تاریخ چاپ: پاییز ۱۳۹۱

بررسی بیوسیستماتیکی سردهٔ حشره‌خوار اوتریکولاریا[1] در ایران

شهریار سعیدی مهرورز: دانشگاه گیلان، گروه زیست‌شناسی
رضا حسن ساجدی: دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی
زینب شمسیان: دانشگاه گیلان، گروه زیست‌شناسی

چکیده

در تحقیق حاضر ویژگی‌های ریخت‌شناسی، تشریحی، گرده‌شناسی و مولکولی سرده اوتریکولاریا از تیرهٔ اوتریکولاریاسه[2] بررسی شد. این سرده در ایران دو گونه به‌نام‌های: اوتریکولاریا استرالیس[3] و اوتریکولاریا مینور[4] دارد. در بررسی ریخت‌شناسی دو گونه از نظر طول استولون، وجود و عدم وجود ریزوئید و شکل کیسه چه تله‌ای[5] با یک‌دیگر تفاوت دارند. در بررسی تشریحی، شکل سلول‌های اپیدرمی ساقه، ضخامت و شکل سلول‌های آئرانشیمی و پارانشیم پوستی از صفات متمایز کننده دو گونه است. در بررسی گرده‌شناسی، دانه‌های گرده این دو گونه چند شیاره و بدون منفذ است و همچنین تزیینات سطح اگزین از نوع شکاف‌دار است. نتایج حاصل از تجزیه وتحلیل توالی کلروپلاستی trnL-F نشان می‌دهد که اوتریکولاریا استرالیس با اوتریکولاریا ماکروریزا[6] و اوتریکولاریا مینور با اوتریکولاریا اینترمدیا[7] خویشاوند هستند.

مقدمه

سردهٔ اوتریکولاریا از تیره اوتریکولاریاسه۲۲۰ گونه دارد [۱] و ۳۵% از کل گیاهان حشره‌خوار را تشکیل می‌دهد. از این سرده در منطقهٔ فلور ایرانیکا چهار گونه به نام‌های اوتریکولاریا نگلکتا[8]، اوتریکولاریا مینور، اوتریکولاریا ولگاریس[9] و اوتریکولاریا اکرولئوکا[10] گزارش شده است که صرفاً به‌پراکندگی گونهٔ اوتریکولاریا ولگاریس از شمال و غرب ایران (لرستان) اشاره گردید [۲]. بر اساس آخرین گزارش‌ها اوتریکولاریا نگلکتا با گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس[11] مترادف شده است [۲]، [۳]. اخیراً گونهٔ اوتریکولاریا مینور به‌عنوان گزارش جدید از جاده هراز در استان مازندران و جاده لاسم در فیروزکوه معرفی شد [۵]. دو گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس و مینور به بخشه اوتریکولاریا تعلق دارد. این سرده گیاهانی علفی، چندساله و حشره‌خوار. خاک‌زی، آب‌زی و یا دارزی؛ فاقد ریشه‌های حقیقی، دارای ریزوئید منتهی به انشعاب‌های کوتاه دو بخشی بسیار منقسم و با

واژه‌های کلیدی: *Utricularia*، تشریحی، گرده شناسی، trnL-F .
دریافت ۹۰/۳/۳ پذیرش۹۰/۱۰/۷
*نویسنده مسئول saeidimz@guilan.ac.ir

۱. *Utricularia* L. ۲. Lentibulariceae ۳. *U. australis* R. Br. ۴. *U. minor* L.
۵. Bladder ۶. *U. macrorhiza* ۷. *U.intermedia* ۸. *U. neglecta* Lehm
۹. *U. vulgaris* L. ۱۰. *U. ochroleuca* R. Hartman. ۱۱. R. Br *U. australis*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]

داشتن برگ‌های ساده در انتها و یا حاشیه دارای موهای سیخکی یا فاقد آن گل‌آذین خوشه، گل‌ها کامل و نامنظم. کاسه ۲ لوبه که روی‌هم قرار گرفته و تقریباً برابر، جام دارای ۵ گلبرگ بهم پیوسته، ۲ لبه، لب پایینی بزرگ‌تر از لب بالایی؛ اغلب زرد. مهمیز کیسه‌ای یا مخروطی، بندرت خمیده، پرچم‌ها ۲ عدد، میوه کپسول شکوفا به‌صورت عرضی یا ناشکوفا و بذرهای فراوان، بسیار کوچک و قهوه‌ای مشخص می‌شود.

