



بررسی تبارزایی جنس *Bromus* (خانواده گندم)

زهرا پورمشیر*، عاطفه امیراحمدی، رضا نادری

گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Zahra.poormoshir@gmail.com

چکیده

جنس *Bromus* به قبیله Bromeae و خانواده گندمیان تعلق دارد. *Bromus* دارای ۱۵۰ گونه در جهان است. این جنس خویشاوندی نزدیکی با جنس *Boissiera* دارد. دو جنس اخیر بر اساس تعداد سیخک های پوشینه از یکدیگر متمایز می شوند. در تعداد و ردیف زیر تقسیمات جنس *Bromus* اختلاف نظرهایی وجود دارد. این پژوهش درصدد آن است که با استفاده از مارکر *trnL-F* کلروپلاستی، روابط فیلوژنی گونه های منتخب از جنس *Bromus* را بازسازی نماید. ۲۵ تاکسون از جنس *Bromus* و ۳ تاکسون برون گروه به منظور انجام مطالعه فیلوژنی انتخاب شدند. پس از استخراج ژنوم واکنش زنجیره ای پلی یابی هم ردیف سازی شدند. آنالیزهای فیلوژنی توسط روش بیشینه صرفه جویی تعبیه شده در نرم افزار PAUP* 4.b10 و روش Bayesian توسط نرم افزار Mrbayes انجام شد. ماتریس داده ها، دارای ۱۱۶۱ جایگاه نوکلئوتیدی بود که از این میان، ۵۱ جایگاه اطلاعاتی و بقیه غیر اطلاعاتی بودند. تحلیل داده ها با استفاده از روش بیشینه صرفه جویی، ۱۰/۰۰۰ کوتاه ترین درخت با طول ۸۷ گام و شاخص پایداری ۰/۶۳۲، شاخص گروه پذیری ۰/۸۲۲ ایجاد کرد. نتایج نشان داد که جنس *Bromus* تک تبار بوده و همچنین گونه *B. pumilio* درون این جنس واقع است و نمی توان آن را به عنوان جنس مجزای *Boissiera* در نظر گرفت.

کلمات کلیدی: *Bromus*، فیلوژنی، بیشینه صرفه جویی، بیژین، تک تبار

مقدمه

تیره گندمیان (Gramineae- Poaceae) یکی از بزرگ ترین و شناخته شده ترین تیره های گیاهی است که در فارسی به تیره غلات یا گندم شهرت یافته است [۱]. این تیره چهارمین تیره بزرگ گیاهان گل دار بعد از Asteraceae، Orchidaceae و Fabaceae بوده ولی از نظر اهمیت اقتصادی در جهان در مقام اول قرار دارد [۲]. تیره گندمیان ۲۷ قبیله و حدود ۱۲۰ جنس در ایران و بیش از ۶۰۰ جنس و ۱۰۰۰۰ گونه در جهان دارد [۳]. قبیله Bromeae یکی از قبایل خانواده گندمیان است که دارای دو جنس *Bromus* و *Boissiera* است. جنس *Bromus* L. در مقایسه با سایر جنس های این تیره بیشترین تعداد گونه را در ایران دارد. *Bromus* حدوداً دارای ۱۵۰ گونه در جهان است. این جنس خویشاوندی نزدیکی با جنس *Boissiera* دارد. دو جنس اخیر بر اساس تعداد سیخک های پوشینه از یکدیگر متمایز می شوند. در جنس *Bromus*، پوشینه دارای ۳-۱ سیخک یا بندرت بدون سیخک است. در جنس *Boissiera* پوشینه دارای ۷ بندرت ۹ سیخک است [۴]. این دو جنس دارای تنوع ریخت شناسی بالایی می باشند. بسیاری از دانشمندان علم رده بندی، جنس *Bromus* را به گروه های کوچک تر زیر جنس، بخش و زیر بخش تقسیم می کنند [۵]. بنابراین در تعداد و ردیف زیر تقسیمات این جنس اختلاف نظر وجود دارد. اخیراً مطالعات جامعی بر روی جنس *Bromus* صورت گرفته است، که می توان به مطالعات آناتومی [۶، ۷]، ریخت شناسی [۸]، کروموزومی [۹، ۱۰]، ایزوزیمی [۱۱] و مولکولی [۱۲، ۱۳]، اشاره نمود. توالی *trnL-F* کلروپلاستی شامل ایترون *trnL* و فاصله گر *trnF* است که



امروزه به طور گسترده به منظور بازسازی فیلوژنی در سطح گونه و جنس های خویشاوند به کار گرفته می شود [۱۴]. این پژوهش درصدد آن است که با استفاده از مارکر *trnL-F* کلروپلاستی، روابط فیلوژنی گونه های منتخب از جنس *Bromus* را بازسازی نماید.

