گل و گیاهان زینتی (۱٤۰۱)، ۷(۱): ۱۳-۲٦
مقاله پژوهشی

بررسی رابطه بین گونه‌های پلاخور (*Lonicera* spp.) موجود در ایران با استفاده از رمزینه کردن DNA و شاخص‌های ریخت‌شناسانه

نجمه فتاحی دهکردی[۱]، مسعود قاسمی قهساره[۱*]، بهروز شیران[۲]
۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد
mghasemi1352@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱۲/۳، تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱/۱۸

چکیده

جنس *Lonicera* از تیره Caprifoliaceae است و در زبان فارسی به نام‌های پلاخور، شونگ و یا پیچ امین‌الدوله (Honeysuckle) خوانده می‌شود. شناخت روابط بین گونه‌ای بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسانه و بیوشیمیایی گاهی نتایج متناقضی داشته‌اند. در این مطالعه، برای شناسایی، جداسازی و تعیین روابط تبارزایی ۱۲ گونه *Lonicera* موجود درایران، از نشانگرهای ریخت شناسانه، رمزینه‌های DNA هسته‌ای و کلروپلاستی (شامل ITS و *matK*) همراه با چند توالی دیگر از پایگاه بانک ژن NCBI استفاده گردید. DNA ژنومی با استفاده از کیت‌های موجود استخراج و واکنش PCR برای تکثیر دو ناحیه مورد نظر انجام شد و در پایان نمونه‌های خالص‌سازی شده توالی یابی شدند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسانه، گونه‌ها را در دو گروه بزرگ قرار داد که گروه اول شامل *L. sempervirens* و گروه دوم شامل ۱۱ گونه دیگر بود. نزدیکترین رابطه ژنتیکی بین گونه‌های *L. floribunda* و *L. nummulariifolia* و کمترین شباهت بین گونه‌های *L. sempervirens* و *L. caprifolium* وجود داشت. واکاوی به عامل‌های اصلی (Principle component analysis (PCAs)) روی داده‌های مربوط به ریخت‌شناسی نشان داد که سه عامل اول در مجموع ۷۱/۱ ٪ گوناگونی را شامل می‌شدند که عامل اول شامل پوشش کرکی ساقه، شکل پهنک، حاشیه برگ، شکل نوک پهنک، رنگ گل، پوشش کرکی برگ، پایین برگ و رنگ میوه، طول دمبرگ و فاصله میانگره به عنوان اجزاء اصلی، ۳۸/۸٪ گوناگونی را توجیه نمود. بر اساس بررسی‌های مولکولی، طول منطقه *matK* در حدود ۱۱۳۵-۱۱۱۰ نوکلئوتید بود. آنالیز پارسیمونی این ناحیه ۹٤٤ جایگاه حفاظت شده، ۱۰۹ جایگاه متغیر و ۱۹ جایگاه پارسیمون را نشان داد. در درخت تبارزایی ایجاد شده بوسیله‌ی ناحیه *matK* جداسازی همه‌ی گونه‌ها به جز دو گونه *L. korolkovii* و *L. maackii* به خوبی صورت گرفته و در شاخه‌های جداگانه قرار گرفتند. گوناگونی و فاصله ژنتیکی بین گونه‌ها در ناحیه *matK* با فاصله ژنتیکی ۰/۰۰ تا ۰/۰۵۷ مشاهده شد. این مطالعه نتوانست از آغازگرهای ITS جواب مطلوبی حاصل نماید. بنابراین، ناحیه *matK* با توجه به گوناگونی و تکثیر آسان، رمزینه مناسبی برای بررسی گوناگونی ژنتیکی بین گونه‌های پلاخور است.

واژه های کلیدی: نشانگرهای ریخت‌شناسانه، نواحی بارکد، فیلوژنی، امین‌الدوله، *matK*.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

مقدمه

جنس *Lonicera* شامل گیاهان پیچنده یا درختچه‌ای و بومی نیمکره شمالی است. حدود ۱۸۰ گونه دارد که ۱۰۰ گونه آن در چین و ۲۰ گونه آن در اروپا، هندوستان و آمریکای شمالی وجود دارد. چندین گونه از آن نیز به‌طور طبیعی در ایران رشد می‌کنند. گونه‌هایی از آن بالارونده‌های مقاوم هستند که به نام پیچ امین‌الدوله خوانده می‌شوند. نام‌های پلاخور و شونگ نیز در فارسی برای برخی گونه‌ها به‌کار رفته است (Ghasemi Ghehsareh & Kafi, 2015). بیشتر آنها خزان‌دار اما برخی گونه‌ها، همیشه سبز هستند. گل‌ها لوله‌ای و دارای یک محور تقارن بوده و شهد خوراکی شیرین تولید می‌کنند. میوه به صورت سته گرد و در رنگ‌های قرمز، آبی و سیاه دیده می‌شود و هر سته حاوی چندین بذر است. گونه‌های مختلف با بذر، قلمه و خوابانیدن قابل افزایش هستند اما روش رایج ریشه‌دار کردن قلمه یا خواباندن است (Hartmann & Kester, 2011). گونه‌های مختلف آن به خاطر توان پوشاندن دیوارها، تولید گل‌های فراوان در تابستان و گل‌های بسیار معطر در برخی از آنها، در فضای سبز اهمیت دارند. (Mabberley, 2008; Ghasemi Ghehsareh & Kafi, 2015). بسیاری از گونه‌های این جنس دارای ارزش قابل توجهی از نظر پزشکی هستند. در چین از برخی گونه‌های آن به عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شود و گفته شده که دارای خواص بیولوژیکی و دارویی مانند ضد باکتریایی، ضد التهاب، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدان و محافظت کننده‌ی کبد هستند (Chen *et al*., 2012).

