

## مطالعه مولکولی و ریزریخت‌شناسی *Juniperus excelsa* و *J. polycarpos* در چهار باغ استان گلستان

تاج محمد عمر عطا<sup>۱</sup>، ابوالفضل دانشور<sup>۲\*</sup>، علی ستاریان<sup>۳</sup>، الهام امینی<sup>۴</sup> و فاطمه نصرالهی<sup>۵</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۲\* نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

پست الکترونیک: Abolfazl.daneshvar@gmail.com

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۵- دانش‌آموخته دکتری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۱۲

### چکیده

ارس از معدود سوزنی‌برگان ایران است که با دارا بودن شش گونه بیشتر جنگل‌های تنک با درختان پراکنده را تشکیل داده است و در میان آنها گونه‌های *Juniperus polycarpos* و *J. excelsa* بیشتر از سایر گونه‌ها انتشار دارند. به علت شباهت ظاهری بسیار زیاد، شناسایی دو گونه یادشده از یکدیگر مشکل است. در این تحقیق شاخص‌های گرده‌شناسی، آناتومی و مولکولی با هدف کمک به شناسایی و تفکیک این دو گونه ارس در استان گلستان، منطقه چهارباغ گرگان ارزیابی شد. با استفاده از نشانگر هسته‌ای nrDNA ITS، روابط مولکولی در دو گونه مورد نظر بررسی شد. آنالیزهای فیلوژنی نشان داد که دو گونه تک‌تبار هستند و جمعیت‌ها در زیرشاخه‌های I و II به صورت حل نشده قرار گرفتند. دانه گرده دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpos* توسط دستگاه میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی گردید. نتایج نشان داد که تمامی دانه‌های گرده منفرد، تک‌شیار سطحی از نوع Ulicurate، نامتقارن و از نظر اندازه کوچک بودند. از لحاظ شکل هر دو گونه کروی کشیده (Prolate spheroidal) با تزئینات آگزین دانه‌دانه (Granulate) هستند. طرح کلی گرده‌ها در میکروسکوپ نوری، دایره‌ای با سطح صاف و بدون فرورفتگی است ولی در دانه گرده مورد بررسی در میکروسکوپ الکترونی نگاره به صورت نامنظم و دارای فرورفتگی‌هایی می‌باشد. نتایج به دست آمده از مطالعات تشریحی ساقه نیز تفاوت کمی را نشان داده و قابلیت تفکیک و شناسایی دو گونه را ندارد. نتایج نشان‌دهنده این موضوع است که احتمالاً در منطقه چهار باغ یک گونه انتشار دارد و این دو آرایه مترادف‌اند.

واژه‌های کلیدی: آگزین، گرده، nrDNA ITS، مطالعات تشریحی، مولکولی

### مقدمه

آمریکا، اروپا و آسیا- حضور دارند (Earle, 2006).  
اجتماعات ارس در بسیاری از نقاط دنیا در مقایسه با قلمرو  
سایر سوزنی‌برگان از سخت‌ترین شرایط اقلیمی (حتی تا ۴۰  
- درجه سانتیگراد) و فقیرترین شرایط خاکی برخوردار  
هستند که موجب تهدید استمرار حیات این گونه شده است

سرده ارس (*Juniperus L.*) متعلق به تیره سرویان  
(Cupressaceae) شامل ۶۸ گونه متفاوت در شکل‌های  
خزنده تا درختی از جمله پایدارترین سوزنی‌برگان جهان  
هستند و معمولاً بیشتر آنها در سرتاسر نیمکره شمالی- شمال

دو گونه مجزا معرفی کرده‌اند. در صورتی که Assadi (۱۹۹۸) این دو گونه را مترادف با یکدیگر دانسته و تنها به یک گونه با نام *J. excelsa* اشاره می‌کند. Korori و همکاران (۲۰۱۰) ثابت کرده‌اند که دو گونه *J. polycarpus* و *J. excelsa* در ارتباط تکاملی با یکدیگر هستند. در کتاب مطالعات اکولوژی و زیست‌شناسی سرده ارس در ایران نیز تفکیک تاکسونومی این سرده به طور محدود مورد بحث قرار گرفته است (Korori & Khoshneviis, 2000). هنوز هم میان استادان و محققان درباره *J. excelsa* (فرم تک‌پایه) و *J. polycarpus* (فرم دوپایه) اختلاف نظر وجود دارد. این گونه در سال ۱۸۴۹ توسط Koch به نام *J. polycarpus* نامیده شد (Salehi, 1998). در تحقیق دیگری Akhtajan و Fedorov (۱۹۷۲) با انجام بررسی‌های بیوسیستماتیک ارس، *J. polycarpus* را زیرگونه *J. excelsa* نامیدند و به صورت *J. excelsa* subsp. *polycarpus* معرفی کردند. با توجه به محدودیت صفات مورفولوژیکی و تأثیرات متقابل محیط و ژنوتیپ بر فنوتیپ گیاهان، امروزه برای تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌ها عمدتاً از روشهای تکمیلی مانند نشانگرهای مولکولی DNA استفاده می‌شود (Mottaghi et al., 2021). مطالعات مولکولی بر روی گونه‌های ایرانی *Juniperus* محدود است. Kermani و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های سروکوهی پارک ملی تندوره با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD پرداختند و نشان دادند تنوع ژنتیکی درون هر رویشگاه خیلی بیشتر از تنوع ژنتیکی بین رویشگاه‌ها می‌باشد. Adams و Hojjati (۲۰۱۲) با استفاده از ۴ ناحیه nrDNA, petN-psbM, trnD-trnT, trnS-trnG, 3,705 (bp) نشان دادند که آرایه‌های مربوط به *Juniperus* در جنوب ایران بسیار متنوع هستند. Adams و همکاران (۲۰۱۴)، با استفاده از همین نواحی حمایت بسیار بالایی برای آرایه‌های *Juniperus* Adams - (Fedtsch.) (*polycarpus* var. *turcomanica* در فسا (جنوب‌غربی ایران) به دست آوردند. این محققان در سال ۲۰۱۶ با استفاده از مارکر هسته‌ای nrDNA ITS روابط بین دو گونه

(Javanshir, 1982). ارس از گونه‌های درختی ارتفاعات ناحیه رویشی ایران‌تورانی است که در کشور ما گونه‌ای ارزشمند و نماد جنگل‌های خشک کوهستانی و شرایط زیستی دشوار شناخته شده است، زیرا این درختان مقاومت زیادی در مقابل تنش‌های محیطی از خود نشان می‌دهند و بیشتر پایه‌های آن در سخت‌ترین شرایط زیستی و بسترهای کاملاً صخره‌ای که امکان رویش برای کمتر گونه‌ای فراهم است، موجودیت خود را حفظ کرده‌اند (Ravanbakhsh et al., 2010). Zohary (۱۹۷۳) ارس ایران را به منزله گونه باستانی و باقی‌مانده از گستره وسیع جنگل‌های کوهستانی فلات مرکزی ایران که دامنه آن به خارج از ایران نیز کشیده شده می‌داند. او عقیده دارد عوامل انسانی، شرایط اقلیمی و فرسایش مناطق کوهستانی در تجزیه این جنگلها مؤثر بوده است. در ایران دو گونه *J. polycarpus* K.Koch و *J. excelsa* M.Bieb. محدوده پراکنش وسیع‌تری را نسبت به دیگر گونه‌های ارس دارند و در بیشتر رویشگاه‌ها این دو گونه به صورت سیمپاتریک دیده می‌شوند. پوشش غالب منطقه چهار باغ استان گلستان دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpus* است. تراکم درختان ارس در این منطقه زیاد و از بسیاری رویشگاه‌های ارس در سطح کشور بیشتر است. از میان دو گونه در این منطقه تنها حدود دو درصد *J. excelsa* می‌باشد (Korori, 1998). تفکیک آرایه‌شناسی گونه‌های این سرده تاکنون چندین بار مورد بحث قرار گرفته است. Farjon (۱۹۹۲) گزارش کرد که این دو گونه ارس شامل دو زیرگونه *polycarpus* subsp. *excelsa* و *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa* می‌باشد. مطالعات ایزوآنزیمی نشان داد که این دو گونه قرابت تکاملی تنگاتنگی دارند و در واقع یک گونه محسوب می‌شوند و برای تکوین از سمت *J. excelsa* به *J. polycarpus* است که از نظر گیاه‌شناسی تکاملی منفی از تک‌پایه به دوپایه را نشان می‌دهد (Korori, 1998). Javanshir (۱۹۸۲) و Sabeti (۲۰۰۵) بر اساس دوپایه بودن *J. polycarpus* و تک‌پایه بودن *J. excelsa* این دو را

*Juniperus* را در ارتفاعات مختلف (۴۲۰-۱۴۲۰ متر) کوه‌های صربستان مطالعه کردند که طی آن سه ویژگی مورفولوژیکی و شش ویژگی آناتومیکی را ارزشمند دانستند. در مطالعه انجام شده توسط Omarata و همکاران (۲۰۱۹)، شاخص‌های صفات کمی و کیفی مخروط میوه و بذر دو گونه ارس در منطقه چهارباغ ارزیابی شده و دو گونه مذکور از هم تفکیک شدند.

