





دانشگاه الزهرا(س)

دانشکده علوم پایه - گروه زیست شناسی

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته علوم گیاهی - سیستماتیک گیاهی

عنوان

**بررسی فیلوژنی جنس *Consolida* (DC.) S. F. Gray از تیره
آلاله (Ranunculaceae) در ایران**

اساتید راهنما

دکتر منیژه پاکروان و دکتر علی سنبلی

دانشجو

زهرا خلیج

اسفند ماه ۱۳۹۱

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق
به دانشگاه الزهرا می باشد.

چکیده :

جنس *Consolida* (DC.) S. F. Gray از خانواده آلاله (Ranunculaceae) از گیاهان علفی، یک ساله، گلدار و مهمیزدار به شمار می آید.

این جنس دارای ۴۳ گونه است، در فلور ایرانیکا ۲۳ گونه معرفی شده که ۱۹ گونه از آن در ایران وجود دارد و چهار گونه از آن اندمیک ایران می باشد .

در این پژوهش، بررسیهای بیوسیستماتیکی از قبیل: بررسی ساختار تشریحی دمبرگ، بررسی فیلوژنی بر اساس صفات ریخت شناسی و صفات بر روی ۱۶ گونه از این جنس در ایران شامل:

C. hohenackeri (Boiss) ، *C. anthoroidea* (Boiss.) Schrod ، *C. tehranica* (Boiss.) Rech.f
C. leptocarpa Nevski ، *C. camptocarpa* (Fish & C.A. Mey. ex Ledeb) Nevski ، Grossh
C. stocksiana (Boiss) ، *C. aucheri* (Boiss) Iranshahr ، *C. persica* (Boiss) Schrod ،
C. orientalis ، *C. rugulosa f.paradoxa* ، *C. rugulosa f.rugulosa* (Boiss) Schrod ، Nevski
C. ambigua (L.) Ball & Heywood ، *C. oligantha* (Boiss) Schrod ، (Gay) Schrod
و *C. regalis* S.F. gray ، *C. flava* (DC.) Schrod ، *C. trigonelloides* (Boiss) Munz
و *C. oliveriana* (DC) Schrod به عمل آمد.

در مطالعات تشریحی دمبرگ، صفات وجود گوشه، وجود یک لایه کلانشیم در زیر اپیدرم، نوع دستجات آوندی؛ DMB (دستجات آوندی پشتی - میانی) یا MLB (دستجات آوندی جانبی اصلی) یا RB (دستجات آوندی حاشیه ای)، وجود دستجات آوندی LB، تیپ غلاف آوندی، وجود بافت مکانیکی بین دستجات آوندی و وجود کرک ها صفات کلیدی برش عرضی دمبرگ در جداسازی گونه ها از همدیگر بودند. در بررسی های کلادیستیکی از نرم افزار Paup استفاده شد. با استفاده از

صفات ریخت شناسی به علت هم پوشانی زیاد بازه های عددی هر گونه با سایر گونه ها صفات زیادی حذف گردیدند و نتایج آنالیزهای انجام شده موید وجود پلی مورفیسم زیاد در این جنس می باشد. در فیلوژنی مولکولی، تعیین توالی ژنوم هستوی با مارکر ITS و تعیین توالی ژنهای کلروپلاستی با مارکر trnL-F، صورت گرفته و ارتباط بین گونه ها با یکدیگر با استفاده از نرم افزارهای MEGA5 و PAUP ver. 4/0 جایگاه گونه ها از لحاظ نزدیکی توالی ژنی مشخص گردید.

