University of Tehran
Faculty of sciences
Department of plant biology

Taxonomy and phylogenetic relationships in complex *Onosma bulbotricha*. DC (Boraginaceae) with emphasis on morphological, micromorphological and molecular evidences

By:
Abdollah Ramezanizadeh Darband

Supervisors:
Dr. Farideh Attar
Dr. Jamil Vaezi

Advisor:
Dr. Arash Sotoodeh

Presented for the Degree of M.S.c in Plant Science (Plant systematic and Ecology)

September, 2022

دانشگاه تهران

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی گیاهی

آرایه‌شناسی و روابط تبارزایشی کمپلکس *Onosma bulbotricha*. DC (خانواده گاوزبان) با تاکید بر شواهد ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی و مولکولی

نگارش:

عبدالله رمضانی‌زاده دربند

استادان راهنما:

دکتر فریده عطار

دکتر جمیل واعظی

استاد مشاور:

دکتر آرش ستوده

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

رشته علوم گیاهی گرایش سیستماتیک-اکولوژی

شهریور ۱۴۰۱

Abstract

The genus *Onosma* L. (Boraginaceae) consists of about 150 species distributed worldwide. This genus faces numerous taxonomic challenges, such as species identification and delimitation problems. In this study, the taxonomic relationships of the complex *O. bulbotricha* (in the subsection *Haplotricha*) and its related species were investigated using morphological, micromorphological, and molecular evidences. The present inspection aimed to find diagnostic characters for better separation of the members of this group. Using nrDNA ITS and cpDNA (*rpl32-trnL*) markers, we reconstructed phylogenetic relationships within this complex by performing maximum parsimony, maximum likelihood, and Bayesian analyses. Our results indicated that effective morphological traits were categorised into 12 main factors that contributed to 70% of the total variance. However, there are no significant differences in qualitative and quantitative diagnostic characteristics (leaves trichome, pollen, nutlet) among the studied populations of the *O. bulbotricha* complex . Interspecific hybridization seems to have played an important role in the species of this study. In addition, three new species were discovered and are illustrated here. Diagnostic morphological characters of this new species are discussed with the related species, and an updated key and descriptions for them are also provided.

Key words : *Onosma*, morphology, micromorphology, phylogenetic analysis, species

چکیده

جنس *Onosma* L. (Boraginaceae) از حدود ۱۵۰ گونه پراکنده در سراسر جهان تشکیل شده است. این جنس با چالش‌های طبقه‌بندی متعددی مانند شناسایی گونه‌ها و مشکلات تعیین حدود مواجه است. در این مطالعه، روابط طبقه‌بندی کمپلکس *O. bulbotricha* در زیربخش (*Haplotricha*) و گونه‌های مرتبط با آن با استفاده از شواهد ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از بررسی حاضر، یافتن ویژگی‌های تشخیصی برای تفکیک بهتر اعضای این گروه بود. با استفاده از نشانگرهای nrDNA ITS و cpDNA (*rpL32-trnL*)، ما روابط فیلوژنتیکی را در این مجموعه با انجام حداکثر تحلیل، حداکثر احتمال و تحلیل بیزی بررسی کردیم. نتایج نشان داد که صفات ریخت‌شناسی مؤثر در ۱۲ عامل اصلی طبقه‌بندی شدند که ۷۰ درصد از واریانس کل را تشکیل می‌دهند. با این حال، تفاوت معنی‌داری اندکی در ویژگی‌های تشخیصی کمی و کیفی ریزریخت‌شناسی (پوشش کرکی برگ، گرده، فندوقچه) در میان جمعیت‌های مورد مطالعه کمپلکس *O. bulbotricha* دیده شد. به نظر می‌رسد هیبریداسیون بین گونه‌ای نقش مهمی در گونه‌های این مطالعه داشته است. علاوه بر این در این مطالعه چهار گونه جدید شرح داده شد که در محدوده کمپلکس *O. bulbotricha* قرار می‌گیرد. خصوصیات ریخت‌شناسی تشخیصی گونه‌های جدید با گونه‌های مرتبط مورد بحث قرار گرفته، و کلید به روز شده و توضیحاتی نیز برای آن‌ها ارائه شده است.

