Phylogenetic analysis of *Chaenorhinum*, *Kickxia* and *Nanorrhinum* with focus on taxa in the Flora Iranica region, based on nuclear ribosomal (ITS) sequence

Nafiseh Yousefi Mahmood

Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

Abstract

Ami and Background: Antirrhineae is a large tribe within Plantaginaceae that some genera of this tribe have undergone significant taxonomic changes in recent years, many of which have yet to be assessed by detailed phylogenetic analyses, including *Kickxia*, *Nanorrhinum* and *Chaenorhinum*.

Material and Methods: To examine the monophyly, relationships, and rank of *Kickxia*, *Nanorrhinum*, and *Chaenorhinum*, a phylogenetic analysis of ITS sequence data was conducted, with special focus on the Flora Iranica region. Representatives of *Kickxia* s.l., *Anarrhinum*, *Chaenorhinum*, some additional genera of *Antirrhineae*, and several outgroup taxa from Plantaginaceae were sampled. Phylogenetic analyses were conducted using Bayesian inference and maximum Parsimony.

Results: Our results showed that the monophyletic genus of *Chaenorhinum* can be subdivided into *Chaenorhinum* and *Microrrhinum*, partially matching two of the currently recognized sections of the genus. *Albraunia* and *Holzneria* are nested within the *Chaenorhinum* clade and should not be recognized as distinct genera. In monophyletic genus of *Kickxia* two clades corresponding to sect. *Kickxia* and sect. *Valvatae* were also highly supported. Our data, when combined with all other available evidence, support recognition of the clade comprising *Kickxia* sect. *Valvatae* at the genus level, as *Nanorrhinum*. Based on this result, four names are here transferred to *Nanorrhinum*.

Conclusion: Although sampling strategy in this study provided strong evidence for the delimitation of studied genera, but obtained results showed that increased tax on sampling as well as additional markers is still necessary for further subdivisions of these genera.

Key words: Plantaginaceae, *Chaenorhinum, Kickxia*, *Nanorrhinum*, nr DNA ITS.

Corresponding author:
Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
Email:
nafiyousefi@yahoo.com

تحلیل تبارزایی *Chaenorhinum*، *Kickxia* و *Nanorrhinum* با تاکید بر آرایه‌های ناحیه فلات ایران، بر مبنای توالی هسته‌ای ریبوزومی (ITS)

نفیسه یوسفی محمود
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: طایفه Antirrhineae یک طایفه بزرگ در بارهنگیان است که برخی از سرده‌های آن در سال‌های اخیر متحمل تغییرات آرایه شناسی مهمی شده‌اند، بسیاری از آن‌ها مانند *Chaenorhinum*، *Kickxia* و *Nanorrhinum* هنوز باید با تجزیه و تحلیل دقیق تبارزایی مولکولی بررسی شوند.

مواد و روش‌ها: برای بررسی تک‌تبار بودن، ارتباطات و رتبه *Chaenorhinum*، *Kickxia* و *Nanorrhinum* تحلیل تبارزایی توالی‌های ITS، با تاکید بر آرایه‌های ناحیه فلات ایران صورت گرفت. نمایندگانی از سرده‌های *Kickxia* s.l.، *Anarrhinum*، *Chaenorhinum* و تعدادی گونه از سایر سرده‌های طایفه Antirrhineae و چند برون گروه از بارهنگیان انتخاب شدند. تحلیل‌های تبارزایشی به دو روش استنباط بیزی و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی انجام شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که سرده تک‌تبار *Chaenorhinum* می‌تواند به دو گروه *Chaenorhinum* و *Microrrhinum* مطابق با دو بخشه شناخته شده این سرده تقسیم شود. سرده‌های *Albraunia* و *Holzneria* باید درون شاخه *Chaenorhinum* قرار بگیرند نه به عنوان سرده-های مجزا. همچنین در سرده تک‌تبار *Kickxia* دو شاخه مطابق با بخشه *Kickxia* و بخشه *Valvatae* با حمایت بالا تشخیص داده شد. نتایج ما همراه با شواهد قابل دسترس دیگر تشخیص شاخه *Kickxia* بخشه *Kickxia* را به عنوان سرده مجزا تحت عنوان *Nanorrhinum* حمایت می‌کند. بر اساس این نتیجه چهار نام در اینجا باید به *Nanorrhinum* تغییر پیدا کند.

نتیجه‌گیری: اگرچه استراتژی نمونه‌برداری در این مطالعه شواهد قوی برای تعیین حدود سرده‌های مورد مطالعه را فراهم کرد، اما نتایج بدست آمده نشان داد که افزایش تعداد آرایه‌ها و استفاده از نشانگرهای بیشتر برای تقسیمات بیشتر این سرده‌ها ضروری است.

واژگان کلیدی: بارهنگیان، *Chaenorhinum*، *Kickxia*، *Nanorrhinum*، توالی ریبوزومی هسته‌ای ITS.

مقدمه

طایفه Antirrhineae از تیره Plantaginaceae با تولید گل‌های لوله‌ای با یک زائده قاعده‌ای (مهمیز، شکم‌دار[۱] یا کیسه دار[۲]) و شکوفایی پوشینه از نوع حجره‌دار (۲۴)، و گلیکوزیدهای ایریدوئید منحصربه‌فرد مشخص می‌شود (۳۴ و ۱۹).

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
پست الکترونیکی: nafiyousefi@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۰

[۱] Gibbous
[۲] Saccate

وجود تنوع قابل توجه در ریخت‌شناسی گل، تعداد کروموزوم و توزیع جغرافیایی باعث افزایش تعداد سرده‌های شرح داده شده Antirrhineae شده است (۳۶). به طوری که Rouy (۲۷) ۹ سرده و Rothmaler (۲۵) ۱۱ سرده را در این طایفه گزارش کردند، اما این طایفه آنچنان که توسط Sutton (۳۳) مورد بازنگری قرار گرفته شامل ۲۷ سرده و ۳۲۸ گونه است. تعدادی از این سرده‌ها در سال‌های اخیر متحمل تغییرات آرایه شناسی مهمی شده‌اند، وضعیت بسیاری از آن‌ها مانند *Chaenorhinum*، *Kickxia* و *Nanorrhinum* هنوز باید با تجزیه و تحلیل دقیق تبازرایی مولکولی بررسی شود.