فهرست مطالب

فصل اول (مقدمه و تاریخچه)

- ۱-۱- ویژگی های تیره آلاله (Ranunculaceae) ۱
- ۲-۱- پراکندگی تیره آلاله (Ranunculaceae) ۲
- ۳-۱- تاریخچه و رده بندی تیره آلاله (Ranunculaceae) ۲
- ۴-۱- سیستم گرده افشانی در تیره آلاله (Ranunculaceae) ۳
- ۵-۱- مقدمه ای بر تاکسونومی تیره آلاله (Ranunculaceae) ۳
- ۶-۱- مطالعات تشریحی در تیره آلاله (Ranunculaceae) ۵
- ۷-۱- فیلوژنی مولکولی در تیره آلاله (Ranunculaceae) ۵
- ۸-۱- کلید شناسایی جنس های تیره آلاله (Ranunculaceae) ۶
- ۹-۱- جایگاه تاکسونومیک *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۸
- ۱۰-۱- معرفی جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۹
- ۱۱-۱- تاریخچه تاکسونومیک جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۹
- ۱۲-۱- تاریخچه رده بندی در جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۱
- ۱۳-۱- مطالعات تشریحی در جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۲
- ۱۴-۱- تاریخچه مطالعات سیتولوژیک در جنس *Consolida*(DC.) S.F. Gray ۱۳
- ۱۵-۱- تاریخچه مطالعات میکرومورفولوژی در جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۳
- ۱۶-۱- بررسی متابولیت های ثانوی در جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۴
- ۱۷-۱- مطالعات مولکولی در جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۵
- ۱۸-۱- پراکنش جهانی جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۵
- ۱۹-۱- نحوه گرده افشانی جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۶

۲۰-۱- خواص دارویی جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray ۱۶

۲۱-۱- اهداف پژوهش ۱۷

فصل دوم (مواد و روش ها)

۱-۲- روش کار در بررسی های تاکسونومیکی ۱۸

۱-۱-۲- بررسی منابع ۱۸

۲-۱-۲- بررسی های هرباریومی ۱۸

۲-۲- فیلوژنی مولکولی ۱۸

۳-۲- مطالعات ریخت شناسی به روش فنتیک و کلادیستیک ۲۳

۴-۲- مطالعات تشریحی ۲۹

۱-۴-۲- برش عرضی دمبرگ ۳۰

۲-۴-۲- بررسی میکروسکوپی ۳۰

فصل سوم (نتایج)

۱-۳- نتایج مطالعات تشریحی ۳۱

۱-۱-۳- نتایج مطالعات تشریحی دمبرگ ۳۱

۲-۱-۳- نتایج کلی مطالعات تشریحی ساقه ۳۳

۲-۳- آنالیز صفات ریخت شناسی ۴۰

۱-۲-۳- آنالیز آماری صفات ریخت شناسی ۴۰

۳-۳- آنالیز کلادیستیک صفات ریخت شناسی ۴۳

۴-۳- نتایج مطالعات فیلوژنی بر اساس ویژگی های مولکولی ۴۵

- ۴۵.....PCR نتایج ژل الکتروفورز محصولات
- ۴۶.....cpDND trn L-F و nrDNA ITS های آنالیز فیلوژنی داده های
- ۵۰..... (Maximum parsimony) روش بیشینه صرفه جویی
- ۵۶.....Maximum Likelihood روش
- ۶۳.....Bayesian روش
- ۶۵..... شرح گونه ها

فصل چهارم (بحث)

- ۸۳..... مطالعات تشریحی
- ۸۴..... مطالعات فنژنتیک
- ۸۴..... مطالعات کلادیستیک
- ۸۴..... مطالعات مولکولی
- ۸۷..... نتیجه گیری کلی