کلمات کلیدی: *Onosma*، ریخت‌شناسی، ریزریخت‌شناسی، روابط تبارزایی، گونه

فهرست مطالب

۱-مقدمه ۱

۱-۱ جایگاه گیاه‌شناسی خانواده گاوزبان ۱

۱-۲ ریخت‌شناسی خانواده گاوزبان ۲

۱-۳ پراکنش جغرافیایی خانواده گاوزبان ۳

۱-۴ زیرتقسیمات و روابط در خانواده گل گاوزبان ۴

۱-۵ دیرینه‌شناسی خانواده گاوزبان ۸

۱-۶ گرده‌شناسی خانواده گاوزبان ۸

۱-۷ معرفی قبیله Lithospermae ۹

۱-۸ گیاهشناسی جنس *Onosma* L. ۱۲

۱-۹ پراکندگی جغرافیایی جنس *Onosma* در جهان ۱۲

۱-۱۰ پراکندگی جغرافیایی جنس *Onosma* در ایران ۱۳

۱-۱۱ طبقه‌بندی جنس *Onosma* ۱۴

۱-۱۲ ریخت‌شناسی گرده جنس *Onosma* ۱۶

۱-۱۳ سیستم گردهافشانی جنس *Onosma* ۱۷

۱-۱۴ مطالعات کروموزومی ۱۷

۱-۱۴ فیتوشیمی جنس *Onosma* ۱۹

۱-۱۵ کاربرد دارویی و اهمیت اقتصادی جنس *Onosma* ۲۰

۱-۱۶ طرح مسئله ۲۰

۱-۱۹ تاریخچه مطالعات انجام شده بر روی جنس *Onosma* L. ۲۱

۲- مواد و روش‌ها .....

