳۸۱۷۱۲/۱	اردبیل	<i>A. melanolepis</i>
۱۱۷۸	۵۳۰۰۲۳/۸	۳۵۵۶۵۷/۶	مازندران	<i>A. aucheri</i>
۱۰۳۷	۵۷۲۵۴۹/۴	۳۷۲۹۱۹/۰	خراسان	<i>A. ciniformis</i>

هر مخلوط واکنش پی.سی.آر شامل ۲۰ نانوگرم دی.ان.ا، دو میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۱۰X شرکت فرمنتاز، ۰/۸ میکرولیتر dNTPs، ۰/۶ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول، یک واحد آنزیم تک دی.ان.ا پلیمرز بود که در نهایت با اضافه کردن ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل حجم مخلوط واکنش پی.سی.آر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

آغازگر trnL-F

چرخه‌های حرارتی پی.سی.آر تکثیر اختصاصی با این جفت آغازگر به شرح زیر بود:

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (i-Cycler, BioRad Co., USA) انجام شد. از دی.ان.ا کلروپلاست که همراه با دی.ان.ا ژنومی در محلول دی.ان.ا به دست آمده وجود داشت، برای بررسی روابط بین ۲۸ گونه درمنه استفاده شد که توسط شش جفت آغازگر عمومی کلروپلاست (PB, BD, Ic2, CS,) (trnL-F, B2B3) تکثیر شدند. هفت جفت آغازگر دیگر (AS و B₁B₂, CD, SR, Sf_M, K2Q, OA) نیز بررسی شدند که رشته‌های تکثیرشده ویژگی‌های لازم برای انجام این بررسی را نداشتند، بدین صورت که یا اصلاً نواری تولید نمی‌کردند یا چند نوار ایجاد می‌کردند (جدول ۲).

مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه
در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم: شامل ۴۵ چرخه:
۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله سوم: بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

جدول ۲. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، اندازه قطعات تکثیرشده با آغازگرهای دی.ان.ا. کلروپلاستی در *Artemisia* spp.

نام آغازگر	توالی آغازگرها*	واکنش زنجیره‌ای پلیمرز		اندازه قطعه در گیاه تنباکو (برحسب bp)	درجه تکثیر**
		دمای اتصال (°C)	مدت زمان بسط (دقیقه)		
tmL-F	F: ATTTGAACTGGTGACACGAG R: CGAAATCGGTAGACGCTACG	۵۸/۵	۱	۹۵۴	++
CS	F: GGTCGTGACCAAGAAACCAC R: GGTTGGAATCCCTCTCTCTC	۵۸/۵	۲	۱۶۱۱	++
Ic ₂	F: GATGRCCCTCCATGGATTACCC R: GCGAGTTTTCAAGAAACTGCTCG	۵۳	۳	۲۲۰۸	++
BD	F: CTATCGTCCRACCGTTACWGAGGCT R: CAAAYGGATAYGCAGGTTACCC	۵۴	۳	۱۶۱۸	++
PB	F: ATAAWAAGAACTAGCAGGTT R: ATAYACCCAATGCCARATAG	۴۶/۵	۳	۱۶۱۸	++
B ₂ B ₃	F: CAGAAGCTTGGTCTAAAATTCC R: GRTCCCAAGGGAARGAATAACCAGT	۵۶	۳	۲۷۸۱	++
Sf _M	F: GAGAGAGAGGGATTGCAACC R: CATAACCTTGAGGTCACGGG	۶۲	۲	۱۲۵۴	NA
K2Q	F: TAAAAGCCGAGTACTCTACCGTTG R: CTATTCGGAGGTTTCAATCCTTCC	۴۷/۵	۳	۳۰۷۵	NA
OA	F: TGGCGATCAGAACYATATGGATAG R: CCCTCKGAAAACAAGAAGTT	۴۷/۵	۳	۲۴۴۹	NA
B ₁ B ₂	F: TGCCTTGGTATCGTGTTCATAC R: CYTGTCTTYTTGTAGTTGGAT	۴۷/۵	۳	۱۵۱۲	NA
CD	F: CCAGTTCAAATCTGGGTGTC R: GGGATTGTAGTTCAATTGGT	۵۸	۴	۳۱۶۷	NA
SR	F: CGCCGCTTTAGTCCACTCA R: ATTGCGTCCAATAGGATTGAA	۴۷/۵	۳	۱۸۱۴	NA
AS	F: ACTTCTGGTTCGGCGAACGAA R: AACCACCTCGGCCATCTCTCCTA	۵۸	۴	۳۶۸۱	NA

* F به معنی آغازگر رفت و R به معنی آغازگر برگشت است.

** NA: عدم تکثیر، ++ تکثیر عالی

هضم با حجم ۲۰ میکرولیتر توسط رنگ *GelRed* روی ژل آغاز ۳ درصد با شرایط ۷۰ ولت به مدت ۴ ساعت الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

آنالیز و بررسی داده‌ها

پس از انجام آزمایش‌های و عکس برداری از ژل‌ها برای بررسی چندشکلی بین نمونه‌ها فقط از محصولات هضم قطعات تکثیرشده‌ای که تفاوت داشتند استفاده شد. رتبه‌بندی نوارها برای تجزیه آماری به صورت صفر (نبودن نوار یا جایگاه برش) و یک (وجود نوار یا جایگاه برش) صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها براساس ضریب تشابه نی و لی (دایس^۱) به روش نیبر جویینگ^۲ انجام

آغازگرهای PB, BD, Ic2, CS, B2B3

چرخه‌های حرارتی پی.سی.آر تکثیر اختصاصی با این جفت آغازگرها به شرح زیر است:

مرحله اول: واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم: شامل ۳۲ چرخه: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و مرحله سوم: بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

هضم و برش قطعات تکثیرشده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط سه آنزیم محدودگر برشی *EcoRI*، *TaqI* و *HinfI* براساس دستورالعمل کارخانه تولیدکننده (فرمنتاز) صورت گرفت. به منظور بررسی الگوی برش، پس از هضم آنزیمی محصول *PCR*، مخلوط واکنش

1. Nei and Li/DICE
2. Neighbor Joining

برشی MseI و EcoRI و TaqI هضم شدند (شکل ۱) محصول هضم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آنزیم را نشان می‌دهد) و از ۱۴ ترکیب آغازگر- آنزیم استفاده شده، ۱۰ ترکیب حالت چندشکلی نشان دادند (جدول ۳). ترکیبات EcoRI-B₂B₃، TaqI-BD، CS-HinfI و CS-TaqI برش خوردند ولی حالت یک‌شکلی نشان دادند.

ارتباط ژنتیکی

از ۱۰ ترکیب آنزیم/آغازگر انتخابی که چندشکلی نشان دادند در کل ۷۷ نوار دی.ان.ا حاصل از هضم توسط آنزیم‌های برشی به دست آمد که از این تعداد، ۵۷ نوار (۶۳/۳ درصد) چندشکلی نشان دادند و ۱۳ نوار (۱۶/۸ درصد) یک‌شکل بودند. میانگین تعداد نوارهای تولیدشده توسط هر ترکیب ۷/۷ محاسبه شد. میانگین چندشکلی به دست آمده (۷۴ درصد) در الگوی نواری نسبتاً بالا بود. در بین ترکیب آنزیم/آغازگرها بیشترین نوار ایجادشده توسط ترکیب PB/HinfI با ۱۲ نوار ایجاد شد که ۱۱ عدد آن‌ها چندشکل بودند؛ و کمترین نوار تولیدشده مربوط به آغازگر B2B3/TaqI با ۲ نوار بود که هیچ‌یک از آن‌ها چندشکل نبودند (جدول ۳).

فاصله ژنتیکی دوه‌دو میان گونه‌ها از صفر میان گونه‌های *A. capillaris* و *A. dracunculus* L. تا ۰/۴۴۸ میان گونه‌های *A. tournefortiana* و *A. oliveriana* محاسبه شد (جدول ۴). درخت نیبر جوینینگ براساس ضریب نی و لی (دایس) ۲۸ گونه درمنه را در شش گروه جای داد که این شش گروه با پایداری ۱۰۰ به دو گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۲).