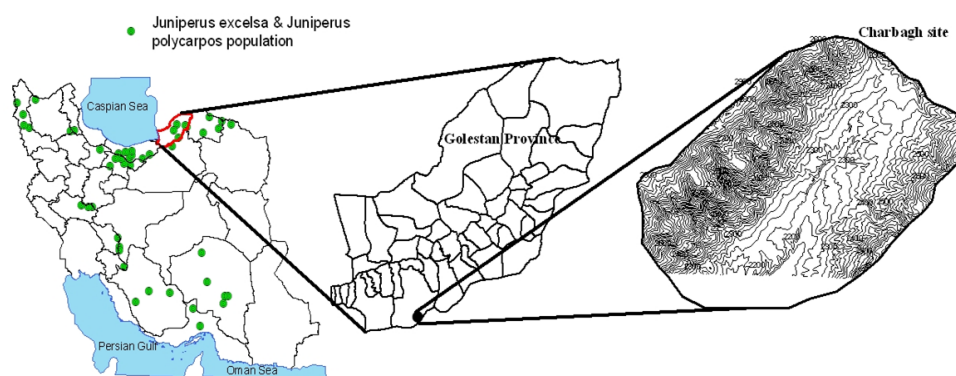
در این تحقیق، تلاش شده است تا برای تفکیک و شناسایی دو گونه ارس در استان گلستان علاوه بر مطالعه دانه گرده و اطلاعات حاصل از صفات تشریحی، برای بررسی روابط تبارشناختی بین آرایه‌های این سرده داده‌های مربوط به بخشی از ژنوم هسته‌ای نیز ارزیابی شود. این پژوهش، نخستین بررسی آناتومی، گرده‌شناسی و مولکولی در مورد گونه‌های *Juniperus* در استان گلستان است.

### مواد و روش‌ها

در این بررسی، ۱۰ جمعیت از دو گونه *Juniperus* در ایران در منطقه چهارباغ استان گلستان بررسی شد (جدول ۱). این جمعیت‌ها از زیستگاه‌های مختلف جمع‌آوری و با مراجعه به فلور ایران (Assadi, 1998) شناسایی شد. کلیه نمونه‌های بررسی شده، در مرکز هرباریوم دانشگاه گنبد کاووس نگهداری می‌شوند.

*J. excelsa* و *J. polycarpos* را در آسیای صغیر بررسی کردند و شواهدی مبنی بر Lineage sorting (جورشدگی دودمان: یکی از عواملی که به متفاوت شدن درخت ژنی از درخت گونه‌ای می‌انجامد) یا Hybridization (به معنای دورگه‌گیری بین دو یا چند دودمان مجزا که به منشأ یک گونه جدید کمک می‌کند) میان گونه‌های *J. polycarpos* و *J. seravschanica* در مرکز ترکیه و شمال غربی ایران نشان دادند (Adams et al., 2016).

در زمینه مطالعات گرده‌شناسی، گونه *J. excelsa* توسط Halbritter (۱۹۸۸) بررسی شده و مشخص شد که گرده‌ها کوچک، نامتقارن، با یک شیار سطحی و تزئینات دانه‌دار هستند. گرده‌های *Juniperus* محتوای یکی از قوی‌ترین مواد حساسیت‌زا است که از طریق هوا منتقل می‌شود و این گرده‌ها با حساسیت‌های مربوط به بینی، سینوس‌ها و حساسیت‌های ریوی در انسان و حیوانات اهلی مرتبط است (Judd et al., 2003). البته تا کنون مطالعات گرده‌شناسی بر روی دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpos* در ایران انجام نشده است. Lakušić و Lakušić (۲۰۱۱)، آناتومی برگ و ساقه چهار آرایه از سرده *Juniperus* را در شبه جزیره بالکان بررسی کردند و ارزش آرایه‌شناختی آن را در سطح گونه و فراگونه‌ای به خوبی نشان دادند. همچنین Vasić و همکاران (۲۰۱۴)، مورفولوژی و آناتومی برگ گونه‌های



شکل ۱- نقشه پراکنش دو گونه ارس در ایران و موقعیت منطقه چهارباغ در استان گلستان (Daneshvar et al., 2015)

Figure 1. Distribution map of *J. excelsa* and *J. polycarpos* in Iran and Location of Chahar Bagh region of Golestan Province, Iran (Daneshvar et al., 2015)



شکل ۲- سیمای عمومی ارس، منطقه چهارباغ استان گلستان

Figure 2. General view of *Juniperus*, Chahar Bagh region of Golestan province, Iran

جدول ۱- لیست جمعیت‌های مورد مطالعه و مشخصات رویشگاه‌های آنها

Table 1. List of species used in the study along with localities and vouchers.

Species	Locality	collector	Altitude (m)	Voucher no.	Accession no.
<i>J. excelsa</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2254	803328-GKUH	LC704579
<i>J. excelsa</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2269	803329-GKUH	LC704580
<i>J. excelsa</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2325	803330-GKUH	LC704581
<i>J. excelsa</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2270	803333-GKUH	LC704582
<i>J. excelsa</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2275	803335-GKUH	LC704583
<i>J. polycarpos</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2231	803343-GKUH	LC704584
<i>J. polycarpos</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2254	803345-GKUH	LC704585
<i>J. polycarpos</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2282	803350-GKUH	LC704586
<i>J. polycarpos</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2299	803351-GKUH	LC704587
<i>J. polycarpos</i>	Chahar Bagh region of Golestan province	Omarata	2294	803352-GKUH	LC704588

آنالیز شدند تا روابط فیلوژنتیک میان آنها بررسی شده و در ارتباط با جایگاه آرایه‌شناختی آنها اظهار نظر دقیق‌تری انجام شود.

#### مطالعات مولکولی

در مجموع دو گونه و ۱۰ جمعیت *J. excelsa* و *J. polycarpos* به عنوان درون‌گروه و یک گونه *J. virginiana* نیز بر اساس مطالعات مولکولی پیشین (Adams et al., 2014) به عنوان برون‌گروه در این مطالعه

نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۱۲ (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند. برای انجام آنالیز فیلوژنی بر اساس روش Bayesian، با استفاده از برنامه MrModeltest، نسخه ۲/۳ و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion)، مدل‌های تکاملی مناسب برای داده‌های مورد نظر انتخاب شدند (Posada & Buckley, 2004). طبق این آزمون، مدل SYM+I+G برای توالی nrDNA ITS انتخاب شده و با استفاده از برنامه MrBayes نسخه ۳/۱۲ آنالیزهای فیلوژنتیک انجام شد. حمایت شاخه‌ها در روش Bayesian با اعداد مربوط به احتمال پسین بیان می‌شود. برای آنالیز داده‌ها به روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) از برنامه raxmlGUI (Silvestro & Michalak, 2012) نسخه ۱،۳ و به روش بیشینه صرفه‌جویی از برنامه PAUP (Swofford, 2002) نسخه 4.0a157 استفاده شد. در شبکه فیلوژنتیک گونه‌های سرده *Juniperus* از طریق نرم‌افزار Huson & Bryant (2010) Splits Tree v.4.14.4 و با استفاده از روش شبکه-همسایه آنالیز شدند. در این آنالیز ماتریس مربوط به ITS بدون حضور برون‌گروه‌ها به کار برده شد.