متکالف[۱] و شالک[۲] [۶]، چند گونه از این سرده را از دیدگاه تشریحی بررسی کردند و به‌وجود مزوفیل با سلول‌های یک‌شکل و قطر یک‌سان در اوتریکولاریا ولگاریسو کریستال‌های کوچک و دوکی شکل در اوتریکولاریا مونتانا[۳] اشاره کردند.

لوبرو-کالن[۴] و همکارانش [۷]، پژوهش‌های گرده‌شناسی ۳۹ گونهٔ این سرده به‌ویژه اوتریکولاریا استرالیس را بررسی کرد و نتیجه‌گیری کرد که دانه‌های گرده از سه شیاره- منفذ[۵] تا چند شیاره- منفذ[۶] متغیر است.

بررسی‌های مولکولی از این سرده بر اساس توالی‌های (rps16 intron و trnL-F DNA [۸]، *trn*K nitron) [۹]، نشان‌گرهای RAPD [۱۰]، انگشت‌نگاری مولکولی[۷] [۱۱] گزارش شده است.

در این مقاله کلید شناسایی دو گونه از سردهٔ اتریکولاریا موجود در ایران بر اساس صفات ریخت-شناسی تهیه گردید و همچنین ویژگی‌های تشریحی، گرده‌شناسی آن‌ها و تعیین موقعیت فیلوژنی اوتریکولاریا مینوربا استفاده از توالی کلروپلاستی trnL-F بررسی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

در فصل تابستان سال ۱۳۸۸، اوتریکولاریا استرالیس (شکل ۱) از تالاب امیرکلایه و مرداب کیاشهر در استان گیلان و اوتریکولاریا مینور از نواحی فیروزکوه جمع‌آوری شد. برای بررسی تشریحی، اندام‌های آن‌ها در محلول تثبیت کننده FAA قرار داده شد سپس نمونه‌های با محلول‌های الکلی آبگیری شده و پس از پارافینه کردن و قالب‌گیری، برش‌گیری به‌صورت عرضی و طولی به ضخامت ۱۰-۵ میکرومتر با دستگاه میکروتوم[۸] صورت گرفت. برش‌ها با محلول‌های آبی متیل و کارمن رنگ‌آمیزی و بررسی شد.

برای بررسی تزئینات سطح دانهٔ گرده از روش [۱۲] و [۱۳] استفاده شد. دانه‌های گرده را از بساک جدا می‌کنیم و با اسید استیک گلاسیال آبگیری کرده و داخل سانتریفوژ قرار می‌دهیم، سپس با روش استولیز در انیدریک استیک و اسید سولفوریک (۹:۱) به‌مدت ۳ تا ٤ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت می‌دهیم تا پلی‌ساکاریدها حذف شوند. پس از شستشو با آب مقطر و چند بار سانتریفوژ به‌کمک میکروسکوپ الکترونی[۹] مدل LEO 1430 VP سطح دانهٔ گرده بررسی شد. برای تفسیر نوع و آرایش سطح دانهٔ گرده از [۱۴] و [۱۵] استفاده شد.

---

۱. Metcalf ۲. Chalk ۳. *U. montana* ۴. Lobreau-Callen ۵. Tricolporate
٦. zonocolporate ۷. DNA fingerprinting ۸. Reichert-Jung Model Biocut 2030
۹. SEM Model LEO 1430

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]