سرده *Kickxia* آنچنان که توسط Sutton (۳۴) مورد بازنگری قرار گرفته‌است شامل ۴۶ گونه (نه گونه در بخشه *Kickxia* و ۳۷ گونه در بخشه *Valvatae*) است. اعضای این سرده در اروپا، آسیا، آفریقا و ماکارونزی توزیع شده‌اند (۲ و ۱۴). Chavannes (۸) بیان کرده‌بود که تعدادی از گونه‌های سرده *Kickxia* دارای پوشینه با شکوفایی درپوش‌دار هستند در حالی که بقیه شکوفایی حجره‌دار دارند. بر این اساس Chavannes (۸) پیشنهاد کرد که گونه‌های سرده *Kickxia* باید در دو گروه مجزا قرار بگیرند، اگرچه او هیچ نام رسمی‌ای برای این گروه‌ها در نظر نگرفت. Wettstein (۳۷) نام‌های *Operculatae* و *Valvatae* را درون سرده *Elatinoides* برای این دو گروه پیشنهاد کرد. Smith (۲۸) بخشه‌های وتشتاین را به عنوان زیرسرده در نظر گرفت، اما این ترکیبات هرگز به صورت معتبر چاپ نشد. این تصمیم او بر اساس اختلافات در نوع شکوفایی پوشینه و ریخت‌شناسی گل بود. Betsche (۶) بخشه *Kickxia* را به عنوان یک سرده و بخشه *Valvatae* را به عنوان دو سرده *Pogonorrhinum* و *Nanorrhinum* در نظر گرفت. اما این آرایه‌شناسی توسط Sutton (۳۴) رد شد. Sutton (۳۴) سرده *Kickxia* را به عنوان یک سرده با دو بخشه *Kickxia* و *Valvatae* معرفی کرد. Ghebrehiwet و همکارانش (۱۴) با استفاده از صفات ریخت شناسی و اطلاعات توالی‌های ژن *ndh*F تک‌تبار بودن سرده *Kickxia* را به اثبات رساندند. همچنین نشان دادند که دو بخشه سرده *Kickxia* گروه خواهری هم و هر دو بخشه گروه خواهری سرده *Anarrhinum* هستند. این شاخه با داشتن صفت پیشرفته مشترک بساک‌های چسبیده به هم که تشکیل حلقه داده‌اند مشخص می‌شود. همچنین Ghebrehiwet (۱۵) با تحلیل تبارزایی سرده *Kickxia* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی تشخیص داد که دو گروه از گونه‌ها درون این سرده، دو شاخه مجزا را بوجود می‌آورند که یکی از این شاخه‌ها با بخشه *Kickxia* و دیگری با بخشه *Valvatae* مطابقت دارد. در این مطالعه، پیشنهاد شد که با توجه به اینکه اختلاف بین این دو بخشه به اندازه اختلاف سایر سرده‌های نزدیک خویشاوند درون طایفه Antirrhineae با یکدیگر است، بخشه *Valvatae* باید به عنوان سرده مجزای *Nanorrhinum* در نظر گرفته شود. Vargas و همکارانش (۳۶) با استفاده از توالی‌های ریبوزومی هسته‌ای ITS تک‌تبار بودن سرده *Kickxia* را تأیید کردند و بیان کردند که این سرده درون شاخه Anarrhinum قرار دارد.

به نظر می‌رسد که مطالعات بیشتری لازم است تا موقعیت آرایه شناسی آرایه‌هایی را که به عنوان *Kickxia* sect. *Valvatae* معرفی شده‌اند بوضوح مشخص کند.

سرده *Chaenorhinum* شامل ۲۱ گونه از گیاهان علفی یا بوته‌ای است که در اروپا، جنوب‌غربی آسیا (ترکمنستان، گرجستان) و شمال آفریقا توزیع شده‌اند (۳۴). Chavannes (۸) سرده *Chaenorhinum* را به عنوان یک بخشه از سرده *Linaria* معرفی کرده بود و این بخشه را بر اساس ریخت‌شناسی پوشینه، اندازه نسبی حفره‌ها، بافت دیواره و روش شکوفایی به دو سری تقسیم کرده بود. Endlicher (۱۱) سری‌های Chavannes (۸) را به عنوان بخشه (بخشه *Chaenorhinum* و بخشه *Microrrhinum*) در نظر گرفت. Fourreau (۱۳) این بخشه‌ها را تا سطح سرده ارتقا داد. Boissier (۷) با استفاده از همان معیارهای Chavannes (۸)، گونه‌های *Chaenorhinum* را به سه گروه تقسیم‌بندی کرد. آخرین گروه تنها شامل *Ch. calycinum* بود. Speta (۲۹) در مقاله‌ای که بر اساس حضور اجسام پروتئینی[3] در هستک سلول بود، دیدگاه Fourreau (۱۳) را تأیید کرد. مجدداً Speta (۳۰) در بازنگری گونه‌های *Chaenorhinum* مدیترانه شرقی و آسیایی Boissier (۷)، پوشینه‌های بالغ و دانه‌های *Ch. calycinum* را مشاهده کرد و دریافت که این گروه از دو گروه Chavannes (۸) کاملاً متمایز است. او گونه *Ch. calycinum* را به عنوان تیپ یک سرده مجزا به نام *Hueblia* در نظر گرفت. سر انجام بر اساس مجموع این یافته‌ها و ریخت‌شناسی دانه و پوشینه، سرده *Chaenorhinum* به سه بخشه تقسیم شد. اختلاف این بخشه‌ها آنقدر فاحش نبود که هر کدام بتوانند به عنوان سرده‌ای مستقل پذیرفته شوند. هر سه بخشه دارای گونه-هایی با ساختار کاسبرگ و جام‌گل مشابه بودند. بر اساس رده-بندی Sutton (۳۴) ۱۱ گونه از این سرده در بخشه *Chaenorhinum*، هشت گونه در بخشه *Microrrhinum* و دو گونه در بخشه *Hueblia* قرار می‌گیرند. شکل پوشینه، ضخامت دیواره، و شکوفایی؛ شیارهای سطح دانه؛ و حاشیه لوب‌های جام-گل ویژگی‌هایی هستند که در تقسیم گونه‌های این سرده به سه

[1] Protein bodies

بخشه (۳۴) یا سه سرده مستقل (۳۰) مؤثرند. در رابطه با موقعیت سرده *Chaenorhinum* در طایفه Antirrhineae، Rothmaler (۲۵ و ۲۶) سرده *Chaenorhinum* را در زیرطایفه Linariinae با ۱۰ سرده دیگر *Asarania*، *Cymbalaria*، *Kickxia*، *Linaria*، *Antirrhinum*، *Neogaerrhinum*، *Acanthorrhinum*، *Schweinfurthia*، *Pseudorontium* و *Misopates* قرار داد. ارتباطات تبارزایی درون طایفه Antirrhineae بر اساس تحلیل صرفه‌جویانه داده‌های ریخت-شناسی و توالی‌های ژن *ndh*F نشان داد که *Chaenorhinum* با سرده‌های *Antirrhinum*، *Linaria*، *Mohavea*، *Misopates*، *Schweinfurthia* و *Howelliella* شاخه Antirrhinum را تشکیل می‌دهد (۱۴). این شاخه به میزان زیادی با زیرطایفه Rothmaler Linariinae (۲۵ و ۲۶) مطابقت دارد. Vargas و همکارانش (۳۶) با تحلیل توالی‌های ریبوزومی هسته‌ای ITS مربوط به ۲۲ سرده از طایفه Antirrhineae شاخه مشخص *Chaenorhinum* متشکل از سرده‌های *Chaenorhinum*، *Holzneria* و *Albraunia* را معرفی کردند. بر خلاف مطالعات قبلی، Guzmán و همکارانش (۱۶) با تحلیل ترکیب توالی‌های ریبوزومی هسته‌ای ITS و *ndh*F طایفه Antirrhineae و مطالعه ۱۵ گونه از سرده *Chaenorhinum* بیان کردند که سرده‌های *Holzneria* و *Albraunia* باید درون سرده *Chaenorhinum* و نه به عنوان سرده‌های مجزا منظور شوند. در گیاگان ایران سرده‌های *Chaenorhinum*، *Albraunia* و *Holzneria* به عنوان سه سرده مجزا در نظر گرفته شده‌اند (۱).