#### مطالعات گرده‌شناسی

برای مطالعه دانه گرده دو گونه سرده *Juniperus* نمونه‌های گرده بر اساس فنولوژی (پدیده‌شناسی) گونه ارس به طور مستقیم از رویشگاه طبیعی منطقه چهارباغ در دهه آخر فروردین و دهه اول اردیبهشت ۱۳۹۶ جمع‌آوری گردید (جدول ۱). منطقه چهارباغ در فاصله ۵۰ کیلومتری جنوب شهرستان گرگان در حوضه آبخیز نکارود، در موقعیت جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۰ دقیقه عرض شمالی و ۵۴ درجه و ۲۵ دقیقه طول شرقی بین استان‌های سمنان و گلستان واقع شده است (Korory, 2010). تغییرات ارتفاع آن از سطح دریا حدود ۲۱۲۰ تا ۲۳۲۰ متر می‌باشد. برای مشاهده با میکروسکوپ نوری از روش استولیز (Erdtman, 1943) استفاده گردید. پس از استولیز با میکروسکوپ نوری

استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و توالی‌یابی DNA کل ژنوم از برگ‌های خشک شده نمونه‌های هرباریومی استخراج شد. روش استخراج بر مبنای روش کیت استخراج DNA گیاهی شرکت تیان ژن چین (DNA secure Plant Kit) است. در این تحقیق، از توالی ناحیه nrDNA ITS برای ارزیابی فیلوژنتیک آرایه‌های مطالعه شده، استفاده شد. به منظور انجام واکنش PCR از آغازگرهای (پرایمر) ITS4 و ITS5 (White et al., 1990) استفاده گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از برنامه بهینه شده با آغازگر مورد نظر و دستگاه‌های ترموسایکلر (Eppendorf, Germany; Astec, Japan) دارای ۹۶ چاهک انجام شد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش‌های

زنجیره‌ای پلیمرز

**Table 2. Sequence of primers used for Polymerase Chain Reactions**

Sequences	Primer
5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	ITS5
5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS4

پس از اطمینان از صحت PCR و تکثیر قطعه مورد نظر به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز، تک باندهای قوی (۲۰ نانوگرم) و فاقد باند اضافی و کشیدگی به منظور تعیین توالی توسط شرکت پیشگام به شرکت Macrogen در کشور کره ارسال شدند.

#### آنالیزهای فیلوژنتیک

در ابتدا کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Bioedit ویرایش شده، سپس توالی‌های مورد اشاره با استفاده از نرم‌افزار Clustal X (Larkin et al., 2007) هم ردیف گردیدند. آنگاه ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده برای قطعه DNA مورد نظر، به کمک

دستی و رنگ‌آمیزی توسط کارمن زاجی و آبی متیل انجام شد. نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری Olympus (مدل BX-40) و با دوربین دیجیتال Canon عکس‌برداری شدند.

### نتایج

#### فیلولوژی

اطلاعات دقیق در مورد ویژگی‌های هم‌ردیفی و مدل انتخابی در جدول ۳ ذکر شده است. توالی‌های هم‌ردیف شده ITS مربوط به آرایه‌های *J. polycarpus* و *J. excelsa* ماتریسی به طول ۵۳۰ جایگاه نوکلئوتیدی ایجاد کرد که ۷۲ جایگاه از لحاظ پارسیمونی اطلاع‌ساز و بقیه غیراطلاعاتی بودند. نتایج حاصل از آنالیزهای بیشینه صرفه‌جویی، بیشینه درست‌نمایی و بیزین باهم سازگار بوده و نتایج مشابه نشان دادند. آنالیز داده‌های حاصل از ITS به روش بیشینه صرفه‌جویی تعداد ۹۲ درخت با طول ۱۳۱ گام، شاخص پایداری (CI) برابر با ۰/۷۰۱ و شاخص گروه‌پذیری (RI) برابر با ۰/۶۹۸ ایجاد کرد. درخت بیزین حاصل از توالی nrDNA ITS در شکل ۳ نشان داده شده است. درون‌گروه که شامل اعضای *J. polycarpus* و *J. excelsa* است، شاخه‌ای با حمایت ۱۰۰/۱۰۰ = PP=1, ML/MP BS تشکیل داد. شاخه اصلی از دو زیرشاخه تشکیل شده است. هر دو زیرشاخه (I و II) شامل جمعیت‌های *J. polycarpus* و *J. excelsa* بصورت ترکیبی باهم هستند.

Nickon مدل E100 و بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ از ۳۰-۲۰ گرده از نمای قطبی و استوایی با دوربین دیجیتال Canon (مدل ۶۳a و ۸ مگاپیکسل) عکس‌برداری شد. به منظور مطالعه و تهیه میکروگراف‌های الکترونی، دانه‌های گرده مناسب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM مدل VEGA// TESCAN-LMU تحت ولتاژ 15, 22KV , KV در مرکز پژوهشکده رازی تهران بررسی و تصویربرداری شدند. برای گزارش نتایج از هر گونه سه پایه درخت انتخاب و در مجموع برای هر گونه ۱۰ نمونه بررسی و میانگین اندازه‌گیری‌ها ارائه شد. صفات طول محور قطبی (P)، طول محور استوایی (E)، نسبت P/E، ضخامت و نوع تزئینات آگزین ارزیابی گردید. تمام اندازه‌گیری‌های مربوطه توسط نرم‌افزار Image tools نسخه ۳ و Axio vision با نسخه ۴/۳ انجام شد. میانگین و انحراف معیار نیز توسط نرم‌افزار Minitab 14 محاسبه گردید. برای تعیین اندازه و شکل گرده از طبقه‌بندی ارتمن (Erdtman, 1943) و برای واژه‌شناسی از سایت معتبر گرده‌شناسی Paldat (Halbritter et al., 2018) استفاده شده است.

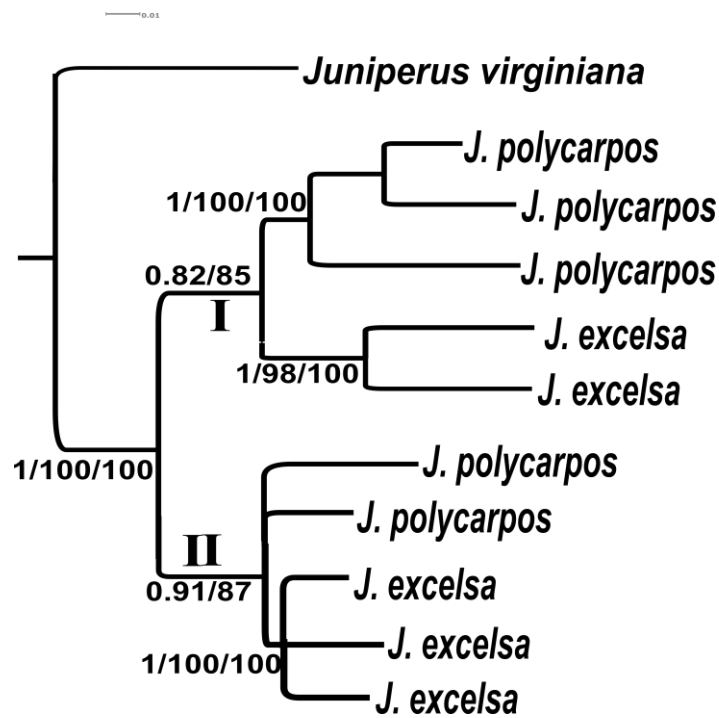
#### مطالعات تشریحی

برای مطالعات تشریحی، پنج جمعیت از هر آرایه انتخاب شد و قسمت‌های مختلف نمونه‌ها از یک بخش ثابت نمونه‌برداری و در محلول اتانول ۷۰ درصد و گلیسرین با نسبت ۳:۱ به مدت ۱۵ روز نگهداری شده، سپس برش‌گیری

جدول ۳- ویژگی‌های توالی و اطلاعات آماری درخت nrDNA ITS

Table 3. Dataset and tree statistics from single analysis of nrDNA ITS region.