پیشنهادات

منابع

ضمیمه

فهرست جداول و شکلها

- جدول (۱-۱): جایگاه تاکسونومیکی جنس *Consolida* (Iranshahr 1992)..... ۸
- جدول (۲-۱): تاریخچه شناسایی گونه های جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray..... ۱۰
- جدول (۳-۱): تاریخچه شمارش کروموزومی در جنس *Consolida* (DC.) S.F. Gray..... ۱۳
- جدول (۱-۲): نمونه های بررسی شده جهت آنالیز مولکولی..... ۲۰
- جدول (۲-۲): کد توالی های گرفته شده از Gene Bank..... ۲۰
- جدول (۳-۲): جمعیت های مورد بررسی در مطالعات فنوتیک و کلادیستیک..... ۲۴
- جدول (۴-۲): صفات مورد بررسی در آنالیزهای آماری..... ۲۸
- جدول (۱-۳): صفات مطالعات تشریحی دمبرگ..... ۳۴
- جدول (۲-۳): نتایج اولیه حاصل از تجزیه عامل ها براساس صفات ریختی کیفی..... ۴۰
- جدول (۳-۳): درصد و تعداد بازهای موجود در توالی nrDNA ITS گونه های *Consolida* مورد بررسی..... ۴۷
- جدول (۴-۳): درصد و تعداد بازهای موجود در توالی cpDNA trnL-F گونه های *Consolida* مورد بررسی..... ۴۸
- شکل (۱-۳): برش عرضی دمبرگ *C. capmtocarpa* ، *C. hohenackeri*، *C. anthoroidea* ، *C. tehranica*..... ۳۶
- شکل (۲-۳): برش عرضی دمبرگ *C. stocksiana* ، *C. aucheri*، *C. persica* ، *C. leptocarpa*..... ۳۷
- شکل (۳-۳): برش عرضی دمبرگ *C. regalis* ، *C. orientalis* ، *C. ambigua* ، *C. rugulosa*..... ۳۸
- شکل (۴-۳): برش عرضی دمبرگ *C. olighantha*، *C. flava* ، *C. oliveriana*..... ۳۹
- شکل (۵-۳): فنوگرام حاصل از صفات کمی گونه های *Consolida* مورد بررسی با روش WARD بر اساس تفکیک گونه..... ۴۲
- شکل (۶-۳): نمودار رسته بندی بر مبنای صفات ریختی کیفی بر اساس فاکتور اول و دوم..... ۴۳
- شکل (۷-۳): کلادوگرام حاصل از آنالیز صفات ریختی از طریق برنامه PAUP..... ۴۵
- شکل (۸-۳): باند های مربوط به محصول PCR در مطالعه nrITS گونه های *Consolida*، باند های بدون سایه و مناسب جهت توالی یابی..... ۴۶

- شکل (۳-۹): باند های مربوط به محصول PCR در مطالعه cpDNA گونه های *Consolida*، باند های بدون سایه و مناسب جهت توالی یابی.....۴۶
- شکل (۳-۱۰): درخت Maximum parsimony حاصل از آنالیز ناحیه nrITS توالی یابی شده گونه های *Consolida*.....۵۲
- شکل (۳-۱۱): درخت Maximum parsimony حاصل از آنالیز ناحیه nrITS و cp trn L-F توالی یابی شده گونه های *Consolida*.....۵۵
- شکل (۳-۱۲): درخت Maximum Likelihood حاصل از آنالیز ناحیه nrITS گونه های *Consolida*.....۵۸
- شکل (۳-۱۳): درخت Maximum Likelihood حاصل از آنالیز ناحیه cpDNA گونه های *Consolida*.....۶۰
- شکل (۳-۱۴): درخت Maximum Likelihood حاصل از آنالیز نواحی nrDNA و cpDNA گونه های *Consolida*.....۶۲
- شکل (۳-۱۵): درخت Bayesian حاصل از آنالیز نواحی nrDNA ITS گونه های *Consolida*.....۶۴

فصل اول

مقدمه

۱-۱- ویژگی های تیره آلاله (Ranunculaceae)

