

مطالعه فیلوژنتیکی بخش‌هایی از گون‌های *گرک دو شاخه‌ای* *Astragalus L. sect. Ornithopodium* با تأکید بر موقعیت با استفاده داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی در ایران

عباس سعیدی^{۱*}، رضا شیخ‌اکبری مهر^۲، شاهرخ کاظم‌پور اوصالو^۳، علی اصغر معصومی^۴ و مجید قربانی نهوجی^۲
^۱ دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
^۲ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
^۳ دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۴ بخش گیاه‌شناسی، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، ایران

چکیده

در مطالعه حاضر، فیلوژنی ۱۵ گونه علفی و چندساله مربوط به بخش *Ornithopodium Bunge* و دو بخش نزدیک به آن یعنی بخش‌های *Onobrychoidei* DC. و *Dissitiflori* DC. با استفاده از داده‌های حاصل از ریخت‌شناسی، توالی ناحیه ITS ژنوم هسته‌ای و توالی ژن *matK* کلروپلاستی، ارزیابی و تحلیل شد. بر اساس نتایج به دست آمده از داده‌های ریخت‌شناختی، اعضای دو بخش *Ornithopodium* و *Onobrychoidei* تاکسون‌های نزدیک به هم بوده، به صورت آمیخته با هم، تشکیل یک تبار واحد را می‌دهند. همچنین، گونه‌های مطالعه شده از بخش *Dissitiflori* نیز درون تباری جداگانه قرار می‌گیرند. بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از توالی‌های ITS nrDNA هسته‌ای و *matK* کلروپلاستی، اعضای بخش‌های *Ornithopodium* و *Onobrychoidei* وابستگی بسیار نزدیکی به هم نشان می‌دهند، به طوری که کلیه گونه‌های مطالعه شده از این دو بخش، درون یک تبار با حمایت شاخه‌ای بالا و ب هطور آمیخته با هم جای گرفته‌اند. در کلیه آنالیزهای مولکولی، تاکسون‌های مطالعه شده، متعلق به بخش *Dissitiflori* تباری مجزا از دو بخش اخیر تشکیل می‌دهند. به طور کلی نتایج داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی در انطباق با یکدیگر هستند. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق مشخص شد، گونه *A. pravitzii* Podlech. که اخیراً به بخش *Ornithopodium* منتقل شده بود، بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی به بخش *Dissitiflori* تعلق داشته، جایگاه آن درون این بخش تأیید می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، تبارشناختی (کلادستیک)، گون (*Astragalus*)، *Dissitiflori*، *Onobrychoidei*، *Ornithopodium*

مقدمه

جنس گون (*Astragalus* L.) متعلق به تیره باقلانیان (Fabaceae)، در میان گیاهان گل‌دار از بزرگترین جنس‌هاست که در جهان بیش از ۲۵۰ بخش (section) و حدود ۳۰۰۰ گونه دارد (Lock and Simpson, 1991, Podlech, 1998).

از میان تمام گونه‌های گون، حدود ۲۴۰۰ گونه آن انحصاراً در قاره آسیا پراکنش دارند. پیرامون تنوع گونه‌ای در این جنس، مقالات و چک لیست‌های متعددی چاپ شده است (Lock and Simpson, 1991; Maassoumi, 1998; Podlech, 1986; Yakovlev et al., 1996). ایران با داشتن ۸۰۴ گونه، که از میان آنها ۵۲۷ گونه انحصاری کشور است، به عنوان یکی از مراکز گونه‌زایی گون در نظر گرفته می‌شود (Maassoumi, 2005). نخستین نظام رده‌بندی گون‌ها، در اوایل قرن نوزدهم و توسط دوکاندول، در سطح واحدهای فوق گونه‌ای مترادف با بخش، پایه‌ریزی گردید. Bunge (۱۸۶۸-۱۸۶۹) پس از جمع‌آوری‌های فراوان از ایران، برای نخستین بار در سال ۱۸۶۸ چارچوب طبقه‌بندی گون‌ها را بنیاد نهاد و با چاپ نخستین اثر خود، طبقه‌بندی جنس *Astragalus* با ۱۰ زیرجنس و حدود ۱۵۰ بخش را ارائه کرد و سپس به شرح گونه‌های جدید و پراکنندگی آنها اقدام نمود. Gontscharov با پذیرفتن ۹ زیرجنس Bunge، فلور شوروی را از نظر گون‌ها، بازننگری کرد (Gontscharov et al., 1946). Podlech (۱۹۸۲) بر اساس یک‌ساله یا چندساله بودن گونه‌ها و همچنین، نوع کرک پوش، تنها دو زیرجنس را برای *Astragalus*‌های دنیای قدیم تشخیص داد. سپس Maassoumi (۱۹۹۸) با قبول ۸ مورد از زیرجنس‌های معرفی شده به وسیله