Sample	nrDNA ITS
Number of sequences	11
Number of ingroup sequences	10
Alignment length [bp]	530
Number of parsimony- informative characters	72
Number of MPTs	92
Length of MPTs	131
Consistency index (CI)	0.701
Retention index (RI)	0.689
Evolutionary model selected (under AIC)	SYM+I+G

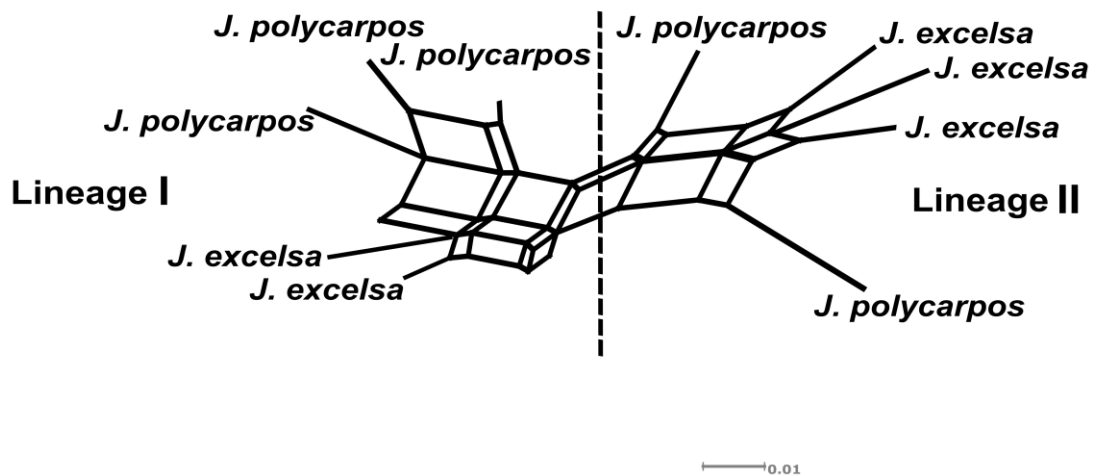


شکل ۳- درخت حاصل از توالی‌های nrDNA ITS آنالیز به روش بی‌زین.

اعداد شاخه‌ها نشان‌دهنده احتمال پسین و حمایت‌های بوتسترپ به ترتیب است. اعداد کمتر از ۵۰ درصد نشان داده نشده است

Figure 3. Tree resulting from the Bayesian phylogenetic analysis of the nrDNA ITS dataset.

Numbers of the branches are posterior probability (PP) from the BI and bootstrap support (BS) values from a MP and ML analysis, respectively. Values <50 % were not shown.



شکل ۴- شبکه دوبخشی حاصل از آنالیز داده‌های nrDNA ITS

Figure 4. Splits graph resulting from the analysis of the nrDNA ITS dataset.

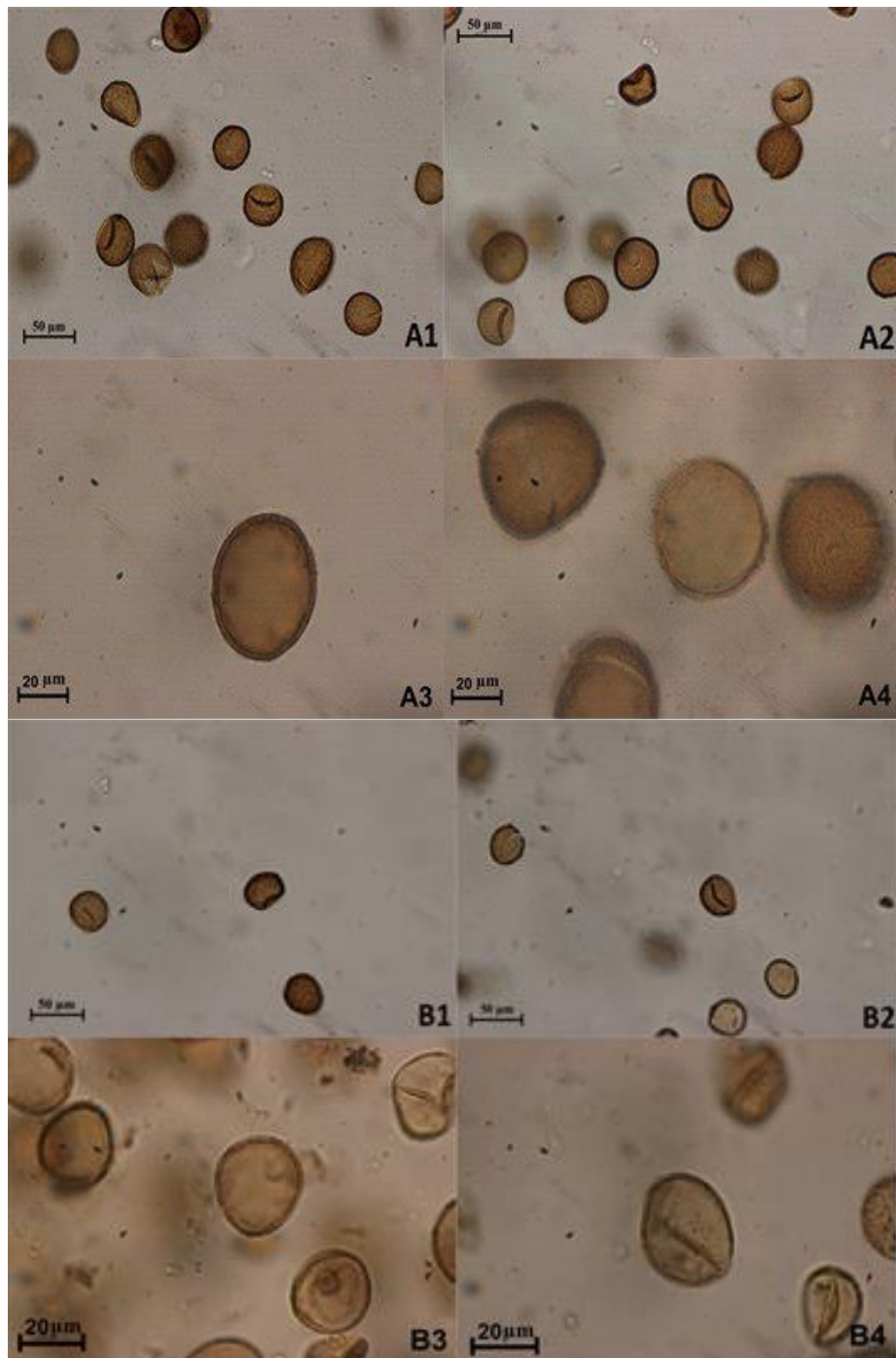
طول محور قطبی به طول محور استوایی (P/E) طبق طبقه‌بندی Erdtman (۱۹۴۳) هر دو گونه دارای شکل تقریباً کروی (Prolate spheroidal) هستند. دانه‌های گرده در تصاویر LM تقریباً بدون فرورفتگی به داخل است و دانه‌های گرده به شکل کروی با سطح صاف دیده می‌شوند (شکل ۵، A1-B4). ولی میکروگراف‌های SEM که با گرده‌های خشک نمونه‌های هرباریومی بررسی شده است، نشان می‌دهد که سطح گرده دارای فرورفتگی‌هایی می‌باشد که به آنها شکل نامنظمی داده است (شکل ۶، A1، A2، B1 و B2). ضخامت آگزمین در اندازه‌گیری تصاویر میکروسکوپ نوری در گونه *J. excelsa* ۳/۵۳ میکرومتر و در گونه *J. polycarpus* ۲/۹۸ میکرومتر اندازه‌گیری شد (جدول ۴). بیشتر بودن ضخامت آگزمین در گونه *J. excelsa* می‌تواند جذب آب را توسط دانه گرده سخت‌تر کرده و باز شدن دانه گرده و امکان عمل لقاح را کمتر کند، شاید به همین علت باشد که گونه *J. excelsa* مخروط میوه کمتری تولید می‌کند و زادآوری کمتری دارد و به همان نسبت پراکنش کمتری نیز در منطقه دارد (Omar Ata et al., 2019). دو گونه ذکر شده از لحاظ تزئینات سطح گرده نیز با هم تفاوتی ندارند و دارای عناصر گرانولی کوچکی (Granulate) هستند که در سرتاسر سطح گرده پراکنده شده‌اند (شکل ۶، A1-B4). شیارهای سطحی (Aperture) در این دو گونه یک عدد است که از نوع Ulcus و وضعیت شیار سطحی آن Ulcurate، یعنی به صورت زخم یا ریش‌شده روی گرده وجود دارد (شکل ۵، A1-B4) (شکل ۶، A4) که تشخیص آنها در تصاویر SEM مشکل ولی در تصاویر LM به صورت شیاری مشخص قابل مشاهده است.