۲-۱ جمع‌آوری اطلاعات ۲۸

۲-۲ مطالعات هرباریومی ۲۸

۲-۳ مطالعه ریزریخت‌شناسی ۲۸

۲-۳-۱ تشریح و آماده‌سازی گل‌ها ۲۸

۲-۴ مطالعات ریخت‌شناسی ۳۳

فهرست مطالب

۲-۴-۱ تجزیه و تحلیل داده‌های ریخت‌شناسی ۳۶

۲-۵ بررسی ریزریخت‌شناسی نمونه‌ها ۳۷

۲-۵-۱ مطالعات پوشش کرکی برگ ۳۷

۲-۵-۲ تجزیه و تحلیل بررسی‌های پوشش کرکی برگ ۳۷

۲-۶ مطالعات گرده‌شناسی ۳۷

۲-۶-۱ عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپالکترونی ۳۷

۲-۶-۲ عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ نوری ۳۸

۲-۶-۳ تجزیه و تحلیل گرده‌شناسی ۳۹

۲-۷ مطالعات فندقچه ۳۹

۲-۷-۱ تجزیه و تحلیل مطالعات بر روی فندقچه ۳۹

۲-۸ مطالعات مولکولی ۴۰

۲-۸-۱ انتخاب نشانگر مولکولی ۴۰

۲-۸-۱-۱ نشانگر مولکولی کلروپلاستی ۴۰

۲-۸-۱-۲ نشاگر مولکولی هستهای ITS ۴۲

۲-۸-۲ استخراج DNA ۴۳

۲-۸-۲-۱ تهیه محلول‌های موردنیاز برای استخراج DNA ۴۴

۲-۸-۲-۱-۱ تهیه بافرTE ۴۴

۲-۸-۲-۱-۲ تهیه بافر TBE(0/5X) ۴۵

۲-۸-۲-۱-۳ تهیه بافر CTAB ۴۵

۲-۸-۳ آماده‌سازی نمونه‌ها برای PCR ۴۶

۲-۸-۴ مراحل واکنش PCR ۴۷

۲-۸-۳-۱ برنامه دمایی برای تکثیر قطعه ITS ۴۸

۲-۸-۳-۲ برنامه دمایی برای تکثیر قطعه *rpL32-trnL* ۴۹

۲-۸-۵ ژل الکتروفورز ۵۳

۲-۹ تعیین توالی قطعات تکثیرشده و همردیفی چندگانه توالی‌ها ۵۵

۲-۱۰ تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی و ترسیم درخت تبارزایشی ۵۶

۲-۱۰-۱ روش استنباط بیزی ۵۶

۲-۱۰-۲ روش حداکثر درست‌نمایی ۵۶

فهرست مطالب

۲-۱۰-۳ روش بیشینه‌صرفه‌جویی ۵۷

۲-۱۰-۵ تخمین شبکه هاپلوتیپ ۵۸

۲-۱۰-۶ توالی آرایه‌های دریافت شده از Gene Bank (NCBI) ۵۸

۳- نتایج .....

۳-۱ آرایه شناختی اجزای کمپلکس ۶۱

۳-۲ نتایج تجزیه و تحلیلهای ریختشناسی ۶۱

۳-۲-۱ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیلهای چندمتغیره ۶۱

۳-۲-۲ شرح گونه‌های کمپلکس *O. bulbotricha* ۶۶

۳-۲-۳ گزارش گونه‌های جدید جنس *Onosma* برای کشور ایران ۷۵

۳-۳ نتایج تجزیه و تحلیل ریز ریخت‌شناسی پوشش کرکی برگ ۹۲

۳-۳-۱ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل PCoA ۹۴

۳-۳ نتایج تجزیه و تحلیل مطالعات گرده‌شناسی ۱۰۱

۳-۳-۱ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای ۱۰۲

۳-۴ نتایج تجزیه و تحلیل مطالعات فندقچه ۱۰۶

۳-۴-۱ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای فندوقچه ۱۰۸

۳-۵ نتایج مطالعات مولکولی ۱۱۱

۳-۵-۱ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیلهای حداکثر درست‌نمایی و بیزین و بیشینه صرفه‌جویی داده‌های نشانگر ITS ۱۱۲

۳-۵-۱-۱ تجزیه و تحلیل شبکه هاپلوتایپی داده‌های ITS ۱۱۴

۳-۵-۲ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیلهای Maximum Likelihood و Bayesian و بیشینه صرفه‌جویی داده‌های نشانگر *trnL_rpL32* ۱۱۵

۳-۵-۲-۱ تجزیه و تحلیل شبکه هاپلوتایپی داده‌های *rpL32_trnL* ۱۱۸

۴- بحث .....

۴-۱ بررسی‌های ریختشناسی ۱۲۲

۴-۴-۱ کلید شناسایی گونه‌های مورد بررسی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی ۱۲۴

۴-۲ بررسی نتایج دادههای حاصل از مطالعات پوشش کرکی سطح برگ ۱۲۸

۴-۳ بررسی نتایج دادههای حاصل از مطالعات گرده‌شناسی ۱۲۹

۴-۴ بررسی نتایج دادههای حاصل از مطالعات فندوقچه ۱۳۰

۴-۵ بررسی نتایج دادههای حاصل از مطالعات مولکولی ۱۳۱

فهرست مطالب

۱-۴-۵ تحلیل درخت‌های تبارزایشی حاصل از استنباط بیزی و حداکثر درست‌نمایی نشانگر (ITS)، با در نظر گرفتن اطلاعات ریخت شناسی ۱۳۱
۴-۶ نتیجه‌گیری:..... ۱۳۲
۵- منابع..... ۱۳۳