شناخت روابط بین گونه‌ای بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسانه و ترکیبات شیمیایی گاهی نتایج متناقضی داشته‌اند زیرا شرایط محیطی، مراحل مختلف رشدی، شرایط آزمایش، زمان نمونه‌گیری و فاکتورهای مختلف دیگر اثر گذار می‌باشند. این تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین نمونه‌های گیاهی می‌تواند سبب نتیجه‌گیری اشتباه در مطالعات طبقه‌بندی گیاهان شود. از این رو استفاده از روش‌های مولکولی و یا بیوشیمیایی اگرچه با افزایش هزینه همراه است اما با توجه به دقت بالا در تمایز گونه‌ها از یکدیگر، امروزه کاربرد فراوانی در تاکسونومی گیاهی دارد (Taberlet *et al*., 2007). استفاده از رمزینه کردن DNA[1] یک مفهوم تازه با هدف دستیابی سریع و دقیق برای شناسایی گونه‌ها با به‌کارگیری منطقه استانداردی از DNA به عنوان یک نشانگر می‌باشد. جهت بررسی روابط فیلوژنی استفاده از روش رمزینه‌کردن DNA، روز به روز در حال افزایش است و چند سالی است که مورد توجه قرار گرفته است (Hebert *et al*., 2003; Qing Ren *et al*., 2010). در واقع با دسته بندی توالی‌ها و مقایسه آنها با استفاده از روش‌های آماری و بیوانفورماتیک، درخت‌های تبارزایی[2] ترسیم و روابط خویشاوندی موجودات زنده تعیین می‌شود. برای این منظور از DNA ژنومی، میتوکندری و چندین ناحیه از ژنوم کلروپلاستی و غیره استفاده می‌شود (Arzanlo *et al*., 2013). DNA کلروپلاستی به دلیل حفاظت شدگی بالا، نوترکیبی اندک و جانشینی اندک نوکلئوتیدی، از جمله نشانگرهایی است که برای جنس‌های مختلف گیاهی به عنوان رمزینه DNA مورد استفاده قرار گرفته است (Drabkova *et al*., 2004; Johnson *et al*., 2008). از جمله توالی‌های کلروپلاستی مورد استفاده گسترده در مطالعه‌های فیلوژنتیک، توالی ناحیه ژنی *matK* است که در سطوح درون گونه‌ای و در سطح جنس برای گیاهان مطرح است (Schöttler *et al*., 2007). همچنین توالی DNA هسته‌ای ناحیه ITS به‌نظر می‌رسد برای نشان دادن روابط در سطوح تاکسونومیکی کوچک‌تر همچون

۱- DNA barcoding

۲- Phylogenetic

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

جنس و گونه مناسب باشد. بنابراین در علم تاکسونومی استفاده ترکیبی از توالی‌یابی DNA و ویژگی‌های ریختی، سرعت طبقه بندی و شناسایی گونه‌ها را در سطح جهانی افزایش داده است (Desalle, 2006; Hajibabaei *et al*., 2007).

در پژوهشی Hong-Jin و Hua (2014) بیان نمودند که ویژگی‌های ریخت‌شناسانه در جنس *Lonicera* برای شناخت و طبقه‌بندی گونه مفید است. در پژوهشی، Theis و همکاران (۲۰۰۸) به منظور بررسی آنالیز فیلوژنتیک *Lonicera* و Caprifolieae از توالی‌یابی ناحیه ITS ریبوزومی و پنج ناحیه کلروپلاستی (*rpo*B-*trn*C, *atp*B-*rbc*L, *trn*S-*trn*G, *pet*N-*psb*M, *psb*M-*trn*D) استفاده نمودند. نتایج حاصل موفق به ساخت تاریخ تکاملی و ارزیابی طبقه‌بندی *Lonicera* و Caprifolieae شدند. Peng و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از ناحیه ITS و RFLP توانستند *Lonicera japonica* را از گونه‌های نزدیک به آن متمایز کنند. در مطالعه‌ای که توسط Sun و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از نواحی *rbcL*، *matK*، *psbA-trnH*، ITS2، ITS1، *trnL* intron و *trnL-F* در ٤٤ نمونه از *Lonicera japonica* انجام شد؛ نشان داده شد که اندازه ناحیه بین ژنی *psbA-trnH* برابر ۳۵۷-۳۳۲ جفت باز بود بنابراین این ناحیه به آسانی توسط جفت آغازگرهای عمومی تکثیر می‌شود ومی‌تواند یک بارکد مناسب جهت تمایز *Lonicera japonica* ازگونه‌های نزدیک باشد.

از آنجا که بر اساس اطلاعات ما گزارشی مبنی بر بررسی گونه‌های جنس *Lonicera* موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای فیلوژنتیکی شامل ITS و *matK* در دست نبود، هدف پژوهش حاضر ارزیابی نژادگان‌های موجود در ایران از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسانه، شناسایی، تفکیک و تعیین روابط تبارزایی آنها و تعیین مناسب‌ترین ناحیه ژنومی DNA یا بارکد جهت تمایز گونه‌ها است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مواد گیاهی، تشخیص و گروه‌بندی: در این پژوهش ۱۲ گونه *Lonicera* از رویشگاه‌های طبیعی و یا کشت شده کشور نظیر استان‌های اصفهان، اردبیل، چهارمحال و بختیاری و گیلان و از کلکسیون مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور جمع‌آوری شدند (جدول ۱). نمونه‌ها در زمان جمع‌آوری کدگذاری و بر اساس منابع گیاه‌شناسی و ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها نام‌گذاری گردیدند. سپس از هر نمونه چندین برگ جوان جدا و پس از شستشو و حذف رطوبت سطحی در ورق آلومینیومی پیچیده شدند و درون نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسانه: برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسانه، ٤ ویژگی کمی و ۲۲ ویژگی کیفی مربوط به دوازده گونه از جنس *Lonicera* ثبت شدند. ویژگی‌های کمی شامل طول دمبرگ، طول جام گل، طول برگ و فاصله میانگره و ویژگی‌های کیفی شامل عادت رشد گیاه، رنگ ساقه، پوشش کرکی ساقه، همیشه سبز یا خزان‌دار، شکل پهنک، شکل بین رگبرگ‌ها، حاشیه برگ، شکل نوک پهنک، زمان گلدهی، موقعیت گل‌آذین، رنگ گل، رنگ میله پرچم، رنگ بساک، رنگ خامه، رنگ کلاله، عطر گل، پوشش کرکی برگ، قاعده برگ، رنگ پشت برگ، رنگ سطح برگ و رنگ میوه بود. برای این منظور ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده خشک گردیدند و سپس با استفاده از فلور ایران[۱](Khatamsaz, 1995) مورد بررسی قرار گرفتند. واکاوی داده‌های ریخت‌شناسانه: با استفاده از داده‌های ریخت‌شناسانه مربوط به گونه‌های مورد بررسی، واکاوی

۱- Flora Iran

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

خوشه‌بندی، آزمودن درستی گروه‌بندی گونه‌ها و واکاوی به عامل‌های اصلی[1] با استفاده از نرم افزار MVSP نسخه ۳/۱ (Kovach, 1999) انجام شد.

جدول ۱- گونه‌ها، مناطق جمع‌آوری و کد شناسایی گونه‌های *Lonicera* استفاده شده در پژوهش.

Table 1- Species, collection areas and identification code of *Lonicera* species used in the research.