مواد و روش ها

۲۵ تاکسون از جنس *Bromus* و ۳ تاکسون برون گروه به منظور انجام مطالعه فیلوژنی انتخاب شدند. از این میان ۵ تاکسون برای اولین بار مورد توالی یابی قرار گرفتند و در مورد بقیه تاکسون ها از توالی های بانک ژن استفاده شد. در ابتدا ژنوم کل گیاهان توسط کیت GeneAll استخراج شد. سپس ناحیه *trnL-F* از ژنوم کلروپلاست که برای این مطالعه انتخاب شده بود، با استفاده از پرایمرهای *trnL* و *trnF* [۱۵] و توسط واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر شد. به منظور اطمینان از انجام صحیح واکنش، محصولات این واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز افقی شدند. کروماتوگرام های حاصل از تعیین توالی توسط نرم افزار BioEdit [۱۶] مشاهده شده و سپس توسط نرم افزار MUSCLE [۱۷] هم ردیف سازی شده و نقاط مبهم به صورت چشمی تنظیم شدند. ماتریس داده های هم ردیف سازی شده توسط روش بیشینه صرفه جویی تعبیه شده در نرم افزار PAUP* 4.b10 [۱۸] و روش Bayesian توسط نرم افزار MrBayes [۱۹] تحلیل شدند. در روش بیشینه صرفه جویی برای تحلیل داده ها از جستجوی ابتکاری و روش تبادل شاخه ای، دونیمه سازی درخت و اتصال مجدد شاخه ها و گزینه چندین درخت با ۱۰۰ تکرار از افزایش تصادفی توالی ها و بیشینه درختان ۱۰/۰۰۰ استفاده گردید. برای تعیین حدود اطمینان کلادها، تحلیل بوت استرپ [۲۰] انجام شد. تعداد تکرارها ۱۰/۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد. در روش بیزین مدل های تکاملی توسط برنامه MrModeltest [۲۱] بررسی شد و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC، مدل جانیشینی نوکلئوتید HKY+I+G برای داده ها انتخاب شد. تحلیل داده ها برای ۶/۰۰۰/۰۰۰ نسل تکرار شد. در هر ۱۰۰ نسل یک درخت نمونه برداری شد و در نهایت ۲۵ درصد درختان سوزانده شدند.