گیاهان علفی، درختچه ای یا گاهی بالا رونده. کرک ها معمولاً ساده. برگها معمولاً متناوب، ساده، لوبدار، پنجه ای و شانه ای، چند قسمتی تا مرکب، معمولاً دارای دندانهای اریه ای، دنداندار یا کنگره ای. معمولاً فاقد گوشواره یا گوشواره دار. گل آذین محدود، گاهی نامحدود به نظر می آید یا تحلیل رفته به یگ گل منفرد، انتهایی. گلها معمولاً دوجنسی، منظم (ولی در *Aconitum*، *Delphinium*، *Consolida* و *Aconitella* گلها نامنظم اند)، شعاعی تا گاهی دوطرفه، نهنج کوتاه تا کشیده. قطعات گلپوش معمولاً غیر سه تایی، تپال ها ۴ تا متعدد، جدا و همپوش؛ یا گلپوش تمایزیافته به کاسه و جام و در این صورت کاسبرگ ها معمولاً ۵ عدد، جدا، همپوش و ریزا. گلبرگها معمولاً ۵ عدد، همپوش و غالباً دارای بخشی در قاعده که شهد تولید می کند یا فقط به صورت غدد شهدی کوچک ظاهر می شوند که احتمالاً از پرچم های عقیم مشتق شده اند. پرچم ها متعدد، میله ها جدا، بساک ها به وسیله شکاف طولی باز می شوند. دانه های گرده سه شیاری (کمابیش تغییر شکل یافته). برچه ها معمولاً ۵ عدد تا متعدد، گاهی کاهش یافته به یک عدد، معمولاً جدا، تخمدان فوقانی، با تمکن معمولاً جداری، کلاله ها نقطه ای یا کشیده شده در امتداد یک سمت خامه. یک تا تعداد زیادی تخمک در هر برچه. میوه معمولاً توده ای از برگه ها یا فندقه ها و گاهی سته. ساقه دارای دستجات آوندی غالباً در چندین حلقه متحد المركز یا کمابیش پراکنده، معمولاً دارای آلکالوئید یا رانونکولین (نوعی لاکتون گلیکوزید)، غالباً دارای ساپونین های تری ترپنوئید. فرمول گل ۱-∞، ∞، ۵، ۵ یا ۴-∞.

۲-۱- پراکندگی تیره آلاله (Ranunculaceae)

در تمام بخشهای زمین از این تیره نمایندگانی گسترده اند اما در نواحی معتدله و شمالی نیمکره شمالی از پراکنش بیشتری برخوردار هستند (Judd et al 2002). تیره آلاله تیره ای بزرگ و متنوع است که رده بندی های متفاوتی از آن ارائه شده است. در رده بندی تاختاجان حدود ۶۶ جنس و ۲۰۰۰ گونه را شامل می شود (Takhtajan 1975)، ولی به نظر Judd و همکاران شامل ۴۷ جنس و حدود ۲۰۰۰ گونه می باشد (Judd et al 2002). اعضای این تیره در سرتاسر دنیا پراکندگی دارند ولی در مناطق گرم و سرد نیمکره شمالی متمرکز شده اند. این تیره اغلب به عنوان ابتدایی ترین گیاهان علفی نهانده در نظر گرفته می شود (Tamura 1966).

۳-۱- تاریخچه و رده بندی تیره آلاله (Ranunculaceae)

یکی از معتبرترین مقالات در رابطه با این تیره توسط Tamura تحت عنوان ریخت شناسی، اکولوژی و فیلوژنی تیره آلاله (Tamura 1967) منتشر شده است. در این رابطه باید اشاره کرد که Tamura ضمن مطالعه دقیق ریخت شناسی توانسته است از صفات دیگری چون جنین شناسی و ویژگی های تشریحی نیز برای معرفی گروه بندی های مختلف این تیره استفاده کند. باید اشاره کنیم که در طبقه بندی تیره آلاله قبلاً دو زیر تیره تشخیص داده شده بود (Langlet 1932) که شاید مهمترین صفت برای تمایز این دو زیر تیره که شامل Thalictroidae و Ranunculoidae هستند صفات مربوط به عدد کروموزومی می باشد. در این دسته بندی گروه اول دارای کروموزوم های R-type و گروه دوم دارای کروموزوم های T-type هستند (Johansson and Yansen 1993).

(Hoot 1995). یکی دیگر از رده بندی های قدیمی توسط Tamura (1968) انجام شد که ۶ زیر تیره و ۱۰ قبیله را در این تیره تشخیص داده و معرفی کرده است (Johansson and Yansen 1991, Hoot 1993). اما در رده بندی های کلادیستیکی جدید فقط دو زیر تیره تشخیص داده شد و در تمامی این موارد نسبت به موقعیت قرارگیری تاکسون های مختلف و همچنین سطوح رده بندی آنها اختلاف نظر دیده می شود (Hoot 1991).