استخراج DNA ژنومی، تکثیر و تعیین توالی قطعه trnL-F کلروپلاستی

استخراج DNA تام از برگ تازه نمونه‌های جمع‌آوری شده اوتریکولاریا مینور با استفاده از روش استخراج CTAB انجام شد [۱۶] و با استفاده از تعیین جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده از گیاه ارزیابی شد. آغازگر یونیورسال[۱] (trnL-F_c °C) 5'-TTTGAACTGGTGACCGAG-) trnL-F_f و (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' ،T_m=٦٥/٥ 3' ،T_m=٥٩ °C) استفاده شدند [۱۷]. اجزای یک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای حجم نهایی ۲۵ µl عبارت بود از: DNA آلگو[۲] (۵ میکرولیتر)، پرایمرهای پیش‌رونده[۳] و پس‌رونده[۴] با غلظت ۱۰ pmol هرکدام ۱میکرولیتر PCR[۵] از شرکت سیناژن (ایران، تهران)(۱۲/۵ میکرولیتر) و آب دیونیزه استریل (۵/۵ میکرولیتر). برای تقویت ناحیهٔ ژنی موردنظر از دستگاه ترموسیکلر[۶]، ژن Amp[۷] استفاده گردید. مراحل انجام PCR به‌ترتیب زیر بود واسرشتگی اولیه[۸] (۵ دقیقه، ۹۳°C)، واسرشتگی (۳۵ ثانیه، ۹۳ °C)، جفت شدگی[۹] (۴۵ ثانیه، ۵۲/۵ °C)، پیشرفت[۱۰] (ثانیه،۹۰°C ۷۲) و گسترش نهایی (۵ دقیقه،°C ۷۲). تخلیص محصول PCR با استفاده از کیت، تخلیص PCR[۱۱] انجام شد. به‌منظور تعیین ترادف‌های نوکلئوتیدی، قطعات تکثیر شده و خالص‌شده با استفاده از یك توالی‌گر مولکولی و به روش‌های اتوماتیك MWG آلمان و اتمام زنجیره[۱۲] [۱۸] و به سفارش شرکت فرآیند دانش تعیین توالی شدند.

روش‌های مربوط به آنالیز توالی

به‌منظور به‌دست آوردن توالی‌های نوکلئوتیدی قطعهٔ trnL-F مربوط به‌گونه‌های مختلف *اوتریکولاریا*، کاوش‌هایی در بانك‌های اطلاعاتی ژنی[۱۳] [۱۹] و EBI[۱۴] انجام شده و با استفاده از بلاستین[۱۵] [۲۰] جستجوهای همولوژی به‌عمل آمد. توالی‌ها به‌کمك برنامهٔ ویژه[۱۶] [۲۱] مقایسه و تطبیق گردیدند.

آنالیز فیلوژنتیکی

آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از قطعه trnL-F از ۸ گونهٔ اوتریکولاریا انجام شد. در این پژوهش برای اولین بار این قطعه از اوتریکولاریا مینور تعیین توالی گردید (شکل ۲). توالی قطعهٔ مذکور از سایر گونه‌های استفاده شده در این تحقیق (از جمله اوتریکولاریا استرالیس) از بانک‌های اطلاعاتی استخراج شد. سپس با استفاده از فرمت dnd فایل خروجی ویژه، درخت فیلوژنتیکی به‌روش نیبور-جوینیگ[۱۷] و به‌کمک نرم افزار مگا[۱۸] ۴ [۲۲] ترسیم گردید.

۱. Universal Primer ۲. Template DNA ۳. Forward Primer ۴. Reverse Primer
۵. PCR Master Mix ۶. Thermocycler ۷. Gene Amp Model 9700 (Applied Biosystems, USA)
۸. Initial Denaturation ۹ . Annealing ۱۰. Extension ۱۱. PCR purification (BIONEER, UK)
۱۲. Chain termination method ۱۳. www.ncbi.nlm.nih.gov w.w.w.srs.ebi.ac.uk
۱۵. BLASTN ۱۶. CLUSTALW ۱۷. Neighbour-Joining ۱۸. Mega

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]

نتایج و بحث

از بررسی ریخت‌شناسی تفاوت‌های محسوس در طول استولون، وجود و عدم وجود ریزوئید، طول پهنک برگ و شکل کیسه چه تله‌ای (شکل ۳) در دو گونه اوتریکولاریا مشاهده شد و کلید شناسایی برای آن‌ها تهیه شد:

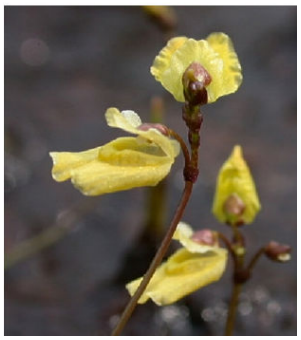
-استولون به‌طول ۱۱۰ سانتی‌متر و هم‌شکل، ریزوئید رشته‌ای. برگ‌ها به طول ۱/۵ تا ۳ سانتی‌متر. گل به طول ۱۲ تا ۱۵ میلی‌متر. کیسه چه تله‌ای تخم مرغی پهن..... (*U. australis*)

- استولون به‌طول ۲۰-۱۰ سانتی‌متر و غیرهم‌شکل، فاقد ریزوئید. برگ‌ها به طول ۱/۵ تا ۵ میلی‌متر. گل به طول تا ۸ میلی‌متر. کیسه چه تله‌ای تقریبا مدور.....(*U. minor*)