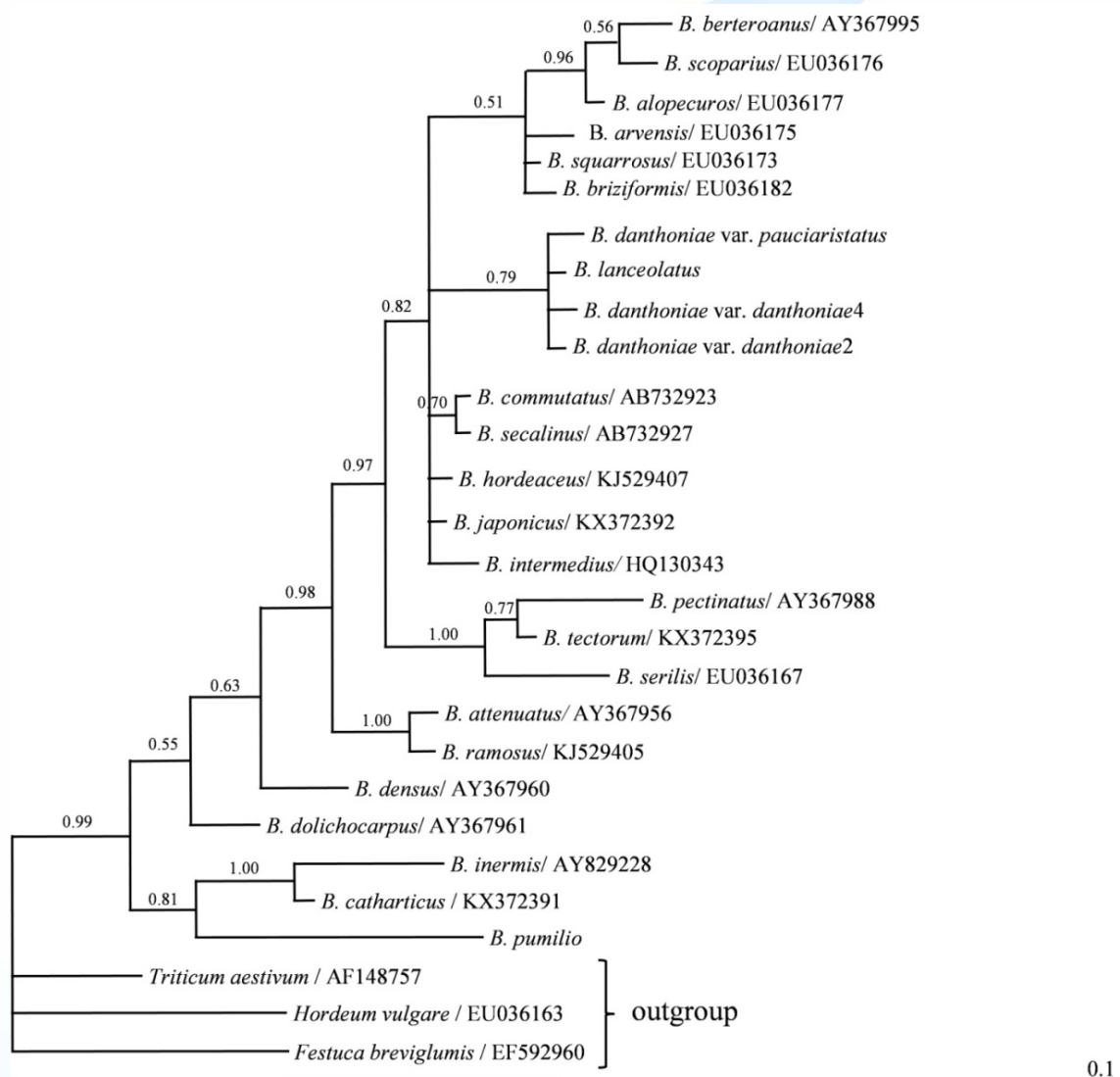
نتایج و بحث

ماتریس داده ها با ۲۸ گونه، دارای ۱۱۶۱ جایگاه نوکلئوتیدی بود که از این میان، ۵۱ جایگاه اطلاعاتی و بقیه غیر اطلاعاتی بودند. تحلیل داده ها با استفاده از روش بیشینه صرفه جویی، ۱۰/۰۰۰ کوتاه ترین درخت با طول ۸۷ گام و شاخص پایداری ۰/۶۳۲، شاخص گروه پذیری ۰/۸۲۲ ایجاد کرد. از آنجاکه توپولوژی درخت حاصل از روش بیشینه درست نمایی مشابه با درخت بیزین بود، بنابراین درخت حاصل از تحلیل بیزین نشان داده شده است (شکل ۱).

در این درخت تمامی گونه های *Bromus* مورد مطالعه کلادی با حمایت بالا تشکیل داده اند که نشان دهنده تک تباری این جنس است. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات سرلا و همکاران [۱۳] و آینوکه و بایر [۲۲] سازگار است. در قاعده درخت *B. inermis* و *B. catharticus* زیرکلادی با حمایت ۱ تشکیل داده اند که با *B. pumilio* ارتباط خوهری دارد. این نتایج نشان می دهد که گونه *B. pumilio* را نمی توان به عنوان جنس مجزای *Boissiera* در نظر گرفت که با مطالعات نادری و همکاران [۲۳] مطابقت می کند. *B. dolichocarpus* و *B. densus* و زیرکلاد متشکل از *B. attenuates* و *B. ramosus* به ترتیب خواهران متوالی به بقیه گونه های مورد مطالعه هستند. زیرکلادی متشکل از *B. tectorum* و *B. pectinatus* که گونه *B. sterilis* با آن ارتباط خوهری دارد، در شاخه بعدی قرار گرفته است. در نهایت یک پلی تومی بزرگ دیده می شود که در آن *B. commutatus* و *B. secalinus* با حمایت ضعیفی خواهر یکدیگرند (۰/۷). همچنین گونه های *B. lanceolatus* var. *B. danthoniae* و *B. danthoniae* var. *pauciaristatus* (با دو تکرار) و کلاد کوچکی با حمایت پایین درون این پلی تومی تشکیل