در گروه ۱ گونه‌های *A. incana*، *A. chamaemelifolla*، *A. marschalliana*، *A. austriaca*، *A. armeniaca* و *A. melanolepis* با میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۱۸۶ جای گرفتند. در واقع این هفت گونه را می‌توان به دو زیرگروه تقسیم کرد. *A. incana* به همراه *A. armeniaca* در ترکیباتی مانند *BD/Hinf I*، *PB/Hinf I*، *B2B3/Hinf I* در یک گروه هاپلوتایپی قرار داشتند که نشان‌دهنده ارتباط نزدیک این دو گونه است. *A. austriaca* در ترکیباتی از قبیل *B2B3/Hinf I*، *PB/TaqI* و *PB/EcorI* با دو گونه *A. incana* و *A. armeniaca* در یک گروه هاپلوتایپی قرار داشتند.

شد و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار تری فری نسخه ۱۰/۹/۱/۵۰ صورت پذیرفت.

نتایج حاصل از تکثیر پی.سی.آر ناحیه *trnL-F* برای توالی‌یابی به شرکت بایونیر^۲ فرستاده شد. پس از کانتینگ^۳ کردن قطعات توالی و بررسی پیک‌ها با استفاده از نرم‌افزار وکتور ان‌تی‌آی^۴ و حصول اطمینان از صحت نتایج، هم‌ردیفی چندگانه که در آنالیزهای فیلوژنتیک به فراوانی استفاده می‌شود با روش کلاستال دلبیو^۵ و با استفاده از نرم‌افزار دی.ان.ا استار^۶ نسخه ۵/۰۱ انجام شد. تجزیه تبارزایی نهایی براساس ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌شده با استفاده از نرم‌افزار پاپ^۷ نسخه ۴ و به روش ماکزیمم پارسیمونی^۸ (بیشترین صرفه‌جویی) و بیشترین درست‌نمایی^۹ برای بررسی روابط فیلوژنتیکی انجام گرفتند و در نهایت درخت توافقی با اجماع ۵۰ درصد به دست آمد. میزان حمایت هر شاخه بر روی درخت مطلق نیز با ۱۰۰ بار تکرار تعیین شد.

نتایج و بحث

الگوهای برش دی.ان.ا کلروپلاست

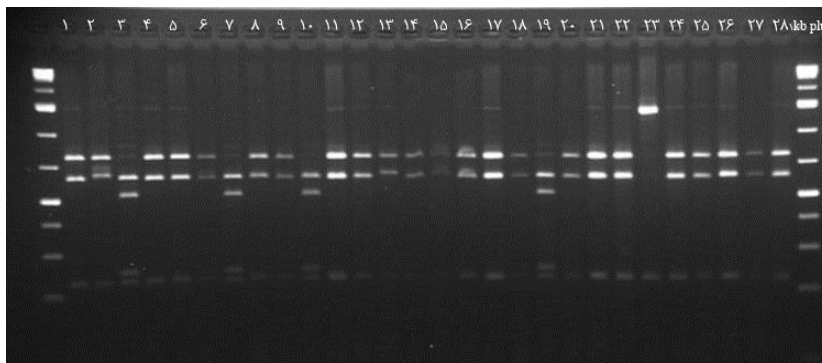
در این پژوهش چندشکلی در مناطق غیر کدشونده دی.ان.ا کلروپلاست در ۲۸ گونه درمنه ایران مطالعه شد. تعداد ۱۳ جفت آغازگر عمومی دی.ان.ا کلروپلاست برای تکثیر بررسی شد و با توجه به درجه تکثیر آغازگرها (جدول ۲)، شش جفت آغازگر (*trnL-F*، *CS*، *IC₂*، *BD*، *PB*) و *B₂B₃* برای این مطالعه انتخاب شد. تعداد هفت جفت آغازگر دیگر (*CD*، *SR*، *Sf_M*، *K2Q*، *OA*، *B₁B₂* و *AS*) چند نوار ایجاد می‌کردند یا اصلاً نواری تولید نکردند. بنابراین، ویژگی‌های لازم برای انجام این بررسی نداشتند و به همین دلایل از بررسی حذف شدند. اندازه تخمینی قطعات تکثیرشده با جفت آغازگرها *BD*، *CS*، *PB*، *trnL-F* و *IC₂* و *B2B3* به ترتیب ۱۶۵۰، ۱۷۰۰، ۲۷۰۰، ۸۷۰ و ۱۶۵۰ bp و ۲۸۰۰ bp بود.

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط سه آنزیم

1. TreeFree Ver. 0.9.1.50
2. BIONEER
3. ContigExpres
4. Vector NTI 10
5. ClustalW
6. DNASTar
7. Paup 4
8. Parsim
9. Maximom likelihood

A. turnifortiana در *A. turnifortiana* *EcoRI* و *A. melanolepis* در *PB/EcoRI* در گروه‌های هاپلوتایپی مشترک و مجزا قرار گرفتند.

A. turnifortiana و *A. melanolepis* در ترکیب *JC2/HinfI* در *A. melanolepis* *PB/HinfI* و *BD/HinfI* در *A. turnifortiana* و *A. melanolepis* در ترکیب *BD/* و *PB/TaqI*



شکل ۱. ژل حاصل از ترکیب *BD- EcoRI*. تصویر بالا نمونه شماره ۱-۲۸ (چاهک اول و آخر سایز مارکر 1Kb Plus)

جدول ۳. تعداد کل قطعات تکثیرشده و چندشکل برای هر ترکیب آنزیم/آغازگر

ردیف	ترکیب آنزیم/آغازگر	تعداد کل قطعات تکثیرشده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی
۱	BD/HinfI	۵	۳	۶۰
۲	PB/HinfI	۱۲	۱۱	۹۱/۶
۳	IC2/HinfI	۸	۲	۲۵
۴	B2B3/HinfI	۶	۲	۳۳/۳
۵	CS/TaqI	۱۰	۱۰	۱۰۰
۶	PB/TaqI	۸	۴	۵۰
۷	IC2/TaqI	۹	۷	۷۷/۷
۸	BD/TaqI	۸	۸	۱۰۰
۹	CS/EcoRI	۲	۱	۵۰
۱۰	PB/EcoRI	۹	۹	۱۰۰
	میانگین	۷/۷	۵/۷	٪۷۴
	جمع کل	۷۷	۵۷	-

A. haussknechtii را در گروه هاپلوتایپی جداگانه‌ای نسبت به سه گونه دیگر قرار داد. *A. oliveriana*، *A. ciniformis*، *A. turanica*، *A. khorassanica* و *A. aucheri* با میانگین فاصله ۰/۱۸۶ گروه چهار را تشکیل دادند. گروه پنجم گونه‌های *A. turcomanica*، *A. kopetdaghensis* و *A. fragrans* را با میانگین فاصله ۰/۱۶۲ در برداشت. گونه‌های *A. sieberi* و *A. spicigera* با میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۱۴۰ گروه شش را تشکیل دادند. در واقع بررسی روابط ژنتیکی میان ۲۸ درمنه توانست گروه‌های هاپلوتایپی حاصل از هر ترکیب را تأیید و در نهایت ۲۸ گونه را به شش گروه تقسیم کند.

