مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2019.127263.1352

جلد ۲۸، شماره ۲، صفحه ۱۹۰-۱۷۳ (۱۳۹۹) شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1399.28.173.56.2.1605.75

مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف مرزه (*Satureja* spp.) بر اساس ناحیه هسته‌ای ITS و ژن کلروپلاستی matK

فرید نورمند مؤید[۱]، محمدرضا بی‌همتا[۲*]، سیدرضا طبائی عقدائی[۳] و محمدرضا نقوی[۴]

۱- دانش آموخته دکترای اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

پست‌الکترونیک: pomato1960@gmail.com

۳- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

۴- استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۳

چکیده

مطالعه فیلوژنی مرزه (*Satureja* spp.) با نام معمول Savory، با داشتن گونه‌های مختلف و ترکیبات با ارزشی همانند تیمول و کارواکرول، اهمیت خاصی در گیاهان دارویی دارد. در این پژوهش، ۲۱ اکسشن مرزه در قالب نه گونه از رویشگاه اصلی در هشت استان ایران شامل آذربایجان‌شرقی، کردستان، گیلان، خراسان شمالی، یزد، لرستان، ایلام و کرمانشاه شناسایی و جمع‌آوری شدند. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB تغییریافته انجام شد. در بررسی فیلوژنی، علاوه بر نه گونه جمع‌آوری شده از جنس *Satureja*، توالی ژن‌های ITS و *matK* گونه‌هایی که در NCBI ثبت شده‌اند نیز به‌عنوان درون گروه به درخت فیلوژنی اضافه شد. علاوه بر جنس *Satureja*، توالی جنس‌های *Thymus*، *Ziziphora* و *Clinopodium* نیز از NCBI به‌عنوان برون گروه برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنی استفاده گردید. نتایج نشان داد که در بررسی روابط خویشاوندی جنس *Satureja* spp.، ژن هسته‌ای ITS نسبت به ژن کلروپلاستی matK مناسب‌تر می‌باشد. در گونه‌های بومی ایران حداکثر فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S. mutica* و *S. atropatana* و حداقل فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S. rechingeri* و *S. khuzistanica* بود. در درخت فیلوژنی، پنج گونه *S. macrantha*، *S. sahendica*، *S. atropatana*، *S. edmondi*، *S. bachtiarica* با ارزش حمایتی ۱۰۰٪، دو گونه *S. mutica*، *S. spicigera* با ارزش حمایتی ۹۶٪ و دو گونه *S. rechingeri*، *S. khuzistanica* با ارزش حمایتی ۱۰۰٪ خویشاوند نزدیک بودند. نتایج حاصل همخوانی قابل توجهی با فلور ایران و فلور ایرانیکا از لحاظ صفات مورفولوژیکی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، ناحیه هسته‌ای ITS، مرزه، فاصله ژنتیکی، ژن کلروپلاستی *matK*

مقدمه

جنس *Satureja* حدود ۳۰ گونه دارد که با نام معمول Savory و نام فارسی مرزه شناخته شده‌اند. این جنس از خانواده نعناع (*Lamiaceae*) متعلق به زیرخانواده *Nepetoideae*، قبیله *Mentheae* و مبدأ پیدایش آن دوران سوم زمین‌شناسی می‌باشد (Jamzad, 2009-b). از نظر فیلوژنتیکی به جنس های *Micromeria*، *Clinopodium*، *Acinos*، *Calamintha* و *Gontscharovia* نزدیک است

(Doroszenko, 1985). این جنس بومی مدیترانه شـــرقی و جنوب‌غرب آسیا است و اولین بار در ایتالیا کشت داده شده اســت. رویشــگاه طبیعی آن در دنیا جنوب اروپا می‌باشــد (Abbasi et al., 2005). جنس *Satureja* در ایران ۱۶ گونه گیاهی یکســاله و چند ســاله دارد که نه گونه آن انحصــاری ایران هســتند (Jamzad, 2009-b و Rechinger, 1982). رشــینگر در ســال ۱۹۸۲، ۱۱ گونه را از ایران گزارش کرد. پس از آن تعداد کمی از گونه‌های دیگر از این جنس مثل *S. khuzistanica* (Jamzad, 1992)، *S. kallarica* (Jamzad, 1994)، *S. rechingeri* (Jamzad, 1996) و *S. marosiphonia* (Jamzad, 2009-a) برای اولین بار برای فلور ایران ثبت شــده اســت. مرزه با دارا بودن ترکیبات با ارزشی همانند تیمول و کارواکرول از جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی برخوردار می‌باشــد (Zarehzadeh, 2005). گونه‌های مختلف مرزه به دلیل داشــتن ترکیب‌های ثانویه‌ای همانند فلاونویید، اســترویید، ترپنویید و تانن‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی، پیچش و درد شکم، دردهای عضلانی و حــالــت تــهــوع کــاربــرد دارنــد (Bezic et al., 2009). ســرشــاخه‌های گل‌دار دارای بوی معطر، نیرودهنده، تســهیل کننده عمل هضم، مقوی معده و مدر بوده و به‌طور خفیف اثر قابض، ضــد نزله و ضــد کرم دارند (Zargari, 1982). مرزه همچنین برای کاهش چربی خون و درمان دردهای عصبی و رماتیسمی نیز مؤثر واقع می‌شود (Omid baigy, 1997).

تجزیه‌های فیلوژنتیکی نشان می‌دهند که چگونه اعضاء یک خانواده در طی فرایند تکامل از هم اشتقاق پیدا می‌کنند. این روابط به وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش دوباره تعیین می‌شود که در معرض انتخاب طبیعی قرار می‌گیرد. روابط تکاملی بین توالی‌ها با نمودارهایی به نام درخت فیلوژنی نشان داده می‌شوند. با مقایسه و رسم درخت‌های فیلوژنی و تجزیه آنها اطلاعات بیشتری در مورد نحوه تکامل ژن‌ها و پروتئین‌ها و شناسایی جد مشترک به‌دست می‌آید. به‌طوری‌که با دانستن روابط فیلوژنتیکی و اطلاعات رده‌بندی گیاهان می‌توان از آنها در تلاقی‌ها و جداسازی ژن‌های مفید استفاده کرد (Duke et al., 2007).

ژن ITS بخشی از DNA ریبوزومی هسته می‌باشد. درون این بخش، نواحی کد گذار بسیار حفاظت شده (18S nrDNA, 5.8S nrDNA, 26S nrDNA) همراه نواحی غیر کد گذار (ITS, ETS) قرار دارند. نواحی ITS1, ITS2 در بالغ شدن و پردازش ریبوزوم نقش مهمی را ایفا می‌کنند. ناحیه ITS پس از پردازش ریبوزوم (بالغ شدن) ترجمه نمی‌شود، به همین دلیل کمتر تحت فشار عملکردی می‌باشد و سرعت بالای تکاملی آن، این ناحیه را برای بررسی روابط فیلوژنتیکی مناسب کرده است (Alvarez & Wendel, 2003). توالی‌های DNA کلروپلاستی، منبع اولیه داده‌ها برای استنباط تبارشناسی گیاهان می‌باشد که شاید تنها رقیب توالی‌های ITS ریبوزومی هسته‌ای در سال‌های اخیر باشد که در سطح مولکولی برای تحقیقات تکاملی، اطلاعات پایه را فراهم می‌کند. توالی‌های نوکلئوتیدی *matK* , *rbc1* به‌عنوان دو جایگاه ژنی برای آشکار کردن پلی‌مورفیسم بین گونه‌ای یا سطوح بالاتر پذیرفته شده‌اند. ژن *matK* برای تشخیص بسیاری از گونه‌های گیاهی به‌عنوان یک بارکد در مطالعات زیادی استفاده شده است. *matK* به‌عنوان یک مارکر DNA قدرتمند و مؤثر برای تشخیص گونه‌ها به دلایل زیر استفاده می‌شود: تعیین توالی آن با کیفیت بالا، روش‌های آزمایشگاهی و توالی‌یابی آسان و فقدان چند شکلی آللی در مقایسه با ژن‌های هسته‌ای (Hollingsworth et al., 2011).

پراکنش وسیع جغرافیایی و تعدد گونه‌های مرزه و به‌ویژه انحصاری بودن برخی از گونه‌های آن در ایران و خواص دارویی مفید، این گیاه را در اولویت‌های تحقیقاتی گیاهان دارویی قرار داده است. با دانستن روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف مرزه می‌توان از آنها در تلاقی‌ها و جداسازی ژن‌های مفید استفاده کرد.

هدف از این پژوهش، بررسی روابط فیلوژنتیکی و خویشاوندی بین گونه‌های بومی و غیر بومی مرزه (*Satureja* spp.) ایران با تعیین فواصل ژنتیکی بین گونه‌ها با استفاده از ژن‌های هسته‌ای و کلروپلاستی به‌منظور ترسیم راهبرد

برنامه‌های اصلاحی این گیاه دارویی و بهره‌برداری تجاری با بازده اقتصادی است.