۱-۴ - سیستم گرده افشانی در تیره آلاله (Ranunculaceae)

برخلاف ریخت شناسی نسبتاً ابتدائی، اعضای این تیره تمهیدات مختلفی برای گرده افشانی نشان می دهند و عمدتاً با جانوران گرده افشانی می کنند. معمولاً با یک گلپوش رنگی تزئین شده اند. برخی گونه های حشره دوست گلپوش های زودافت و کوچک دارند. در این گونه ها میله های رنگی عمل جذب را انجام می دهند. رنگهای گل عمدتاً زرد، سفید، ارغوانی و گاهی آبی ارغوانی است (Kubitzki 1993).

۱-۵ - مقدمه ای بر تاکسونومی تیره آلاله (Ranunculaceae)

اولین تغییر مهم در این تیره توسط Langlet (1932) با مطالعه کاربوتیپی بر روی ۲۰۰ گونه از این تیره صورت گرفت. او با تکیه بر دو تیپ کروموزومی که در آلاله تشخیص داد، دو زیر تیره پیشنهاد کرد: Ranunculoidae با کروموزوم های بزرگ نوع R (*Ranunculus*) و Thalictroideae با کروموزوم های کوچک نوع T (*Thalictrum*). او زیر تقسیمات بعدی را بر اساس عدد پایه

کروموزومی پایه انجام داد. Gregory (1941) فیلوژنی و سیستماتیک این تیره را از دیدگاه سیتولوژی و عمدتاً بر اساس نوع و عدد کروموزومی بررسی کرد. او زیر تقسیماتی در تاکسون های با کروموزوم نوع T صورت داد. (1966, 1968) Tamura اگرچه اصول استدلال Langlet را پذیرفت، اما بر اساس مطالعات ریخت شناسی Ranunculaceae را به ۶ زیر تیره تقسیم کرد. مطالعات او نشان داد که در گروه تیپ R عدد پایه کروموزومی اصلی ۸ است. زیر تیره Ranunculoideae با میوه های یک دانه ای از زیر تیره Helleboroideae با میوه های پر دانه جدا می شود. در زیر تیره Helleboroideae قبیله Cimcifugeae با گل آذین خوشه، قبیله Nigelleae با فرم رویشی یکساله، عدد پایه کروموزومی $x=6$ و $x=7$ و همچنین قبیله Delphinieae با گل های نامنظم مشخص می شوند. در زیر تیره Ranunculoideae قبیله Adonieae با تخمک دو پوسته ای از قبیله های دیگر متفاوت است. قبیله Anemoneae اکثراً بدون گلبرگ هستند. زیر تیره Thalictroideae با $x=7$ میوه فندقه دارد که به نظر می رسد از قبیله Isopyroideae مشتق شده باشد. زیر تیره Hydrastidoideae با $x=13$ یک زیر تیره جدا در این تیره است (Kubizki 1993). (1991) Hoot بر پایه مطالعات ریز ریخت شناسی بشره و ریخت شناسی روابط فیلوژنی این تیره را بررسی کرد. او در این تیره دو زیر تیره تشخیص داد. نتایج به دست آمده نشان داد که گروهی با کروموزوم نوع T در Ranunculaceae ابتدائی تر است. اگر حضور گلبرگ وضعیت ابتدائی در نظر گرفته شود گروه Anemone در گروهی با کروموزوم نوع R پایه ای است. گروه Delphinieae کلاد انتهایی است و رابطه نزدیکی با گروه Helleborus دارد. او بیان کرد که آنالیزهای کلادیستیک سرعت بالای تکامل موجود در این تیره را تأیید می کند.

۶-۱- مطالعات تشریحی در تیره آلاله (Ranunculaceae)

استفاده علمی از تشریح در تاکسونومی و رده بندی گیاهان منحصر به ۱۰۰ سال گذشته است و علت این امر پیشرفته شدن میکروسکوپ ها با بزرگنمایی های بیشتر می باشد. امروزه اطلاعات حاصل از ساختمان میکروسکوپی منبع استاندارد جهت استفاده در مسیر اهداف تاکسونومیک است و همیشه به عنوان اطلاعات و خصوصیتی مکمل برای خصوصیات ریخت شناسی محسوب می شوند. حتی مشاهده شده است که برخی اوقات این صفات در شناسایی صحیح گیاهان نقشی تعیین کننده تر از صفات ریخت شناسی دارند (Stace 1989).