گونه‌های *A. dracunculus*، *A. capillaris*، *A. diffusa*، *A. campestris* L.، *A. vulgaris* و *A. selengensis* Turcz. با میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۱۴۳ در گروه دوم جای گرفتند. این شش گونه در ۱۳ ترکیب در یک گروه هاپلوتایپی مشترک قرار داشتند. تنها ترکیب *B2B3/HinfI* بود که توانست *A. campestris*، *A. vulgaris* و *A. selengensis* را در یک گروه هاپلوتایپی (*D*) و سه گونه دیگر را در گروه هاپلوتایپی دیگری (*B*) قرار دهد. گروه سه با دربرداشتن گونه‌های *A. haussknechtii*، *A. absinthium*، *A. annua* و *A. scoparia* با میانگین فاصله ژنتیکی ۰/۱۶۶ را به خود اختصاص داد. تنها *PB/TaqI* بود که

جدول ۴. بخشی از ماتریس فاصله ۲۸ گونه درمنه با استفاده از ضریب تشابه نی و لی (دایس)

گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	
۱	۱/۰۰																		
۲	۰/۱۷۲	۱/۰۰																	
۳	۰/۳۲۲	۰/۱۹۳	۱/۰۰																
۴	۰/۱۰۷	۰/۱۴۲	۰/۲۳۳	۱/۰۰															
۵	۰/۳۳۳	۰/۱۹۲	۰/۰۸۱	۰/۲۳۶	۱/۰۰														
۶	۰/۳۰۰	۰/۱۶۶	۰/۱۲۵	۰/۲۰۶	۰/۱۱۸	۱/۰۰													
۷	۰/۳۲۲	۰/۲۵۴	۰/۰۴۷	۰/۲۲۸	۰/۱۳۷	۰/۱۴۷	۱/۰۰												
۸	۰/۲۴۱	۰/۱۳۷	۰/۰۹۶	۰/۱۴۲	۰/۰۸۷	۰/۰۶۶	۰/۱۱۸	۱/۰۰											
۹	۰/۲۷۵	۰/۱۷۲	۰/۱۲۹	۰/۱۷۸	۰/۱۲۲	۰/۱۰۰	۰/۱۸۶	۰/۰۶۸	۱/۰۰										
۱۰	۰/۳۳۳	۰/۲۳۳	۰/۰۳۱	۰/۲۴۱	۰/۱۱۸	۰/۱۲۹	۰/۰۱۶	۰/۱۳۳	۰/۱۶۶	۱/۰۰									
۱۱	۰/۳۳۳	۰/۱۹۲	۰/۰۸۱	۰/۲۳۶	۰/۰۷۱	۰/۱۱۸	۰/۱۳۷	۰/۰۸۷	۰/۱۲۲	۰/۱۱۸	۱/۰۰								
۱۲	۰/۲۷۵	۰/۱۳۷	۰/۰۹۶	۰/۱۷۸	۰/۰۸۷	۰/۰۶۶	۰/۱۵۲	۰/۰۳۴	۰/۰۶۸	۰/۱۳۳	۰/۰۸۷	۱/۰۰							
۱۳	۰/۲۹۸	۰/۱۲	۰/۱۱۴	۰/۲۰۰	۰/۱۰۷	۰/۰۵۰	۰/۱۳۷	۰/۰۵۲	۰/۰۸۷	۰/۱۱۸	۰/۱۰۷	۰/۰۵۲	۱/۰۰						
۱۴	۰/۲۷۵	۰/۱۳۷	۰/۰۹۶	۰/۱۷۸	۰/۰۸۷	۰/۰۳۳	۰/۱۱۸	۰/۰۳۴	۰/۰۶۸	۰/۱۰۰	۰/۰۸۷	۰/۰۳۴	۰/۰۱۷	۱/۰۰					
۱۵	۰/۳۹۲	۰/۲۵۰	۰/۲۰۰	۰/۲۹۶	۰/۲۰۰	۰/۱۳۷	۰/۲۲۸	۰/۱۴۲	۰/۱۷۸	۰/۲۰۶	۰/۲۰۰	۰/۱۴۲	۰/۱۲۷	۰/۱۰۷	۱/۰۰				
۱۶	۰/۳۱۰	۰/۱۷۲	۰/۱۲۹	۰/۲۱۴	۰/۱۲۲	۰/۱۰۰	۰/۱۸۶	۰/۰۶۸	۰/۱۰۳	۰/۱۶۶	۰/۱۲۲	۰/۰۳۴	۰/۰۸۷	۰/۰۶۸	۰/۱۴۲	۱/۰۰			
۱۷	۰/۳۲۱	۰/۱۷۸	۰/۱۳۳	۰/۲۲۲	۰/۱۲۷	۰/۱۰۳	۰/۱۹۲	۰/۰۷۱	۰/۱۰۷	۰/۱۷۲	۰/۰۵۴	۰/۰۷۱	۰/۰۹۰	۰/۰۷۱	۰/۱۴۸	۰/۰۷۱	۱/۰۰		

ادامه جدول ۴

گونه	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸
۱۹	۱/۰۰									
۲۰	۰/۲۰۰	۱/۰۰								
۲۱	۰/۲۳۳	۰/۰۳۴	۱/۰۰							
۲۲	۰/۲۰۰	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴	۱/۰۰						
۲۳	۰/۳۴۴	۰/۱۴۲	۰/۱۷۸	۰/۱۴۲	۱/۰۰					
۲۴	۰/۳۲۲	۰/۱۶۶	۰/۲۰۰	۰/۱۶۶	۰/۳۱۰	۱/۰۰				
۲۵	۰/۲۲۵	۰/۳۰۰	۰/۳۳۳	۰/۳۰۰	۰/۴۴۸	۰/۲۲۵	۱/۰۰			
۲۶	۰/۳۰۰	۰/۱۰۳	۰/۱۳۷	۰/۱۰۳	۰/۲۱۴	۰/۱۶۶	۰/۴۰۰	۱/۰۰		
۲۷	۰/۲۴۱	۰/۱۰۷	۰/۱۴۲	۰/۱۰۷	۰/۲۵۹	۰/۱۳۷	۰/۳۴۴	۰/۱۴۲	۱/۰۰	
۲۸	۰/۲۳۳	۰/۰۶۸	۰/۱۰۳	۰/۰۶۸	۰/۲۱۴	۰/۱۰۰	۰/۳۰۰	۰/۱۰۳	۰/۰۳۵	۱/۰۰

A. گونه‌های *A. tschermieviana* و *A. vulgaris*

A. ciniformis و *A. selengensis* Turcz نیز توانستند گروه‌های مستقلی را تشکیل دهند. با وجود این بررسی اطلاعات هاپلوتایپی توالی‌های هم‌ردیف‌شده ۲۸ گونه درمنه نتایج متفاوتی را در پی داشت.

الف) ۱۵ گروه هاپلوتایپی با تنوع هاپلوتایپی $Hd=0/867$ برای کل ناحیه *trnL-F* (جدول ۵).

ب) ۷ گروه هاپلوتایپی با تنوع $Hd=0/537$ ناحیه اینترون (جدول ۶).

ج) ۱۲ گروه با $Hd=0/751$ ناحیه فاصله (جدول ۷).