اگرچه مطالعات مولکولی جنبه‌های مهم زیادی از طایفه Antirrhineae را آشکار کرده‌اند، اما هنوز سوال‌های زیادی در رابطه با سرده‌هایی چون *Chaenorhinum*، *Kickxia*، *Nanorrhinum*، وجود دارد.

هدف از انجام این مطالعه بررسی تک تبار بودن سرده‌های طایفه Antirrhineae با تاکید بر آرایه‌های ناحیه فلات ایران و تحلیل تبارزایی سرده‌های *Chaenorhinum*، *Albraunia*، *Holzneria*، *Kickxia* و *Nanorrhinum* در طایفه، بر مبنای توالی‌های هسته-ای ریبوزومی (ITS) بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاکده‌ای از هرباریوم مرکزی دانشگاه تهران، هرباریوم دانشگاه مونیخ و هرباریوم مونیخ مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های شناسایی نشده بوسیله Flora Iranica (۲۱) مورد شناسایی قرار گرفتند. علاوه بر نمونه‌های هرباریومی ذکر شده، مجموعه کامل تصاویر نمونه‌های موجود در هرباریوم باغ گیاه‌شناسی سلطنتی ادینبورگ و هرباریوم موزه تاریخ طبیعی وین نیز مطالعه شدند (جدول ۱).

جدول ۱- فهرست اطلاعات گونه‌های استفاده شده جهت ایجاد درخت تکاملی بر اساس نشانگر ریبوزومی هسته‌ای ITS

آرایه	محل جمع آوری	جمع آوری کننده	شماره گیاکده‌ای	کد بانک ژن
برون گروه				
Chelone glabra L.	USA, Massachusetts	-	1779237 (UC)	**HQ652976**
Che. lyonii Pursh	-	J. Nelson	131 (OKL)	**AF375163**
Che. obliqua L.	-	C. Wolfe	586 (OS)	**AF375164**
Globularia repens Lam.	USA, Connecticut	-	s.n.	**AY492105**
G. salicina Lam.	England (cultivated)	M. Chase	2547 (K)	**AF313039**
G. trichosantha Fisch. & C.A. Mey.	Germany, Berlin	Cultivated	s.n. (B)	**AY591287**
Tetranema mexicanum Benth.	-	C. Wolf	s.n. (OS)	**AF375151**
T. roseum (M. Martens & Galeotti) Standl. & Steyerm a	USA, Connecticut	-	s.n.	**AY492121**
Veronica chamaedryoides Bory & Chaub.	-	D. Albach	393 (WU)	**AY673611**
V. krumovii (Peev) Peev	-	D. Albach	484 (WU)	**AY673612**
V. vindobonensis (M. A. Fisch.) M. A. Fisch.	Austria, Vienna	M. Fischer	s.n. (WU)	**AY673614**
درون گروه				
Lafuentea				
Lafuentea rotundifolia Lag.	Spain	M. Ortega	889 (SALA)	**AF509816**
Linaria				
Linaria algarviana Chav.	Portugal, Algarve	J. Fdez Casas et al.	FC2202 (M)	**KT031854**
L. caesia DC. ex Chav.	Spain	A.S. Zubizarreta	13632 (M)	**KT031853**
L. chalepensis (L.) Mill. a	Iran, Tehran	J. Vaezi	19266 (TUH)	**KT031855**
L. cretacea Fisch. ex Spreng.	Russia, Belgorod	V. Gladkova & T. Leonova	5845 (M)	**KT031851**
L. decipiens Batt.	Algeria, Wilaya Tizi Ouzou	A. Dubuis	17414 (M)	**KT031852**
L. triornithophora (L.) Cav.	_	_	617622 (MA)	**AY731248**
L. unaiensis Patzak	Afghanistan	D. Podlech	18807 (MSB)	**KT031850**
Chaennorhinum				
Sect. *Chaenorhinum*				
Chaenorhinum glareosum (Boiss.) Willk.	Spain, Prov. Granada	J.M.Losa Quintana	14440 (MSB)	**KT031893**
Ch. grandiflorum (Coss.) Willk.	Spain, Almeria	R.W. Rutherford & S.L. Jury	18415 (MSB)	**KT031889**
Ch. origanifolium (L.) Fourr.	Germany, Bayern	Th. Schauer	s.n. (M)	**KT031882**
Ch. raveyi Boiss.	Spain, Prov. Granada	E. Bayer et al.	BG195 (M)	**KT031885**
Ch. robustum Loscos	Spain, Vadocondes (Burgos)	A.S. Zubizarreta	24.261 (M)	**KT031884**
Ch. rubrifolium (Robill. & Castagne DC.) Fourr.	Spain, Prov. Huesca	P. Monteserrat	JACA112388 (M)	**KT031886**
Ch. villosum Lange	Morocco, Prov. Boulemane	W. Lippert	24626 (M)	**KT031881**
Sect. *Microrrhinum*				
Albraunia foveopilosa Speta	Iran, Andimeshk	S. Mobayen	25738 (TUH)	**KT031917**
Ch. johnstonii (Stapf) Pennell	Afghanistan, Prov.	O. Anders	8908 (MSB)	**KT031890**