ردیف Row	گونه Species	شماره دسترسی Accession number *matK*	عرض جغرافیایی Latitude	استان Province	محل جمع‌آوری Collection area
1	*L. floribunda*	MW557831	37° 61′ 04″	گیلان Gilan	حوزه لومیر Lomir area
2	*L. korolkovii*	MW557832	نمونه هرباریوم	مازندران Mazandaran	سنگده Sangdeh
3	*L. nummulariifolia*	MW557833	33° 00′ 4″	اصفهان Isfahan	سکان Sokkan
4	*L. iberica*	MW557834	37° 61′ 81″	اردبیل Ardabil	اندبیل Andabil
5	*L. bracteolaris*	MW557835	37° 61′ 83″	اردبیل Ardabil	خلخال Khalkhal
6	*L. caucasica*	MW557836	37° 62′ 06″	آذربایجان شرقی East Azerbaijan	ارس‌باران Arasbaran
7	*L.maackii*	MW557837	32° 64′ 24″	اصفهان Isfahan	پارک بیشه حبیب Bisheh Habib Park
8	*L. caprifolium*	MW557838	32° 63′ 98″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
9	*L. heckrottii*	MW557839	32° 63′ 48″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
10	*L. fragrantissima*	MW557840	32° 63′ 00″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
11	*L. sempervirens*	MW557841	32° 63′ 30″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
12	*L. nitida*	MW557842	32° 63′ 25″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA و تکثیر نواحی کلروپلاستی و هسته‌ای: برای استخراج DNA ژنومی، نمونه‌های برگی با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند و استخراج DNA با استفاده از کیت Vivantis GF-1 محصول کشور مالزی انجام شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ٪ ۰/۸ در بافر ۰/۵ X TBE و اسپکتوفتومتری با استفاده از

۱- Principle component analysis (PCAs)

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

دستگاه بیوفتومتر (Eppendorf AG) تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به منظور تکثیر توالی‌های هسته‌ای وکلروپلاستی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG) انجام گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است. واکنش PCR برای هر نمونه در دو حجم ۲۵ میکرولیتری انجام شد و سپس محصول واکنش‌ها با یکدیگر مخلوط گردیدند. نوع و مقدار مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR شامل ۱۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (10µM)، ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X، ۰/۷ میکرولیتر MgCl2 (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5U/µl) (شرکت سیناژن محصول کشور ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA ژنومی (50 ng/µl) بود.

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ی پلیمراز شامل واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل؛ دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال (دمای ۵۵ درجه سلسیوس جهت ناحیه ITS و دمای ٦۳ درجه سلسیوس جهت ناحیه *matK*) به مدت ٤۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه بود.

جدول ۲- موقعیت و توالی آغازگرهای استفاده شده در تکثیر نواحی هسته‌ای و کلروپلاستی.

Table 2. Position and sequence of primers used in amplification of nuclear and chloroplast regions.

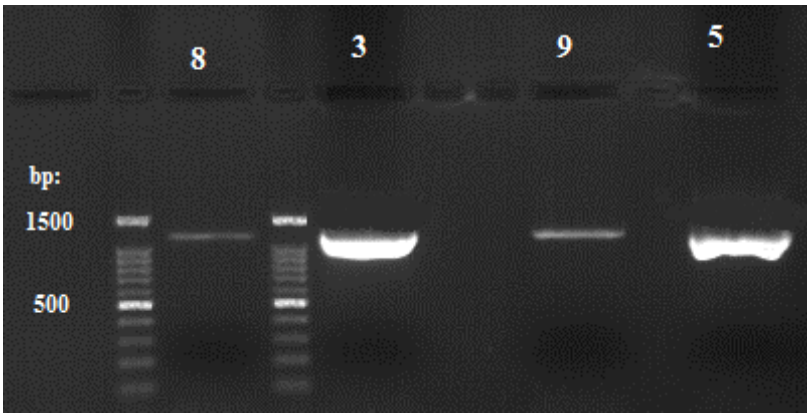
نام آغازگر Primer name	جهت Direction	توالی آغازگر (′۵-′۳) Primer's sequence (5′-3′)	منبع Reference
ITS	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White *et al*., 1990)
	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
matK	F	TAATTTACGATCAATTCATTCA	(Dunning & Savolainen, 2010)
	R	ATACAAATAATATCCAAATAC	

خالص‌سازی محصولات PCR: به منظور خالص نمودن محصولات PCR، از کیت خالص سازی PCR (محصول شرکت Favorgen کشور تایوان) استفاده شد (شکل ۱). پس از خالص‌سازی کمیت و کیفیت نمونه‌ها به روش اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Eppendorf AG) تعیین شد. DNAی خالص‌سازی شده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد و در نهایت نمونه‌های خالص‌سازی شده جهت توالی یابی به شرکت Seqlab آلمان ارسال شدند.

آنالیز داده‌ها: پس از استخراج DNA کلروپلاستی و تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR از قطعه *matK* هر یک از نمونه‌ها با پرایمر رفت و برگشت توسط شرکت Seqlab آلمان تعیین توالی گردیدند (شماره دسترسی[۱] نمونه‌ها در جدول ۱ ثبت شد). کروماتوگرام دریافتی با استفاده از نرم افزار Chromas ver. 4 مشاهده شد و توالی *matK* استخراج گردید. کیفیت توالی‌ها با نرم‌افزار Chromas ver 4 سنجیده و با همین نرم افزار ابتدا و انتهای توالی‌ها حذف گردیدند. آنالیز آماری Maximum Parsimony، برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ناحیه و در نهایت رسم درخت تبارزایی توالی DNAی کلروپلاستی نمونه‌های *Lonicera* به همراه تعدادی توالی‌های دیگر انتخاب شده از پایگاه بانک ژن NCBI که بیشترین شباهت را در بلاست داشتند با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه پنجم (Tamura *et al*., 2007) آنالیز شدند.

۱- Accession number

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

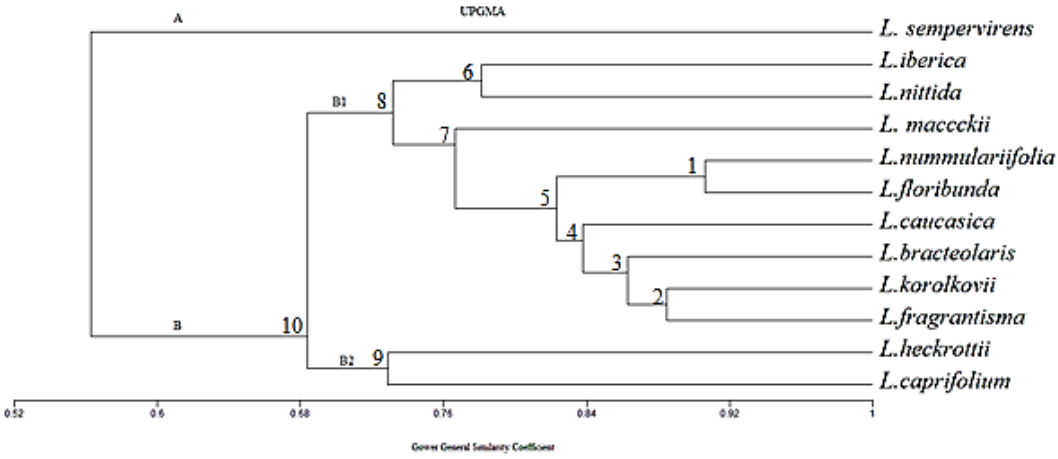


شکل ۱- محصولات PCR خالص شده مربوط به ناحیه کلروپلاستی *matK* بارگذاری شده روی ژل آگارز ۱٪. اندازه باندها در حدود bp ۱۵۰۰-۱۰۰۰ است.