Bunge، اعضای دو زیرجنس *Caprinus* و *Pogonophace* Bunge را به درون دیگر زیرجنس‌ها منتقل کرد. در مطالعات مولکولی جامعی که در سال‌های اخیر روی تاکسون‌های متعددی از *Astragalus* انجام شد، مشخص گردید که هیچ کدام از این زیرجنس‌ها، گروه‌های تک‌تبار نیستند (Wojciechowski et al., 1999; Kazempour Maassoumi, 2003, 2005). بنابراین، (۲۰۰۳) هنگام بازننگری گون‌ها برای فلور ایران، هیچ‌یک از این زیرجنس‌ها را نپذیرفت و اقدام به طبقه‌بندی و معرفی گون‌ها در سطح بخش نمود. تنها مطالعات مولکولی جامعی که در ایران بر روی بخش‌های وسیعی از *Astragalus* با استفاده از توالی‌های ITS nrDNA انجام شد، تنها ۶ بخش تک‌تبار را مشخص نمودند و روابط میان سایر بخش‌ها، به صورت حل نشده باقی ماند (Kazempour Osaloo et al., 2003, 2005).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعات، نماینده‌های انتخاب شده از بخش‌های *Ornithopodium*، *Dissitiflora* و *Onobrychoidei* به همراه تاکسون‌هایی از دیگر بخش‌های کرک دوشاخه‌ای، درون یک تبار بزرگ پلی‌تومیک با روابط حل نشده، قرار می‌گیرند. با توجه به بزرگی جنس *Astragalus* از جهت تعداد گونه و بخش در ایران، بررسی فیلوژنی کلیه بخش‌ها در یک یا چند مطالعه محدود، ناممکن بوده، به نظر می‌رسد این مهم، طی مطالعات فیلوژنتیک متعدد یک یا چند بخش نزدیک به هم، با استفاده از صفات مختلف ریخت‌شناختی و به ویژه مولکولی، تحقق یابد. در تحقیق حاضر، کوشش شده است تا موقعیت فیلوژنتیک بخش *Ornithopodium* از جنس گون و همچنین،

ارزش‌های داده شده به حالات مختلف صفات، هیچ گونه برتری نسبت به یکدیگر نداشته، صفات و حالات مختلف دارای ارزش یکسان بودند. برای تعیین قطبیت صفات از روش به کارگیری برون‌گروه (Maddison *et al.*, 1984) استفاده شد. کلیه صفات وارد شده، از نظر بیشینه صرفه‌جویی، حاوی اطلاعات (parsimony informative) هستند. در نهایت، ماتریس عددی حاصل از داده‌های ریخت‌شناختی، در آنالیز تبارشناختی استفاده شد که در جدول ۳ ارائه شده است.

مطالعات مولکولی

در تحقیق حاضر، تعدادی از گونه‌های مربوط به دو بخش *Dissitiflora* و *Onobrychoidei* به همراه ۷ گونه از بخش *Ornithopodium* مطالعه شدند تا روابط فیلوژنتیک میان آنها بررسی شده، در ارتباط با جایگاه تاکسونومیک آنها اظهار نظر دقیق‌تری انجام پذیرد.

استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و توالی‌یابی

DNA کل ژنوم از برگ‌های خشک شده نمونه‌های هرباریومی استخراج شد. روش استخراج بر مبنای روش C TAB (Doyle and Doyle, 1987) همراه با اندکی تغییر است. در این تحقیق، از توالی ناحیه nrDNA ITS ژنوم هسته‌ای و توالی ژن *matK* کلروپلاستی برای ارزیابی فیلوژنتیک تاکسون‌های مطالعه شده، استفاده شد. به منظور انجام واکنش PCR برای توالی هسته‌ای nrDNA ITS از آغازگرهای (پرایمر) ITS₄ و ITS_{5m} (White *et al.*, 1990) یا آغازگرهای AB101F و AB102R (Douzery *et al.*, 1999) استفاده شد. همچنین، برای تکثیر ژن *matK* از آغازگرهای *trnk-F* و

روابط تبارشناختی میان این بخش و بخش‌های نزدیک به آن با استفاده از اطلاعات حاصل از صفات ریخت‌شناختی و داده‌های مربوط به بخش‌هایی از ژنوم هسته‌ای و کلروپلاستی ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

مطالعات ریخت‌شناسی

نمونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده و همچنین، نمونه‌های موجود در هرباریوم دانشگاه شهید بهشتی (SBUH) و هرباریوم مرکزی ایران (TARI) واقع در مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، برای مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی استفاده شدند. در مجموع ۱۵ گونه به عنوان درون‌گروه و همچنین دو گونه نیز بر اساس مطالعات مولکولی پیشین (Kazempour Osaloo *et al.*, 2003, 2005) به عنوان برون‌گروه وارد مطالعه شدند (جدول ۱). بر اساس منابع موجود و مطالعات انجام شده روی نمونه‌های بخش‌های مذکور، صفات متعددی انتخاب، و حالت‌های مختلف آنها برای گونه‌ها، یادداشت شدند. سپس، حالات مختلف این صفات بر اساس ارزش‌گذاری‌های عددی و به صورت نامرتب (unordered) که در آن، تغییر از حالتی به حالت دیگر صفت یک گام محسوب می‌شود، کددهی شدند. کددهی به حالات مختلف صفات ریخت‌شناختی، با استفاده از روش gap-coding انجام پذیرفت (Tiele, 1993) و تلاش شد تا این صفات به صورت گسسته بوده، محدوده حالات تعریف شده صفات با یکدیگر هم‌پوشانی نداشته باشند. مجموعاً ۲۶ صفت ریخت‌شناختی در این تحقیق استفاده شد که مشخصات این صفات به همراه حالات و کدهای مربوطه در جدول ۲ ارائه شده‌اند. شایان ذکر است که

۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها در دمای ۵۳ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه؛ و در پایان بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. تکثیر ناحیه *matK* نیز مشابه ITS بود؛ با این تفاوت که تعداد چرخه‌های واکنش به ۳۵ چرخه افزایش یافت و همچنین زمان بسط اولیه، با توجه به طول ناحیه مورد نظر، ۹۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

matK-R (Ooi *et al.*, 1995) استفاده گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۴ ارائه شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از برنامه بهینه شده با آغازگر مورد نظر و دستگاه‌های ترموسایکلر (Eppendorf, Germany; Astec, Japan) دارای ۹۶ چاهک انجام شد. برنامه PCR پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش، بدین شرح است: برای تکثیر قطعه ITS: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵۰ ثانیه؛ ۲۷ چرخه واکنش PCR (واسرشتگی در دمای