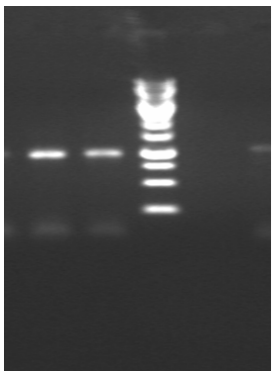
از بررسی تشریحی اندام‌های این دو گونه صرفاً تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در برش‌های ساقه به‌شرح زیر به‌دست آمد:

ساقه: در دو گونه بررسی شده شکل مقطع عرضی ساقه کروی، یا حاشیه صاف است. در خارجی‌ترین لایه، یک ردیف اپیدرم قرار دارد که در اوتریکولاریا استرالیس این سلول‌ها یا قطر یکسان ولی در اوتریکولاریا مینور سلول‌های اپیدرمی طویل‌تر و یا قطر نابرابر است و در بین سلول‌های اپیدرمی، سلول‌های روزنه از نوع هم سطح مشاهده می‌شود. سلول‌های آئرانشیم در اوتریکولاریا استرالیس بیضوی تا تقریبا مدور (شکل ۳) و در اوتریکولاریا مینور تخم مرغی تا تخم مرغی باریک است. یک ردیف لایه اندودرم در گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس دیده می‌شود (شکل ۴). در قسمت داخلی ساقه آوند چوب و آبکش قرار دارد که در اوتریکولاریا مینور تقلیل یافته است (شکل ۵).

در گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس ضخامت مقطع عرضی μ ۹۸۰-۸۵۰، پارانشیم پوستی ۴ تا ۵ لایه، ضخامت سلول‌های آئرانشیمی μ۱۹۵-۱۱۱/۸؛ در گونهٔ اوتریکولاریا مینور ضخامت مقطع عرضی μ ۵۹۲/۵-۴۵۲/۵، پارانشیم پو ستی ۲ تا ۳ لایه، سلول‌های آئرانشیمی μ ۲۴۷-۱۳۷/۸مشاهده گردید (جدول ۱). در برش طولی ساقه در گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس سلول‌های اپیدرمی مستطیلی باریک و کشیده، اما در گونهٔ اوتریکولاریا مینور سلول‌های مستطیلی قطور است (شکل ۶).

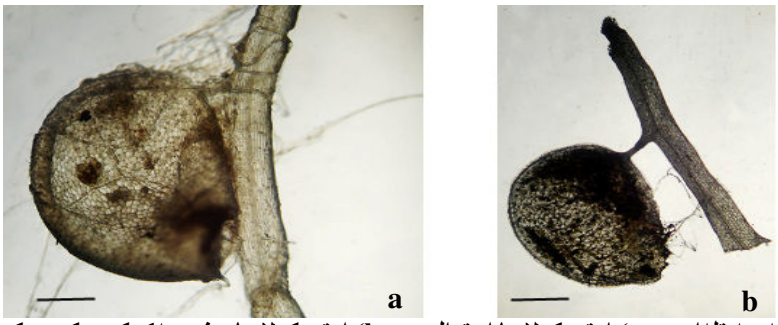


شکل ۱. نمایی از گونه اوتریکولاریا استرالیس

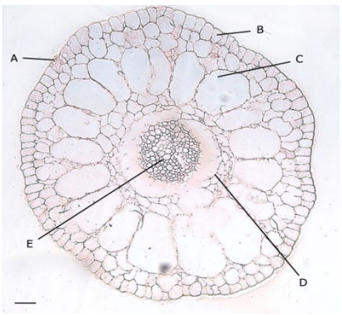


شکل ۲. آنالیز PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز گونهٔ اوتریکولاریا مینور مارکر وزن ملکولی DNA استفاده شده SM0311 است

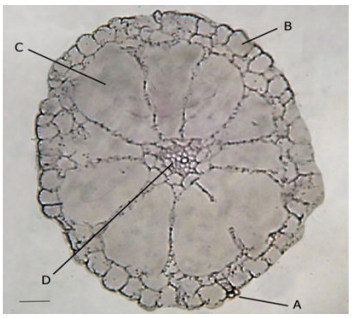
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]