	Paktia			
Ch. minus (L.) Lange	Germany, Düsseldorf	L. & W. Dietrich	7002 (M)	**KT031888**
Ch. pterosporum Lange	Yugoslavia, Dalmatia	A. Polayschek	s.n. (M)	**KT031883**
Ch. tuberculatum Speta	Afghanistan, Prov. Ghazni	D. Podlech	s.n. (MSB)	**KT031887**
Holzneria spicata (Korovin) Speta a	Afghanistan, Prov. Balkh	D. Podlech	30964 (MSB)	**KT031891**
H. spicata b	Iran, Khorasan		23577 (TARI)	**AY731258**
Anarrhinum				
Anarrhinum bellidifolium (L.) Willd.	Natural Botanical Garden of Dublin	-	145150 (VAL)	**AY731263**
A. corsicum Jordan & Fourr.	France, Corsica	D. Podlech	47340 (A)	**AF513881**
***Kickxia* s.l.**				
Nanorrhinum				
Nanorrhinum acerbianum (Boiss.) Betsche	Jordan, Wadi Quelt	W. Lang	s.n. (M)	**KT031894**
N. cabulicum (Benth.) Podlech & Iranshahr	Afghanistan, Kunar	D. Podlech	20358 (MSB)	**KT031916**
Kickxia judaica Danin	Jordan, Wadi El-Auja	A. Liston	7-85-316/7 (M)	**KT031907**
N. macilentum (Decne.) Betsche	Egypt, Sinai	D. Podlech	49679 (MSB)	**KT031908**
K. petrana Danin	Jordan/Edom	I. Kühne	3713 (M)	**KT031909**
N. ramosissimum (Wall.) Betsche	Pakistan, Indus valley	J. Roelt	s.n. (MSB)	**KT031904**
K. sagittata (Poir.) Rothm.	Morocco, Cap Rhir	T. Hagen	100 (M)	**KT031902**
K. scariosepala Täckh. & Boulos	Egypt, Sinai	D. Breckle	3926 (MSB)	**KT031911**
K. scoparia (Brouss. ex Spreng.) G.Kunkel & Sunding	Spain, Canary Islands	E. Vitek	08-0015 (MSB)	**KT031903**
K. urbani (Pit.) K. Larsen	Spain, Gran Canaria,	G. Kunkel	12302 (M)	**KT031915**
***Kickxia* s.s.**				
K. aegyptiaca Nabelek subsp. *aegyptiaca*	Tunisia, Dakar mountains	W. Hiilbig	s.n. (M)	**KT031905**
K. caucasica (Muss. Puschk. ex Spreng.) Kuprian.	Georgia, Abchazia	A.K. Skvortsov	s.n. (M)	**KT031895**
K. cirrhosa Fritsch	Italy, Cagliari	G. Dutarte	19518 (MSB)	**KT031896**
K. commutata (Rchb.) Fritsh subsp. *commutata*	France, Barcaggio	G. Dutartre	19519 (MSB)	**KT031897**
K. elatine (L.) Dumort. subsp. *elatine*	Germany, Bayern	F. Schuhwerk	06/280 (M)	**KT031898**
K. elatine subsp. *crinita*	Turkey, Antalya	W. Lang	s.n. (M)	**KT031899**
K. floribunda (Boiss.) Täckholm & Boulos	Egypt, Negev	K. Thielburger	s.n. (M)	**KT031900**
K. lanigera Hand-Mazz.	Morocco, Prov. Er Rachidia	D. Podlech	51006 (MSB)	**KT031906**
K. sieberi Dorfl.	Greece, Dodekanes	H. Kalheber	98-844 (M)	**KT031912**
K. spuria (L.) Dumort. subsp. *integrifolia* (Brot.) R.Fernandes	Spain, Huesca	I. Aizpuru	19521 (MSB)	**KT031913**
K. spuria subsp. *spuria*	Germany, Bayern	E. Duerr	s.n. (M)	**KT031914**
Antirrhinum				
Antirrhinum graniticum Rothm.	Spain, Madrid	-	99540 (VAL)	**AY731283**
Misopates				
Misopates orontium (L.) Raf.	-	R.K. Oyama	49 (A)	**AF513889**
Schweinfurthia				

Schweinfurthia pedicellata Benth. & Hook. f.	Socotra	-	99213 (E)	**AY731256**
S. imbricata A. G. Mill., M. Short & D. A. Sutton	Oman, Wadi Bed	-	99215 (E)	**AY731254**
Cymbalaria				
Cymbalaria muralis G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.	-	R. Nyffeler	s.n. (M)	**AF513883**
Mohavea				
Mohavea breviflora Coville	-	-	57521 (UTEP)	**AY878937**
M. confertiflora A. Heller	-	-	57522 (UTEP)	**AY878935**

* شناسه بانک ژنی توالی‌های تولید شده در این مطالعه به صورت ضخیم نشان داده شده‌اند.

برگ گونه‌های منتخب، جهت تهیه توالی‌های DNA مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند. نمونه‌برداری از سرده‌هایی از طایفه *Antirrhineae* در ناحیه فلات ایران صورت گرفت. نمایندگانی از سرده‌های *Veronica*، *Chelone*، *Tetranema* و *Globularia* به عنوان برون گروه انتخاب شدند. این انتخاب بر اساس مطالعات آلباخ و همکارانش (۳)، صورت‌گرفت.

برای انجام مطالعات مولکولی، از توالی ریبوزومی هسته‌ای ITS (ITS1-5.8s rDNA-ITS2) در گروه مورد مطالعه، استفاده شد. به طور کلی ۲۱ گونه از سرده *Kickxia* s.l. (شامل ۱۷ گونه از *Kickxia* s.s. و ۴ گونه از *Nanorrhinum*)، ۲ گونه از *Anarrhinum*، ۱۱ گونه از *Chaenorhinum* و ۱۸ گونه از ۸ سرده دیگر طایفه Antirrhineae برای استخراج DNA انتخاب و یا از بانک ژن برداشت شدند. آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ لیست شده‌اند.

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

ناحیه	نام پرایمر	توالی	منابع
ITS	Leu1	GTC CAC TGA ACC TTA TCA TTT AG	(۳۵)
	ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	(۳۸)
	ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	(۳۸)
	ITS4	TCC TCCGCT TAT TGA TAT GC	(۳۸)

استخراج DNA از برگ خشک با کیت NucleoSpin (Macherey-Nagel, Düren, Germany)، انجام و مطابق جدول ۳ محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تهیه شد.

جدول ۳- محلول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

	ITS
Primer forward	**0.1**
Primer reverse	**0.1**
10XTP buffer“neu”	**5**
10XTP buffer	**-**
dNTPs (2.0 Mm)	**4**
Taq DNA Polymerase	**1**
DNA template	**1**
BdH20	**35.8**
BSA	**0.5**
DMSO	**2.5**

برنامه‌های PCR به کار رفته جهت تکثیر قطعات هسته‌ای در جدول ۴ ارائه شده‌اند.

جدول ۴- برنامه‌های طراحی شده جهت تکثیر قطعات هسته‌ای (۴۰)

نشانگر	واسرشت سازی اولیه	چرخه‌ها	واسرشت سازی	بازآرایی	تکثیر	تکثیر نهایی
					Taq Polymerase	
ITS	5 min, 94 ºC	40º C	30 S, 94 ºC	30 S, 54 ºC	1 min, 72 ºC	**10 min, 72 ºC**
					Phusion Polymerase	
ITS	1 min, 98 ºC	35º C	30 S, 98 ºC	1 min, 53.5 ºC	1 min, 72 ºC	**10 min, 72 ºC**

کلیه مراحل تکثیر در دستگاه T-Personal 48 مدل Primus 96 plus یا مدل 2720 انجام گرفت.با استفاده از روش Cycle sequencing، محصولات موفق حاصل از واکنش‌های زنجیره-ای پلیمراز توسط دستگاه ABI 3730 48 capillary sequencer (Applied Biosystems) تعیین توالی شدند.