Figure 1- Purified PCR products related to the *matK* region of chloroplasts loaded on 1% agarose gel. The band size is around 1000-1500 bp.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از انجام مطالعات ریخت‌شناسانه: داده‌ها برای رسم دندروگرام با نرم‌افزار MVSP نسخه ۱/۳ (Kovach, 1999) مورد استفاده قرار گرفتند. دندروگرام بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب Gower برای تمام صفات رسم شد (شکل ۲). دندروگرام رسم شده به روش UPGMA نشان داد که ۱۲ گونه به دو گروه بزرگ تقسیم شدند. گونه *L. sempervirens* در اولین گروه دارای رنگ خامه زرد، رنگ کلاله پرتقالی و غیر معطر بود در حالی‌که گونه‌های قرار گرفته در گروه دوم دارای رنگ خامه سفید، رنگ کلاله سبز و معطر بودند. نزدیکترین رابطه ژنتیکی بین گونه‌های *L. floribunda* و *L. nummulariifolia* با ۹۰٪ شباهت و کمترین شباهت بین گونه‌های *L. sempervirens* و *L. caprifolium* وجود داشت (جدول ۳).

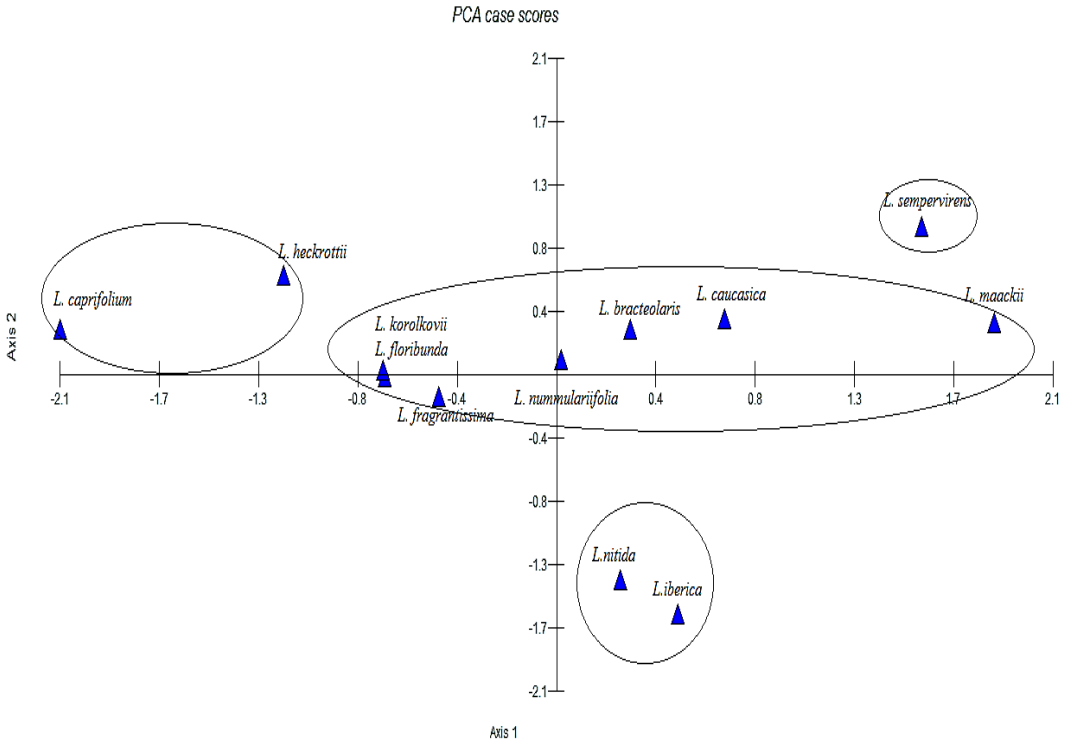


شکل ۲- دندروگرام گونه‌های *Lonicera* با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسانه و رابطه تبارزایی آنها بر اساس الگوریتم UPGMA. اعداد روی شکل مربوط به شماره گره‌ها است.

Figure 2- Dendrogram of *Lonicera* species using morphological markers and their phylogeny relationship based on UPGMA algorithm. The numbers on the figure correspond to the number of nodes.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

برای آزمودن ارتباط میان گونه‌ها واکاوی به عامل‌های اصلی روی داده‌های مربوط به ریخت‌شناسی با استفاده از نرم‌افزار MVSP نسخه ۱/۳ (Kovach, 1999) انجام شد (جدول‌های مربوطه به علت حجم زیاد داده‌ها در متن قرار داده نشده‌اند). دو عامل اول که در مجموع ٥٦/٤٢٪ گوناگونی را شامل می‌شدند، برای مشخص کردن ارتباط گونه‌ها به کار رفت که بر این اساس گونه‌ها در ٤ گروه قرار گرفتند که با دندروگرام همسو بود (شکل ۳). بنابراین این آزمایش نشان داد که نشانگر ریخت‌شناسانه، نشانگر موثر و امیدبخش برای تشخیص گوناگونی در جنس *Lonicera* است. Jalili و همکاران (۲۰۱۷) پس از بررسی تشریح برگ ۹ گونه از جنس *Lonicera* متعلق به ایران متوجه شدند که شکل ظاهری برگ و نوع پارانشیم دو صفت مهم در شناسایی محسوب می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان یک صفت تاکسونومیکی جداکننده استفاده شوند.



شکل ۳- نمودار پراکنش دو بعدی گونه‌های *Lonicera* بر اساس واکاوی به عامل‌های اصلی داده‌های ریخت‌شناسانه.

Figure 3- Two-dimensional distribution diagram of *Lonicera* species based on Principle component analysis (PCAs) on morphological data.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

جدول ۳- ماتریس تشابه بین گونه‌های ***Lonicera*** بر اساس نشانگرهای ریخت‌شناسانه.