حاصل بررسی اطلاعات هاپلوتایپی توالی‌های

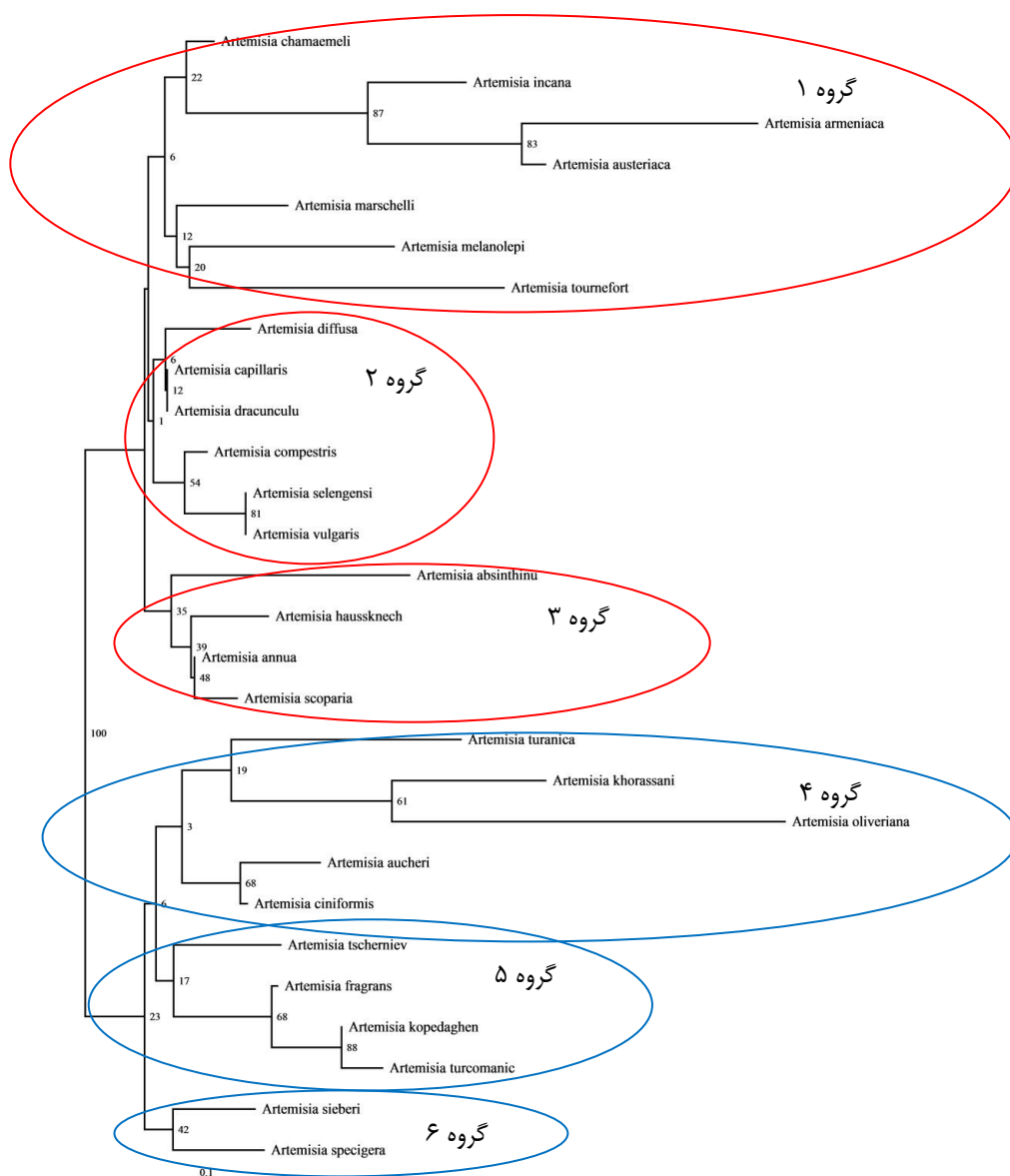
هم‌ردیف‌شده با استفاده از نرم‌افزار دی.ان.ا.اس.پ بود.

ارتباط فیلوژنتیکی

الگوی برش آنزیمی و تعیین هاپلوتایپ‌ها

حاصل برش توالی ناحیه *trnL-F* در ۲۸ گونه درمنه به‌وسیله آنزیم *HinfI* با نرم‌افزار ایپ^۱ به‌صورت شبیه‌سازی شده^۲، هشت گروه مجزا بود. الگوی برش با آنزیم *TaqI* توانست مانند آنزیم *HinfI* گونه‌ها را به هشت گروه هاپلوتایپی تقسیم کند. گونه‌های *A. armeniaca* و *A. austriaca* توانستند الگوی برشی متفاوتی را نسبت به سایر گونه‌ها ایجاد کنند که همین گروه هاپلوتایپی مستقل در ترکیب پنج آغازگر و سه آنزیم برشی نیز مشاهده می‌شود.

1. Ape
2. In silico



شکل ۲. درخت نیبر جوینینگ برای ۲۸ گونه درمنه براساس اطلاعات حاصل از PCR-RFLP. اعداد نزدیک هر گره شاخص ارزش پایداری^۱ را نشان می‌دهد.

متنوع است و بینش جدیدی را در میان تاریخچه تکاملی و زیست‌جغرافیایی این گونه‌ها فراهم می‌کند. نتایج آنالیز پارسیمونی اطلاعات ناحیه *trnL-F* توپولوژی مشابهی را نسبت به گونه‌ها و دودمان بررسی شده در دیگر مطالعات نشان داد. در درخت توافقی به دست آمده، تاکسون‌های درون گروه توده پلی‌تومی چندشاخه‌ای را تشکیل می‌دهند. از توالی هم‌ردیف‌شده ناحیه *trnL-F* ماتریسی به طول ۹۰۷ نوکلئوتید به دست آمد.

درخت توافقی بیشترین پارسیمونی هاپلوتایپ‌های ۲۸ گونه درمنه برای کل ناحیه *trnL-F* (شکل ۳) تفکیک و فاصله میان گروه‌های هاپلوتایپی ۱ و ۲ را با دیگر گروه‌ها نشان می‌دهد. این دو گروه دو گونه *A. absinthium* و *A. chamaemelifolia* را شامل می‌شوند که تمایز آن‌ها با دیگر گونه در رابطه ژنتیکی بررسی شده نیز مشخص است.

درخت فیلوژنی

مطالعه مولکولی گونه‌های درمنه دنیای قدیم و جدید کامل‌کننده ارزیابی فیلوژنی قبلی از این گروه بزرگ و

Serephidium تعلق دارند. مطالعه تشریحی برگ گونه‌های درمنه در ایران نشان می‌دهد این دو گونه از لحاظ شکل برگ به یک گروه تعلق دارند. اما در صفاتی از قبیل تقارن برگ، اندازه اپیدرم، شکل کرک‌ها و اندازه رگبرگ با یکدیگر و دیگر گونه‌های این زیرجنس تفاوت دارند (Noorbakhsh *et al.*, 2008).

درخت توافقی بیشترین پارسیمونی برای توالی ناحیه *trnL-F* برای ۱۰۶ گونه درمنه تفاوت گونه‌های ایران با سایر گونه‌های جهان (شکل ۵) را به‌وضوح نشان می‌دهد که بیانگر غنی‌بودن ذخیره ژنتیکی این گیاه در ایران است.

در نتیجه جست‌وجوی کاوش ابتکاری با استفاده از داده‌های ناحیه *trnL-F* ۹۷۲ درخت با بیشترین صرفه‌جویی و $CI=1$ ، $RI=1$ به دست آمد.

نتایج آنالیز پارسیمونی (شکل ۴) نشان می‌دهد که دو گونه *A. turanica* و *A. spicigera* فاصله زیادی با دیگر گونه‌های درمنه دارند. *A. turanica* در جایگاه‌های PB/HinfI و PB/TaqI گروه هاپلوتایپی متفاوتی را نشان داد. گروه شش هاپلوتایپی براساس توالی هم‌ردیف‌شده کل ناحیه *trnL-F* دو گونه *A. turanica* و *A. spicigera* را در خود جای دادند. این دو گونه به زیرجنس