تمامی مراحل ذکر شده، در آزمایشگاه تبارزایی مولکولی مؤسسه گیاه‌شناسی دانشگاه مونیخ تحت نظر خانم تانیا ارنست، تکنسین آزمایشگاه، انجام شد. الکتروفروگرام‌های به دست آمده با نرم افزار Bioedit (۱۷) مشاهده، ویرایش و به صورت نوشتاری در آمدند، سپس توالی مربوط به آغازگر، از ابتدای توالی‌ها حذف شد. به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده با نرم‌افزار بلاست (BLAST: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) جستجو انجام گرفت. ردیف‌خوانی توالی‌ها، با نرم افزار MUSCLE انجام شد (۱۰). سپس بهترین فایل‌ها توسط نرم افزار Mesquite V.1.12 (۲۰) بررسی و تصحیح نهایی گردیدند. تحلیل‌های تبارزایشی به دو روش استنباط بیزی و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی انجام شد. نهایتاً درخت‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای FigTree v.1.3.1 (۲۳) و TreeGraph 2 (۳۲) مشاهده و به وسیله نرم افزار Adobe photoshop CS5 جهت ارائه گرافیکی آماده گردیدند.

یافته‌ها

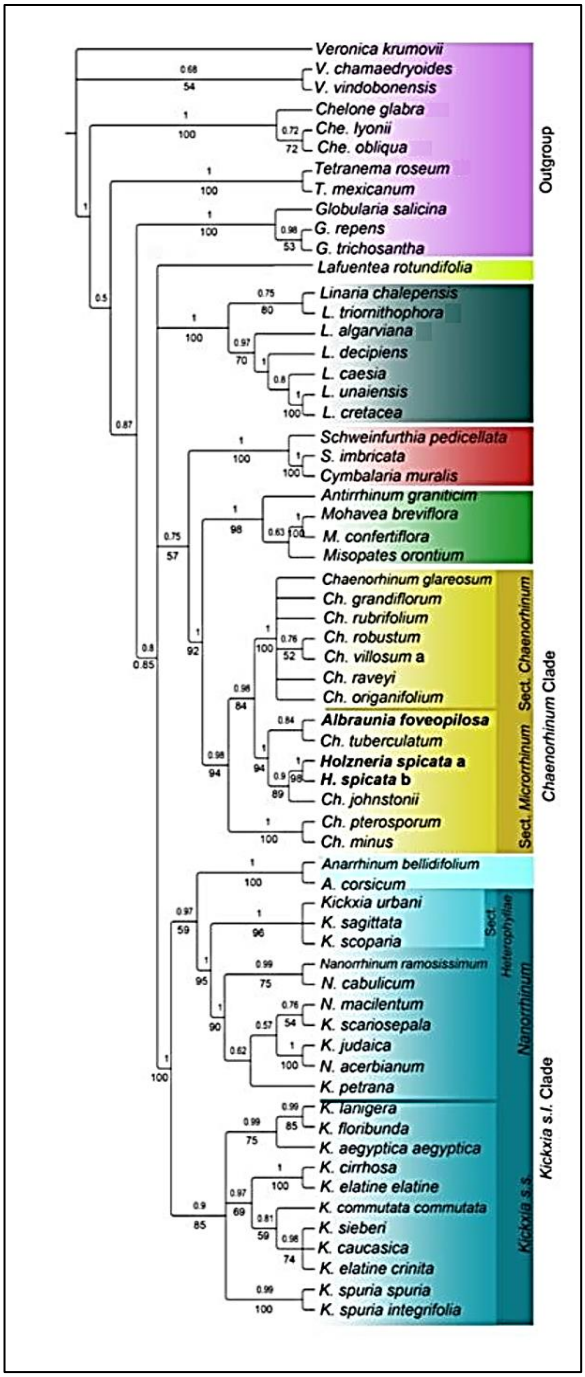
مطالعات تبارزایی مولکولی برروی سرده‌های *Kickxia* و *Chaenorhinum* متمرکز بود. مدل‌های تکاملی انتخاب شده توسط برنامه jModelTest (۲۲) و همچنین نتایج تحلیل

بیشینه صرفه‌جویی شامل تعداد صفات غیر متغیر، تعداد صفات اطلاعاتی، ضریب سازگاری و ضریب گروه‌پذیری در جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

جدول ۴- مدل‌های تکاملی انتخابی برای تحلیل **BI**، اختصاصات توالی‌ها و اطلاعات آماری تحلیل بیشینه صرفه‌جویی بر اساس نشانگر ریبوزومی هسته‌ای **ITS**

	ITS
Number of accessions	**63**
AIC model choice	**R+I+G**
Aligned length (bp)	**852**
Parsimony-informative characters (bp)	**284**
Consistency index	**0.545**
Retention index	**0.829**
Tree length	**1149**

شکل ۱ درخت حاصل از استنباط بیزی را برای نشانگر ریبوزومی هسته‌ای ITS نشان می‌دهد. تحلیل بیشینه صرفه-جویی و استنباط بیزی بر روی مجموعه‌های اطلاعاتی هسته-ای منجر به بازسازی درخت‌هایی شد که تطابق بالایی را نشان می‌دادند و تفاوت‌های جزئی مشاهده شده در آن‌ها از حمایت‌های پایین برخوردار بودند. در واقع با وجود این که درخت حاصل از استنباط بیزی ارائه شده نسبت به درخت حاصل از تحلیل بیشینه صرفه‌جویی وضوح بیشتری داشت، ولی سطح بالایی از سازگاری بین این دو روش تحلیل آشکار بود، به گونه‌ای که شاخه‌های با احتمال پسین (PP) بالا، از ارزش پشتیبانی بالای بوت‌استراپ نیز برخوردار بودند. بنابراین برای جلوگیری از تکرار مطالب، نتایج حاصل فقط بر روی درخت حاصل از استنباط بیزی به تفصیل بررسی می-شود. گروه‌های اصلی که در مورد آن‌ها بحث خواهد شد شاخه‌های *Kickxia* s.l. و *Chaenorhinum* هستند که بر روی درخت حاصل از تحلیل بیزی قابل ردیابی هستند. نتایج حاصل از تحلیل نشانگر ITS نشان داد که طایفه Antirrhineae یک گروه تک‌تبار در تیره بارهنگیان با *Lafuentea* به عنوان گروه خواهری (BS=85, PP=0.80) است. شاخه *Kickxia* s.l. یک گروه تک‌تبار در طایفه Antirrhineae (BS=100, PP=1.00) است. درون این شاخه دو گروه با حمایت شاخه‌ای بالا قابل تشخیص هستند. گروه اول شامل *Anarrhinum* همراه با *Nanorrhinum* (مطابق با بخشه *Kickxia* *Valvatae*) (BS=59, PP=0.97) و گروه دوم شامل *Kickxia* s.s. (مطابق با بخشه *Kickxia* *Kickxia*) (BS=85, PP=0.90) است. شاخه *Chaenorhinum* یک گروه تک‌تبار در طایفه Antirrhineae با *Antirrhinum* به عنوان گروه خواهری ((BS=94, PP=0.98) است. درون این شاخه دو گروه با حمایت شاخه‌ای بالا قابل تشخیص هستند. گروه اول شامل *Chaenorhinum* بخشه *Chaenorhinum* (BS=100, PP=1.00) و گروه دوم شامل *Chaenorhinum* بخشه *Microrrhinum* است. این گروه خود شامل دو گروه غیرخواهری است. گروه بزرگتر که خود شامل سرده‌های *Albraunia* و *Holzneria* نیز می‌شود (BS=94, PP=1.00) و گروه کوچکتر که شامل دو گونه *Ch. Pterosporum* و *Ch. minus* (BS=100, PP=1.00) است.