شبکه دوبخشی حاصل از آنالیز داده‌های nrDNA ITS گراف حاصل، ساختار شبکه درونی را نشان داده که نشان‌دهنده reticulation است. گروه‌های موجود در شبکه با شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنی مطابقت دارد (شکل ۴). از اصطلاح دودمان برای گروه‌های موجود در شبکه و از اصطلاح شاخه برای گروه‌های موجود در درخت فیلوژنی استفاده شد. ساختار شبکه - همسایه دو دودمان اصلی را نشان داد که دودمان A مرتبط با شاخه I و دودمان B با شاخه II تطابق دارد. دودمان A و B شامل جمعیت‌های *J. excelsa* و *J. polycarpus* به صورت ترکیبی است و شبکه نیز همانند درخت فیلوژنی نتوانست بین این دو گونه مرز جدایی ایجاد کند و ساختار کمپلکسی که در این دو گونه مشاهده می‌شود توسط آنالیز شبکه نیز تأیید شد.

#### مطالعات گرده‌شناسی

نتایج بررسی دانه گرده دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpus* از لحاظ صفت‌های مورد ارزیابی در این تحقیق نشان داد که تمام دانه‌های گرده منفرد (Monad) هستند و به صورت منفرد نیز پراکنده می‌شوند (شکل ۵، A1، A2، B1 و B2). در بررسی تصاویر LM طرح کلی آنها از دید قطبی دایره‌ای (Circular) ولی در Scanning Electron Microscopy به صورت نامنظم (Irregular) است. از لحاظ اندازه کوچک (۲۵-۱۰ میکرومتر) است، به طوری که گونه *J. excelsa* با میانگین طول محور قطبی ۲۴/۳۴ میکرومتر (شکل ۵، A1 و A2) و گونه *J. polycarpus* با میانگین طول محور قطبی ۲۲/۹۲ میکرومتر (شکل ۵، B1 و B2) می‌باشد. با توجه به نسبت





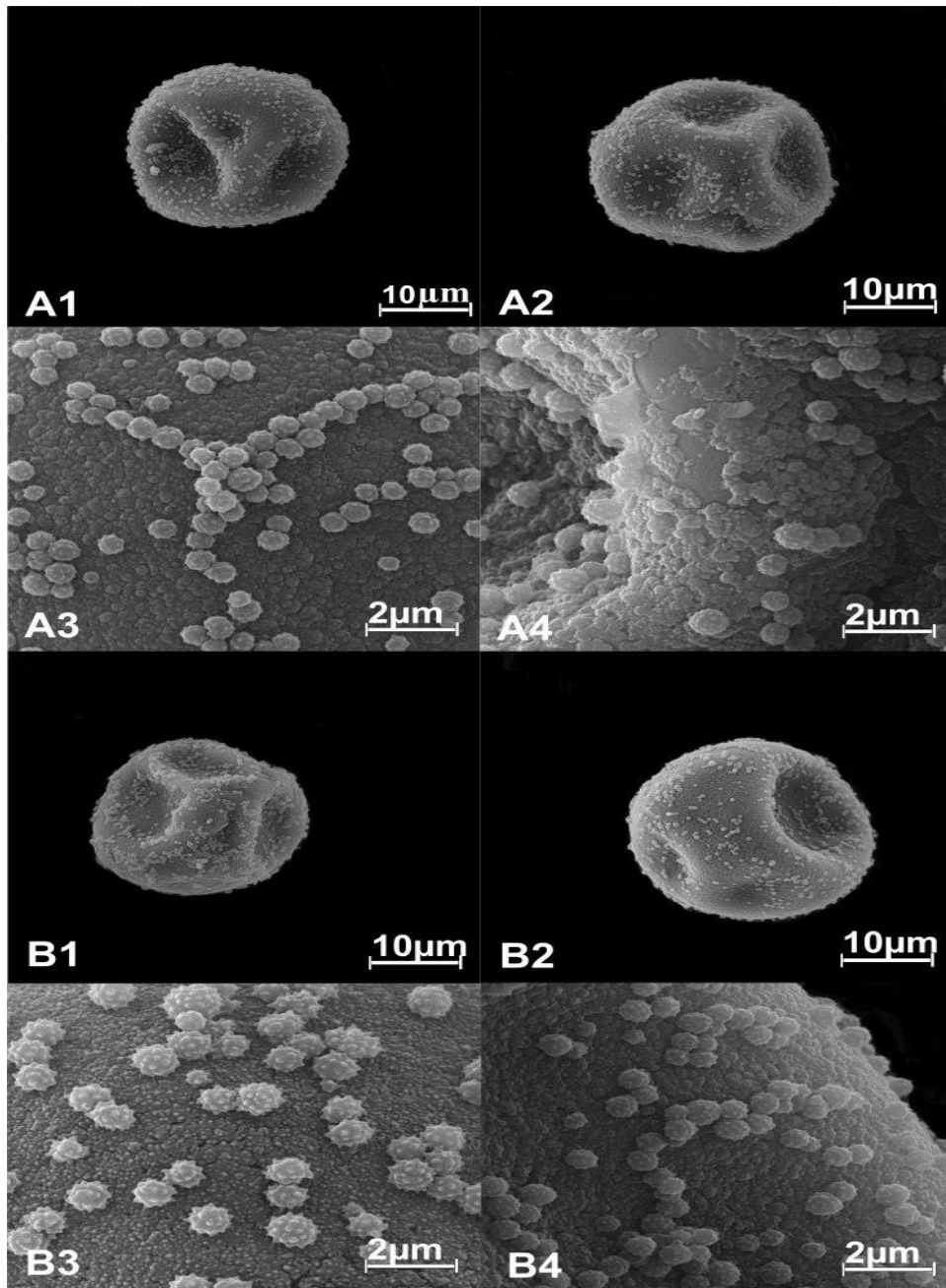
شکل ۵- دانه‌های گرده استولیز شده (میکروسکوپ نوری)

**Figure 5. Acetolyzed pollen grains (LM)**  
 گونه A4 - A1: *J. excelsa* (A1-A2: x40- A3-A4: x100)،  
 گونه B4 - B1: *J. polycarpus* (B1-B2: x40- B3-B4: x100)

جدول ۴- صفات اندازه‌گیری شده گرده‌ها (SEM)

**Table 4. Measured characteristics of pollens (SEM)**

Species	P	E	P/E	Shape	Size	exine ornamentation	exine thickness (LM)
<i>J. excelsa</i>	24.34±0.57	22.68±0.82	1.07	Prolate- spheroidal	small	granulate	53.01±3.1
<i>J. polycarpus</i>	22.92±2.25	20.74±2.71	1.10	Prolate- spheroidal	small	granulate	98.2±0.71



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره

**Figure 6. Micrographs of Scanning Electron Microscopy.**

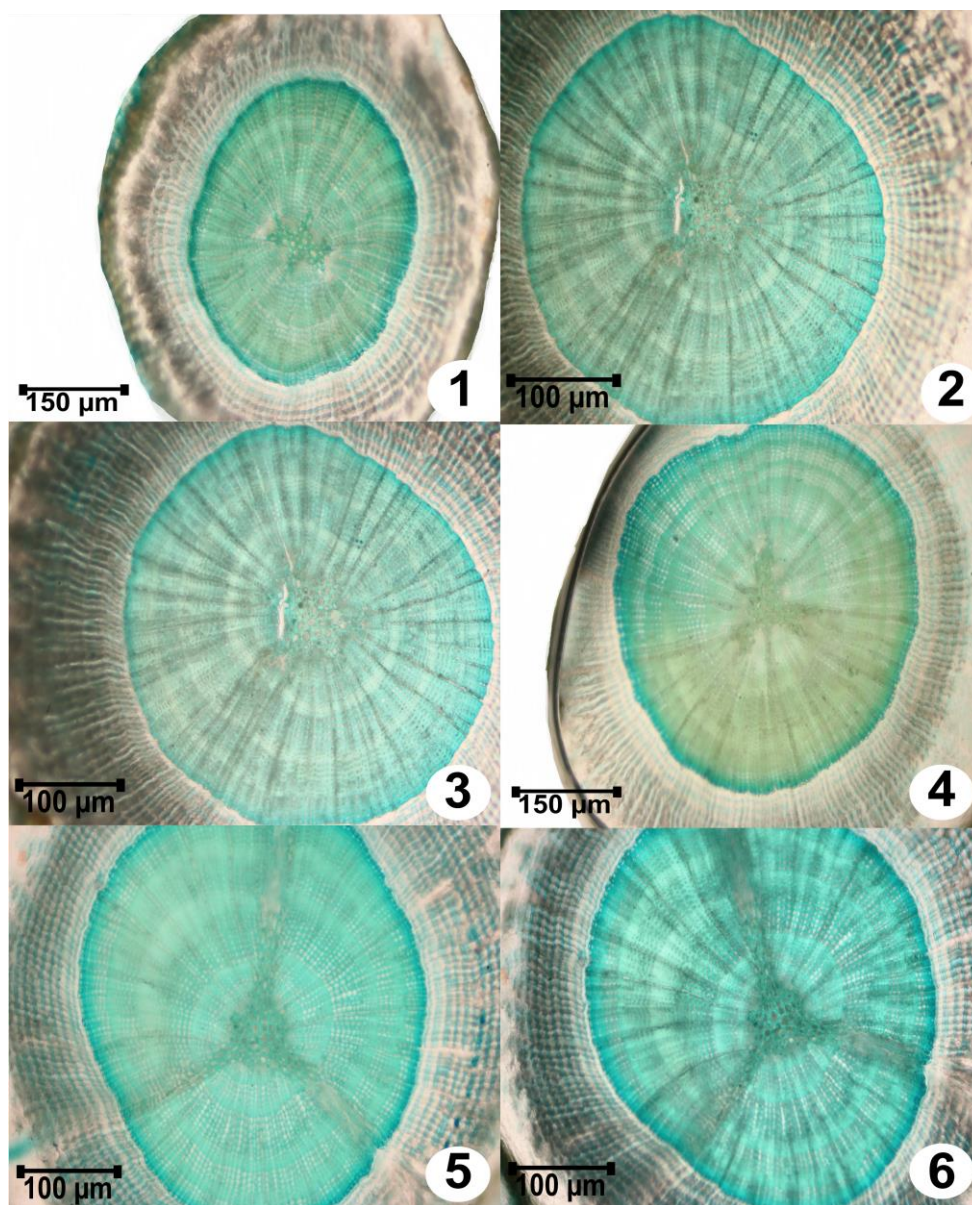
A2-A1: دید قطبی و استوایی گرده گونه *J. excelsa*, A3-A4: تزئینات گرانولی آگزین