مواد و روش

به‌منظور مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف مرزه (Satureja spp.)، رویشگاه اصلی هر یک از گونه‌ها در هشت استان ایران شامل آذربایجان‌شرقی، کردستان، گیلان، خراسان شمالی، یزد، لرستان، ایلام و کرمانشاه شناسایی و درمجموع نه گونه شامل ۲۱ اکسشن جمع‌آوری شد (جدول ۱).

جدول ۱- لیست اکسشن‌های مختلف نه گونه مرزه در هشت استان کشور

گونه	استان	اکسشن	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	کد ITS	کد *Matk*
S. sahendica	آذربایجان‌شرقی	کوه سهند، روستای زینجناب	۳۷° ۵۱' ۴۶/۲"	۴۶° ۱۹' ۷/۱"	AZ(1)	AZ(2)
		کوه سهند، روستای مجارشین	۳۷° ۴۳' ۵۳/۲"	۴۶° ۱۰' ۲/۲"	AZ(3)	AZ(24)
		کوه سهند، روستای عنصرود	۳۷° ۵۰' ۱۲"	۴۶° ۱۵' ۲۸"	AZ(4)	AZ(25)
	کردستان	روستای وزمان	۳۵° ۵۷' ۵۵/۵"	۴۷° ۲' ۴۰/۳"	Kor(5)	Kor(26)
		روستای قره‌بلاغ میان‌کوه	۳۶° ۵' ۳/۷"	۴۷° ۳۰' ۴۵/۸"	Kor(6)	Kor(27)
		کوه کوناتته	۳۵° ۴۸' ۲۱/۲"	۴۷° ۷' ۵۹/۲"	Kor(7)	Kor(28)
S. macrantha	آذربایجان‌شرقی	ارسباران، روستای ابراهیم بیگلو	۳۸° ۵۵' ۳۶/۸"	۴۶° ۴۲' ۵۱/۷"	(17)	(38)
		ارسباران، روستای وینق	۳۹° ۲' ۱۵/۹"	۴۶° ۵۰' ۳۴"	(18)	(39)
		ارسباران، روستای صفرلو	۳۹° ۱۱' ۲۰"	۴۷° ۳' ۵"	(19)	(40)
		ارسباران، قلعه بابک	۳۸° ۵۱' ۴۶/۶"	۴۷° ۱' ۲۴/۲"	(20)	(41)
S. atropatana	آذربایجان‌شرقی	اهر، روستای نهند	۳۸° ۸' ۲۹/۷"	۴۶° ۲۷' ۴۰/۲"	(21)	(42)
		تبریز، روستای اسپیران	۳۸° ۱۴' ۹/۳"	۴۶° ۱۸' ۲۹/۲"	(22)	(43)
S. spicigera	گیلان	کوه گنجه	۳۶° ۵۰' ۵۶/۸"	۴۹° ۲۷' ۴۵/۵"	(8)	(29)
		رودبار	۳۶° ۵۱' ۲۶/۸۳"	۴۹° ۲۶' ۲۱/۴۶"	(9)	(30)
S. mutica	خراسان شمالی	روستای هاور	۳۷° ۲۶' ۲۹"	۵۶° ۴۵' ۲۹"	(10)	(31)
		روستای چخماقلو	۳۷° ۳۰' ۵۴"	۵۶° ۴۵' ۱۲"	(11)	(32)
S. bachtiarica	یزد	دامگاهان مهریز	۳۱° ۳۱' ۲"	۵۴° ۱۸' ۵۶"	(12)	(33)
		کنج کوه مهریز	۳۱° ۳۰' ۵۶"	۵۴° ۲۱' ۴۵"	(13)	(34)
S. khuzistanica	لرستان	پل‌دختر	۳۲° ۵۳' ۱۹/۳"	۴۷° ۵۷' ۳۷/۲"	(15)	(36)
S. rechingeri	ایلام	زرین‌آباد	۳۲° ۵۷' ۳۸/۹"	۴۶° ۵۰' ۳۰/۷"	(16)	(37)
S. edmondi	کرمانشاه	کوه پرآو	۳۴° ۲۱' ۲۸/۲"	۴۷° ۱۵' ۲۳/۹"	(23)	(44)

در رویشگاه‌های اصلی، بذر هر گونه در فصل پاییز در مرحله رسیدن فیزیولوژیکی و نمونه گیاهی کامل به‌منظور

خشک کردن و شناسایی دقیق گونه‌ها در هرباریوم بخش تحقیقات منابع طبیعی آذربایجان‌شرقی تهیه گردید. بذرهای ۲۱ اکسشن از نه گونه مرزه (*Satureja* spp.) بعد از ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ و شستشو با آب‌مقطر استریل، به‌طور جداگانه در پتری‌دیش‌های محتوای کاغذ صافی استریل کشت و با آب‌مقطر استریل خیس شدند. در طول سه هفته بعد از جوانه‌زنی در مرحله سه تا چهار برگی، گیاهچه‌ها برای استخراج DNA آماده شدند. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB تغییریافته (Dodos *et al.*, 2014 , Doosty *et al.*, 2012) انجام شد (جدول ۲).

حدود ۱۰ گیاهچه بدون ریشه متعلق به یک اکسشن، به همراه ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج در هاون چینی کاملاً له شده و به یک میکروتیوپ دو میلی لیتری منتقل گردید. برای تأثیر بهتر بافر، میکروتیوپ‌ها را در بن‌ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده و چند بار سر و ته (invert) شدند. برای از بین بردن کلروفیل، ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴ به یک به هر میکروتیوپ اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع فوقانی (سوپر ناتانت) هر میکروتیوپ به آرامی جدا شده و به میکروتیوپ دیگر منتقل گردید. سپس به هر میکروتیوپ ۸۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۹۶٪ اضافه شد. پس از مشاهده کلاف DNA، میکروتیوپ‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محتوای میکروتیوپ‌ها به آرامی خالی و به حالت وارونه روی کاغذ صافی قرار گرفت تا خشک شوند. در پایان برای نگهداری DNA، ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris EDTA) به هر میکروتیوپ اضافه گردید. برای مشاهده کمیت و کیفیت DNA از الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید استفاده شد.

برای مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف مرزه از آغازگرهای اختصاصی ژن ITS (ژن هسته‌ای) و *mat*K (ژن کلروپلاستی- ناحیه نوکلئوتیدی ۵۲۲-۳۰۲) استفاده گردید (جدول ۳). به‌منظور تکثیر قطعات DNA از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) (جدول ۴ و ۵) و مشاهده محصول PCR از الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵٪ رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید استفاده شد. قطعات تکثیری حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای Forward و Reverse توالی‌یابی شدند.

در بررسی فیلوژنی، علاوه بر نه گونه جمع‌آوری شده از جنس *Satureja*، توالی ژن‌های ITS و *mat*K گونه‌های زیر که در NCBI ثبت شده نیز به‌عنوان درون گروه (in group) به درخت فیلوژنی اضافه شد.

ITS: *S. cuneifolia, S. pallaryi, S. parnassica, S. pilosa, S. subspicata, S. thymbra, S. visianii, S. hortensis, S. montana, S. mutica.mat*K : *S. sahendica, S. intermedia, S. cuneifolia, S. hortensis, S. innota, S. pilosa, S. parnassica, S. montana, S. thymbra, S. mutica, S. pallaryi, S. linearifolia, S. spinosa, S. thymbrifolia, S. spicigera.*

علاوه بر جنس *Satureja* توالی جنس‌های *Thymus, Ziziphora, Clinopodium* نیز از NCBI به‌عنوان برون گروه (out group) برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنی استفاده گردید.

تعیین قرابت گونه‌ها و بررسی رابطه فیلوژنتیکی پس از توالی‌یابی قطعات تکثیری با استفاده از نرم‌افزارهای: Bio Edit، Fast PCR، Chromas، DNAstar، Mafft، Clustal w، Modeltest، Blast، Mega و Paup انجام شد.