شکل ۱- درخت تبارزایی حاصل از استنباط بیزی داده‌های ITS طایفه Antirrhineae.

اعداد پایین شاخه‌ها نشان‌دهنده بوت‌استراپ در تحلیل بیشینه صرفه‌جویی و اعداد بالای شاخه‌ها نشان‌دهنده احتمال پسین (PP) در استنباط بیزی است که بر روی شاخه‌های مربوطه نشان داده شده‌اند. سرده‌های شامل شده مهمترین هدف این مطالعه تعیین روابط بین‌سرده‌ای و درون‌سرده‌ای در *Chaenorhinum* و *Kickxia* با استفاده از در سرده Chaenorhinum به صورت ضخیم نشان داده شده‌اند.

بحث

تبارزایی مولکولی بود. نتایج حاصل، نظام رده‌بندی موجود در این سرده‌ها را زیر سؤال برده و ضرورت بازنگری در آن‌ها را جهت تطابق با درخت‌های تبارزایی و ارائه نظامی طبیعی و تکاملی نشان داد.

نمونه‌برداری ما از ۱۳ سرده از طایفه Antirrhineae (*Nanorrhinum*، *Linaria*، *Albraunia*، *Antirrhinum*، *Schweinfurthia*، *Anarrhinum*، *Lafuentea*، *Holzneria*، *Kickxia*، *Cymbalaria*، *Mohavea*، *Misopates* و *Chaenorhinum*) و تحلیل بر اساس توالی DNA هسته‌ای (ITS) یک فرضیه تبارزایی را برای طایفه Antirrhineae و به خصوص سرده‌های *Kickxia* و *Chaenorhinum* فراهم کرد (شکل ۱). بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه طایفه Antirrhineae یک گروه تک‌تبار در تیره Plantaginaceae با *Lafuentea* به عنوان گروه خواهری است. این نتیجه با یافته‌های مطالعات تبارزایی پیشین بر روی تیره *Plantaginaceae* (۹ و ۱۴) همخوانی دارد. افزایش تعداد گونه‌های نمونه‌برداری شده در این مطالعه، نسبت به مطالعات قبلی، حمایت بالایی را برای تک‌تبار بودن هر یک از سرده‌های *Chaenorhinum* و *Kickxia* فراهم کرده. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط Vargas و همکارانش (۳۶) بر اساس توالی‌های ITS و *ndh*F دو گونه از *Kickxia* و دو گونه از *Chaenorhinum*، Ghebrehiwet و همکارانش (۱۴) بر اساس توالی *ndh*F دو گونه از *Kickxia* و یک گونه از *Chaenorhinum*، Fernández-Mazuecos و همکارانش (۱۲) بر اساس توالی ITS دو گونه از *Kickxia* و دو گونه از *Chaenorhinum* و Guzmán و همکارانش (۱۶) بر اساس توالی‌های ITS و *ndh*F چهار گونه از *Kickxia* و ۱۵ گونه از *Chaenorhinum* همخوانی دارد.

شاخه *Kickxia* s.l. یک گروه تک‌تبار در طایفه Antirrhineae است. درون این شاخه دو گروه با حمایت شاخه‌ای بالا قابل تشخیص هستند. گروه اول شامل *Anarrhinum* همراه با *Nanorrhinum* (مطابق با بخشه *Valvatae*) و گروه دوم شامل *Kickxia* s.s. (مطابق با بخشه *Kickxia*) است. در رابطه با رتبه *Kickxia* اختلاف نظر زیادی بین آرایه‌شناسان وجود دارد و دودمان‌های موجود در این سرده به عنوان بخشه (۳۴ و ۳۷)، زیرسرده (۲۸)، یا سرده‌های مجزا (۶، ۱۵ و ۳۹) در نظر گرفته شده‌اند. به طوری که Wettstein (۳۷) نام‌های *Operculatae* و *Valvatae* را درون سرده *Elatinoies* برای این دو گروه پیشنهاد کرد. Smith (۲۸) بخشه‌های Wettstein را به عنوان زیرسرده در نظر گرفت، اما این ترکیبات هرگز به صورت معتبر چاپ نشد. این تصمیم او بر اساس اختلافات پوشینه و ریخت‌شناسی گل بود. Betsche (۶) بخشه *Kickxia* را به عنوان یک سرده و بخشه *Valvatae* را به عنوان دو سرده *Pogonorrhinum* و *Nanorrhinum* در نظر گرفت. اما این آرایه‌شناسی توسط Sutton (۳۴) رد شد. Sutton (۳۴) سرده *Kickxia* را به عنوان یک سرده با دو بخشه *Kickxia* و *Valvatae* معرفی کرد. همچنین Ghebrehiwet (۱۵) با تحلیل تبارزایشی سرده *Kickxia* با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی تشخیص داد که دو گروه از گونه‌ها درون این سرده، دو شاخه مجزا را بوجود می‌آورند که یکی از این شاخه‌ها با بخشه *Kickxia* و دیگری با بخشه *Valvatae* مطابقت دارد. Ghebrehiwet (۱۵) بیان کرد که اختلاف بین این دو بخشه به اندازه اختلاف سایر سرده‌های نزدیک خویشاوند درون طایفه Antirrhineae با یکدیگر است. بنابراین پیشنهاد کرد که بخشه *Valvatae* باید به عنوان سرده مستقل *Nanorrhinum* در نظر گرفته شود. اختلاف ریخت‌شناسی اصلی که *Kickxia* و *Nanorrhinum* را از هم جدا می‌کند نحوه شکوفایی پوشینه است (۱۸). در *Kickxia* شکوفایی به صورت درپوش‌دار و در *Nanorrhinum* به صورت حجره‌دار است. به علاوه در *Nanorrhinum* بساک‌ها بدون کرک و دانه‌ها منحنی، در رأس زگیل‌دار و پوشیده شده از غدد کوچک ستونی هستند. همچنین مراکز پراکندگی دو سرده با هم متفاوت است به طوری که *Nanorrhinum* در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا-آفریقا پراکنش دارد و محدوده‌های غربی آن به ایران می‌رسد در حالی که *Kickxia* الگوی پراکنش مدیترانه‌ای دارد. به علاوه *Anarrhinum* به عنوان یک سرده درون شاخه *Kichxia* s.l. قرار گرفته و گروه خواهری *Nanorrhinum* است.