B2-B1: دید قطبی و استوایی گونه *J. polycarpus*, B3-B4: تزئینات گرانولی آگزین گونه *J. polycarpus*

مطالعات تشریحی

تصاویر بدست آمده از مطالعات تشریحی ساقه دو گونه *J. polycarpus* و *J. excelsa* تفاوتی ناچیز را نشان داده

و ارزش سیستماتیکی برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها را ندارند. هر دو گونه دارای سطح مقطع دایره‌ای هستند.



شکل ۷- تصاویر بدست آمده از برش عرضی ساقه: ۱، ۲ و ۳: *J. excelsa*، ۴، ۵ و ۶: *J. polycarpus*

Figure 7. The images obtained from the transverse section of the stem:  
1, 2 and 3: *J. excelsa* 4, 5 and 6: *J. polycarpus*

بحث

ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های گیاهی اطلاعات

ارزشمندی را در زمینه سیر تکاملی آنها ارائه می‌دهد و از نظر اتخاذ راهبردهای مناسب در راستای شناسایی و

حفاظت از ذخایر ژنتیکی گیاهی ملی از اهمیت بسزایی برخوردار است (Kiani *et al.*, 2015). مطالعات مولکولی در سال‌های اخیر گسترش فراوانی داشته و ایجاد دیدگاه‌های جدیدی برای پژوهشگران درباره روابط تکاملی از گونه تا سلسله در سراسر دنیا داشته است (Soltis *et al.*, 2000). بهمین دلیل و بعلت فقدان مرز مشترک بین گونه‌های *J. excelsa* و *J. polycarpus* از مارکر مولکولی ITS استفاده شد. مطالعه مولکولی انجام شده قادر نبود این دو گونه را از هم تفکیک کند و در فیلوگرام، گونه‌های مذکور در زیرشاخه‌های جداگانه قرار نگرفتند و این نتایج در تطابق با یافته‌های ما در مطالعه تزئینات گرده و آناتومیکی می‌باشد. آنالیز فیلوژنی نشان داد که دو گونه تک‌تبار نیستند و آنها در شاخه‌ها مرز مشترک دارند و هر دو گونه در زیرشاخه‌های I و II بصورت حل‌نشده قرار گرفتند. در واقع واگرایی توالی‌ها شرایط پلی‌مورفیک را در توالی‌های نوکلئوتیدی nrDNA ITS بین دو گونه نشان داد که نشان‌دهنده دورگه‌گیری بوده، این مسئله باعث عدم تفکیک دو گونه شد. نتایج حاصل یافته‌های Adams و Hojjati (۲۰۱۲) را تأیید نمی‌کند. البته کمبود صفات ریخت‌شناسی و جریان ژنی بین گونه‌های مورد نظر و تکیه بر یک مارکر مولکولی ممکن است علت این عدم تفکیک باشد. بنابراین بنظر می‌رسد استفاده از مارکرهای کلروپلاستی و هسته‌ای Single copy نیز به این مسئله کمک کند. در بیشتر گونه‌های *Juniperus* ایران، تنها یک نوع از توالی ITS نمایان است. این ممکن است به دلیل Concerted evolution از طریق نوترکیبی (Gene conversion) یا تبادل ژنی (Crossing-over) نابرابر باشد که منجر به هم‌گراشدن تکرارهای توالی هسته‌ای شده است. چندین عامل زیستی برای Concerted evolution ناقص پیشنهاد می‌شود، همانند آپومیکی (Apomixis)، جاذبه شاخه‌های بلند (Long generation times)، دو رگه‌گیری و پلی‌پلوئیدی (Campbell *et al.*, 1997; Sang *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 1993; Grim & Denk, 2008; Shang *et al.*, 2016). از آن‌جا که تا کنون هیچ آرایه آپومیکتیک

گزارش نشده است، از این رو این احتمال ضعیف است که آپومیکی Concerted evolution را در گونه‌های بالا مختل کرده باشد، اما پلی‌پلوئیدی و دورگه‌گیری پدیده‌های شایعی در این سرده‌اند (Adams *et al.*, 2014). اگرچه خشکی منطقه، مهمترین عامل تحریک گونه‌زایی گیاهان خشکی‌پسند در منطقه ایران توراتی بوده است. عواملی مانند ارتفاعات بلند و بوم‌های اکولوژیکی متفاوت، انواع متفاوت خاک، گرده‌افشان‌ها، سازوکارهای متفاوت پراکنش دانه، پلی‌پلوئیدی و آپومیکی نیز می‌توانند از عوامل مهم تحریک گونه‌زایی در این منطقه به‌شمار روند. تعداد زیادی از گونه‌های این سرده، به صورت بومی منطقه‌ای هستند و به نظر می‌رسد گونه‌زایی از نوع سیم‌پاتریک نسبت به آلویاتریک بیشتر اتفاق بیفتند. اشتقاق گونه‌ها از نوع سیم‌پاتریک فقط تحت تأثیر عوامل درونی (ژنتیکی) است. یکی از مدل‌های گونه‌زایی سیم‌پاتریکی در گیاهان به روش پلی‌پلوئیدی است که در آن یک تغییر آنی باعث جدایی تولیدمثلی یک پلی‌پلوئید جدید از گونه اجدادی می‌شود. مطالعات انجام شده بر روی برخی از گونه‌های ارس نشان داده است که دورگه‌گیری می‌تواند از عوامل مهم گونه‌زایی در این سرده باشد (Adams *et al.*, 2014). پلی‌پلوئیدی نیز یکی از روش‌های اصلی گونه‌زایی در گیاهان محسوب می‌شود. در بیشتر موارد گونه‌های پلی‌پلوئید در اثر دورگه‌گیری اجدادی که از لحاظ ژنتیکی با هم اختلاف دارند بوجود می‌آیند. هنگامی که یک دورگه تبدیل به یک گونه جدید می‌شود فیلوژنی از حالت دوشاخه‌ای خارج شده و حالت شبکه‌ای پیدا می‌کند. در بسیاری از سرده‌ها دورگه‌گیری منجر به ایجاد پلی‌پلوئیدهایی می‌شود که از لحاظ تعداد کروموزوم‌ها متنوع هستند یا منجر به ایجاد کمپلکس‌های پلی‌پلوئید می‌شود. تعداد زیادی از گونه‌های این سرده، به صورت بومی منطقه‌ای هستند و به نظر می‌رسد گونه‌زایی از نوع سیم-پاتریک نسبت به آلویاتریک بیشتر اتفاق بیفتند. اشتقاق گونه‌ها از نوع سیم‌پاتریک فقط تحت تأثیر عوامل درونی (ژنتیکی) است. یکی از مدل‌های گونه‌زایی سیم‌پاتریکی