جدول ۵. نتایج گروه‌بندی هاپلوتایپی براساس توالی هم‌ردیف‌شده کل ناحیه *trnL-F*

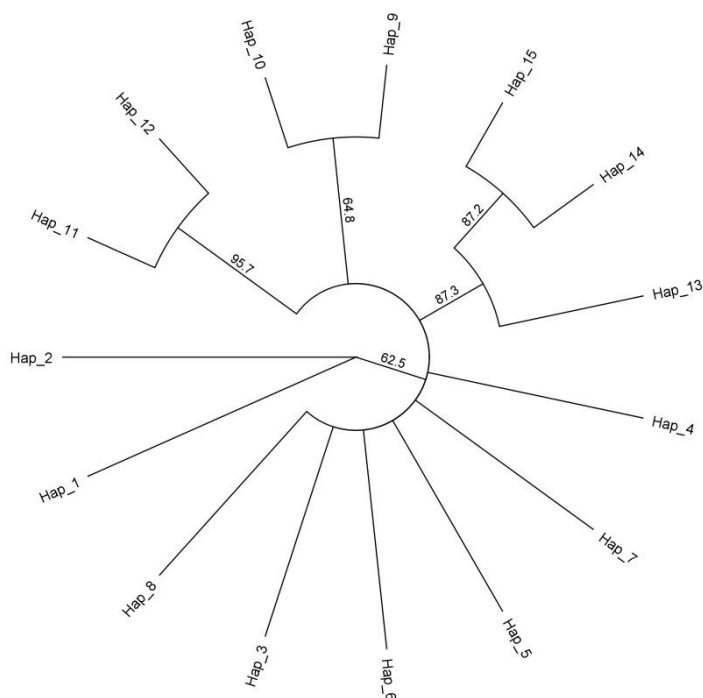
نام گونه	تعداد گونه در گروه هاپلوتایپی	هاپلوتایپ
<i>A. absinthium</i>	۱	۱
<i>A. chamaemelifolla</i>	۱	۲
<i>A. ciniformis</i>	۱	۳
<i>A. melanolepis</i>	۱	۴
<i>A. haussknecht</i>	۱	۵
<i>A. spicigera</i> - <i>A. turanica</i>	۲	۶
<i>A. campestris</i> - <i>A. incana</i> - <i>A. scoparia</i>	۳	۷
<i>A. kopedaghen</i> - <i>A. tournefort</i> - <i>A. aucheri</i> - <i>A. dracunculu</i> <i>A. turcomanic</i> - <i>A. oliveriana</i> - <i>A. khorassani</i> - <i>A. sieberi</i> - <i>A. annua</i> - <i>A. diffusa</i>	۱۰	۸
<i>A. armeniaca</i> - <i>A. austriaca</i>	۲	۹
<i>A. fragrans</i>	۱	۱۰
<i>A. selengensi</i>	۱	۱۱
<i>A. vulgaris</i>	۱	۱۲
<i>A. marschelli</i>	۱	۱۳
<i>A. capillaris</i>	۱	۱۴
<i>A. tscherniev</i>	۱	۱۵

جدول ۶. نتایج گروه‌بندی هاپلوتایپی براساس توالی هم‌ردیف‌شده ناحیه اینترون

نام گونه	تعداد گونه در گروه هاپلوتایپی	هاپلوتایپ
<i>A. armeniaca</i> - <i>A. incana</i>	۲	۱
<i>A. fragrans</i> - <i>A. austriaca</i> - <i>A. spicigera</i> - <i>A. haussknechtii</i> - <i>A. turcomanica</i> - <i>A. chamaemelifolla</i> - <i>A. marschalliana</i> - <i>A. kopetdaghensis</i> - <i>A. sieberi</i> - <i>A. campestris</i> - <i>A. scoparia</i> - <i>A. khorassanica</i> - <i>A. dracunculus</i> L - <i>A. selengensis</i> Turcz - <i>A. capillaris</i> - <i>A. tournefortiana</i> - <i>A. turanica</i> - <i>A. oliveriana</i> - <i>A. melanolepis</i>	۱۹	۲
<i>A. annua</i>	۱	۳
<i>A. absinthium</i>	۱	۴
<i>A. vulgaris</i> - <i>A. diffusa</i> - <i>A. tschernieviana</i>	۳	۵
<i>A. aucheri</i>	۱	۶
<i>A. ciniformis</i>	۱	۷

جدول ۷. نتایج گروه‌بندی هاپلوتایپی براساس توالی هم‌ردیف‌شده ناحیه فاصله

نام گونه	تعداد گونه در گروه هاپلوتایپی	هاپلوتایپ
<i>A. armeniaca</i> - <i>A. incana</i>	۲	۱
<i>A. fragrans</i> - <i>A. spicigera</i> - <i>A. haussknechtii</i> - <i>A. turcomanica</i> - <i>A. scoparia</i> - <i>A. annua</i> - <i>A. absinthium</i> - <i>A. vulgaris</i> - <i>A. diffusa</i> - <i>A. tschermieviana</i> - <i>A. khorassanica</i> - <i>A. dracuncululus</i> - <i>A. tournefortiana</i> - <i>A. melanolepis</i>	۱۴	۲
<i>A. austriaca</i>	۱	۳
<i>A. chamaemelifolla</i>	۱	۴
<i>A. marschalliana</i>	۱	۵
<i>A. kopetdaghensis</i> - <i>A. campestris</i>	۲	۶
<i>A. sieberi</i>	۱	۷
<i>A. selengensis</i> Turcz	۱	۸
<i>A. capillaris</i>	۱	۹
<i>A. turanica</i> - <i>A. oliveriana</i>	۲	۱۰
<i>A. aucheri</i>	۱	۱۱
<i>A. ciniformis</i>	۱	۱۲



شکل ۳. درخت توافقی بیشترین پارسیمونی هاپلوتایپ‌های ۲۸ گونه درمنه

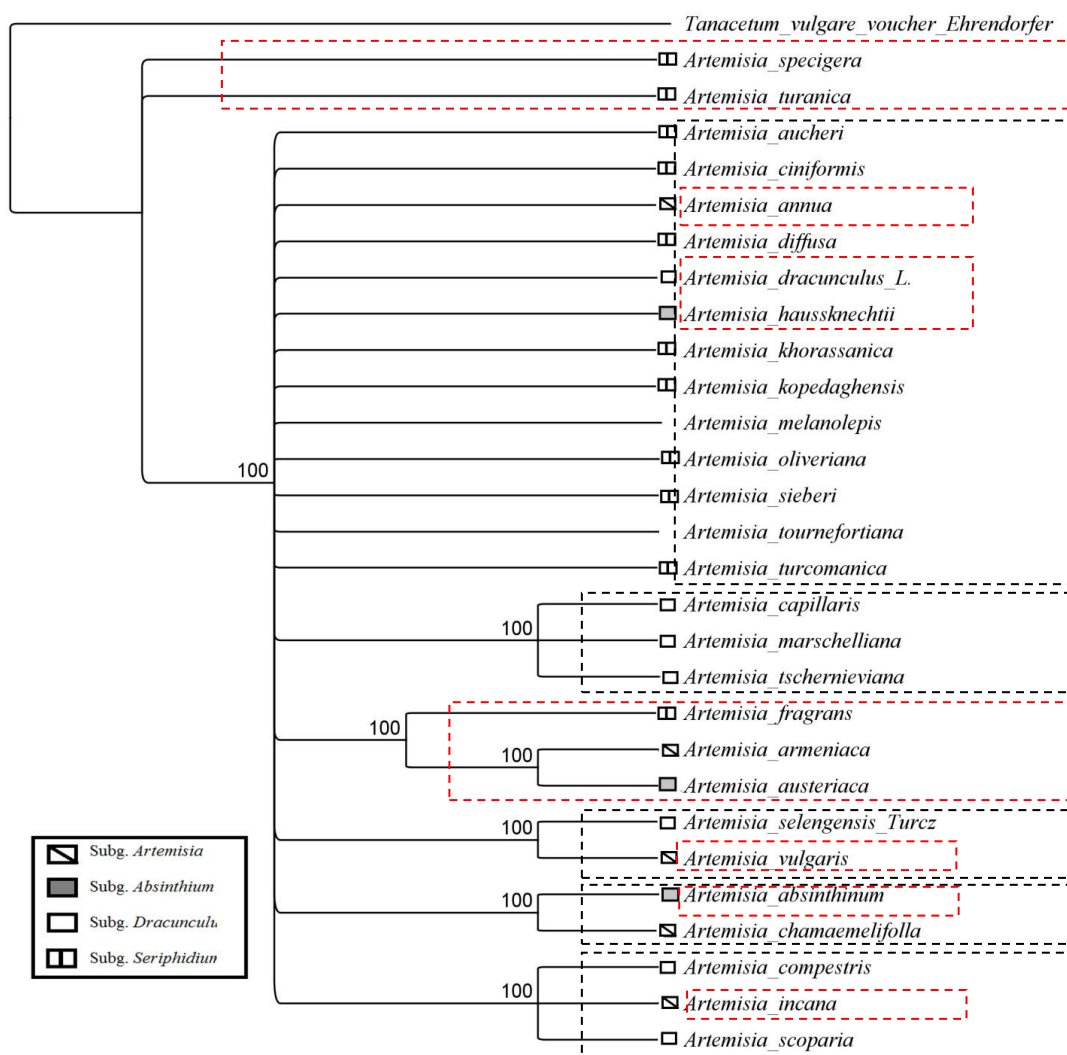
کلادهای خاصی تعلق دارند (*A. absinthium* و *A. vulgaris*) و توانستند خود را متفاوت از دیگر گونه‌ها نشان دهند. Lee *et al.* (2009) پیشنهاد دادند که گونه *A. absinthium* فاصله بیشتری از دیگر گونه‌های موجود در کشور کره دارد. اطلاعات ما تأیید می‌کند که گونه *A. absinthium* به همراه *A. chamaemelifolla* با پایداری ۱۰۰٪ از دیگر گونه‌های بررسی شده متفاوت است. با این