جدول ۲- ترکیب بافر استخراج در حجم نهایی یک لیتر با اسیدیته ۸

۴۰ میلی‌لیتر	اسیدیته ۸ – مولاریته ۰/۵	Na_2EDTA
۲۸۰ میلی‌لیتر	اسیدیته ۸ – مولاریته ۱	Tris-Hcl
۴۰ میلی‌لیتر	مولاریته ۵	NaCl
۲۰ گرم	–	CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide)

جدول ۳- توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر

ردیف	آغازگر	منبع	توالی آغازگر
۱	ITS-F	White *et al*., 1990	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
۲	ITS-R	White *et al*., 1990	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
۳	*mat*K-F	Cuenoud *et al*., 2002	ATCTATTCATTCAATATTC CG
۴	*mat*K-R	Cuenoud *et al*., 2002	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT

جدول ۴- ترکیبات به‌کاررفته در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

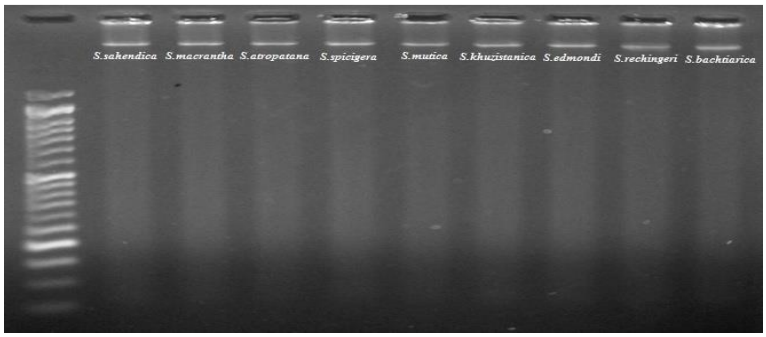
ردیف	نام ماده	غلظت	حجم مورد استفاده (µl)
۱	Master mix	1x	۱۰
۲	DNA	30 ng/µl	۱
۳	آغازگر	100 pm/ µl	۱
۴	آب مقطر دیونیزه	-	۱۳

جدول ۵- برنامه دمایی واکنش‌های PCR برای تکثیر قطعات ITS و *mat*K

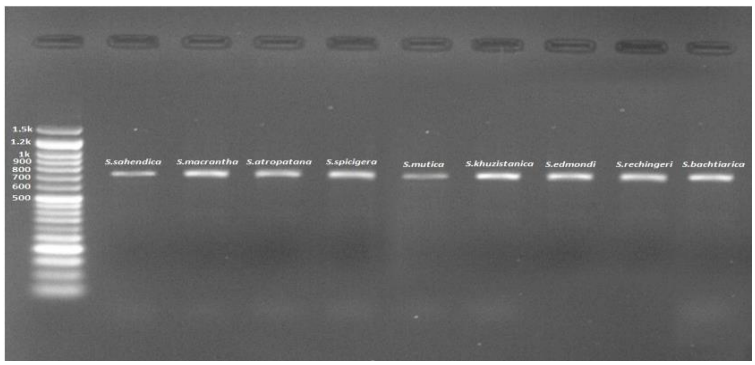
مراحل PCR	ITS			*mat*K		
	دما	زمان	تکرار	دما	زمان	تکرار
واسرشتگی ابتدایی	۹۴°c	۲ دقیقه	–	۹۵°c	۵ دقیقه	–
واسرشتگی ثانویه	۹۴°c	۳۰ ثانیه	۳۵	۹۵°c	۱ دقیقه	۳۵
اتصال آغازگرها	۵۳°c	۳۰ ثانیه	۳۱	۵۸°c	۱ دقیقه	۳۵
طویل شدن	۷۲°c	۱ دقیقه	۳۵	۷۲°c	۱ دقیقه	۳۵
طویل شدن نهایی	۷۲°c	۵ دقیقه	–	۷۲°c	۱۰ دقیقه	–

نتایج و بحث

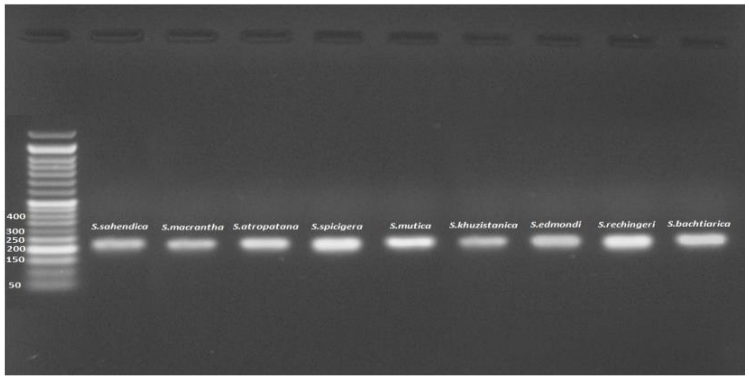
نتایج حاصل از استخراج DNA ژنومی گونه‌های مختلف مرزه به روش CTAB در ژل آگارز ۰/۸ درصد (شکل ۱) و محصولات PCR بر اساس ژن هسته‌ای ITS (شکل ۲) و ژن کلروپلاستی *mat*K (شکل ۳) در ژل آگارز ۱/۵ درصد بدست آمد.



شکل ۱- باندهای DNA ژنومی نه گونه مرزه



شکل ۲- محصولات PCR ناحیه ITS نه گونه مرزه (ناحیه 750 bp)



شکل ۳- محصولات PCR ناحیه *mat*k نه گونه مرزه (ناحیه 220 bp)

نتایج حاصل از تعیین توالی محصولات PCR گونه‌های مختلف مرزه، به‌صورت کروماتوگرام دریافت و شامل محتوای نوکلئوتیدی، نواحی تغییریافته (informative regions)، نواحی حفاظت‌شده (conserved regions) و فواصل ژنتیکی بودند. طول توالی قطعات ITS و *mat*K بدست‌آمده برای تمامی نمونه‌ها به‌طور میانگین به‌ترتیب ۶۶۸/۴ و ۲۱۷/۱ جفت باز بود. تمامی توالی‌های بدست‌آمده هم‌ردیف‌سازی و مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

در درخت فیلوژنی جنس *Satureja* spp. بر اساس ژن هسته‌ای ITS به روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) (شکل ۴)، در بین نه گونه جمع‌آوری شده بومی ایران حداکثر فاصله ژنتیکی بین گونه های *S. mutica* و *S. atropatana* و حداقل فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S. rechingeri* و *S. khuzistanica* بود. در این درخت فیلوژنی، مونوفایلتیک

بودن خوشه متشکل از پنج گونه مرزه بومی ایران *S. macrantha*، *S. atropatana*، *S. sahendica*، *S. edmondi* و *S. bachtiarica* با پشتیبانی بوت استرپ ۹۶٪ ملاحظه می‌شود. چهار اکسشن گونه *S. macrantha* از مناطق ابراهیم بیگلو، وینق، صفرلو و قلعه با یک ارسباران خوشه‌ای با ارزش حمایت ۶۱٪ تشکیل داده‌اند. این خوشه که اختصاصی گونه *S. macrantha* است، جد مشترک با گونه *S. atropatana* منطقه اهر- نهند با ارزش حمایت ۶۵٪ دارد. این رابطه مشترک، با نزدیک بودن دو منطقه اهر و ارسباران از لحاظ جغرافیایی قابل توجیه است. دو گونه *S. atropatana* از منطقه اسپیران- تبریز و *S. edmondi* از کوه پرآو کرمانشاه خوشه‌ای با ارزش حمایت ۹۱٪ تشکیل داده‌اند. قرابت نزدیک این دو گونه در فلور ایرانیکا (جدول ۷) بر اساس صفات مورفولوژی قابل توجیه است، به‌طوری‌که این دو گونه از لحاظ صفات خشبی بودن با ارتفاع کمتر از ۳۰ سانتی‌متر و طول برگ کوچک‌تر در یک کلاس قرار گرفته‌اند. خوشه مربوط به دو گونه *S. atropatana* از منطقه اسپیران- تبریز و *S. edmondi* از سویی خویشاوندی نزدیک با خوشه اخیر متشکل از دو گونه *S. atropatana* ، *S. macrantha* منطقه اهر- نهند با ارزش حمایت ۸۱٪ دارند. از سوی دیگر خویشاوندی نزدیک سه گونه *S. macrantha*، *S. atropatana* و *S. edmondi* در فلور ایرانیکا (جدول ۷) نیز با قرار گرفتن در یک کلاس بر اساس مشترک بودن در صفت پهنای برگ بیشتر از دو میلی‌متر و تخت بودن برگ قابل توجیه است. سه اکسشن گونه *S. sahendica* از مناطق زینجناب و مجارشین آذربایجان‌شرقی و کوه کوناتته کردستان خوشه‌ای با ارزش حمایت ۶۶٪ تشکیل داده‌اند. اکسشن‌های این خوشه با سه اکسشن دیگر گونه *S. sahendica* (مناطق عنصرود آذربایجان شرقی، وزمان و قره‌بلاغ میان‌کوه کردستان) به همراه گونه *S. bachtiarica* خوشه‌ای با ارزش حمایت ۶۱٪ تشکیل داده‌اند. البته خویشاوندی نزدیک اکسشن‌های مختلف گونه *S. sahendica* دور از انتظار نیست. دو اکسشن گونه *S. bachtiarica* (دامگاهان مهریز و کنج کوه مهریز) از استان یزد برحسب منطقه جغرافیایی در یک خوشه قرار گرفته‌اند. خویشاوندی نزدیک گونه *S. bachtiarica* با گونه *S. sahendica* در فلور ایران (جدول ۶) بر اساس صفات مورفولوژی قابل توجیه است، به‌طوری‌که این دو گونه از لحاظ صفت برگ‌ها تماما ناودانی، خطی و مستطیلی در یک کلاس قرار گرفته‌اند. دو گونه *S. khuzistanica* و *S. rechingeri* در خوشه‌ای مستقل با ارزش حمایتی ۱۰۰٪ قرار گرفته‌اند و خویشاوند خیلی نزدیک هم هستند. در بین کلیه گونه‌های مورد مطالعه، فاصله ژنتیکی فقط بین این دو گونه در حد صفر بود. رویشگاه اصلی این دو گونه، دو استان همجوار لرستان و ایلام و از لحاظ جغرافیایی نزدیک هم بوده، از لحاظ ترکیبات اسانس یکسان و در هر دو درصد کارواکرول ۹۵-۹۳ و درصد تیمول ۰/۱۵ -۰/۱ است. در فلور ایران (جدول ۶) نیز از لحاظ صفات برگ‌ها واژ نیزه‌ای، قاشقی تخم‌مرغی، واژ تخم‌مرغی و کم و بیش دایره‌ای در یک کلاس قرار گرفته‌اند. در این فلور، فقط از لحاظ اینکه در *S. khuzistanica* گیاه سبز، سبز مایل به خاکستری، گل بنفش و در *S. rechingeri* گیاه نقره‌ای خاکستری و گل زرد کم رنگ است، در دو گونه متفاوت نام‌گذاری شده‌اند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات مولکولی و سایر خصوصیات گیاه‌شناسی احتمالا *S. khuzistanica* و *S. rechingeri* دو اکسشن متفاوت از یک گونه باشند.