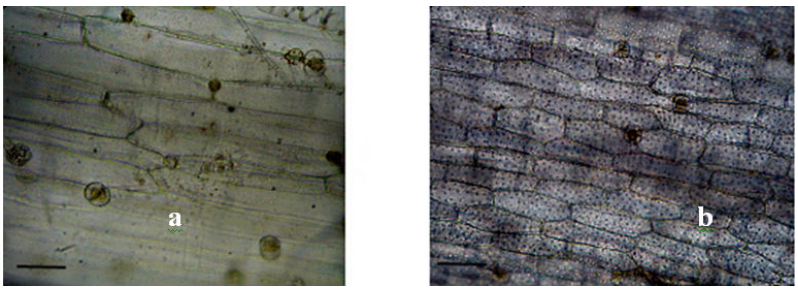
شکل ۳. کیسه چه تله‌ای در a) اوتریکولاریا استرالیس و b) اوتریکولاریا مینور به‌کمک میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰



شکل ۴. برش عرضی از بافت ساقه در اوتریکولاریا استرالیس با بزرگ‌نمایی ۱۰: A) روزنه، B) اپیدرم، C) آئرانشیم ، D) آندودرم، E) دستجات آوندی.



شکل ۵. برش عرضی از بافت ساقه در و اوتریکولاریا مینور با بزرگ‌نمایی ۱۰: A) روزنه، B) لایه اپیدرم، C) آئرانشیم، D) دستجات آوندی

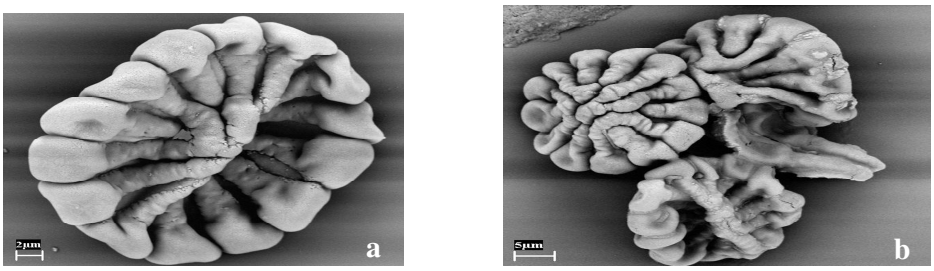


شکل ۶. سلول‌های اپیدرمی ساقه در a) اوتریکولاریا استرالیس و b) اوتریکولاریا مینور به کمک میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی۴۰

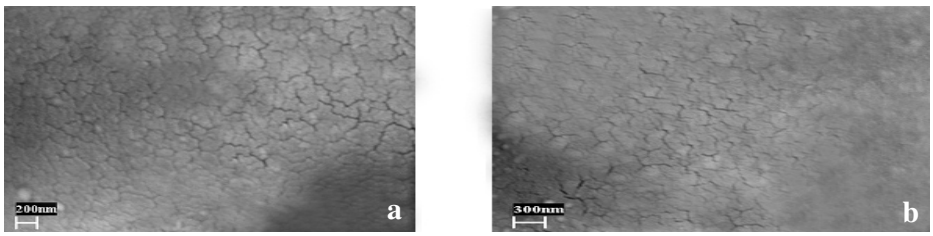
تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره با بزرگ‌نمایی ۲ و ۵ ماکرومتر از دانهٔ گرده دو گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس و مینور (شکل ۷) نشان می‌دهد که دانه‌های گرده آن‌ها ساده، چند دریچه‌ای (بیش از ۱۰ دریچه)، بدون منفذ و در انتهای آپوکولپیوم[۱]، پاراسینکولپیت[۲] هستند. همچنین با بررسی سطح اگزین با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ و ۳۰۰ ماکرومتر مشخص شد که تزئینات سطح اگزین شان شکاف‌دار است (شکل ۸). با توجه به بررسی گرده‌شناسی، تفاوت آشکاری در دانه‌های گرده این دو گونه دیده نمی‌شود. این *نتایج با نتایج* حاصل از لوبرئو-کالن[۳] و همکارانش [۷] که بر روی دانهٔ گردهٔ گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس بررسی شده مطابقت دارد. اما در نوع تزئینات سطح اگزین دانهٔ گرده که از نوع شکاف‌دار است (شکل ۸) مغایرت دارد، به‌طوری‌که وی تزئینات سطح اگزین در گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس را صاف گزارش کرده بود.