بر اساس صفات تشریحی، برخی گونه‌ها در کمپلکس‌هایی قرار می‌گیرند که از نظر ریخت‌شناسی نیز به هم نزدیک‌اند. گونه‌های کمپلکس‌های *A. aucheri* و *A. sieberi* متعلق به زیرجنس *Serephidium* صفات مشترکی دارند که ارتباط نزدیک بین آن‌ها را تأیید می‌کند (Noorbakhsh *et al.*, 2008). تعدادی از گونه‌های شناخته‌شده جهانی که به

زیرجنس در صفات ریخت‌شناسی از قبیل شکل مقطع برگ، شکل روزنه و شکل دیواره سلول تفاوت نشان می‌دهند (Noorbakhsh *et al.*, 2008). این دو گونه در گروه‌های هاپلوتایپی و الگوی آنزیم برشی تفاوت نشان دادند.

A. armeniaca *A. annua* *A. chamaemelifolla* و *A. vulgaris* چهار گونه متعلق به زیرجنس *Artemisia* هستند که در این مطالعه تفاوت چندانی را نسبت به هم نشان می‌دهند. نتایج گروه‌بندی هاپلوتایپی براساس توالی هم‌ردیف‌شده کل ناحیه *trnL-F* و الگوی قطعات برش‌خورده ناحیه *trnL-F* حاصل از آنزیم‌های محدودگر نشان‌دهنده تفاوت این چهار گونه است.

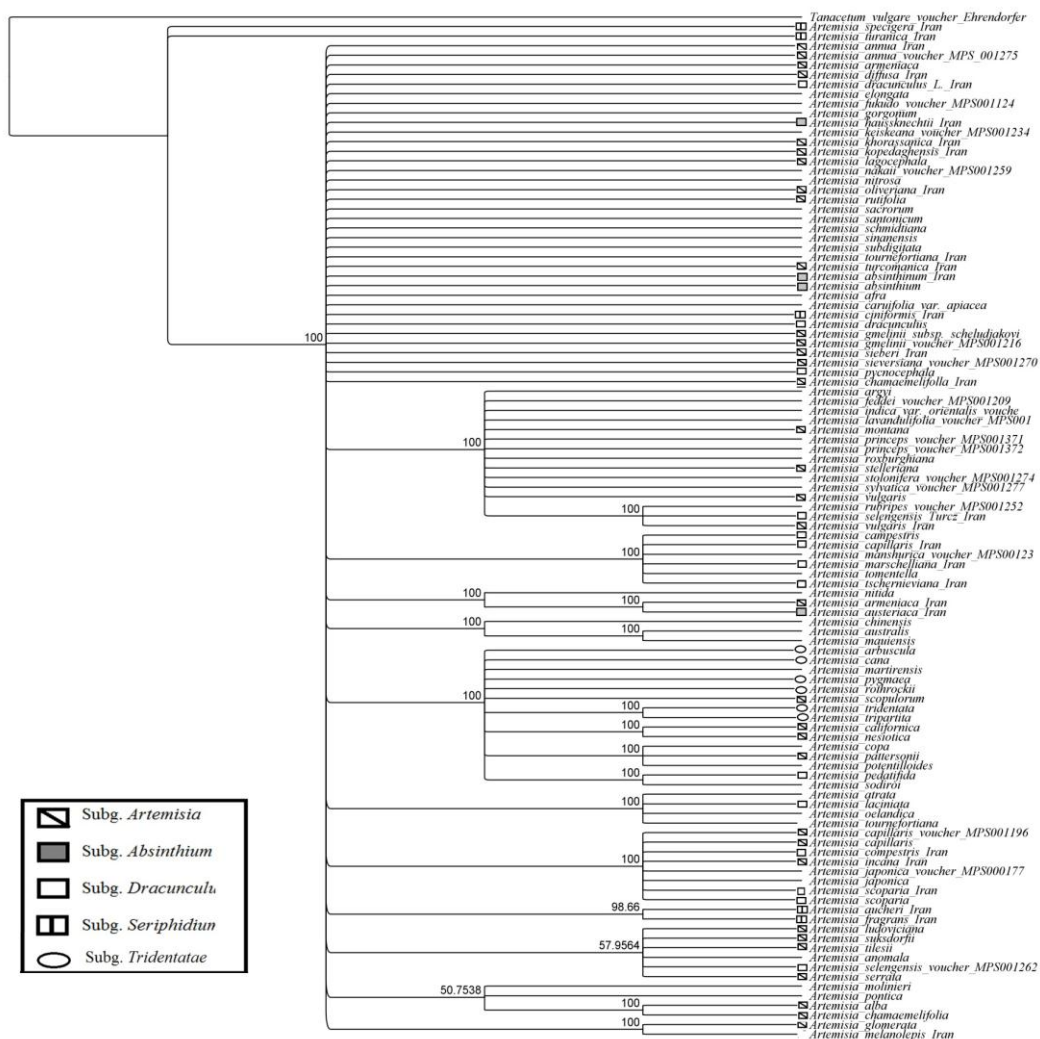
وجود این دو گونه در دیگر ژن‌های کلروپلاستی بررسی شده گروه‌های هاپلوتایپی مشابهی را نشان دادند اما گروه‌های هاپلوتایپی براساس توالی هم‌ردیف‌شده کل ناحیه *trnL-F* گویای فاصله این دو گونه از یکدیگر است. فلور آمریکا و نیز فلورهای دیگر جهانی گونه *A. absinthium* را متعلق به کلاد *A. absinthium* می‌دانند. بیشتر گونه‌های بازیافت‌شده در این کلاد در حال حاضر اعضای زیرجنس *absinthium* هستند. کلید اصلی تشخیص این زیرجنس وجود موهای درون‌سلولی است. بیشتر گونه‌ها نیز براساس بزرگ با گلچۀ دیسک‌مانند (دوجنسه و بارور) دارند (Moss, 1940). دو گونه *A. austriaca* و *A. haussknechtii* متعلق به این



شکل ۴. درخت توافقی حاصل از ۹۷۲ درخت با بیشترین پارسیمونی برای توالی ناحیه *trnL-F* برای ۲۸ گونه درمنه به همراه

Tanacetum vulgare به‌منزله برون‌گروه.

عدد بالای هر شاخه مقدار بوتستراب را با هزار تکرار نشان می‌دهد.



شکل ۵. درخت توافقی بیشترین پارسیمونی برای توالی ناحیه trnL-F برای ۱۰۶ گونه درمنه (۲۸ گونه ایران و ۷۸ گونه موجود در بانک‌های اطلاعاتی) به همراه *Tanacetum vulgare* به‌منزله برون‌گروه عدد بالای هر شاخه مقدار بوتسترپ را با هزار تکرار نشان می‌دهد.

مهم را تفاوت در سطوح پلوئیدی تیپ‌های اوراسیا و آمریکای شمالی گزارش کرد. جایگاه‌های *B2B3/TaqI* و *B2B3/HinfI* گروه هاپلوتابی ۱۲ کل ناحیه *trnL-F* الگوی برشی آنزیم‌های محدودگر برای این ناحیه نشان‌دهنده فاصله و تفاوت این گونه نسبت به سایر گونه‌هاست.