۷-۱- فیلوژنی مولکولی در تیره آلاله (Ranunculaceae)

وجه مشترک میان زیست مولکول و کلادیستیک رشته ای جدید و جالب به نام فیلوژنی مولکولی را گشوده است. فنون جدید با استفاده از استخراج، تکثیر و توالی یابی DNA و سایر ماکرومولکول ها نظیر پروتئین ها تغییرات ویژه در بازهای تکی یا باقی مانده های اسید آمینه را به صورت کلادیستیکی آنالیز می کنند (Wolters et al. 2006). Cai و همکارانش در مطالعه خود توالی ITS ۳۲ گونه از تیره Ranunculaceae و گیاهان مرتبط که قبلاً گزارش نشده بود را آنالیز نمودند. که نتایج آن دانش ابتدائی روابط و روند تکاملی در تیره Ranunculaceae و سایر گیاهان مرتبط را فراهم نمود. مطالعات فیلوژنتیک به طور اصلی بر اساس کاراکترهای ریخت شناسی و مولکولی می باشد (Cai et al. 2010). وظیفه فیلوژنتیک مولکولی برگرداندن اطلاعات توالی ها به درخت تکاملی برای آن توالی ها می باشد (Page & Holms 1998). Homoplasy در تیره

Ranunculaceae همیشه یک فاکتور محدود کننده در ایجاد یک فرضیه تکاملی قابل اعتماد و تلقی تاکسونومیکی خانواده بوده است.

۸-۱- کلید شناسایی جنس های تیره آلاله (Ranunculaceae) در ایران

a.۱- برگ ها متقابل، گیاه بالارونده *Clematis* L.

b- برگ ها متناوب و قاعده ای، گیاه غیر بالارونده ۲

a.۲- میوه ها برگه ۳

b- میوه فندقه ۸

a.۳- گل ها منظم ۴

b- گل ها نامنظم ۶

a.۴- گلپوش یک حلقه ای (یک ردیفی)، غدد شهدی با برچه ها پوشیده شده، برگ ها ساده و

قلبی شکل *Caltha* L.

b- گلپوش دو ردیفی (دو حلقه ای)، حلقه داخلی دارای غدد شهدی، برگ ها مرکب ۵

a.۵- یک ساله، برگ ها ۲-۳ بار شانه ای منقسم با تقسیمات طویل *Nigella* L.

b- چند ساله، برگ ها با تقسیمات سه تایی، گل ها مهمیز دار *Aquilegia* L.

a.۶- برگه ها منفرد (برگه منفرد)، حلقه داخلی گلپوش به هم پیوسته با

یک مهمیز. *Consolida* (DC.) S. F. Gray.

b- برگه ۳-۵ عدد، حلقه داخلی گلپوش با قطعات جدا از هم ۷

a.۷- قطعه بالایی حلقه بیرونی گلپوش کلاه خود مانند (Hooded) و برگشته، دو قطعه بالایی

حلقه داخلی به شکل عصای کشیش ها (crozier shaped or crosier shaped) و در زیر کلاه خود

قرار گرفته. *Aconitum* L.

b- قطعه بالایی حلقه بیرونی گلپوش مهمیزدار، قطعات گلپوش حلقه داخلی پهنکدار و دو قطعه

بالایی مهمیزدار و درون مهمیز کاسبرگی قرار گرفته. *Delphinium* L.

a.۸- گلپوش یک حلقه ای، تمام قطعات مشابه ۹

b- گلپوش دو حلقه ای، قطعات دو حلقه نامشابه ۱۰

a.۹- برگ ها پنجه ای یا شانه ای منقسم، برگ های ساقه منفرد، دارای حلقه ای از

گریبان *Anemone*L.

b- برگ ها منقسم سه تایی، برگ های ساقه دارای حلقه ای از گریبان، منفرد

نیستند. *Thalictrum* L.

a.۱۰- برگ ها همگی قاعده ای، گیاه یک ساله *Ceratocephalus* Moench.

b- برگ ها قاعده ای و ساقه ای ۱۱