در این درخت فیلوژنی، مونوفایلتیک بودن خوشه متشکل از دو گونه مرزه بومی ایران (*S. mutica* و *S. spicigera*) نیز با پشتیبانی بوت استرپ ۸۸٪ ملاحظه می‌شود. دو اکسشن گونه *S. mutica* از مناطق هاور و چخماقلو خراسان شمالی در خوشه‌ای با ارزش حمایتی ۱۰۰٪ قرار گرفته‌اند و خویشاوند نزدیک با گونه *S. mutica* مستخرج از NCBI با ارزش حمایتی ۸۴٪ می‌باشند. دو اکسشن گونه *S. spicigera* از مناطق کوه گنجه و رودبار گیلان خویشاوند نزدیک هم بوده و با خوشه اختصاصی گونه *S. mutica* جد مشترک با ارزش

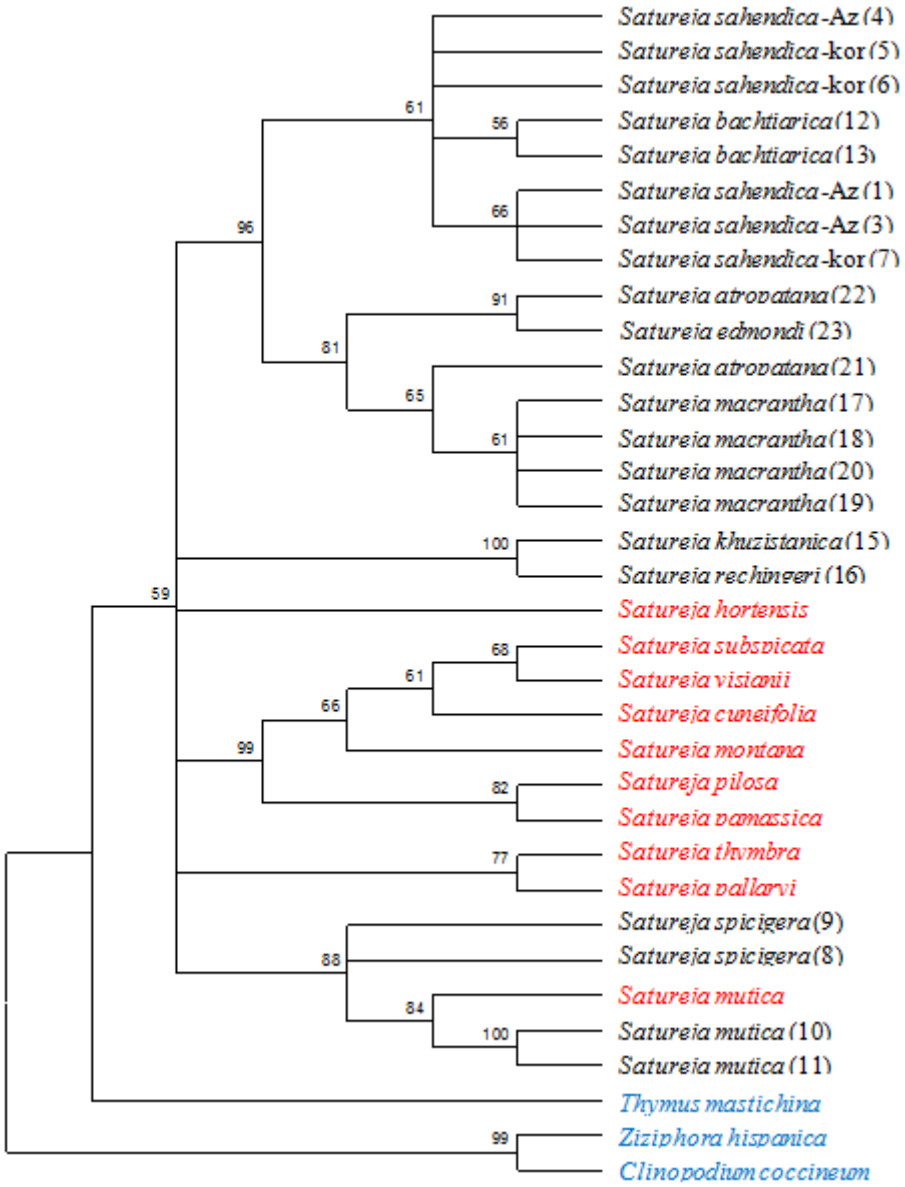
حمایتی ۸۸٪ دارند. خویشاوندی نزدیک دو گونه *S. spicigera* و *S. mutica* در هر دو فلور ایرانیکا و فلور ایران قابل توجیه است. در فلور ایرانیکا (جدول ۷) این دو گونه از لحاظ صفت محصور بودن لوله جام گل در داخل کاسه گل و در فلور ایران (جدول ۶) از لحاظ صفت برگ‌ها خطی، مستطیلی و سرنیزه‌ای در یک خوشه قرار گرفته‌اند.

گونه‌های مستخرج از NCBI در خوشه‌های مستقل و با فاصله‌های ژنتیکی زیاد نسبت به گونه‌های بومی ایران قرار گرفته‌اند. به‌طوری‌که یک خوشه مونوفایلتیک از گونه های *S. montana*، *S. visianii*، *S. subspicata*، *S. pilosa*، *S. parnassica* و *S. cuneifolia* با پشتیبانی بوت استرپ ۹۹٪ ملاحظه می‌شود. گونه *S. hortensis* به‌تنهایی و مستقل از سایر گونه‌ها قرار دارد و دو گونه *S. pallaryi* ,*S. thymbra* در خوشه‌ای مستقل با ارزش حمایتی ۷۷٪ قرار گرفته‌اند.