۱. Apocolpium ۲. Parasyncolpat ۳. Lobreau-Callen

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]



شکل ۷. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از دانه‌های گرده با بزرگ‌نمایی ۲ و ۵ ماکرومتر a) اوتریکولاریا استرالیس و b) اوتریکولاریا مینور.



شکل ۷. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از تزئینات سطح اگزین دانه‌های گرده با بزرگ‌نمایی ۲ و ۵ ماکرومتر a) اوتریکولاریا استرالیس و b) اوتریکولاریا مینور

جدول ۱. خلاصه اطلاعات صفات تشریحی برش عرضی ساقه در دو گونهٔ بررسی شده

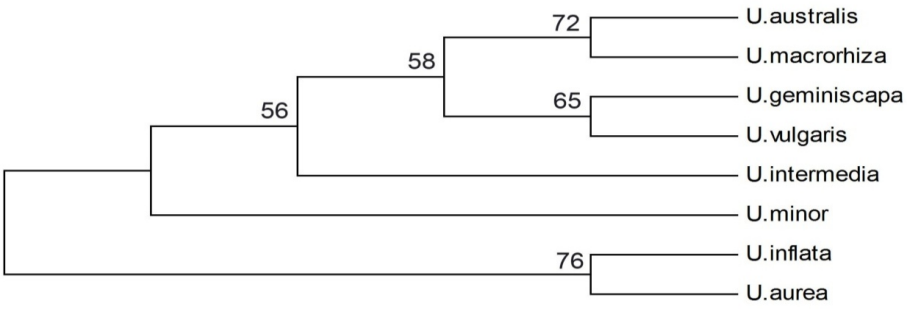
تعداد لایه سلولی	ضخامت مقطع عرضی ساقه (µ)	ضخامت سلول های آئرانشیمی (µ)	شکل سلولهای آئرانشیم	تاکسون
۴-۵	۸۵۰-۹۸۰ µ	۱۹۵-۱۱۱/۸ µ	بیضوی تا تقریبا مدور	*U. australis*
۲-۳	۴۵۲.۵ – ۵۹۲.۵ µ	۲۴۷- ۱۳۷/۸ µ	تخم مرغی تا تخم مرغی باریک	*U. minor*

درخت نیبور- جوینیگ حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های توالی کلروپلاستی trnL-F برای گونه‌های بخشه اوتریکولاریا (شکل ۹) از پایین به بالا شامل کلادی با دوگونهٔ اوتریکولاریا اینفلاته[۱] و اوتریکولاریا اورئا[۲] {با ارزش حمایتی[۳] ۷۶٪} و دو گونه اوتریکولاریا اینترمدیا و مینور {با ارزش حمایتی ۵۶٪} به‌صورت پله‌ای[۴] قرار گرفته‌اند. بعد از آن کلادی از دوگونهٔ اوتریکولاریا ولگاریس و اوتریکولاریا جمینیسکاپا[۵] {با ارزش حمایتی ۶۵٪) و بالاتر از آن‌ها کلادی با دو گونهٔ اوتریکولاریا استرالیس و اوتریکولاریا ماکروریزا {با ارزش حمایتی ۷۲٪} که دو کلاذ بالایی گروه خواهری را تشکیل می‌دهند دارای ارزش حمایتی برابر ۵۸٪ است.

یافته‌های حاضر با نتایج فیلوژنی‌های مولکولی بر اساس نشانگرهایRAPD [۱۰] و ژن rps16 [۸] سازگار است. هم‌چنین خویشاوندی اوتریکولاریا استرالیس *با* اوتریکولاریا *ولگاریس و ماکروریزا* که در تحقیق حاضر حاصل شد رده‌بندی درون جنس این سرده را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی تأیید می‌کند [۳]. ارتباط نزدیک دو گونهٔ اوتریکولاریا ماکروریزا و اوتریکولاریا استرالیس *را* می‌توان به عدد کروموزومی مشرک آن‌ها [۲۲] و شباهت کیسه چه تله‌ای تخم مرغی‌شان [۳] نسبت داد. در نتیجه روش تعیین توالی قطعه trnL-F کلروپلاستی برای تعیین تنوع ژنتیکی و قرابت گونه‌های جنس آبزی اوتریکولاریا مفید ارزیابی می‌شود.