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱ کلادوگرام راسته‌های Asterids برطبق APG IV؛ موقعیت قرارگیری راسته Borginales ۱

شکل ۱-۲ بعضی از جنس های خانواده گاوزبانیان ۳

شکل ۱-۳ فیلوژنی خانواده گاوزبانیان ۷

شکل ۱-۷ تنوع ریخت‌شناسی در قبیله Lithospermae ۱۱

شکل ۱-۸ نقشه پراکنش جنس *Onosma* در ایران ۱۴

شکل ۱-۹ اشکال مختلف کرک در زیربخش‌های بخش *Onosma* ۱۶

شکل ۱-۱۰ توزیع جغرافیایی رکوردهای تعداد کروموزوم در جنس *Onosma* ۱۸

شکل ۱-۱۱ درصد رکوردهای تعداد کروموزوم برای جنس *Onosma* ۱۸

شکل ۱-۱۲ توزیع پلی پلوئیدی در جنس *Onosma* ۱۹

شکل ۱-۱۳عکس از گونه *O. sulaimanica* و *O. bulbotricha* ۲۱

شکل ۱-۱۴تجزیه و تحلیل بیزی مجموعه داده nrDNA ITS ۲۵

شکل ۱-۱۵تجزیه و تحلیل بیزی مجموعه داده ترکیبی *psbA-trnH* و *rpl32-trnL* (UAG) ۲۶