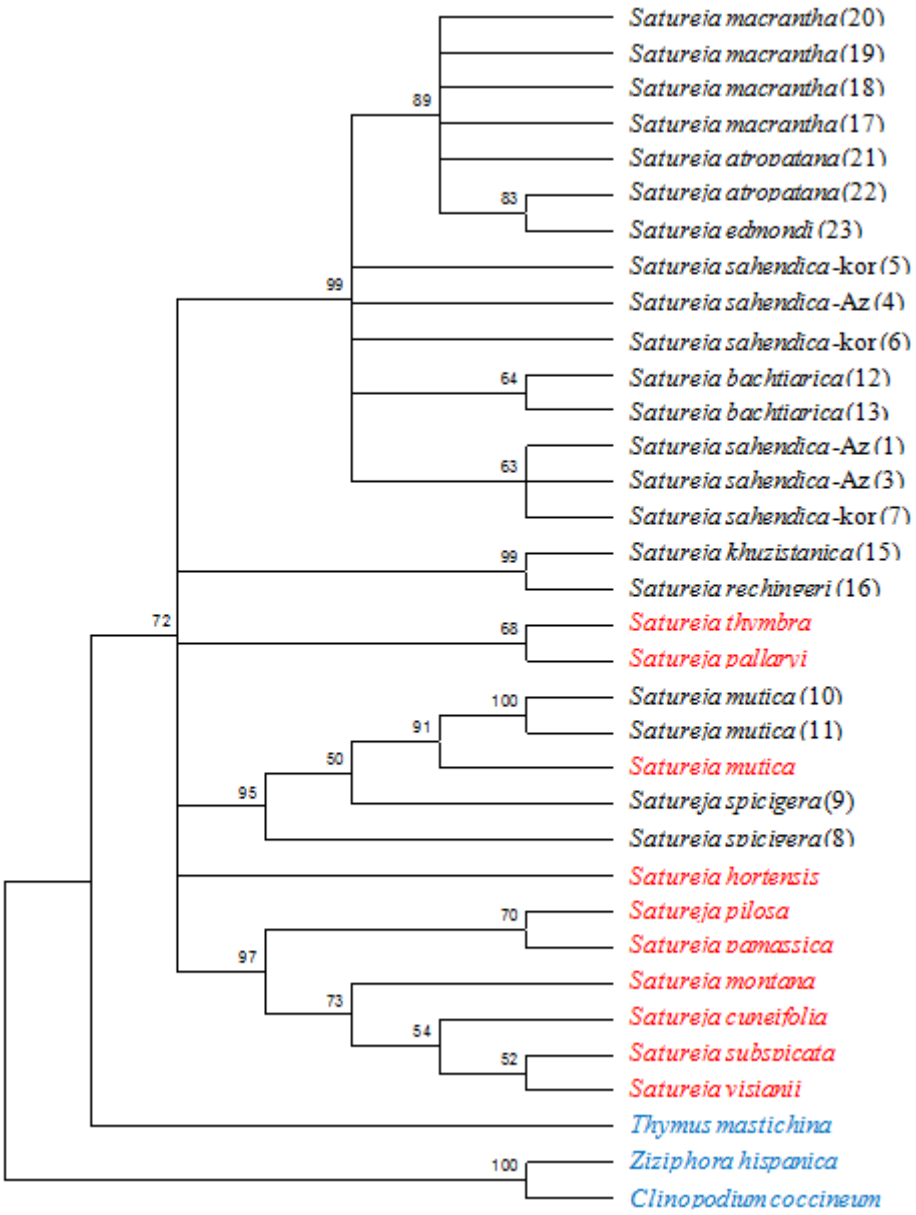
گونه‌های جنس *Satureja* spp. در یک خوشه بزرگ با ارزش حمایتی ۵۹٪ و مستقل از سایر جنس‌های خویشاوند به‌عنوان برون گروه (out group) شامل: *Thymus, Ziziphora, Clinopodium* مستخرج از NCBI هستند.

درخت فیلوژنی بر اساس ژن ITS به روش های نزدیک‌ترین هم سایه (Neighbor-joining) (شکل ۵) و حداقل تفاوت‌ها (Maximum Parsimony) (شکل ۶) رسم شد. نتایج حاصل از رسم سه درخت فیلوژنی تقریبا مشابه هم بودند، فقط مقادیر ارزش حمایتی آنها با هم تفاوت داشت.

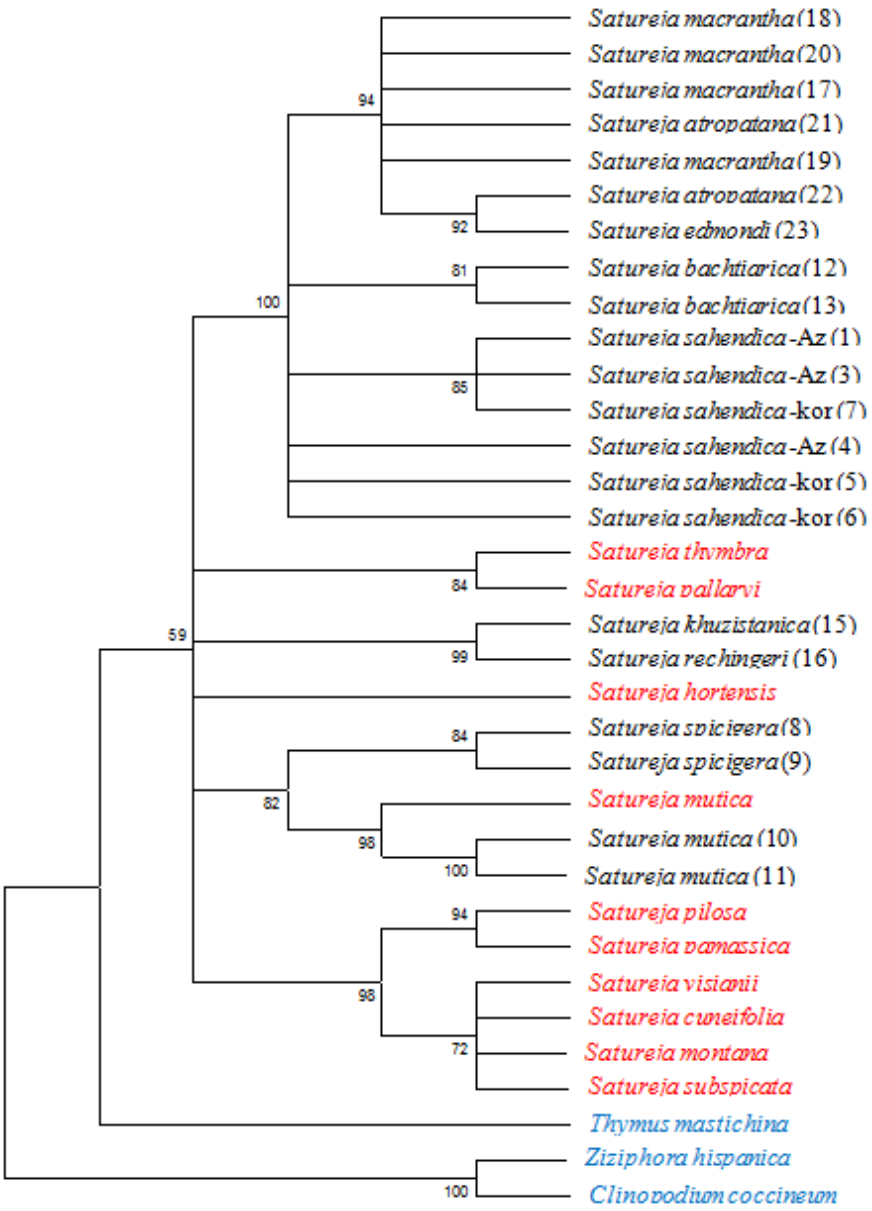
به‌طورکلی ژن هسته‌ای ITS در تفکیک گونه های مختلف جنس *Satureja* و بررسی روابط خویشاوندی ژن مناسبی می‌باشد و به‌دلیل استخراج نتایج قابل توجیه، برای مطالعه روابط فیلوژنی این جنس توصیه می‌شود.



شکل ۴- درخت فیلوژنی جنس ***Satureja*** بر اساس ژن **ITS** به روش **Maximum Likelihood**



شکل ۵– درخت فیلوژنی جنس ***Satureja*** بر اساس ژن **ITS** به روش **Neighbor-joining**



شکل ۶- درخت فیلوژنی جنس *Satureja* بر اساس ژن ITS به روش Maximum Parsimony

جدول ۶- صفات مورفولوژی مشترک بین گونه‌های مختلف جنس *Satureja* spp. بر اساس فلور ایران (Ghahraman, 1999)

S. sahendica *S. bachtiarica*	برگ‌ها به‌طور کامل ناودانی، خطی، مستطیلی	برگ‌ها خطی، مستطیلی و سرنیزه‌ای
S. spicigera	ساقه با کرک‌های پراکنده در دو سطح، گل‌آذین متراکم، یک‌طرفه، چرخه گل‌ها با ۳ تا ۴ گل، پرچم‌ها بلند و از گل بیرون آمده	
S. mutica *S. atropatana* *S. macrantha*	ساقه پوشیده از کرک‌های زبر کوتاه در تمام سطح، گل‌آذین و پرچم متفاوت	
S. rechingeri	گیاه نقره‌ای خاکستری، گل زرد کم‌رنگ	برگ‌ها واژ نیزه‌ای، قاشقی تخم‌مرغی، واژ تخم‌مرغی، کم و بیش دایره‌ای
S. khuzistanica *S. edmondi*	گیاه سبز، سبز مایل به خاکستری، گل بنفش	

جدول ۷- صفات مورفولوژی مشترک بین گونه‌های مختلف جنس *Satureja* spp. بر اساس فلور ایرانیکا (Rechinger, 1982)