Table 3- Similarity matrix between *Lonicera* species based on morphological markers.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	*L. caprifolium*	1											
2	*L. heckrottii*	0.729	1										
3	*L. fragrantissima*	0.700	0.791	1									
4	*L. nittida*	0.645	0.649	0.764	1								
5	*L. floribunda*	0.783	0.721	0.842	0.801	1							
6	*L. korolkovii*	0.682	0.734	0.885	0.699	0.846	1						
7	*L. nummulariifolia*	0.724	0.671	0.83	0.798	**0.907**	0.801	1					
8	*L. iberica*	0.565	0.69	0.745	0.781	0.743	0.716	0.752	1				
9	*L. bracteolaris*	0.683	0.695	0.879	0.685	0.807	0.847	0.789	0.708	1			
10	*L. caucasica*	0.644	0.685	0.845	0.747	0.842	0.812	0.828	0.668	0.856	1		
11	*L. sempervirens*	**0.428**	0.61	0.591	0.52	0.548	0.613	0.554	0.574	0.567	0.617	1	
12	*L. maackii*	0.653	0.595	0.749	0.744	0.754	0.694	0.789	0.673	0.809	0.804	0.572	1

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]

[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

نتایج داده‌های مولکولی

آنالیز BLAST توالی به دست آمده نشان داد که توالی محصولات تکثیر شده دارای بیشترین تشابه با توالی‌های مربوط به ژن *matK* و نیز مربوط به گونه مورد نظر بود. طول توالی این ناحیه، محدوده‌ای بین ۱۱۱۰ تا ۱۱۳۵ جفت باز از گونه‌ای به گونه‌ی دیگر متفاوت بود که پس از همردیفی چندگانه تمام توالی‌های مربوط به ناحیه *matK*، با استفاده از نرم‌افزار MEGA، ۱۰۵۳ جفت باز به همراه ایندل‌های موجود بر روی توالی، تشخیص داده شد. تعداد جایگاه متغیر[۱] و جایگاه محافظت‌شده[۲] برای این ناحیه به ترتیب ۱۰۹ و ۹٤٤ جفت باز بود. تعداد جایگاه Parsimony informative برای این ناحیه برابر ۱۹ و نسبت جایگزینی transition به transversion (R) برای این ناحیه ۱/۰۲ تخمین زده شد. همچنین فراوانی نوکلئوتیدها شامل ۲۵٪ باز آدنین (A)، ۲۵٪ باز تیمین (T)، ۲۵٪ باز سیتوزین (C) و ۲۵٪ باز گوانین (G) بود. نتایج برآورد الگوی جایگزینی برای گونه‌ها در جدول ٤ آورده شده است. همچنین محاسبه واگرایی تکاملی[۳] که به نوعی همان فاصله ژنتیکی[٤] نیز محسوب می‌شود بین تمامی داده‌های توالی حاصل از این دو ناحیه (جدول‌های مربوطه به علت حجم زیاد داده‌ها در متن قرار داده نشده‌اند) نشان داد بیشترین واگرایی مربوط به گونه‌های *L. fragrantissima* و *L. heckrottii* (۰/۰۵۷) است.

جدول ٤- برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ناحیه *matK* به روش حداکثر درست‌نمایی ترکیبی.

Table 4- Estimation of the nucleotide substitution pattern of the *matK* region by the Maximum composite likelihood method.

نوکلئوتید ***Nuclotide***	***A***	***T***	***C***	***G***
A	-	*6.18*	*6.18*	**12.63**
T	*6.18*	-	**12.63**	*6.18*
C	*6.18*	**12.63**	-	*6.18*
G	**12.63**	*6.18*	*6.18*	-

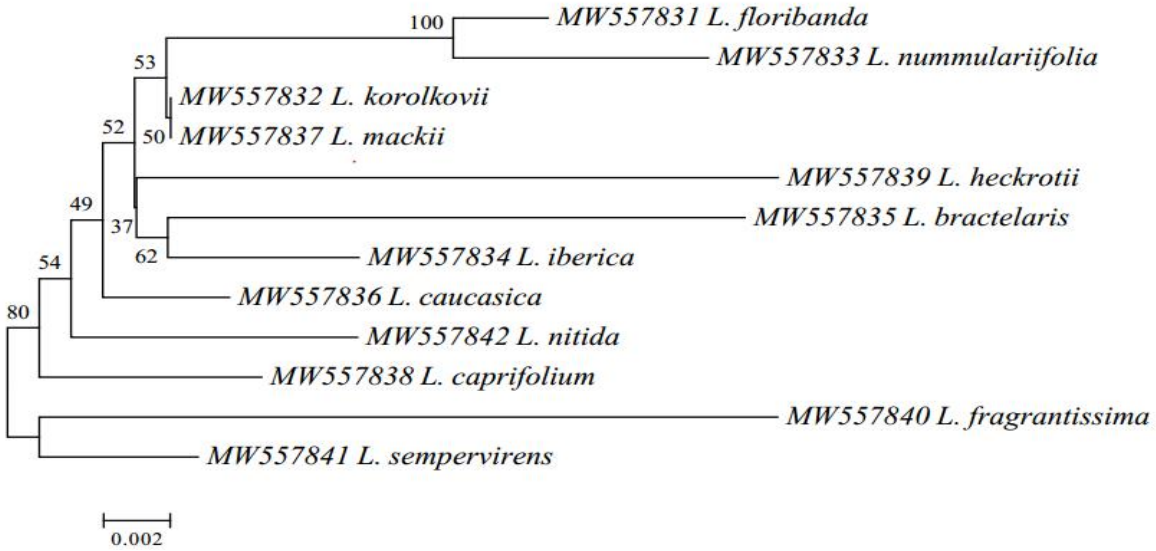
† هر عدد نشان‌دهنده احتمال جایگزینی (r) یک باز (ردیف) با باز دیگر (ستون) است. برای سادگی مجموع مقادیر r برابر ۱۰۰ می‌باشد. مقادیر مختلف جایگزینی ترانزیشن به صورت بولد (bold) و جایگزینی‌ها از نوع ترانسورژن به صورت اریب (Italic) آورده شده است.

† Each entry is the probability of substitution (r) of one base (row) to another base (column). For simplicity, sum of r values is made equal to 100. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

پس از محاسبه واگرایی ژنتیکی و پارامترهای آماری مختلف برای این ناحیه درخت فیلوژنتیک رسم گردید. نتایج درخت تبارزایی گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* به‌تنهایی بر اساس ناحیه *matK* بـه روش Maximum Likelihood (شکل ٤) مشخص کرد که جداسازی همه‌ی گونه‌ها به جز دو گونه *L. korolkovii* و *L. maackii* به خوبی صورت گرفته و در شاخه‌های مجزا قرار گرفتند. براساس درخت ایجاد شده گونه‌های *L. nummulariifolia* و *L. floribunda* ارتباط فیلوژنتیک نزدیکی داشته و دارای جد مشترک بودند (بوت استرپ ۱۰۰ درصد). همچنین یک ارتباط نزدیک بین دو گونه *L. bracteolaris* و *L. iberica* (بوت استرپ ٦۲) در درخت فیلوژنتیک مذکور قابل مشاهده بود.

۱- Variable ۲- Conserved ۳- Evolutionary divergence ۴- Genetic distance

نتایج درخت فیلوژنتیک گونه‌های ایرانی همراه توالی گونه‌های گرفته شده از بانک ژن NCBI به روش حداکثر درست_نمایی (Maximum likelihood) با نتایج جدول واگرایی ژنتیکی و درخت فیلوژنتیک گونه‌های ایرانی هم‌سو بود (شکل ۵). بر اساس درخت فیلوژنتیک ایجاد شده به وسیله ژن *matK* از بین دوازده گونه‌ی جنس *Lonicera* موردمطالعه گونه‌های *L. floribunda*، *L. nummulariifolia*، *L. iberica*، *L. bracteolaris*، *L. caprifolium*، *L. heckrottii*، *L. fragrantissima*، *L. sempervirens* و *L. nitida* شاخه‌های مجزایی را تشکیل دادند و از بقیه گونه‌های مذکور قابل شناسایی بودند.