دادند و روابط بین آنها نیز حل نشده باقی مانده است. نادری و رحیمی نژاد [۲۴] بخش سه سیخکی *Triniusia* را مترادف بخش *Bromus* در نظر گرفتند. همچنین نادری و همکاران [۲۳] با بررسی روند تدریجی تشکیل سیخک به روابط خویشاوندی *B. danthoniae* و *B. lanceolatus* اشاره کردند. در این پژوهش تحلیل فیلوژنی حاصل از توالی کلروپلاستی ضمن تأیید ادغام بخش سه سیخکی به رابطه نزدیک این دو گونه اشاره می کند. درون این پلی تومی کلاد دیگر وجود دارد که در آن *B. scoparius* و *B. berterioanus* ارتباط ضعیفی داشته و با *B. alopecuros* خواهند. روابط بین گونه های *B. squarrosus* و *B. arvensis* *briziformis* با یکدیگر و بقیه اعضای پلی تومی به صورت حل نشده است. در پایان به منظور کسب نتایج بهتر استفاده از توالی های دیگر هسته ای و کلروپلاستی پیشنهاد می شود.



شکل ۱. درخت تبارزایی حاصل از تحلیل توالی کلروپلاستی *trnL-F* با استفاده از روش بیزین. اعداد روی شاخه ها حدود اطمینان کلادها هستند. اعداد زیر 0.5 نشان داده نشده اند. مقابل گونه های اخذ شده از بانک ژن شماره دسترسی درج شده است.