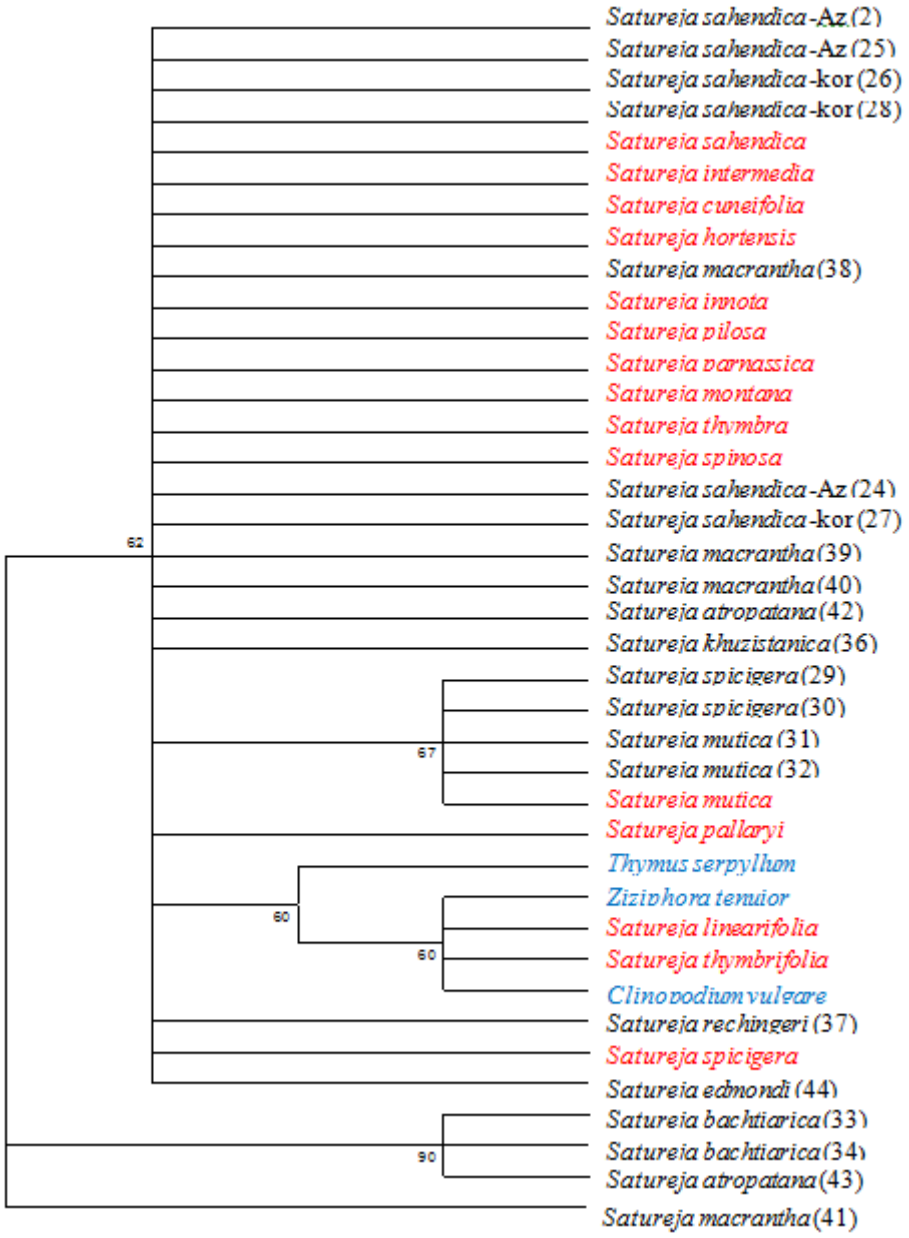
S. bachtiarica	طول کاسه گل کوچک‌تر به طول کم و بیش یک و نیم میلی‌متر		
S. spicigera *S. mutica*	لوله جام گل در داخل کاسه گل محصور		
S. sahendica	پهنای برگ ۲-۱ میلی‌متر - خطی		
S. macrantha	گیاه خشبی به ارتفاع ۶۰-۳۰ سانتی‌متر - دارای برگ‌های به طول ۲۶-۸ میلی‌متر	پهنای برگ بیشتر از دو میلی‌متر- تخت	لوله جام گل از داخل کاسه گل خارج شده
S. edmondi *S. atropatana*	گیاه خشبی به ارتفاع کمتر از ۳۰ سانتی‌متر - طول برگ‌ها کوچکتر		

در درخت فیلوژنی جنس *Satureja* spp. بر اساس ژن *matK* به روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) (شکل ۷)، دو اکسشن گونه *S. spicigera* از مناطق کوه گنجه و رودبار گیلان با دو اکسشن گونه *S. mutica* از مناطق هاور و چخماقلو خراسان شمالی به همراه گونه *S. mutica* مستخرج از NCBI در یک خوشه با ارزش حمایتی ۶۷٪ قرار گرفته‌اند. خویشاوندی نزدیک دو گونه *S. spicigera* و *S. mutica* در هر دو فلور ایرانیکا و فلور ایران قابل توجیه است. دو اکسشن گونه *S. bachtiarica* از استان یزد با گونه *S. atropatana* از منطقه اسپیران- تبریز در یک خوشه با ارزش حمایتی ۹۰٪ قرار گرفته‌اند. رابطه خویشاوندی دو گونه *S. bachtiarica* و *S. atropatana* در هیچ یک از دو فلور ایرانیکا و فلور ایران از لحاظ صفات مورفولوژیکی قابل توجیه نیست. دو جنس *Ziziphora* و *Clinopodium* به همراه دو گونه از جنس *Satureja* (*S. thymbrifolia* و *S. linearifolia*) در یک خوشه با ارزش حمایتی ۶۰٪ قرار گرفته‌اند. این خوشه جد مشترک با جنس *Thymus* با ارزش حمایتی ۶۰٪ دارد.

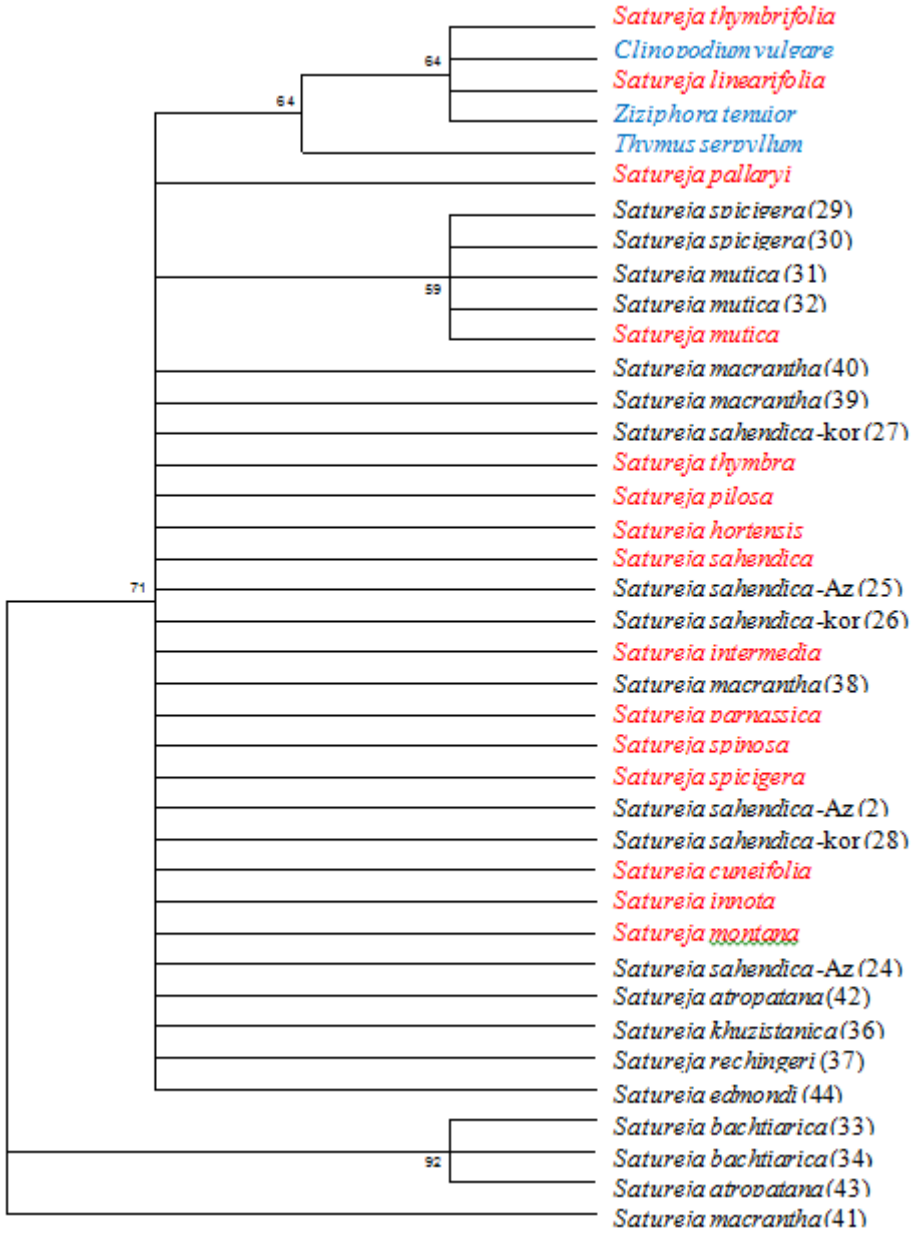
همان‌طور که ملاحظه می شود ژن کلروپلاستی *matK* به اندازه ژن هسته‌ای ITS قادر به شناسایی فواصل ژنتیکی جنس *Satureja* spp. و تفکیک این جنس از جنس‌های خویشاوند نزدیک نیست.