شکل ٤- درخت فیلوژنتیک حاصل از توالی‌های ناحیه *matK* گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* به روش *Maximum Likelihood*. اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰ مرتبه نمونه گیری می باشد.

Fig 4- Phylogenetic tree from *matK* region sequences of Iranian *Lonicera* species by Maximum Likelihood method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of similarity within the group obtained from 100 samples.

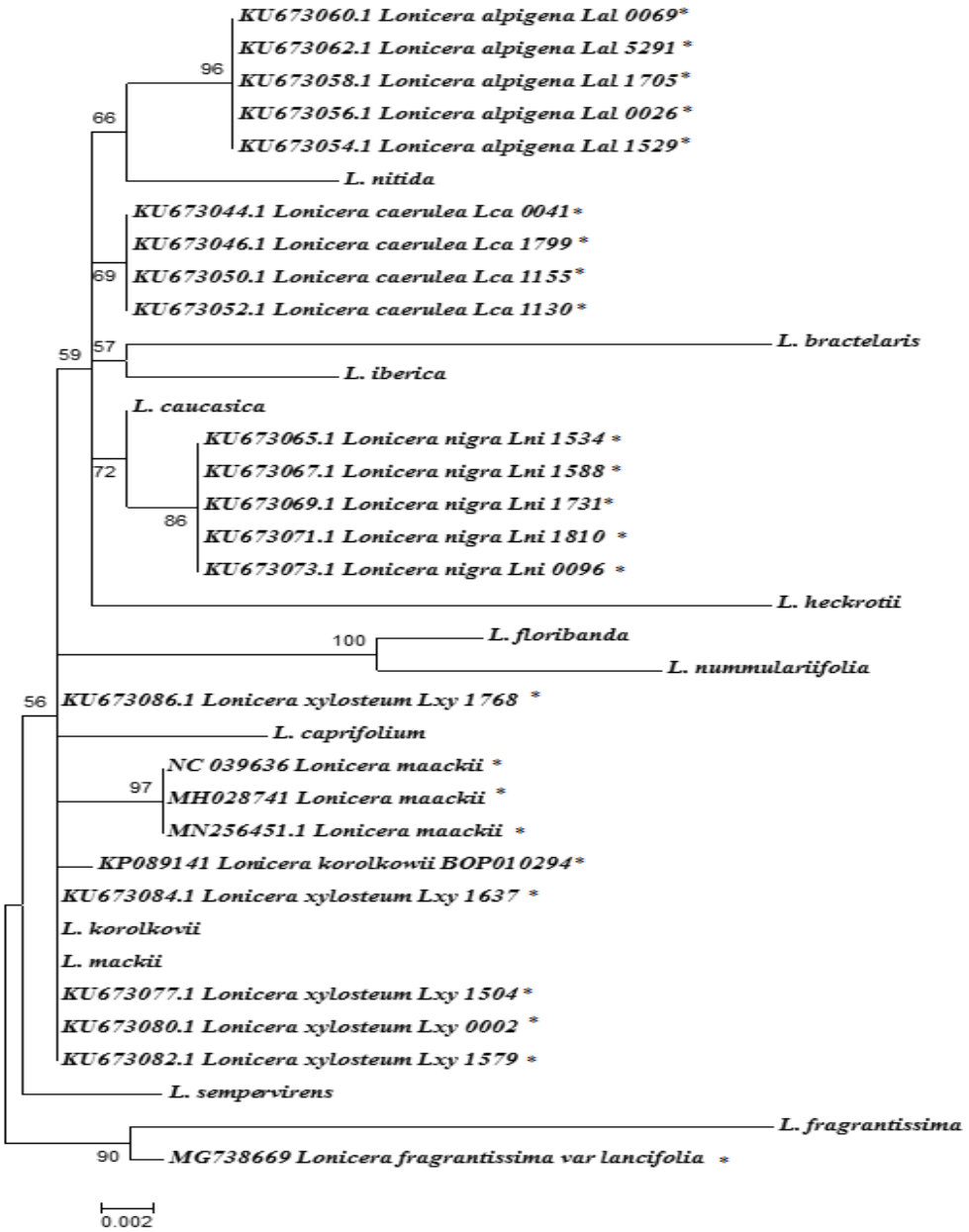
گونه *L. caucasica* از دیگر گونه‌های مورد بحث قابل تمایز بود ولی با گونه *L. nigra* قابل تفکیک نبود و به عنوان یک گروه مونوفایلتیک نمی‌تواند در نظر گرفته شود. گونه *L. korolkovii* نیز از گونه *L. maackii* (گونه موجود در پژوهش) و *L. xylosteum* قابل تفکیک نبود. همچنین گونه *L. maackii* موجود در ایران نیز با گونه‌های دیگر *L. maackii* از کشورهای مختلف یک گروه مونوفایلتیک تشکیل ندادند. در حقیقت استفاده از این ژن برای شناسایی گونه *L. maackii* کشورهای دیگر (شماره دسترسی MN256451، NCO39636 و MHO28741) قابل اعتماد بوده و بر اساس آنالیز فیلوژنی این ژن در یک گروه مونوفایلتیک قرار گرفتند. در حالی‌که استفاده از این ژن برای شناسایی گونه *L. maackii* در ایران توصیه نمی‌شود.

در مطالعه Fatahi و همکاران (۲۰۲۱) با استفاده از نشانگر کلروپلاستی *trnL-F* در تعیین رابطه تبارزایی بین گونه‌های پلاخور (*Lonicera* spp.) موجود در ایران نیز *L. maackii* با گونه مشابه خود از کشورهای دیگر یک گروه تک جدی را تشکیل ندادند و قرابت نزدیک‌تری با *L. korolkovii* و *L. floribunda* داشتند. در این مورد به احتمال زیاد رخدادهایی مانند Incomplete Lineage Sorting (ILS) و هیبریداسیون در نتیجه‌ی گیرش کلروپلاست باعث گوناگونی زیاد از حد داخل گونه‌ها شده و مانع از شناسایی گونه‌ها به عنوان گروه‌های مونوفایلتیک شده باشد. گونه ایرانی *L. nitida* با گونه *L.*

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

alpigena اروپا دارای قرابت فیلوژنی نزدیک‌تری بود. ارتباط فیلوژنتیکی بین دیگر گونه‌های ایرانی با بررسی این درخت فیلوژنتیک قابل تشخیص نبود. بنابراین بر اساس درخت فیلوژنتیک *matK*، اکثر گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* از یکدیگر قابل تفکیک بودند.