گزارش نشده است، از این رو این احتمال ضعیف است که آپومیکی Concerted evolution را در گونه‌های بالا مختل کرده باشد، اما پلی‌پلوئیدی و دورگه‌گیری پدیده‌های شایعی در این سرده‌اند (Adams *et al.*, 2014). اگرچه خشکی منطقه، مهمترین عامل تحریک گونه‌زایی گیاهان خشکی‌پسند در منطقه ایران توراتی بوده است. عواملی مانند ارتفاعات بلند و بوم‌های اکولوژیکی متفاوت، انواع متفاوت خاک، گرده‌افشان‌ها، سازوکارهای متفاوت پراکنش دانه، پلی‌پلوئیدی و آپومیکی نیز می‌توانند از عوامل مهم تحریک گونه‌زایی در این منطقه به‌شمار روند. تعداد زیادی از گونه‌های این سرده، به صورت بومی منطقه‌ای هستند و به نظر می‌رسد گونه‌زایی از نوع سیم‌پاتریک نسبت به آلویاتریک بیشتر اتفاق بیفتند. اشتقاق گونه‌ها از نوع سیم‌پاتریک فقط تحت تأثیر عوامل درونی (ژنتیکی) است. یکی از مدل‌های گونه‌زایی سیم‌پاتریکی در گیاهان محسوب می‌شود. در بیشتر موارد گونه‌های پلی‌پلوئید در اثر دورگه‌گیری اجدادی که از لحاظ ژنتیکی با هم اختلاف دارند بوجود می‌آیند. هنگامی که یک دورگه تبدیل به یک گونه جدید می‌شود فیلوژنی از حالت دوشاخه‌ای خارج شده و حالت شبکه‌ای پیدا می‌کند. در بسیاری از سرده‌ها دورگه‌گیری منجر به ایجاد پلی‌پلوئیدهایی می‌شود که از لحاظ تعداد کروموزوم‌ها متنوع هستند یا منجر به ایجاد کمپلکس‌های پلی‌پلوئید می‌شود. تعداد زیادی از گونه‌های این سرده، به صورت بومی منطقه‌ای هستند و به نظر می‌رسد گونه‌زایی از نوع سیم-پاتریک نسبت به آلویاتریک بیشتر اتفاق بیفتند. اشتقاق گونه‌ها از نوع سیم‌پاتریک فقط تحت تأثیر عوامل درونی (ژنتیکی) است. یکی از مدل‌های گونه‌زایی سیم‌پاتریکی

ویژگیهای دو گونه می‌تواند نشان‌دهنده نزدیک شدن دو گونه به یکدیگر یا شروع تغییرات دو گونه از یکدیگر باشد. از آن جا که دورگه‌گیری و پلی‌پلوئیدی پدیده‌های شایعی در این سرده هستند، این دو آرایه یا مترادفانند یا در سطح زیرگونه باید قرار بگیرند. به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که در منطقه چهار باغ یک گونه انتشار دارد که یا بایستی بر اساس فلور ایران و فلورا ایرانیکا آن را *J. excelsa* بنامیم، یا اینکه بر اساس نتایج Adams (۲۰۱۶) قبول کنیم که گونه *J. excelsa* در ایران حضور ندارد و آرایه موجود در منطقه ذکر شده نتیجه‌گیری شد که احتمالاً در منطقه چهار باغ یک گونه انتشار دارد و این دو آرایه مترادفانند.

#### منابع مورد استفاده:

- Adams, R.P. and Hojjati, F., 2012. Taxonomy of *Juniperus* in iran: insight from DNA sequencing. *Phytologia*, 94(2): 219-227.
- Adams, R.P., Hojjati, F. and Schwarzbach Andrea, E., 2014. Taxonomy of *Juniperus* in Iran: DNA sequences of nrDNA plus three cpDNAs reveal *Juniperus polycarpus* var. *turcomanica* and *J. seravschanica* in southern Iran. *Phytologia*, 96(1): 19-25.
- Adams, R.P., Armagan, M., Boratynski, A., Douaihy, B., Dou Dagher-Kharrat, M., Farzaliyev, V., Gucel, S., Mataraci, T., Tashev, A. and Schwarzbach, A., 2016. Evidence of relictual introgression or incomplete lineage sorting in nrDNA of *Juniperus excelsa* and *J. polycarpus* in Asia Minor. *Phytologia*, 98(2): 146-155.
- Assadi, M., 1998. Flora of Iran: Pinaceae, Taxaceae, Cupressaceae and Ephedraceae. Ministry of Jahade-Sazandage. Research Institute of Forests and Rangelands. No. 19-22 (In Persian).
- Campbell, C.S., Wojciechowski, M.F., Baldwin, B.G., Alice, L.A. and Donoghue, M.J., 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Molecular Biology and Evolution*, 14(2): 81-90.
- Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Daneshvar, A., 2015. Improved Seed Handling Techniques for *Juniperus polycarpus*. Ph.D. thesis, Faculty of Forest Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, 66p. Sweden.

گونه‌زایی در گیاهان به روش پلی‌پلوئیدی است که در آن یک تغییر آنی باعث جدایی تولیدمثلی یک پلی‌پلوئید جدید از گونه اجدادی می‌شود.

نتایج ارائه‌شده در مورد صفات بررسی‌شده گونه *J. excelsa* تأییدکننده نتایج Halbritter در سال ۱۹۹۸ است. همچنین کوچک بودن دانه گرده گونه‌های *Juniperus* توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است (Rogers & Adams et al., 2016; Levetin, 1998; Levetin, 1998). هر چند اطلاعات دانه گرده و تنوع ریخت‌شناسی آنها بصورت کلی در همه سطوح آرایه‌شناسی ارزشمند هستند (Radford, 1974). به‌ویژه تزئینات سطح دانه گرده که صفات آرایه‌شناسی ارزشمندی محسوب می‌شوند (Cronquist, 1981; Ranjbar et al., 2015; Pakravan, 2016) اما با توجه به نتایج ارائه‌شده دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpus* در صفات مورد بررسی دانه گرده تفاوتی ناچیز را نشان می‌دهند و ارزش سیستماتیکی برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها را ندارند. نزدیک بودن صفات دانه گرده در دو گونه می‌تواند نشان‌دهنده نزدیک شدن دو گونه به یکدیگر یا شروع تغییرات دو گونه از یکدیگر باشد. هر چند مطالعات تشریحی و اطلاعات آنها بصورت کلی صفات آرایه‌شناسی ارزشمندی در سرده *Juniperus* محسوب می‌شوند (Lakušić & Lakušić, 2011; Vasić et al., 2014) اما تصاویر بدست آمده از مطالعات تشریحی ساقه دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpus* تفاوتی ناچیز را نشان داده و ارزش سیستماتیکی برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها را ندارند. نزدیک بودن ویژگیهای آناتومی در دو گونه به یکدیگر می‌تواند نشان‌دهنده نزدیک شدن دو گونه به یکدیگر یا شروع تغییرات دو گونه از یکدیگر باشد.

#### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که خصوصیات دانه گرده، مطالعات تشریحی و داده‌های مولکولی با استفاده از نشانگر هسته‌ای nrDNA ITS، بخوبی قادر به تفکیک و شناسایی دو گونه *J. excelsa* و *J. polycarpus* نیست. نزدیک بودن