جدول ۱- گونه‌های استفاده شده در مطالعه حاضر و مشخصات هرباریومی و مولکولی گونه‌ها

شماره ثبت توالی در بانک ژن	مشخصات هرباریومی (vucher)	بخش (section)	گونه
ITS: AB727530 <i>matK</i> : AB727537	تهران، رباط کریم، ۷۲۲۹۶ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>Astragalus brachyodontus</i> Boiss.
ITS: AB727531 <i>matK</i> : AB727538	۳۰ کیلومتری قزوین به منجیل، ۵۵۱۴۵ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>A. glochideus</i> Boiss.
ITS: AB727532 <i>matK</i> : AB727539	۲۲ کیلومتری خوی به سلماس، ۴۵۶۹۶ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>A. jodostachys</i> Boiss.
ITS: AB727533 <i>matK</i> : AB727540	مازندران، مرزن آباد، ۸۲۴۲۱ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>A. lunatus</i> Pall.
ITS: AB727534 <i>matK</i> : -	۲۰ تا ۴۰ کیلومتری گیوی از اردبیل، ۸۰۱۲۹ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>A. ornithopodioides</i> Lam.
ITS: AB727535 <i>matK</i> : AB727541	جلفا به چالدوران، ۳۴۷ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>A. shelkovnikovii</i> Grossh.
ITS: AB727536 <i>matK</i> : AB727542	آذربایجان، ۱۳ کیلومتری ونیار به اهر، ۸۲۵۱۲ (TARI)	<i>Ornithopodium</i>	<i>A. stevenianus</i> DC.
ITS: AB721936 <i>matK</i> : AB727543	شاهرود، کوه راز، ۲۰۱۱۲ (SBUH)	<i>Dissitiflora</i>	<i>A. argyroides</i> Beck.
ITS: AB721944 <i>matK</i> : AB727544	آباد، مهنستان، ۲۱۸۳ (TARI)	<i>Dissitiflora</i>	<i>A. pravitzii</i> Podl.
ITS: AB721945 <i>matK</i> : AB727545	سمنان، شاهرود، جنوب کوه راز، ۲۰۱۱۸ (TARI)	<i>Dissitiflora</i>	<i>A. ruscifolius</i> Boiss.
ITS: AB727518 <i>matK</i> : AB727546	۱۶ کیلومتری اهر به طرف تبریز، ۸۴۰۱۱ (TARI)	<i>Onobrychoidei</i>	<i>A. onobrychis</i> L.
ITS: AB727511 <i>matK</i> : AB727547	۴۵ کیلومتری شمال مشهد، ۲۱۳۶۶ (TARI)	<i>Onobrychoidei</i>	<i>A. brevidens</i> Freyn & Sint.
ITS: AB727513 <i>matK</i> : AB727548	ماکو، چالدوران به طرف خوی، مهملو، ۸۴۰۷۴ (TARI)	<i>Onobrychoidei</i>	<i>A. cancellatus</i> Bunge.
ITS: AB727521 <i>matK</i> : AB727549	ماکو، ۱۱ کیلومتری شوط به طرف چالدوران، ۸۲۵۵۵ (TARI)	<i>Onobrychoidei</i>	<i>A. sevangensis</i> Grossh.
ITS: AB727516 <i>matK</i> : AB727550	۲۰ کیلومتری فیروز کوه به طرف سمنان، ۵۸۹۶۲ (TARI)	<i>Onobrychoidei</i>	<i>A. lilacinus</i> Boiss.
ITS: AB051966 <i>matK</i> : (Kazempour Osaloo <i>et al.</i> , Unpubl. data)	بلوچستان، راسک به طرف سرباز ۱۰۱۰۸ (TARI)	<i>Caraganella</i>	<i>A. stocksii</i> Benth.
ITS: AB231092 <i>matK</i> : (Kazempour Osaloo <i>et al.</i> , Unpubl. data)	فلور شوروی سابق، ۵۷۳۲ (TARI)	<i>Cenanthrum</i>	<i>A. frigidus</i> (L.) Gray.

جدول ۲- صفات ریخت‌شناختی و کدگذاری حالت‌های استفاده شده در تحقیق حاضر

Habit
#1. Height: ≤15 cm (0), 15-50 cm (1), >50 cm (2)
Stem
#2. Branching: low (0), high (1)
Stipule
#3. Stipule size: ≤ 2 mm (0), > 2 mm (1)
#4. Stipule color: greenish (0), white (1)
#5. Hair compression: dispersed (0), dense (1)
#6. Hair color: only white (0), white mixed with black (1)
Leaf
#7. Leaf size: ≤ 2 cm (0), 2-7 cm (1), > 7 cm (2)
#8. Leaflet pairs no.: ≤ 3 (0), 3-10 (1), > 10 (2)
#9. Leaflet L/W ratio: ≤ 1.5 (0), > 1.5 (1)
#10. Leaflet shape: linear (0); oblong elliptic (1), obovate (2)
#11. Leaflet indumenta type: both sides densely covered (0), both sides dispersedly covered (1), one side densely and other one dispersedly covered (2)
Inflorescence
#12. Black hair on peduncle: absent (0), presence (1)
#13. Inflorescence type: sparse raceme (0), dense raceme (1), head (2)
Calyx
#14. Calyx type: campanulate (0), tubular (1), gibbose tubular (2)
#15. Calyx hair symmetry: symmetrical (0), asymmetrical (1)
#16. Calyx teeth type: equal (0), unequal (1)
#17. Calyx teeth internal surface hair: absent (0), presence (1)
Corolla
#18. Corolla color: yellow (0), purple (1), blue (2)
#19. Standard L/W ratio: ≤ 2.5 (0), > 2.5 (1)
#20. Standard shape: elliptic (0), obovate (1), rhomboid (2)
#21. Standard tip: obtuse (0), acute (1), emarginated (2)
Style
#22. Style hair: absent (0), presence (1)
Pod
#23. Pod shape: linear (0), elliptic (1)
#24. Pod L/W ratio: ≤ 3 (0), 3-15 (1), > 15 (2)
#25. Hair compression on pod: dispersed (0), dense (1)
#26. Black hair on pod: absent (0), presence (1)