با تاسف، این مطالعه نتوانست از آغازگرهای ITS جواب مطلوبی حاصل نماید، به همین منظور ترکیبات مختلف آغازگر مورد آزمون قرار گرفت ولی نتیجه‌ای حاصل نشد.



شکل ۵- دندروگرام حاصل از توالی‌های ناحیه *matK* گونه‌های جنس *Lonicera* که به روش Maximum Likelihood رسم گردیده است. اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد شباهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰ مرتبه نمونه گیری می‌باشد. توالی گونه‌های گرفته شده از بانک ژن NCBI با ستاره (*) مشخص شده‌اند.

Fig 4. Phylogenetic tree from *matK* region sequences of *Lonicera* species by Maximum Likelihood method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of similarity within the group obtained from 100 samples. Species taken from the NCBI gene bank are marked with an asterisk (*).

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

پژوهش Lahaye و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که بخشی از ژن *matK* در پلاستید می‌تواند به عنوان رمزینه DNA عمومی برای گیاهان گل‌دار استفاده شود. همچنین Ipek و همکاران (۲۰۱٤) که از نواحی ITS و *matK* جهت تمایز گونه‌های *Allium* استفاده نمودند، نتیجه گرفتند ناحیه *matK* جهت آنالیز فیلوژنتیک *Allium* بهتر از ITS می‌باشد. Yao و همکاران (۲۰۱۷) نیز ناحیه *matK* را به عنوان بهترین بارکد جهت شناسایی و تفکیک گونه‌های خانواده Chenopodiaceae و Poaceae معرفی نمودند. همچنین Alian و همکاران (۲۰۱۳) به منظور بررسی آنالیز فیلوژنتیکی گونه‌های *Stachys* L. از توالی‌یابی نواحی DNA ITS ریبوزومی و *trn*L-F کلروپلاستی استفاده نمودند. نتایج حاصل نشان داد نواحی کلروپلاستی می‌توانند در جداسازی گونه‌های این جنس در سطح بخش نسبت به ناحیه ITS هسته‌ای بهتر عمل نمایند.

کارایی بارکدها در گیاهان مختلف متفاوت است به‌طوری که بر خلاف نتایج این آزمایش، Wang و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی پتانسیل رمزینه کردن DNA برای شناسایی جنس *Salvia* بر اساس DNA کلروپلاستی و هسته‌ای از نواحی *matK*، *rbcL*، *trn*H-*psb*A، ITS1 و ITS2 استفاده نموده و نتیجه گرفتند که ناحیه ITS1 بهتر از سایر نواحی قادر به تفکیک بین گونه‌ها و درون گونه‌ها می‌باشد. همچنین Feng و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی ٤۳ نمونه از گونه‌های *Dendrobium* (خانواده ارکیداسه) و واریته‌های درون این گونه بر اساس ناحیه ITS2 دریافتند که میزان موفقیت تکثیر PCR و توالی‌یابی این ناحیه ۱۰۰ درصد بود و این ناحیه ژنی، به‌خوبی اکسشن‌ها را از هم تفکیک نمود. بنابراین سایر مطالعات مولکولی پیشین را نیز تایید نمودند. Castro و همکاران (۲۰۱۵)، نیز ۷ رقم انجیر جمع‌آوری شده از نواحی مختلف را با استفاده از بارکدهای نواحی ITS، *matK* و *trn*H-*psb*A مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که ناحیه ITS بالاترین میزان گوناگونی را دارد و با ناحیه *trn*H-*psb*A هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد نشانگرهای مولکولی و ریخت‌شناسانه می‌توانند برای جداسازی گونه‌ها و بررسی رابطه فیلوژنتیکی در جنس *Lonicera* به کار روند. دندروگرام رسم شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسانه نشان داد که ۱۲ گونه به دو گروه بزرگ تقسیم شدند. گونه *L. sempervirens* در اولین گروه دارای رنگ خامه زرد، رنگ کلاله پرتقالی و غیر معطر بود در حالی که گونه‌های قرار گرفته در گروه دوم دارای رنگ خامه سفید، رنگ کلاله سبز و معطر بودند. نتایج نشان داد که نزدیکترین رابطه ژنتیکی بین گونه‌های *L. floribunda* و *L. nummulariifolia* و کمترین شباهت بین گونه‌های *L. sempervirens* و *L. caprifolium* وجود دارد. نتایج واکاوی به عامل‌های اصلی نشان داد که نشانگرهای ریخت‌شناسانه استفاده شده برای تشخیص گونه‌های مورد بررسی با دقت مناسبی کارآمد هستند. در بیشتر موارد نتایج واکاوی خوشه‌ای و واکاوی به عامل‌های اصلی همسو بودند. هر دو نشانگرهای مولکولی *matK* و ریخت‌شناسانه، نشان دهنده رابطه ژنتیکی نزدیک *L. floribunda* و *L. nummulariifolia* می‌باشند. بنابراین نتایج این آزمایش نشان داد که نشانگر ریخت‌شناسانه، تا حدودی موثر و امیدبخش برای تشخیص گوناگونی و روابط گونه‌های جنس *Lonicera* است. کاربرد نواحی رمزینه DNA هسته‌ای ITS و کلروپلاستی *matK* نشان داد از آغازگر ITS نتیجه‌ای حاصل نشد اما ناحیه *matK* با توجه به گوناگونی و تکثیر آسان، رمزینه مناسبی برای بررسی گوناگونی ژنتیکی بین گونه‌های پلاخور است.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

منابع

Alian, M. (2013). Phylogenetic analysis of *Stachys* L. species in Central Zagros region of Iran using sequencing of ribosomal ITS DNA ITS *trnL-trnF* chloroplasts. PhD Thesis, University of Shahrekord, Iran. (In Persian).

Arzanlo, M., Dokhanchi, H., Davari, M., Khodaveisi, S., Badali, H. (2013). DNA Barcoding: New Horizons in Molecular Identification of Pathogenic Fungi (Review Article). *Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*, *18*, 113-126 (In Persian).

Castro, C., Hernandez, A., Alvarado, L., Flores, D. (2015). DNA barcodes in fig cultivars (*Ficus carcia*) uses ITS regions of ribosomal DNA, the *trnH-psbA* spacer and the *matK* coding sequence. *American Jonrual of Plant Sciences*, *6*(01), 95-102.

Chen, W.C., Liou, S.S., Tzeng, T.F., Lee, S.L., Liu, I.M. (2012). Wound repair and anti-inflammatory potential of *Lonicera japonica* in excision wound induced rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*(1), 1-9.

Desalle, R.O.B. (2006). Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. *Conservation Biology*, *20*(5), 1545– 547.

Drabkova, L., Kirschner, J., Vlček, Č., Pačes, V. (2004). *TrnL–trnF* intergenic spacer and *trnL* intron define major clades within *Luzula* and *Juncus* (Juncaceae): importance of structural mutations. *Journal of Molecular Evolution*, *59*(1), 1-10.