شکل ۲-۱ همبستگی صفات ریخت‌شناسی برای به دست آوردن صفات گمشده ۳۴

شکل ۲-۲ ژنوم کلروپلاستی و جایگاه *rpL32-trnL* بر روی آن ۴۱

شکل ۲-۳ ساختار آغازگر ITS1-4 ۴۲

شکل ۲-۴ محل انجام فرایند PCR ۴۵

شکل ۲-۶ شماتیک از مراحل PCR ۴۸

شکل ۲-۷ برنامه دمایی برای تکثیر قطعه ITS ۴۸

شکل ۲-۷ برنامه دمایی برای تکثیر قطعه *rpL32-trnL* ۴۹

شکل ۲-۸ دستگاه ترموسایکلر مورد استفاده در فرآیند PCR ۴۹

شکل ۲-۹ راست: دستگاه Gel duc، چپ: لدر استفاده شده ۵۴

شکل ۲-۱۰ الکتروفورز محصول PCR ۵۵

شکل ۲-۱۱ توالی‌های ویرایش‌شده، به همراه توالی‌هایی NCBI در نرم‌افزار BioEdit ۵۵

فهرست شکل‌ها

شکل۳-۱. نمودار پراکندگی به دست آمده از طریق PCoA برای صفات ریخت‌شناسی..... ۶۳

شکل ۳-۲: باکس پلات مربوط به طول براکته..... ۶۳

شکل ۳-۳. باکس پلات مربوط به میزان بیرون‌زدگی بخش نازای بساک از جام گل..... ۶۴

شکل ۳-۴. باکس پلات مربوط به طول جام..... ۶۴

شکل ۳-۵. باکس پلات مربوط به طول گل‌آذین..... ۶۴

شکل ۳-۶. باکس پلات مربوط به طول کاسه گل..... ۶۵

شکل ۳-۷. باکس پلات مربوط به عرض لوبه جام..... ۶۵

شکل ۳-۸. باکس پلات مربوط به طول میله پرچم..... ۶۵

شکل ۴-۹. نمونه هرباریومی گونه *O. bulbotricha*..... ۶۸

شکل ۳-۱۰. گونه *Onosma bulbotricha*..... ۶۹

شکل۳-۱۱. نمونه هرباریومی گونه *O. sulaimanica*..... ۷۱

شکل ۳-۱۲. نمونه هرباریومی گونه *O. cyrenaica subsp. straussii*..... ۷۳

شکل ۳-۱۳. نمونه هرباریومی گونه *O. estahbanensis*..... ۷۴

شکل ۳-۱۴نمونه هرباریومی گونه *O. aleppica*..... ۷۶

شکل ۳-۱۵. نمونه هرباریومی گونه *O. sp.* (43649)..... ۷۷

شکل ۳-۱۶. نمونه هرباریومی گونه *O. sp.* (12174)..... ۷۸

شکل ۳-۱۷. نمونه هرباریومی گونه *O. sp.* (20391)..... ۷۹

شکل ۳-۱۸. *Onosma bulbotricha*..... ۸۰

شکل ۳-۱۹. *Onosma sulaimanica* (48480)..... ۸۱

شکل ۳-۲۰. *Onosma sulaimanica* (8183)..... ۸۲

شکل ۳-۲۱. *Onosma sulaimanica* (48479)..... ۸۳

شکل ۳-۲۱. *Onosma aleppica*..... ۸۴

شکل ۳-۲۲. *Onosma cyrenaica subsp. straussii*..... ۸۵

شکل ۳-۲۳. *Onosma estahbanensis* (46706)..... ۸۶

شکل ۳-۲۳. *Onosma estahbanensis* (19174)..... ۸۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۳-۲۴. *Onosma sp* (12174) ۸۸

شکل ۳-۲۶. *Onosma sp* (20391) ۸۹

شکل ۳-۲۷. *Onosma sp* (43649) ۹۰

شکل ۳-۲۵. *Onosma sp* (20426) ۹۱

شکل۳-۲۸. نمودار پراکندگی به دست آمده از طریق PCoA برای پوشش کرک برگ‌ها ۹۴

شکل ۳-۲۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma bulbotricha* ۹۵

شکل ۳-۳۰. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma estahbanensis* ۹۶

شکل ۳-۳۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma cyrenaica subsp. straussii* ۹۶

شکل ۳-۳۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma sulaimanica* ۹۷

شکل ۳-۳۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma sulaimanica* ۹۸

شکل ۳-۳۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma sulaimanica* ۹۹

شکل ۳-۳۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه *Onosma aleppica* ۹۹

شکل ۳-۳۷. تصاویر میکروسکوپ الکترونی پوشش کرکی برگ گونه‌های sp ۱۰۰

شکل ۳-۳۸. نمودار درختی حاصل از طبقه‌بندی خوشه‌ای داده‌های گرده ۱۰۲

شکل ۳-۳۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma bulbotricha* ۱۰۳

شکل ۳-۴۰. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma cyrenaica subsp. straussii* ۱۰۳

شکل ۳-۴۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma estahbanensis* ۱۰۴

شکل ۳-۴۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma sulaimanica* ۱۰۴

شکل ۳-۴۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma sp.* (۲۰۴۲۶) ۱۰۵

شکل ۳-۴۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma sp.* (۱۲۱۷۴) ۱۰۶

شکل ۳-۴۵. تصاویر میکروسکوپ الکترونی دانه گرده گونه *Onosma sp.* (۲۰۳۹۱) ۱۰۶

شکل ۳-۴۶. تصاویر دانه گرده توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X50 ..... ۱۰۷

شکل ۳-۴۷. نمودار درختی حاصل از طبقه‌بندی خوشه‌ای داده‌های مربوط به فندوقچه ۱۰۸

شکل۳-۴۸. تصاویر میکروسکوپ الکترونی فندوقچه گونه *O. bulbotricha* ۱۰۹

شکل۳-۴۹. تصاویر میکروسکوپ الکترونی فندوقچه گونه *O. estahbanensis* ۱۰۹

فهرست شکل‌ها

شکل ۳-۵۰. تصاویر میکروسکوپ الکترونی فندوقچه گونه *O. cyrenaica subsp. straussii* ۱۱۰

شکل ۳-۵۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی فندوقچه گونه *O. sulaimanica* ۱۱۰