درخت فیلوژنی بر اساس ژن matK به روش‌های نزدیک‌ترین همسایه‌ها (Neighbor-joining) (شکل۸) و حداقل تفاوت‌ها (Maximum Parsimony) (شکل۹) نیز رسم شد. نتایج حاصل از رسم سه درخت فیلوژنی تقریبا مشابه هم بودند، فقط مقادیر ارزش حمایتی آنها با هم تفاوت داشت.

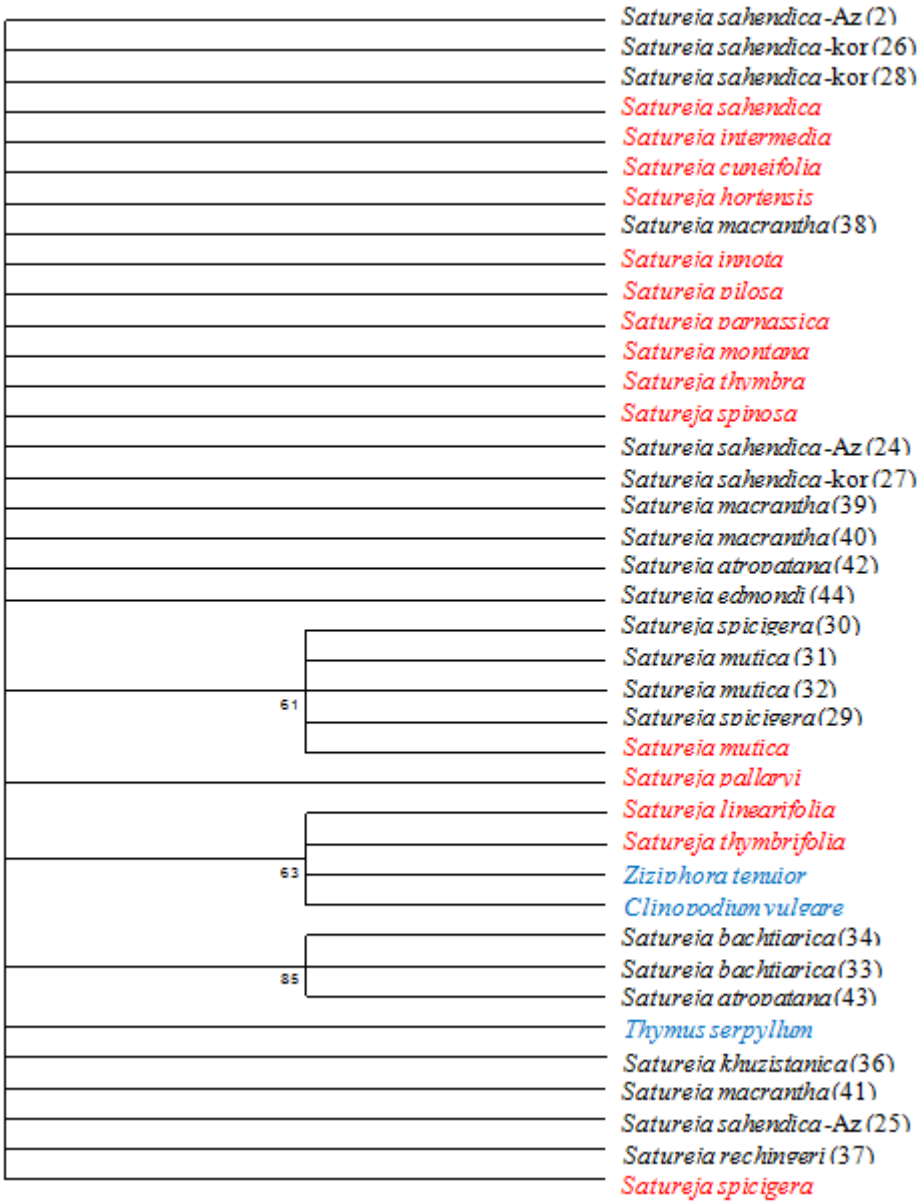
به‌طور کلی در مقایسه دو ژن مورد مطالعه در بررسی روابط خویشاوندی گونه‌های مختلف جنس *Satureja*، ژن هسته‌ای ITS نسبت به ژن کلروپلاستی *matK* (ناحیه نوکلئوتیدی ۵۲۲-۳۰۲) مناسب‌تر می‌باشد، دلیل آن تغییرات ژنتیکی کم ناحیه مورد نظر در ژن *matK* در طول تکامل جنس *Satureja* و کمبود نواحی نوکلئوتیدی تغییریافته (informative regions) و زیادی نواحی نوکلئوتیدی حفاظت‌شده (conserved regions) می‌باشد.



شکل ۷- درخت فیلوژنی جنس ***Satureja*** بر اساس ژن ***mat*K** به روش **Maximum Likelihood**



شکل ۸- درخت فیلوژنی جنس ***Satureja*** بر اساس ژن ***mat*K** به روش **Neighbor-joining**



شکل ۹- درخت فیلوژنی جنس *Satureja* بر اساس ژن *mat*K به روش Maximum Parsimony

در بررسی رده‌بندی گونه‌های جنس ممرز *Carpinus* Spp. بر اساس ژن‌های هسته‌ای و کلروپلاستی، نتایج حکایت از کارایی بیشتر ژن هسته‌ای ITS نسبت به ژن کلروپلاستی trnH- psba در تفکیک و شناسایی گونه‌های این جنس داشت (Chapolagh *et al*, 2012). فیلوژنی تیره علف هفت‌بند در ایران با استفاده از داده‌های توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی انجام شد. در این پژوهش، ۱۰۱ گونه در آنالیز ITS و ۸۵ گونه در آنالیز *mat*K مورد مطالعه قرار گرفتند. آنالیز مولکولی نشان داد که این تیره در ایران شامل چهار قبیله *Persicarieae, Rumiceae, Calligoneae, Polygoneae* می‌باشد. تک تباری هریک از آنها با حمایت بالا تأیید شد (Tavakoly *et al*., 2014). در پژوهشی بارکدگذاری DNA در ۳۴ اکوتیپ عناب از هشت استان عناب‌خیز کشور با استفاده از ژن *mat*K انجام گردید.

توالی‌های بدست‌آمده بیشترین شباهت ژنتیکی را با گونه *Ziziphus jujuba* نشان دادند. نتایج ارزیابی توالی ژن *mat*K اکوتیپ‌ها را به دو گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل اکوتیپ‌های قابل انتساب به گونه *Z. jujuba* بودند. در حالی‌که اکوتیپ‌های گروه دوم حضور محتمل گونه‌ای دیگر را نشان دادند که کمبود اطلاعات درباره ژن *mat*K در گونه‌های متعدد مانع از نتیجه‌گیری قطعی در این رابطه شد (Abbasi, and Malekzadeh. 2010). در مطالعه‌ای به‌منظور شناسایی ژنتیکی پنج گیاه دارویی منطقه سیستان و بلوچستان با نام‌های زنیان، به‌لیمو، روناس، بارهنگ سرنیزه‌ای و پنیرباد از بارکدگذاری DNA استفاده شد. بارکد rbc1 برای بررسی جنس بارهنگ، trnH-psbA برای بررسی گونه‌های جنس پنیرباد و روناس و بارکد ITS برای بررسی جنس زنیان و به‌لیمو بارکد مناسبی شناسایی شدند (Vahabi *et al.*, 2017). تعداد هشت گونه از جنس *Rochelia* و دو گونه از جنس *Lappula* به‌عنوان برون گروه با استفاده از توالی هسته‌ای ITS و توالی کلروپلاستی trnL-F به‌طور جداگانه و نیز به صورت ترکیبی آنالیز شدند. آنالیزها آشکار کرد که بخشه *Rochelia* به دلیل قرار گرفتن بخشه مونوتیپیک Cryptocarpa (*Rochelia cardiosepala*) در میان آن، تک‌تبار نیست (Khoshsokhan *et al*., 2010). در پژوهشی به‌منظور بررسی روابط فیلوژنی جنس *Teucrium* L از خانواده Lamiaceae بر اساس توالی ژن ITS ، در مجموع ۸۲ نمونه از سرده *Teucrium* و ۴۴ نمونه نیز براساس توالی ژن کلروپلاستی ycf1-rps15 توالی‌یابی و مورد آنالیز قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست‌آمده، سرده *Teucrium* یک گروه تک‌تبار در ایران تشکیل می‌دهد و شامل دو کلاد اصلی است (Moazen shaikhjan *et al*., 2016). در مطالعه فیلوژنی و جایگاه تاکسونومیکی گونه‌های درختی توس (*Betula* spp.) ایران بر اساس توالی‌یابی ژن ITS نمونه‌های توس ایران از لحاظ درصد نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده بیشترین میزان شباهت و کمترین فاصله ژنتیکی را با گونه *B. pendula* نشان دادند (Bina *et al*, 2014). ارزیابی‌های فیلوژنتیک ۱۹ جمعیت از لاله واژگون از رویشگاه‌های طبیعی خود در شش استان ایران بر اساس توالی ژن ITS انجام شد. ژنوتیپ‌های لاله واژگون در سه گروه مختلف جای گرفتند، به‌طوری‌که جمعیت‌های موجود در هر شاخه از الگوی منطقی نسبی پیروی کرده و بر اساس فاصله جغرافیایی و اختصاصات اقلیمی توزیع شدند (Kiani *et al*, 1015).