زیرجنس *Dracunculus* شامل تقریباً ۸۰ گونه است که عمدتاً در نواحی استپی و خشک و نیمه‌خشک سرتاسر نیم‌کره شمالی یافت می‌شوند مخصوصاً آسیای شرقی. کلید تشخیص این گروه وجود گلچه‌های دیسکی دوجنسه با خامه منشعب تغییر یافته و تخمک عقیم است. اطلاعات مولکولی از وجود یک گروه طبیعی بزرگ

A. vulgaris همواره رابطه نزدیکی با گونه‌های مختلف از جمله گروه *A. ludoviciana* نشان داده است. مونوفیلی هر دو گروه شامل رابطه خواهری قبلاً با تعدادی نمونه محدود گزارش شده است. با وجود این نمونه‌برداری‌های بیشتر و بررسی‌های دقیق‌تری برای به رسمیت‌شناختن این گونه به‌منزله یک گروه طبیعی مستقل را تقویت می‌کند (Garcia et al., 2011; Tkach et al., 2008; Watson et al., 2002). تنوع مورفولوژی موجود در این گونه تصمیم‌گیری برای طبقه‌بندی صحیح و رابطه آن با سایر دودمان‌ها و گونه‌ها را بسیار دشوار کرده است (Rydberg, 1916; Hall & Clements, 1923) برای مثال Keck (1946) یکی از این تفاوت‌های

2008). یکی دیگر از الگوهای گسترده تفکیک‌پذیری بین آمریکای شمالی و غرب آمریکای جنوبی مشاهده شده است، در جایی که تنها پنج گونه بومی درمنه به صورت خیلی موضعی در زیستگاه متمرکز شده‌ای در مناطق کردیلران، اکوادور، شیلی و آرژانتین یافت می‌شوند (Pellicer et al., 2010). بیشتر پیوندهای دنیای قدیم و جدید جغرافیای گیاهی، در سراسر حاشیه اقیانوس آرام شمالی و مناطق قطب شمال دیده می‌شود، از جمله بسیاری از جزایر و مجمع‌الجزایر، که در آنجا گونه‌های درمنه به صورت بومی و منطقه‌ای خاص یا علف هرز خودرو یافت شدند. گونه‌های درمنه در فیلیپین، میکرونزی، تایوان، ژاپن، جزیره ساخالین، و مجمع‌الجزایر کوریل به سمت بسیاری از جزایر منطقه دریای برینگ، از جمله سلسله کوه آلوتیان^۲ با توسعه به سوی جنوب در امتداد خط ساحل غربی آمریکای شمالی، شامل جزایر ملکه شارلوت و جزایر کانال در کالیفرنیا وجود دارند. گونه‌های درمنه همچنین در جزایر هاوایی، گرینلند، و جزایر مختلف در مجمع‌الجزایر شمالی کانادا قرار دارند.

پیشرفت‌های مهم و معتبر در تکنیک‌های فیلوژنی مولکولی، بسیاری از پژوهشگران را وادار به مطالعات بیشتر بر روی جنس درمنه کرد. مقاله‌های زیادی در زمینه فیلوژنی مولکولی این جنس صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۶ ابتدا واتسون با استفاده از دی.ان.ا. کلروپلاستی به مطالعه سایت‌های برشی روی یک گونه درمنه از *Anthimideae* پرداخت (Watson, 1996). در سال ۱۹۹۷ واتسون به همراه کرنکون و در سال ۱۹۹۸ کرنکون و همکاران سیستم مولکولی فیلوژنی را در "Tridentatae" با استفاده از توالی‌های ITS و سایت‌های برشی دی.ان.ا. کلروپلاستی بررسی کردند (Watson & Kornkven, 1998).

Francisco-Ortega et al. (1997) توالی ITS (فواصل بین ژنی) یکی از گونه‌ها را بررسی و ارائه دادند. آنالیز توالی‌یابی ITS ارائه شده توسط Vallès et al. (2003) به طور آشکاری تغییرات طبقه‌بندی در درمنه را اثبات کرد. آن‌ها همچنین بیان داشتند که زیر طایفه آرتمیزیینا^۳ به طور رضایت‌بخشی حل‌کننده این مشکل

برای این زیرجنس حمایت می‌کند (Garcia et al., 2011; Pellicer et al., 2011; Sanz et al., 2008; Tkach et al., 2008; Valles et al., 2003). شش گونه بررسی شده از این زیرجنس، *A. scoparia*، *A. capillaris*، *A. campestris*، *A. marschalliana*، *A. tschernieviana* و *A. dracunculus* L. در چهار گروه جداگانه قرار گرفتند. موقعیت سه گونه *A. capillaris*، *A. tschernieviana* و *A. marschalliana* در میان گونه‌های دیگر حائز اهمیت است به گونه‌ای که توانستند با ایجاد رابطه نزدیک فاصله خود را از دیگر گونه‌ها حفظ کنند. بررسی گونه‌های متعلق به زیرجنس *Dracunculus* نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین گونه‌های آن وجود ندارد و همراه تنوع بالایی به خصوص در ناحیه ITS نشان می‌دهند (Shultz, 2006).

نتیجه‌گیری کلی

جنس درمنه یک کاندید بسیار عالی برای بررسی موضوعات و سؤالات مربوط به پراکندگی در مسافت‌های دور، زیست‌جغرافیایی، مسیرهای مهاجرت در سراسر اقیانوس آرام شمالی، و تنوع و تکامل گیاهان قطب شمال و به خصوص آسیاست. دو مرکز اصلی تنوع این جنس در اوراسیا (اروپا و آسیا) و غرب آمریکای شمالی واقع شده است. درمنه یک جنس بزرگ (حدود ۳۵۰-۵۰۰ گونه) و شامل بسیاری از گونه‌های بومی اروپا و آسیا و آمریکا شمالی است. شواهد زیادی در مورد سابقه طولانی درمنه در برنجیان^۱ (شامل آلاسکا، شرق سیبری و سرزمین یوکان) از پروفایل فسیل‌های دانه‌گرده و خصوصیات آن به دست آمده است (Murray, 1981; Colinvaux, 1996). در واقع، فراوانی دانه‌گرده درمنه‌ها در سراسر برنجیان به‌منزله شاهد و مدرکی برای بررسی زیست‌بوم منطقه وسیع جلگه‌ای که در سرتاسر نواحی دست‌نخورده گسترش یافته‌اند، استفاده شده‌اند (Elias et al., 1996).

در یک مفهوم گسترده، درمنه یک الگوی تفکیک‌پذیری بین‌قاره‌ای مشهور بین آسیای شرقی و شمال غربی آمریکا ارائه می‌دهد، که احتمالاً در زمان‌های مختلف از طریق راه‌های زمینی مهاجرت کرده‌اند (Tkach et al.,

2. Aleutian
3. Artemisiinae

1. Beringian

ناحیه‌های جدید ژنوم استفاده شود. برای این منظور لازم است در مطالعات آینده برای روشن شدن طبقه‌بندی زیرقبیله‌ای، از تمام جنس‌های باقی‌مانده در زیرقبیله و زیرجنس‌ها نمونه‌های با تعداد مساوی و متناسب با بررسی‌های مولکولی گرفته شده و بررسی شوند. این نتایج اجازه می‌دهد تا پیشنهاد‌های کاربردی‌تر و مشخصی برای یک طبقه‌بندی طبیعی در جنس درمنه ارائه شود. به همین صورت، طبقه‌بندی براساس مورفولوژی باید دوباره دایر و بررسی شود و فاکتورهای مورفولوژیکی بیشتری باید برای حل تفاوت‌ها در طبقه‌بندی درمنه استفاده شود. در سال‌های اخیر به‌ویژه، ارائه و بهره‌گیری از تکنیک‌های نوین توالی‌یابی نسل جدید (Next Generation Sequencing) کمک شایان توجهی به مطالعات تنوع و فیلولوژی مولکولی گیاهان از جمله جنس درمنه کرده و توانسته است با دقت و سرعت بیشتری به بسیاری از سؤالات پیش روی پژوهشگران در این زمینه‌ها پاسخ دهد.