بنابراین تحلیل تبارزایشی ما شواهد بیشتری را برای تشخیص *Anarrhinum*، *Nanorrhinum* و *Kickxia* به عنوان سرده‌های مجزا فراهم کرده‌است. در گروه *Nanorrhinum*، گونه‌های *K. scoparia*، *K. urbani*، *K.sagittata* و یک گروه مجزا را تشکیل می‌دهند. این سه گونه همراه با گونه *N. heterophyllum* (که در تحلیل ما وجود ندارد) قبلاً توسط Smith (۲۸) به عنوان بخشه *Heterophyllae* معرفی شده بودند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشترک این گروه، شامل لوله جام‌گل نسبتاً کوتاه، پوشینه تخم‌مرغی با حجره‌های برابر و دانه‌های بزرگ؛ تک‌تبار بودن آن را حمایت می‌کند.

شاخه *Chaenorhinum* یک گروه تک‌تبار در طایفه Antirrhineae با *Antirrhinum* به عنوان گروه خواهری است. این شاخه شامل سه شاخه *Chaenorhinum* بخشه *Chaenorhinum* (تک‌تبار با حمایت بالا)، *Chaenorhinum* بخشه *Microrrhinum* (شامل دو گروه غیرخواهری که گروه بزرگتر *Albraunia* و *Holzneria* را نیز در بر می‌گیرد) و همچنین *Chaenorhinum* بخشه *Huebelia* (=سرده *Huebelia*) است. متأسفانه از نمایندگان *Chaenorhinum* بخشه *Huebelia* برای ما گونه‌ای جهت نمونه‌برداری قابل دسترس نبود. گروه‌های موجود در *Chaenorhinum* به عنوان دو سری سرده *Linara* (۸)، دو بخشه سرده *Chaenorhinum* (۱۱ و ۳۴)، دو سرده *Chaenorhinum* و *Microrrhimum* (۱۳) یا سرده‌های *Chaenorhinum*، *Albraunia*، *Holzneria* و *Huebelia* (۳۱) در نظر گرفته شده‌اند. در Flora Iranica سرده‌های *Chaenorhinum*، *Albraunia* و *Holzneria* به عنوان سرده-های مجزا پذیرفته شده‌اند اما *Huebelia* با داشتن اختلافات ریخت‌شناسی کمتر با بقیه اعضای *Chaenorhinum* (دانه-هایی با ۱۰ تاج[۴] طولی در مقایسه با پنج تاج طولی در بخشه‌های *Microrrhinum* و *Chaenorhinum*) به عنوان یک بخشه در سرده *Chaenorhinum* در نظر گرفته شده است (۲۱). نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که *Albraumia* و *Holzneria* درون سرده *Chaenorhinum* بخشه *Microrrhinum* قرار دارند و نباید به عنوان سرده‌های مجزا از *Chaenorhinum* در نظر گرفته شوند. از دیدگاه جغرافیای زیستی مرکز پراکنش همه این آرایه‌ها ناحیه رویشی ایران و تورانی است که از فلات آناتولی در غرب آغاز و به فلات ایران- توران در شرق می‌رسد. بنابراین شواهد جغرافیای زیستی نیز جدایی *Albraunia*، *Huebelia* و *Holzneria* از *Chaenorhinum* و تشخیص آن‌ها در سطح سرده را حمایت نمی‌کند. Guzmán و همکارانش (۱۶) بر اساس توالی ITS و *ndh*F نیز دو سرده *Albraumia* و *Holzneria* را درون سرده *Chaenorhinum* قرار داده‌اند. علاوه بر این اختلافات ریخت-شناسی در کرک‌های جام‌گل، ریز ریخت‌شناسی دانه و نحوه شکوفایی پوشینه، که پیش از این برای جداسازی این سرده ها ذکر شده بود، وضعیت حد واسط زیادی را نشان می‌دهند که کاربرد آن‌ها را در آرایه‌شناسی گروه زیر سؤال می‌برد. نتایج ما با قاطعیت شرح ارائه شده توسط Sutton (۳۴) بر روی سرده *Chaenorhinum* به عنوان یک سرده بزرگ (*Chaenorhinum* s.l.)و تقسیم‌بندی گونه‌های آن به سه بخشه را حمایت می‌کند.

نتیجه‌گیری

نتایج تبارزایی مولکولی ارائه شده در این مطالعه نشان داد که *Chaenorhinum* یک سرده تک‌تبار است و به سه گروه، همانند رده‌بندی‌های پیشین، تقسیم می‌شود (یک بخشه تک‌تبار، دیگری شامل دو گروه غیرخواهری و بخشه سوم که نمونه‌برداری نشده‌است). سرده‌های *Holzneria* و *Albraunia* درون سرده *Chaenorhinum* قرار دارند و نباید به عنوان سرده‌های مجزا در نظر گرفته شوند. درون شاخه *Kickxia* s.l. دو گروه قابل تشخیص هستند. گروه اول شامل *Anarrhinum* همراه با *Nanorrhinum* (مطابق با *Kickxia* بخشه *Valvatae*) و گروه دوم شامل *Kickxia* s.s. (مطابق با *Kickxia* بخشه *Kickxia*) است. *Kickxia* s.s. تک‌تبار و گروه خواهری سرده تک‌تبار *Nanorrhinum* است. بنابراین تحلیل تبارزایشی ما شواهد بیشتری را برای تشخیص *Anarrhinum*، *Nanorrhinum* و *Kickxia* به عنوان سرده‌های مجزا فراهم کرده‌است. مطالعه دقیق سازگان‌شناسی مولکولی شامل تعداد زیادی از گونه‌های این سرده‌ها در دنیا در کنار برخی سرده-های نزدیک می‌تواند به بازسازی تبارزایشی این سرده‌ها و در نتیجه ارائه یک نظام رده‌بندی طبیعی درون سرده‌ای دقیق کمک شایان توجهی کند. همچنین افزودن نمونه‌های بیشتر از تمامی مناطق جغرافیایی می‌تواند در حل پیچیدگی‌های درون سرده‌ای در گروه‌های مورد مطالعه راه‌گشا باشد. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه روابط بین گونه‌ای در درخت‌های تکاملی حاصل از داده‌های مولکولی تا حد زیادی حل نشده باقی مانده، که این امر نشان‌دهنده این است که نشانگر مورد استفاده در این پژوهش تنوع ژنتیکی کافی نداشته است. بنابراین بهره‌گیری از تکنیک‌های مولکولی دیگر به همراه افزودن نشانگرهای کلروپلاستی و کارآمد و همچنین استفاده از ژن‌های تک‌نسخه و یا کم‌نسخه هسته‌ای ممکن است تا اندازه‌ای سبب بهبود روابط درون سرده‌ای شود.

[1] Cristae

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسنده اعلام می‌دارد تعارضی در منافع وجود ندارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه بوعلی سینای همدان به دلیل فراهم کردن امکانات اجرای مطالعه قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

۱. سعیدی مهرورز ش، عطار ف، حمدی م م، شریف‌نیا ف، اسدی م. یوسف نعنایی ص، مهرگان ا. فلور ایران، تیره گل میمون (Scrophulariaceae)، شماره: ۶۸. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۱۳۹۸.