Dunning, L.T., Savolainen, V. (2010). Broad-scale amplification of *matK* for DNA barcoding. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *164*(1), 1–9.

Fatahi, N., Ghasemi ghehsare, M., Shiran, B., Siampoor, M. (2021). The investigation of chloroplast marker *psbA-trnH and trnL-F* in determining the relationships between species of *Lonicera* spp. In: Third International and Fourth National Congress of Flowers and Ornamental Plants of Iran. (In Persian).

Feng, S., Jing, Y., Wang, S., Jiang, M., Chen, Z., Ying, Q., Wang, H. (2015). Molecular identification of Dendrobium species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21975-21988.

Ghasemi Ghehsareh, M., Kafi, M. (2015). *Scientific and Practical Floriculture*. Moallef Press. 296p. (In Persian).

Hajibabaei, M., Singer, G.A., Hebert, P.D., Hickey, D.A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trend in Genetics*, *23*(4), 167-172.

Hebert, P.D., Ratnasingham, S., De Waard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Biological Sciences*, *270*, 96-99.

Hong-Jin, D.O.N.G., Hua, P.E.N.G. (2014). Relationships within the *Lonicera macrantha* complex based on morphological and molecular data. *Plant Diversity and Resources*, *36*(2), 133-142.

Ipek, M., Ipek, A., Simon, P.W. (2014). Testing the utility of *matK* and ITS DNA regions for discrimination of Allium species. *Turkish Journal Botanical*, *38*(2), 203-212.

Jalili, S., Hamdi, S.M.M., Oraghiardebili, Z. (2017) Anatomical characteristics of the leaves and stems of 9 species of the genus *Lonicera* from Caprifoliaceae family in Iran. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(4), 751-765. (In Persian).

Johnson, L. A., Chan, L. M. Weese, Weese, L. D., Mcmurry, S. (2008). Nuclear and cpDNA sequences combined provide strong inference of higher phylogenetic relationships in the phlox family (Polemoniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *48*(3), 997–1012.

Hartmann, H. T., Kester, D. E. (2011). *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices.* Pearson Prentice Hall. 922p.

Khatamsaz, M. (1995). *Flora of Iran*, No. 13, Caprifiliaceae. Research Instutute og Forest and Rangelands. 32p. (In Persian).

Kovach, W. L. (1999). MVSP-A multivariate statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK. 137p.

Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]

[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

Proceedings of the National Academy of Sciences, *105*(8), 2923-2928.

Mabberley, D.J. (2008). *Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses*. Cambridge University Press. 1040P.

Pang, X., Song, J. Zhu, Y., Xie, C., Chen, S. (2010). Using DNA barcoding to identify species within euphorbiaceae. *Planta Medica*, *76*(15), 1784-1786.

Qing Ren, B., Guo xiang, X., Duan chen, Z. (2010). Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Molecular Ecology Resources*, *10*(4), 594-605.

Schöttler, M.A., Flügel, C., Thiele, W., Stegemann, S., Bock, R. (2007). The plastome-encoded PsaJ subunit is required for efficient photosystem I excitation, but not for plastocyanin oxidation in tobacco. *Biochemical Journal*, *403*(2), 251-260.

Sun, Z., Gao, T. Yao, H., Shi, L., Zhu. Y., Chen, S. (2011). Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method. *Planta Medica*, *77*(03), 301–306

Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L. Miquel, C. (2007). Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, *35*(3), 3-14.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596-1599.

Theis, N., Donoghue, M.J., Li, J. (2008). Phylogenetics of the Caprifolieae and *Lonicera* (Dipsacales) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. *Systematic Botany*, *33*(4), 776-783.

Wang, M., Zhao, H.X., Wang, L., Wang, T., Yang, R.W., Wang, X.L., Zhou, Y.H., Ding, C.B., Zhang, L. (2013). Potential use of DNA barcoding for the identification of Salvia based on cpDNA and nrDNA sequences. *Gene*, *528*(2), 206-215.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Gens for Phylogenetics. In: Innis M.A. et al. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. New York, pp. 315-322

Yao, P.C., Gao, H.Y., Wei, Y.N., Zhang, J.H. Chen, X.Y., Li, H.Q. (2017). Evaluating sampling strategy for DNA barcoding study of coastal and inland halo-tolerant Poaceae and Chenopodiaceae: a case study for increased sample size. *Plos One*, *12*(9), 0185311.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]

[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]

Flower and Ornamental Plants (2022), 7(1): 13-26
Research article

Investigation of the relationship between Honeysuckle species (*Lonicera* spp.) in Iran using DNA barcoding and morphological markers

Najmeh Fattahi Dehkordi[1], Masood Ghasemi ghehsare[1*], Behrooz Shiran[2]

1. Horticultural Science Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University
2. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University
mghasemi1352@gmail.com

Abstract

The genus *Lonicera* belongs to the Caprifoliaceae and in Persian, it is called Plakhor, Shung, or Honeysuckle. Understanding inter-species relationships based on morphological and biochemical characteristics sometimes have conflicting results. In this study, morphological markers, and DNA of nuclear and chloroplast barcodes (including *ITS* and *matK*) along with several other sequences from NCBI gene bank database were used to identify, differentiate and determine the phylogenetic relationships of 12 *Lonicera* species in Iran. Genomic DNA was extracted using existing kits and PCR reaction was performed to amplify the two gene regions and finally the purified samples were sequenced. Cluster analysis based on morphological characteristics divided the species into two large groups, the first group consisting of *L. sempervirens* and the second group consisting of 11 other species. The closest genetic relationship was observed between *L. floribunda* and *L. nummulariifolia* and the least similarity was related to *L. sempervirens* and *L. caprifolium*. Principle component analysis (PCAs) of morphological data showed that the first three principal components explaining 71.1% of total variation. The first principal component is controlled by fluffy stem cover, leaflet shape, leaf margin, leaflet tip shape, flower color, fluffy leaf cover, leaf base and fruit color, petiole length and internode distance explaining 38.8% of variation. Based on molecular studies, the length of the *matK* region was about 1110-1135 nucleotides. Parsimony analysis of this area showed 944 protected sites, 109 variable sites and 19 Parsimony sites. In the phylogenetic tree created by the matK region, all species were isolated except two species, *L. korolkovii* and *L. maackii*, and were placed in separate branches. The genetic diversity and distance between species were observed in the *matK* region with a genetic distance of 0.00 to 0.057. This study could not provide a satisfactory answer from ITS primers. Therefore, the *matK* region was identified as the best region in terms of the ability to show genetic diversity between species due to its maximum diversity and easy reproduction, which can be used in future research.

Keywords: Morphological marker, Barcode regions, Molecular phylogeny, *Lonicera*, *matK*.

[Downloaded from flowerjournal.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.26765993.1401.7.1.2.7]
[DOI: 10.61186/flowerjournal.7.1.13]