- construction, 38(6): 37-41.
- Lakušić, B. and Lakušić, D., 2011. Anatomy of four taxa of the Genus *Juniperus* sect. *Juniperus* (Cupressaceae) from the Balkan peninsula. *Botanica Serbia*, 35(2): 145-156.
  - Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P., AMcWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D. and Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947-2948.
  - Levetin, E., 1998. A long-term study of winter and early spring tree pollen in the Tulsa, Oklahoma atmosphere. *Aerobiologia*, 14(1): 21-28.
  - Mottaghi, M., Salehi Shanjani, P., Jafari, A.A., Mirza, M. and Bihamta M.R., 2021. Investigation of genetic diversity in Iranian populations of *Achillea nobilis* using ISSR molecular markers and morphological traits. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 29 (1): 1-12 (In Persian).
  - Omarata, T.M., Daneshvar, A., Sattarian, A. and Amini, E., 2019. Quantitative and qualitative indicators of cone and seed for identification of two Juniper species in Golestan province. *Journal of Plant Ecosystem Conservation*, 7(14): 275-290, (In Persian).
  - Pakravan, M., 2016. Palynological study of the genus *Consolida* (Ranunculaceae) in Iran. *Nova Biologica Reperta*, 3(2): 177-183(In Persian).
  - Posada, D. and Buckley, T.R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of AIC and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology*, 53(5): 793-808.
  - Radford, A.E., 1974. *Vascular plant systematics*. Harper & Row in New York.
  - Ranjbar, M., Pakatchi, A. and Radjabian, T., 2015. Pollen morphology study of *Salvia* sect. *Plethiospace* and sect. *Hemispace* (Lamiaceae) in Iran. *Nova Biologica Reperta*, 1(2): 16-28, (In Persian).
  - Ravanbakhsh, H., Marvi Mohajer, M.R., Zahedi Gh., and Shirvani, A., 2010. Forest typology in relation with altitude gradient on southern slopes of Central Alborz mountains (Latian watershed in North of Iran). *Journal of Forest and Wood Products (Iranian Journal of Natural Resources)*, 63(1): 9-22 (In Persian).
  - Rogers, C.A and Levetin, E., 1998. Evidence of long-distance transport of mountain cedar pollen into Tulsa, Oklahoma. *International Journal of Biometeorology*, 42(2): 65-72.
  - Ronquist, F. and Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed
  - Earle, C.J., 2006. *Juniperus communis*. The Gymnosperm Database. [www.conifers.org/cu/ju/communis.hm](http://www.conifers.org/cu/ju/communis.hm)
  - Erdtman, G., 1943. An introduction to pollen analysis. *Chronica Botanical Company Waltham, Mass., USA*.
  - Farjon, A., 1992. The taxonomy of multiseed junipers (*Juniperus* Sect. *Sabina*) in southwest Asia and east Africa (Taxonomic notes on Cupressaceae I). *Edinburgh Journal of Botany*, 49(3): 251-283.
  - Grimm, G.W., Denk, T., 2008. ITS evolution in *Platanus* (Platanaceae): Homoeologues, pseudogenes and ancient hybridization. *Annals of Botany*, 101(3): 403-419.
  - Halbritter, H., 1998. Preparing living pollen material for scanning electron microscopy using 2,2-dimethoxypropane (DMP) and criticalpoint drying. *Biotechnic Histochem* 73(3): 137-143.
  - Huson, D.H. and Bryant, D., 2010. Splits Tree: A program for analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics*, 14(1): 68-73.
  - Javanshir, K., 1982. Research on seed production and how it grows in *Juniperus juniper* trees in order to rehabilitate juniper forests. *Publications of Forests and Rangelands Research Institute*, 4(12): 25-35, (In Persian).
  - Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. F. and Donoghue, M.J., 2003. *Plant systematics. A phylogenetic approach*. Third edition. Pp. 232-248.
  - Kermani, M., Marashi, H. and Mellati, F., 2010. Study of genetic variation of *Juniperus polycarpus* from Tandure National Park of Iran using RAPD markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 18 (1): 115-124(In Persian).
  - Kiani, M., Babaei, A., Sefidkon, F. and Naghavi, R., 2015. Molecular characterization of phylogenetic relationships in populations of the medicinal-ornamental imperial crown (*Fritillaria imperialis* L.) of Iran inferred from ITS sequences. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 35 (1): 31-39(In Persian).
  - Korori, A.S. and Khoshnevis, M., 2000. Ecological and environmental studies of juniperus habitat in Iran. *Research institute of forests and rangelands, Tehran, Iran 208p*, (In Persian).
  - Korori, A.S., Khoshnevis, M. and Mateinzadeh, M., 2010. *Comprehensive study of Juniperus in Iran*. Poneh Publication, Tehran, Iran 478p, (In Persian).
  - Koruri, A.A., 1998. Study and study of the relationship between *J. excelsa* and *J. polycarpus* bases by enzymological method. *Research and*

- Farris, J. S., 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133(4): 381-461.
- Suh, Y., Thien, L.B., Reeve, H.E. and Zimmer, E.A., 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *American Journal of Botany*, 80(9):1042-1055.
- Swofford, D. L., 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and (Other Methods), Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates.
- Takhtajan, A.L. and Fedorov, A.A., 1972. *Flora Yerevana: opreditel' dikorastuscikh ratenij Araratskoj kotloviny*. Nauka, Leningrad
- Vasic Predrag, S., Topuzovic Marina, D., Labus Nenad, D. and Dubak Darko, V., 2014. Morphological-Anatomical characteristic of common Juniper (*Juniperus communis*) from the area of mountain Kopanoik. *Natura Montenegrina, Podgorica*, 7(3): 97-107.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis DH, Gelfand J.J. Sninsky et al. (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. 315-322.
- Zohary, M., 1973. *Geobotanical Foundation of the Middle East*, G. Fischer publisher, Stuttgart.
- models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572-1574.
- Sabeti, H., 2005. *Forests, trees and shrubs of Iran*. Yazd University Press, Yazd, Iran, 806 Pp (In Persian).
- Sang, T., Crawford, D.J. and Stuessy, T.F., 1995. Documentation of reticulate ribosomal DNA implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15): 6813-6817.
- Salehi shanjani, P., 1998. *Tissue culture and environmental factors on second -metabolism production and variability of protein and ISO-enzyme of Proxsidase in Juniperus* Dissertation, Faculty of science .Tehran University press. Tehran, Iran
- Shang, H., Wang, Y., Zhu, X.F., Zhao, G.H., Wang, F.H., Lu, J.M. and Yan, Y.H., 2016. Likely allopatric origins of *Adiantum meishanianum* (Pteridaceae) through multiple hybridizations. *Journal of Systematics and Evolution*, 54(12): 528-534.
- Silvestro, D. and Michalak, I., 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12(5): 335-337.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Chase, M.W., Mort, M. E., Albach, T. D., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W. H., Hoot, S. B., Fay, M.F., Axtell, M., Swensen, S. M., Prince, L. M., Kress, W. J., Nixon, K. C. and

## Molecular and micromorphological study of *Juniperus excelsa* and *J. polycarpos* in the Chahar-Bagh of Golestan province, Iran

T. M. Omarata<sup>1</sup>, A. Daneshvar<sup>2\*</sup>, A. Sattarian<sup>3</sup>, E. Amini<sup>4</sup>, F. Nasrollahi<sup>5</sup>

1- MSc Graduated. Dept. Biology, Science College. Gonbad kavous university, Gonbad Kavous, I.R. Iran

2\*- Corresponding author. Assist. Prof., Dept. Biology, Science College. Gonbad kavous university, Gonbad Kavous, I.R. Iran, Email Address: Abolfazl.daneshvar@gmail.com

3- Assoc. Prof. Dept. Biology, Science College. Gonbade kavous university, Gonbad Kavous, I.R. Iran

4- Assist. Prof. Dept. Biology, Science College. Gonbade kavous university, Gonbad Kavous, I.R. Iran

5- PhD Graduated. Science College. Qom University. Qom, I.R. Iran

Received: 08.01.2022

Accepted: 02.05.2022

### Abstract

*Juniperus* is one of the few conifers in Iran, which has six species and forms mostly sparse forests with scattered trees. Among them, *Juniperus polycarpos* and *J. excelsa* are more widespread than the other species. Due to the great similarity in their phenotypes, it is difficult to distinguish the two species from each other. In this study, pollinological, anatomical, and molecular indicators were evaluated to identify and differentiate these two Juniper species in the Chahar-Bagh region of Gorgan province, Iran. Using nrDNA ITS nuclear marker, molecular relationships between the two species were investigated. Phylogeny analyzes showed that two species are monophyletic and the populations were subdivided into unresolved subclades I and II. Pollen grains of the two species, *J. polycarpos* and *J. excelsa*, were examined using light (LM) and scanning electron (SEM) microscopes. The results showed that all pollen grains were monad, ulcurate, asymmetric, and small in size. In terms of shape, both species were spheroidal (prolate spheroidal) with granular exine ornamentations. The general shape of the pollens in the LM was circular with a smooth surface and no fovea, but the pollen grains examined under SEM were irregular and had fovea. The results of the anatomical studies of the stems also showed little difference, and it was not possible to distinguish and identify the two species. The results indicate that one species is probably distributed in the Chahar-Bagh region and these two taxons are synonymous.

**Keywords:** Exine, pollen, nrDNA ITS, anatomical studies, molecular.