جدول ۳- ماتریس عددی حاصل از کددهی حالات مختلف صفات ریخت‌شناختی

Character No.	1111111112222222
Taxa	12345678901234567890123456
<i>A. frigidus</i>	2110012102200000001210001
<i>A. stoksii</i>	21000000020100010001210100
<i>A. pravitzii</i>	00010011120002000000210000
<i>A. ruscifolius</i>	10000010120102001011200000
<i>A. argyroides</i>	10100011120102001211210001
<i>A. brachyodontus</i>	11110111110101011202200100
<i>A. jodostachys</i>	11110112111101010201100111
<i>A. glochideus</i>	11111112111101011201100111
<i>A. lunatus</i>	11110112111001001110100101
<i>A. ornithopodioides</i>	11100112120120001202200110
<i>A. shelkovnikovii</i>	11100111000111011202100110
<i>A. stevenianus</i>	11111111110111011211110101
<i>A. onobrychis</i>	11110112111101011212101110
<i>A. cancellatus</i>	11111121110111011211110101
<i>A. lilacinus</i>	11110102111101011212101110
<i>A. brevidens</i>	11111111110121101212000110
<i>A. sevangensis</i>	1111112101120101211200110

جدول ۴- توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز، F: پرایمر پیشرو، R: پرایمر معکوس

ناحیه	نام پرایمر	توالی پرایمر
ITS ₁ +ITS ₂	ITS5m (F)	5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'
	ITS4 (R)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
	AB101F	5'-AGGAATTCATGGTCCGGAAGTC-3'
	AB102R	5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3'
matK	trnK-F	5'-GTATCGCACTATGTATCATTTGA-3'
	matK-R	5'-TTGCATAGAAATAGATTTCGCTCAAAA-3'

منظور کاهش اثر هموپلازی (هم‌نمایی) در میان صفات ریخت‌شناختی، از روش وزن‌دهی مجدد صفات (reweighting) با استفاده از شاخص Rescaled RC (Consistency Index استفاده شد (Farris, 1989). پس از سه دور وزن‌دهی مجدد، هیچ تغییری در شاخص‌های درختان به دست آمده، مشاهده نشد. لذا پس از این مرحله، درخت مطلق مرکزی به روش بیشینه صرفه‌جویی محاسبه و ارائه شد. به منظور ارزیابی حدود اطمینان شاخه‌ها، از روش بوتسترپ (bootstrap) (Felsenstein, 1985) استفاده شد.

داده‌های مولکولی: در ابتدا کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Bioedit، ویرایش شده، سپس توالی‌های مورد اشاره با استفاده از نرم‌افزار Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) هم‌ردیف گردیدند. سپس ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده برای هر دو قطعه DNA مورد نظر، به کمک نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۱۲ (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) به صورت جداگانه و ترکیب با یکدیگر، بررسی و تحلیل شدند. برای انجام آنالیز فیلوژنی بر اساس روش Bayesian، با استفاده از برنامه MrModeltest نسخه ۲/۳ و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion)، مدل‌های تکاملی مناسب برای داده‌های مورد نظر، انتخاب شدند (Posada and Buckley, 2004). طبق این آزمون، به ترتیب مدل‌های SYM+I+G برای توالی nrDNA ITS، GTR+I برای ژن *matK* کلروپلاستی و HKY+I برای ماتریس داده‌های ترکیبی، انتخاب شده

پس از اطمینان از صحت PCR و تکثیر قطعه مورد نظر به کمک الکتروفورز روی ژل آگاروز، تک باندهای قوی (۲۰ نانوگرم) و فاقد باند اضافی و کشیدگی به منظور تعیین توالی به پژوهشگاه فناوری‌های نوین جهاد دانشگاهی ابن سینا (تهران)، ارسال شد و توسط بخش تحقیقات ژنتیک مولکولی این پژوهشگاه توسط دستگاه ABI Genetic analyzer 3130 تعیین توالی گردید. برای توالی‌یابی ناحیه ITS nrDNA از آغازگرهای ITS_m یا AB101F و برای توالی‌های کلروپلاستی از *trnK-F* استفاده شد.