۱. *U. inflate* ۲ . *U. aurea* ۳. Bootstrap ٤. grade ۵. *U. geminiscapa*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]



شکل ۹. درخت نیبور- جوینیگ برای گونه‌های بخشه اوتریکولاریا بر اساس اطلاعات حاصل از توالی کلروپلاستی trnL-F، اعداد روی شاخه‌ها ارزش حمایتی هستند

منابع

1. W. Barthlott, S. Porembski., R. Seine, I. Theisen, "Karnivoren, Biologie und Kultur Fleischfressender Pflanzen, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (2004).
2. S. J. Casper, "Lentibulariaceae. In K. H. Rechinger (ed.)", Flora Iranica vol.58 (1969)1-3. Graz.
3. P. Taylor, "The genus *Utricularia*: a taxonomic monograph. Kew Bulletin Additional Series XIV", Her Majesty's Stationery Office, London (1989).
4. N. Mette, N. Wilbert, W. Barthlott, "Food Composition of Aquatic Bladderworts (Utricularia, Lentibulariaceae) in Various Habitats", Beitr. Biol. Pflanzen 72 (2000)1-13.
5. A. Naqinezhad, B. A. Rice, F. Attar, A. Jalili, "*Utricularia* (Lentibulariaceae) of Iran", Carniv. Pl. Newslett., 37 (2007) 4-10.
6. C. R. Metcalf, L. Chalk, "Anatomy of the Dicotyledons", 1(1957) 991-885., Oxford. Clarendon press.
7. D. Lobreau-Callen, J. Jérémie, M. Suarez-Cervera, "Morphologie et ultrastructure du pollen dans le genre *Utricularia* L. (Lentibulariaceae)", Can. J. Bot. 77 (1999) 744-767.
8. R. W. Jobson, J. Playford, K. M. Cameron, V. A. Albert, "Molecular phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid rps16 intron and trnL-F DNA sequences: implications for character evolution and biogeography", Syst. Bot. 28 (2003) 157-171.
9. K. Muller, T. Borsch, "Phylogenetics of Utricularia (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the trnK intron in a lineage with high substitutional rates", Plant Syst. Evol, 250: (2005) 39-67.
10. M. O. Rahman, "Evaluation of RAPD markers for taxonomic relationships in some aquatic species of *Utricularia* L. (Lentibulariaceae)", Bangladesh J. Plant Taxon 13 (2)(2006) 73-82.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]

11. M. O. Rahman, M. O. "DNA fingerprinting in Utricularia L. Section Utricularia as revealed by PCR based assay", Inter. J. Bot. 3 (1) (2007) 56-63.

12. G. Erdtman, "Pollen morphology and plant taxonomy" Angiosperms, (An Introduction to Palynology I), Hafner Pub. Co. New York (1966).

13. M. Hesse, H. Halbritter, R. Zetter, M. Weber, R. Buchner, A. Frosch-Radivo, S. Ulrich, "Pollen Terminology. An illustrated handbook", Springer, Wien. (2009) 264.

14. W. Punt, P. P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson, A. L. Thomas, "Glossary of Pollen and Spore Terminology", 143 (2007) 1-81.

15. J. W. Walker, J. A. Doyle, "The bases of angiosperm phylogeny, palinology", Annals of the Missouri Botanical Garden, 1975;62 (2006) 664-723.

16. A. Untergasser, "DNA Miniprep using CTAB" Untergasser's Lab. (include here the date when you accessed these page). <http://www.untergasser.de/lab/ protocols/miniprep _dna_ctab_v1_0.htm> (2008).

17. P. Taberlet, L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet, "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA", *Plant Molecular Biology* 17 (1991)1105-1109.

18. F. Sanger., S. Nicklen, A. R. Coulson, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (1977) 5463-5467.

19. D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, B. A. Rapp, D. L.Wheeler, "GenBank, *Nucleic Acids Research*", 32 (2004) 23-26.

20. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang., Z. Zhang., W. Miller, D. J. Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein", Nucleic Acids Res. 25 (17) (1997) 3389-402.

21. J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, "CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting", position specific gap penalties and weight matrix choice*, Nucleic Acids Research*. 22 (1994) 4673-4680.

22. K. Tamura K, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)", Software Version 4.0. Mol Biol Evol. 24 (2007) 1596-1599.

23. S. J. Casper, H. Manitz, "Beiträge zur Taxonomie und Chorologie der mitteleuropäischen *Utricularia*-Arten", II. Androsporogenese, chromosomenzahlen und pollenmorphologie. *Feddes Reportorium* 86 (1975) 211-23.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-29]