2. Abd-ElGawad AM, El-Amier YA, Bonanomi G, Gendy AE-NGE, Elgorban AM, Alamery SF, Elshamy AI. Chemical Composition of *Kickxia aegyptiaca* Essential Oil and Its Potential Antioxidant and Antimicrobial Activities. Plants, 2022; 11: 594-606.
3. Albach DC. Paraphyly of *Veronica* (Veronicaceae; Scrophulariaceae): Evidence from the Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. J Plant Research, 2001; 114: 9-18.
4. Al Masousi LN, Bukhari NA, Whibi M Al, Macro- and Micro-Morphological Characteristics of Kickxia Dunort. and some Related Taxa in Saudi Arabia. Bangladesh J Plant Taxon, 2022; 29: 1-11,
5. Barringer K. Five New Tribes in the Scrophulariaceae. Novon, 1993; 3: 15-17.
6. Betsche I. Taxonomische Untersuchungen an *Kickxia* Dumortier (s.1.). Die Neuen Gattungen Pogonorrhinum n. Gen. und *Nanorrhinum* n. Gen. Cour Forsch Inst, 1984; 71: 125-142.
7. Boissier E. Flora Orientalis. AH Georg, Geneva, 1879; 4.
8. Chavannes E. Monographie des Antirrhinees. Paris, Lausanne, 1833.
9. de Pamphilis CW, Atkinson TN, Elisens WJ. Tribal Relationships in the Scrophulariaceae Subfamily Antirrhinoideae: Insights from Sequence Variation of the Plastid- Encoded Gene *rps2*. Am J Bot Suppl, 1994; 81: 152 [Abstract].
10. Edgar RC. MUSCLE: Multiple Sequence Aalignment with High Accuracy and High throughput. Nucleic Acids Res, 2004; 32: 1792-1797.
11. Endlicher S. Genera Plantarum Secundum Ordines Naturales Disposita. Apud Fr. Beck Universitatis Bibliopolam, Wien, 1839.
12. Fernández-Mazuecos M, Blanco- Pastor JL, Vargas P. A Phylogeny of Toadflaxes (*Linaria* Mill.) based on Nuclear Internal Transcribed Spacer Sequences: Systematic and Evolutionary Consequences. Int J Plant Sci, 2013b; 174 (2): 234-249.
13. Fourreau PJ. Catalogue des Plantes qui Croissant Spontanement le Long du Cours de Rhone. Ann Soc Linn Lyon, 1869; 17: 89-200.
14. Ghebrehiwet M, Bremer B, Thulin M. Phylogeny of the Tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae) based on Morphological and *ndh*F Sequence Data. Plant Syst Evol, 2000; 220: 223-239.
15. Ghebrehiwet M. Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of *Kickxia* and *Nanorrhinum* (Scrophulariaceae). Nord J Bot, 2001; 20: 655-690.
16. Guzmán B, Gomez JM, Vargas P. Bees and Evolution of Occluded Corollas in Snapdragons and Relatives (Antirrhineae). Plant Ecol Evol Syst, 2015; 17: 467-475.
17. Hall TA. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser, 1999; 41: 95-98.

18. Jagel A, Unterladstetter V. *Kickxia elatine* und *K. spuria* – Spießblättriges und Eiblättriges Tännelkraut (Plantaginaceae) in Nordrhein-Westfalen. Jahrb Bochumer Bot Ver, 2018; 9: 243-251.

19. Kooiman P. The Occurrence of Iridoid Glycosides in the Scrophulariaceae. Acta Bot Neerl, 1970; 19: 329-340.

20. Maddison DR, Maddison WP. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. http://mesqiteproject.org/mesquite/ mesquite, html, 2006.

21. Podlech D, Iranshar M. Scrophulariaceae III, Tribe Antirrhineae in KH Rechinger, ed. Flora Iranica, Vienna, 2015; 179.

22. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molec Biol Evol, 2008; 25: 1253-1256.

23. Rambaut A. FigTree V1. 3.1: Tree Figure Drawing Tool. http://tree. bio. ed. ac. uk/software/figtree, 2009.

24. Rocio J, Inmaculada F, Pastor J. Morphological and Anatomical Studies of *Linaria* Species from South-West Spain: Fruits. Ann Bot, 1999; 84: 21-31.

25. Rothmaler W. Zur Gliederung der Antirrhineae. Feddes Repert Spec Nov Regni Veg, 1943; 52: 16-39.

26. Rothmaler W. Notes on Western Antirrhineae. Leafl Bot, 1954; 7: 113-117.

27. Rouy MG. Conspectus des Tribus et des Genres de la Famille des Scrofulariacees. Rev Gen Bot, 1909; 21: 194-207.

28. Smith VA. A Revision of the Genus *Kickxia* with Particular Reference to the Section *Heterophyllae* in the Canary Islands. M.Sc. Thesis, University of Reading, Reading, 1973.

29. Speta F. Proteinkorper in Zellkernen: Neue Ergebnisse und deren Bedeutung fur die Gefasspflanzensystematik Nebst einer Kiteraturuberischt fur die Jahre 1966-1976. Candollea, 1977; 32: 133-63.

30. Speta F. Die Ggattungen *Chaenorhinum* (DC.) Reichenb. und *Microrrhinum* (Endl.) Fourr. im ostlichen Teil ihrer Areale (Balkan bis Indien). Stapfia, 1980; 7: 1-72.

31. Speta F. Drei neue Antirrhineen-Gattungen aus dem Orient: *Holzneria*, *Huebelia* und *Albraunia* (Scrophulariaceae). Bot Jahrb Syst, 1982; 103 (1): 9-45.

32. Stöver BC, Müller KF. TreeGraph 2: Combining and Visualizing Evidence from Different Phylogenetic Analyses. BMC bioinformatics, 2010; 11: 7-15.

33. Sutton DA. Peloric Flowers in the Tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae). Watsonia, 1987; 16: 337-338.

34. Sutton DA. A Revision of the Tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae). Oxford, Oxford University Press, 1988.

35. Vargas P, Baldwin BG, Constance L. Nuclear Ribosomal DNA Evidence for a Western North American Origin of Hawaiian and South American Species of *Sanicula* (Apiaceae). Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1998; 95: 235-240.

36. Vargas P, Rossello JA, Oyama R, Guemes J. Molecular Evidence for Naturalness of Genera in the Tribe Antirrhineae (Scrophulariaceae) and Three Independent Evolutionary Lineages from the New World and the Old. Plant Syst Evol, 2004; 249: 151-172.

37. Wettstein R. Scrophulariaceae in A Engler, K Prantl, eds. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Wilhelm Engelmann, 1891.

38. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics in M Innis, D Gelfand, J Sninsky, T White, eds. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990.

39. Yusef Naanaie S, Tavassoli A. Taxonomy of the Jenus *Nanorrhinum* (Scrophulariaceae) in Iran. Iran J Bot, 2010; 16 (1): 114-124.

40. Yousefi N, Heubl G, Zarre Sh. Subgeneric Classification of *Linaria* (Plantaginaceae; Antirrhineae): Molecular Phylogeny and Morphology Revisited. Prog Biol Sci, 2017; 7 (1): 53-65