نیست. Hayat *et al.* (2009) برای طبقه‌بندی کردن ۳۱ گونه درمنه از ITSها استفاده کردند. در نتیجه مشخص شد که ITSها توانایی کمی در تشخیص صفات و خصوصیات جنس درمنه دارند.

به دلیل سطح بالای تشابه ساختمانی و تعداد کم صفات مفید مشخص شده به وسیله توالی‌یابی ناحیه *ITS*، پیشنهاد می‌شد که سایر نواحی برای فهمیدن بهتر محدوده‌ها و فیلولوژی در جنس درمنه بررسی شده قرار گیرد.

Lee *et al.* (2009) از ناحیه *trnL-F* و به روش

PCR-RFLP، برای بررسی تنوع در ۲۱ گونه درمنه استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد هر چند برخی گونه‌ها مانند *A. absinthium* از گونه‌های دیگر فاصله بیشتری دارد اما این ناحیه به تنهایی برای طبقه‌بندی و بررسی رابطه میان گونه‌های درمنه کافی نیست. به صورت آشکاری این مطالعه مشخص کرد که ناحیه *trnL-F* دی.ان.ا. کلروپلاستی به تنهایی در این سطح مفید نیست. احتیاج است که برای بررسی‌های آینده از

REFERENCES

1. Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York. 511 p.
2. Borsch, T., Hilu, K.W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C. & Barthlott, W. (2003). Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology*, 16, 558-576.
3. Besendahl, A., Qiu, Y.L., Lee, J., Palmer J.D. & Bhattacharya, D. (2000). The cyanobacterial origin and vertical transmission of the plastid tRNA^{Leu} group-I-intron. *Current Genetics*, 37, 12-23.
4. Cech, T.R. (1990). Self-splicing of group I introns. *Annual Review of Biochemistry*, 59, 543-568.
5. Cech, T.R., Damberger, S.H. & Gutell, R.R. (1994). Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1, 273-280.
6. Colinvaux, P.A. (1996). Pollen records: Point Barrow, Pribilof Archipelago, and Imuruk Lake. In: West, F.H. (Ed.), *American Beginnings, The Prehistory and Paleoecology of Beringia*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 83-96.
7. Elias, S.A., Short, S.K., Nelson, C.H. & Birks, H.H. (1996). Life and times of the Beringland bridge. *Nature*, 382, 60-63.
8. Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Hines, A. & Jansen, R.K. (1997). Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 84, 1595-1613.
9. Garcia, S., McArthur, E.D., Pellicer, J., Sanderson, S.C., Vallès, J. & Garnatje, T. (2011). A molecular phylogenetic approach to western North America endemic *Artemisia* and allies (Asteraceae): untangling the sagebrushes. *American Journal of Botany*, 98, 638-653.
10. Hamza, N.B. (2005). *Population genetic analysis of European and African willows (Salix spp.) using nuclear microsatellite and chloroplast markers*. Ph.D. Thesis, University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria.
11. Hall, H.M. & Clements, F.E. (1923). *The Phylogenetic Method in Taxonomy*. The North American species of *Artemisia*, *Chrysothamnus* and *Atriplex*. Publication 326, Carnegie Institution of Washington, Washington, DC.
12. Hayat, M.Q., Ashraf, M., Khan, M.A., Mahmood, T., Ahmad, M. & Jabeen, S.H. (2009). Phylogeny of *Artemisia L.*: Recent developments. *African Journal of Biotechnology*, 8(11), 2423-2428.
13. Kazemi, M., Dakhili, M., Rustaiyan, A., Larijani, K., Ahmadi, M.A. & Mozaffarian, V. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia tschernieviana* Besser from Iran. *Pharmacognosy Research*, 1, 120-124.

14. Keck, D.D. (1946). A revision of the *Artemisia vulgaris* complex in North America. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 25, 421-468.
15. Kornkven, A., Watson, L. & Estes, J. (1998). Phylogenetic analysis of the *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on the sequences from the internal transcribed spacers (ITS) of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 85, 1787-1795.
16. Lee, J.H., Lee, J.W., sung, J.S., bang, K.H. & Moon, S.G. (2009). Molecular Authentication of 21 Korean *Artemisia* Species (Compositae) by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Based on *trnL-F* Region of Chloroplast DNA. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1912-1916.
17. Moss, E.H. (1940). Interxylary cork in *Artemisia*. *American Journal of Botany*, 27, 762-768.
18. Murray, D.F. (1981). The role of arctic refugia in the evolution of the arctic vascular flora – a Beringian perspective. In: Scudder, G.G.E., Reveal, J.L. (Eds.), *Evolution Today*, Proceedings of the Second International Congress of Systematic and Evolutionary Biology. Hunt Institute for Botanical Documentation, *Pittsburgh*, pp. 11-20.
19. Noorbakhsh, S.N., Ghahreman, A., Attar, A. & Mahdigholi, K. (2008). Leaf anatomy of *Artemisia* (Asteraceae) in Iran and ITS taxonomic implications. *Iranian Journal of Botany*, 14 (1). 54-69.
20. Pirttila, A.M., Hirsikorpi, M., Kamarainen, T., Jaakola, L. & Hohtola, A. (2001). DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 273a-273f.
21. Pellicer, J., Vallès, J. & Korobkov, A.A. & Garnatje, T. (2011). Phylogenetic relationships of *Artemisia* subg. *Dracunculus* (Asteraceae) based on ribosomal and chloroplast DNA sequences. *Taxon*, 60, 691-704.
22. Quandt, D., Muller, K., Stech, M., Hilu, K.W., Frey, W., Frahm, J.P. & Borsch, T. (2004). Molecular evolution of the chloroplast *trnL-F* region in land plants. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 98, 13-37.
23. Rydberg, P.A. (1916). (Carduales), *Carduaceae*, *Tageteae*, *Anthemideae*. *North American Flora* 34(3). New York Botanical Garden, Bronx.
24. Sanz, M., Vilatersala, R., Hidalgo, O., Garcia, J.N., Susanna, A., Gerald, M., Schneeweiss, M., Valles, J. (2008). Molecular phylogeny and evolution of floral characters of *Artemisia* and allies (Anthemideae, Asteraceae): Evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. *Taxon*, 57(1), 68-78.
25. Simon, D., Fewer, D., Friedl, T., Bhattacharya, D. (2003). Phylogeny and self-splicing ability of the plastid tRNA-Leu group I intron. *Journal of Molecular Evolution*, 57, 710-720.
26. Shultz, L.M. (2006). *Artemisia*. In *Flora of North America* Editorial Committee (Ed.), *Flora of North America North of Mexico*, vols. 19–21. Oxford University Press, New York, pp. 503-534.
27. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
28. Tkach, N.V., Hoffmann, M.H., Roser, M., Korobkov, A.A. & Hagen, K.B.V. (2007-2008). Parallel evolutionary patterns in multiple lineages of the Arctic *Artemista* L. (Asteraceae). *Evolution*, 62(1), 184-194.
29. Valles, J., Torrell, M., Garnatje, T., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R. & Susanna, A. (2003). Genus *Artemisia* and its allies, phylogeny of the subtribe *Artemisiinae* (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Plant Biology*, 5, 274-284.
30. Watson, L.E., Bates, P.L., Unwin, M.M., Evans, T.M. & Estes, J.R. (2002). Molecular phylogeny of Subtribe *Artemisiinae* (Anthemideae: Asteraceae), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evolutionary Biology*, 2, 17 (12 pp).
31. Watson, L.E. (1996). Molecular systematics of the tribe Anthemideae. In: Hind DJN, Jeffrey C, Pope GV (ed.). *Advances in compositae systematics*. Kew Publishing, Kew, UK. pp. 315-322.