شکل ۳-۵۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی فندوقچه گونه *O. aleppica* ۱۱۰

شکل ۳-۵۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی فندوقچه گونه *Onosma sp.* (۱۲۱۷۴) ۱۱۱

شکل ۳-۵۴ درخت تبارزایشی حاصل از استنباط بیزی، حداکثر درست‌نمایی بیشینه درست‌نمایی نشانگر ITS ۱۱۳

شکل ۳-۵۵. شبکه هاپلوتایپ برای ۲۲ تاکسون از داده‌های ITS ۱۱۵

شکل۳-۵۶. درخت تبارزایشی حاصل از استنباط بیزی و حداکثر درست‌نمایی نشانگر *rpL32_trnL* ۱۱۶

شکل۳-۵۷. درخت تبارزایشی حاصل از بیشینه صرفه جویی ۱۱۷

شکل ۳-۵۸. شبکه هاپلوتایپ برای ۲۱ تاکسون از داده‌های *rpL32_trnL* ۱۱۹

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۱ مقایسه روزنه دانه گرده بین برخی از قبایل خانواده Boraginaceae ۹

جدول ۲-۱ نمونه‌های مورد استفاده در تشریح اندام زایشی گل ۲۹

جدول ۲-۲ صفات کمی و کیفی مورد استفاده در مطالعات ریخت‌شناسی ۳۴

جدول ۲-۳ فهرست نمونه‌های بررسی شده جهت مطالعات گرده‌شناسی ۳۸

جدول ۲-۴ نام قطعات و توالی آغازگرهای استفاده شده در پژوهش مولکولی ۴۰

جدول ۲-۵ مواد لازم برای تهیه بافر Tris EDTA (TE). ۴۴

جدول ۲-۶ مواد لازم برای تهیه بافر TBE ۴۵

جدول ۲-۷ مواد لازم برای تهیه بافر CTAB ۴۵

جدول ۲-۸ نام و حجم اجزای به‌کار رفته در تهیه محصول PCR ۴۷

جدول ۲-۹ مشخصات گیاهان مورد استفاده برای مطالعه مولکولی و پوشش کرکی سطح برگ ۵۲

جدول ۲-۱۰ انتخاب درصد آگارز مورد استفاده برای ساخت ژل ۵۳

جدول ۲-۱۱ توالی آرایه‌های دریافت شده از بانک ژن ۵۸

جدول ۳-۱ نتایج آزمون ANOVA جهت بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین گونه‌های مورد مطالعه ۶۲

جدول ۳-۲. داده‌های مربوط به اندازه‌گیری پوشش کرکی برگ ۹۲

جدول ۳-۳ داده‌های مربوط به دانه گرده در گونه‌های مورد مطالعه ۱۰۱

جدول ۳-۴. داده‌های مربوط به اندازه‌گیری فندوقچه‌ها ۱۰۷

جدول۳-۵ شاخص‌های آماری مربوط به تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه جویی ۱۱۲

جدول۳-۶ شاخص‌های آماری مربوط به تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه جویی ۱۱۸

جدول ۳-۷. اطلاعات مربوط به فراوانی هر یک از نوکلئوتیدهای گونه‌های مورد مطالعه توسط برنامه Bioedit ۱۱۹

جدول ۴-۱. مقایسه صفات ریخت‌شناسی تشخیصی بین *O.sp.* (43649) و *O. bulbotricha* ۱۲۸

جدول ۴-۲. مقایسه صفات ریخت‌شناسی تشخیصی بین *O.sp.* (20391) و *O. bulbotricha* ۱۲۹

فهرست جدول‌ها

جدول ۴-۳. مقایسه صفات ریخت‌شناسی تشخیصی بین (12174) *O.sp.* و *O. bulbotricha* ۱۳۰

جدول ۴-۴. مقایسه صفات موفولوژی تشخیصی بین (20426) *O.sp.* و *O. bulbotricha* .....