نتیجه‌گیری کلی

در بررسی روابط خویشاوندی جنس *Satureja* spp.، ژن هسته‌ای ITS نسبت به ژن کلروپلاستی *mat*K مناسب‌تر می‌باشد. در گونه‌های بومی ایران حداکثر فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S.mutica* و *S.atropatana* و حداقل فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *S.rechingeri* و *S.khuzistanica* بود. در درخت فیلوژنی، پنج گونه *S.macrantha, S.sahendica, S.atropatana, S.edmondi, S.bachtiarica* با ارزش حمایتی ۱۰۰٪، دو گونه *S.mutica, S.spicigera* با ارزش حمایتی ۹۶٪ و دو گونه *S.rechingeri, S.khuzistanica* با ارزش حمایتی ۱۰۰٪ خویشاوند نزدیک بودند. نتایج حاصل همخوانی قابل توجهی با فلور ایران و فلور ایرانیکا از لحاظ صفات مورفولوژیکی نشان داد.

منابع مورد استفاده

- Abbasi, Kh., Sefidkon, F. and Yamini, Y. 2005. Comparison of Oil Content and Composition of two *Satureja* Species (*S. hortensis* L, and *S. rechingeri* Jamzad) by Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction (SFE). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 21 (3): 307-318. In persian.
- Abbasi, S. and Malekzadeh, S. 2010. Phylogenetic evaluation of genomic diversity based on *Mat*K chloroplasts gene and RAPD molecular markers in *Ziziphus* Spp. of Iran. Master's Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. Iran. In persian.
- Alvarez, L., Wendel, JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution. 29(3): 417-434.
- Bezic, N., Ivica, S., Valerija, B., Visnja, B. and Jasna, P. 2009. Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four south-Croatian *Satureja* species (Lamiaceae).

(1): 51-56.
– Jamzad, Z. 2009-b. *Thymus* and *Satureja* species of Iran. Publishing of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.
– Khoshsokhan, M., Kazempour Osaloo, S., Saadatmand, S. and Attar, F. 2010. Molecular phylogeny of Rochelia (Boraginaceae) based on nrDNA ITS and cpDNA trnL-F sequences. Iranian Journal of Botany. 16 (1): 22-29.
– Kiani, M., Babaei, A., Sefidkon, F. and Naghavi, M.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. 23 (1): 30-38. In persian.
– Moazen shaikhjan, R., Sonboli, A., Kazempoor, Sh. and jamzad, Z. 2016. Study of phylogenic (Lamiaceae) .Teucrium based on nrDNA ITS and cpDNA ycf1 sequences in Iran. Master's Thesis. Tarbiat Modares University. Faculty of Biological Sciences. Iran. In persian.
– Omid baigy, R. 1997. Approaches to production and processing of medicinal plants. Volume 2. Publishing of Tehran University. Iran. 190 – 195.In persian.
– Rechinger, K.H. 1982. Flora Iranica. Labiatae . 1th. Ed. Akademische. Druck- U. Verlagsanstalt. Austeria. No.152: 544-545.
– Tavakoly, S., kazempoor, Sh. and Mozaffarian, V.A. 2014. Systematic molecular of polygonaceae family in Iran. Ph.D. Thesis. Tarbiat Modares University. Tehran. Iran.In persian.
– Vahabi, N., Soloki, M. and Mehdi nejad, N. 2017. Identification of five medicinal plants using the DNA bar coding method. Master's Thesis. Zabol university. Iran. In persian.
– Zarehzadeh, A. 2006. Ecological identification of essential oil plants of Yazd province for domestication and cultivation. Publishing of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. 166 pp. In persian.
– Zargari, A. 1982 . Medicinal Plants. Volume 2. Publishing of Tehran University. Iran. 1001 pp. In persian.

Molecules, 14: 925-938.
– Bina, H., Yosefzadeh, H., Esmailpoor, M. and Esmailzadeh, O. 2014. Molecular identification of the genus Betula based on ITS sequence data and its secondary structure in Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 22 (2). In persian.
– Chapolagh Paridari, I., Jalali, Gh., Sonboli, A. and Zarafshar, M. 2012. Revision of Iranian Carpinus species using of molecular markers (nrDNA ITS and trnH-psbA). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 20 (1). 1-13. In persian.
– Dodos, T., Aleksic, J., Rajcevic, N. and Marin, P.D. 2014. Arobust and cost-effective method for DNA isolation from *Satureja* (Lamiaceae). Archives of Biological Science Belgrade. 66(1): 285-297.
– Doosty, B., Drikvand, R., Salahvarzi, E., Amiri, H. and Hadian, J. 2012. Comparative analysis and optimization of different DNA extration protocols in *Satureja khuzistanica*. International Journal of Biology. 4 (4). p.111.
– Doroszenko, A. 1985. Taxonomic studies on *Satureja* complex (Labiatae). Ph.D. Dissertation. Edinbourgh University and Royal Botanic Gardens, Edinburgh. Scotland. p.313.
– Duke S. O. 2007. Risks and Benefits of Glyphosate-Resistant Crops. Natural Products Utilization Research Unit Agricultural Research Service, USDA.
– Ghahraman, A.1999. Flora of Iran. Volume 17. Publishing of Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. In persian.
– Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. Plos one. 6(5): e 19254.
– Jamzad, Z. 1992. Two new species from Labiatae in Iran. Iranian Journal of Botany.5 (2): 69-74.
– Jamzad, Z. 1994. A new species of the genus *Satureja* (Labiatae) from Iran. Iranian Journal of Botany. 6 (2): 215-218.
– Jamzad, Z. 1996. *Satureja rechingeri* (Labiatae), a new species from Iran. Annalen Des Naturhistorischen Museum In Wien 98B suppl. 75-77.
– Jamzad, Z. 2009-a. New species and new records of Lamiaceae from Iran. Iranian Journal of Botany. 15

Study of phylogenetic relationships of different species of *Satureja* spp. based on nuclear ITS region and chloroplast *mat*K gene

F. Noormand Moaied[1], M.R. Bihamta[2*], S.R. Tabaei Aghdaei[3] and M.R. Naghavi[4]

1- Ph.D graduated, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. I.R. Iran.
2-*Corresponding Author. Prof., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. I.R. Iran.
Email: pomato1960@gmail.com.
3- Prof. Research Institute of Forests and Rangelands. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.
4- Prof., College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran. I.R. Iran.

Received: 04.08.2019 Accepted: 04.11.2019

Abstract

Phylogenetic study of savory (*Satureja* spp.), which has different species and valuable compounds such as thymol and carvacrol, is of special importance among medicinal plants. In this study, 21 accessions belonged to nine *Satureja* species were identified and collected from main habitats in eight provinces of Iran, including East Azarbaijan, Kurdistan, Gilan, North Khorasan, Yazd, Lorestan, Ilam, and Kermanshah. Genomic DNA extraction was performed using the modified CTAB method. In the phylogenetic study, in addition to the nine collected species, the sequences of ITS and *mat*K genes of *Satureja* species registered with the NCBI were also added to the phylogeny tree as part of the group. In addition to *Satureja* genus, the sequences of *Thymus*, *Ziziphora*, *Clinopodium* genera were also used NCBI as an outgroup to root the phylogenetic tree. The results showed that in the study of *Satureja*. spp kinship relationships, the ITS nuclear gene was more appropriate than the matK chloroplast gene. In the native species of Iran, the maximum genetic distance was between *S.mutica* and *S.atropatana* and the minimum genetic distance was between *S.rechingeri* and *S.khuzistanica*. In the phylogenetic tree, five species of *S.macrantha*, *S.atropatana*, *S.sahendica*, *S.edmondi*, and *S.bachtiarica* with %100 bootstrap value, two species of *S.mutica* and *S.spicigera* with %96 bootstrap value, and two species of *S.khuzistanica* and *S.rechingeri* with %100 bootstrap value were close relatives. The results showed a significant consistency with Flora Iran and Flora Iranica in terms of morphological traits.

Keywords: Phylogeny, Nuclear ITS region, *Satureja*, Genetic distance, Chloroplast *matK* gene.