منابع

1. **Termeh, F. (1975).** New grasses from Iran and geographical distribution. vol. 2, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran (in Persian).
2. **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A. & Stevens, P. F. (1999).** Plant systematics: A phylogenetic approach. Sinauer, Sunderland.
3. **Mozaffarian, V. (2005).** Plant systematics, First book: Morphology Taxonomy, 4th edition. Amir Kabir Institute Publications, Tehran (in Persian).
4. **Bor, N. L. (1970).** *Bromus* In: Rechinger, K. H. (ed), Flora Iranica. 70: 107-141, Akademische Druck-U. Verlagsanstalt, Graz-Austria.
5. **Smith, P. M., & Sales, F., (1993).** "Bromus L. sect. *Bromus*: Taxonomy and relationship of some species with small spikelets." *Edinburgh Journal of Botany*, **50**(2): 149-171.
6. **Ghahreman, A., Alemi, M., Attar, F., Hamzeh'ee, B., & Columbus, J. T. (2006).** "Anatomical studies in some species of *Bromus* L.(Poaceae) in Iran". *Iranian Journal of Botany*, **12**(1): 1-14.
7. **Acedo, C., & Llamas, F. (2001).** "Variation of micromorphological characters of lemma and palea in the genus *Bromus* (Poaceae)". *Annales Botanici Fennici*, **3**(1):1-14.
8. **Naderi, R., & Rahiminejad, M. R. (2015).** "A taxonomic revision of the genus *Bromus* (Poaceae) and a new key to the tribe Bromeae in Iran". *Annales Botanici Fennici*, **52**(3): 233-248.
9. **Sheidai, M., & Fadaei, F. (2005).** "Cytogenetic studies in some species of *Bromus* L., section *Genea* Dum." *Journal of Genetics*, **84** (2): 189-194.
10. **Sadeghian, S., Jafari, E., & Hatami, A. (2010).** " Cytogenetic Studies in Some Species of *Bromus* L. in Iran". *Asian Journal of Biological Sciences*, **3**(4): 188-194.
11. **Oja, T. (2005).** "Isozyme evidence on the genetic diversity, mating system and evolution of *Bromus intermedius* (Poaceae)". *Plant Systematics and Evolution*, **254**(3): 199-208.
12. **Pillay, M., & Hilu, K. W. (1995).** "Chloroplast-DNA restriction site analysis in the genus *Bromus* (Poaceae)". *American journal of botany*, **82**: 239-249.
13. **Saarela, J. M., Peterson, P. M., Keane, R. M., Cayouette, J., & Graham, S. W. (2007).** "Molecular phylogenetics of *Bromus* (Poaceae: Pooideae) based on chloroplast and nuclear DNA sequence data". *Aliso*, **23**(1), 450-467.
14. **Amirahmadi, A., Kazempour Osaloo, S., Moein, F., Kaveh, A., & Maassoumi, A. A. (2014).** "Molecular systematics of the tribe Hedysareae (Fabaceae) based on nrDNA ITS and plastid *trnL-F* and *matK* sequences". *Plant Systematics and Evolution*, **300**: 729-747.
15. **Taberlet, P., Gelly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991).** "Universal Primers for Amplification of 3 Noncoding Regions of Chloroplast DNA". *Plant Molecular Biology*, **17**: 1105-1109.
16. **Hall, T. A. (1999).** "Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows" 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, **41**: 95-98.
17. **Edgar, R. C. (2004).** "Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput". *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.
18. **Swofford, D. L. (2002).** "PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)". version 4.0b10. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
19. **Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003).** "MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models". *Bioinformatics*, **19**: 1572-1574.
20. **Felsenstein, J. (2004).** "Inferring phylogenies". Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
21. **Nylander, J. A. A. (2004).** "MrModeltest v2. Program distributed by the author". Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
22. **Ainouche, M. L., Bayer, R. J., Gourret, J.-P., Defontaine, A. & Misset, M.-T. (1999).** "The allotetraploid invasive weed *Bromus hordeaceus* L. (Poaceae): Genetic diversity, origin and molecular evolution". *Folia Geobotanica*, **34**: 405-419.
23. **Naderi, R., Rahiminejad, M. R., Assadi, M. & Vitek, E. (2016).** "A new taxonomic concept for *Bromus danthoniae* including comments on *Bromus* sect. *Bromus* and *Triniusia* (Poaceae)". *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, B*, **118**: 167-180.
24. **Naderi, R. and Rahiminejad, M. R. (2015).** "A taxonomic revision of the genus *Bromus* (Poaceae) and a new key to the tribe Bromeae in Iran". *Annales Botanici Fennici*, **52**: 233-248.



Phylogeny of the genus *Bromus* (Poaceae) Zahra Poormoshir*, Atefe Amirahmadi, Reza Naderi

Department of Plant Biology, Faculty of Biology and Institute of Biological Science, Damghan University,
Damghan, Iran.

* Corresponding author: Zahra.poormoshir@gmail.com

Abstract

The genus *Bromus* belongs to the tribe Bromeae and Poaceae family. *Bromus* has 150 species in the world. The genus has a close relationship with the genus *Boissiera*. The two later genera are distinct from each other with the number of awns in the lemmas. There are some disagreements in species number and circumscription of subgenera in *Bromus*. This study is aimed to reconstruct the phylogenetic relationship between selected species of the genus *Bromus* with cp DNA *trnL-F* marker. 25 taxa of the genus *Bromus* as ingroup and 3 outgroup taxa selected for phylogenetic study. After extraction the genome, PCR performed with special primers and sequencing performed in Korea. Then chromatograms of sequencing were aligned. Phylogenetic analyses were performed using maximum parsimony approach as implemented in PAUP* software and Bayesian inference using Mr Bayes program. Data matrix has 1161 nucleotide site that 51 site was informative. The heuristic search of the MP analysis resulted in 10000 shortest trees of 87 steps length with a consistency index (CI) = 0.632 and a retention index (RI) = 0.822. Result showed that *Bromus* is monophyletic. Also *B. pumilio* is not a separate genus under *Boissiera* and this species is located within *Bromus*.

Keywords: *Bromus*, Phylogeny, Maximum Parsimony, Bayesian, Monophyletic.