آنالیزهای فیلوژنتیک

داده‌های ریخت‌شناختی: آنالیز فیلوژنتیکی پس از تشکیل ماتریس داده‌ای، به کمک نرم‌افزار PAUP* نسخه 4b10 (Swofford, 2002) و با استفاده از روش بیشینه صرفه‌جویی (maximum parsimony) انجام شد. کدگذاری صفات به صورت نامرتب است. ابتدا همه صفات به صورت هم‌وزن (equal weighting) وارد آنالیز شدند. کلیه صفات وارد شده، از نظر بیشینه صرفه‌جویی، حاوی اطلاعات بودند. تنظیمات مراحل مختلف آنالیز بدین صورت بود که از روش جستجوی اکتشافی (heuristic) با روش افزایش گام به گام و تصادفی با ۱۰۰۰ تکرار و روش بهینه‌سازی حالات صفات ACCTRAN، به همراه تکنیک مبادله شاخه به روش دونیمه‌سازی درخت و اتصال مجدد (TBR) استفاده شد. کلیه کوتاه‌ترین درختان به دست آمده از آنالیز، خلاصه شده و به صورت درخت مطلق مرکزی (strict consensus tree) ارائه گردید. در ادامه، به

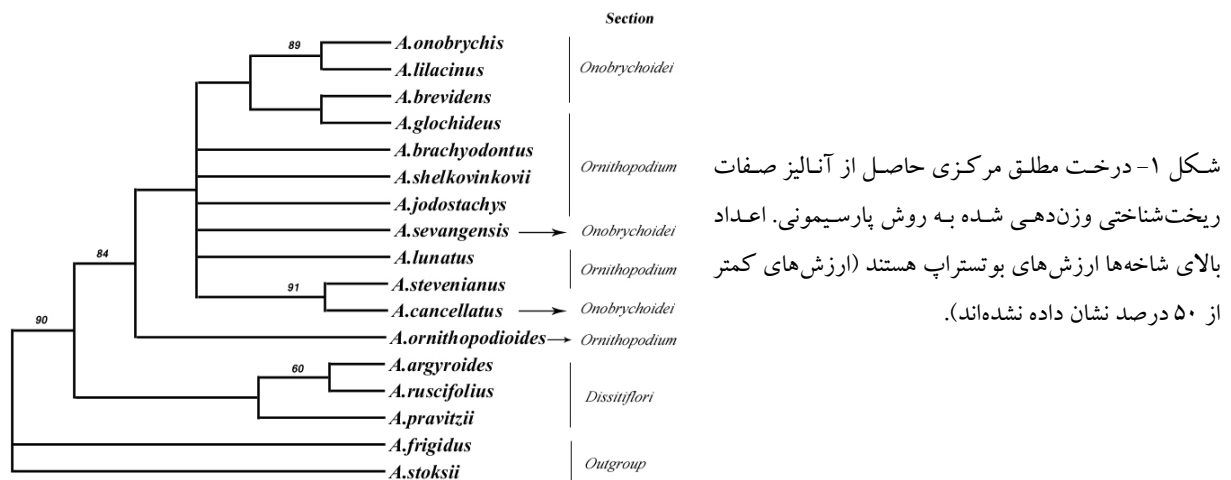
۰/۶۸۹ منجر گردید. در درخت مطلق مرکزی حاصل از این آنالیز که بر روی صفات ریخت‌شناسی هم‌وزن انجام شد، گونه‌های بخش *Ornithopodium* و *Onobrychoidei*، یک کلاد واحد با پلی‌تومی بالا تشکیل دادند. همچنین در این درخت سه گونه *A. pravitzii*، *A. argyroides*، *A. ruscifolius* به همراه با تشکیل یک شاخه مجزا، از بقیه گونه‌ها جدا می‌شوند (این درخت نشان داده نشده است). به منظور کاهش اثر هم‌پلازی صفات، از روش وزن‌دهی مجدد بر اساس شاخص RC استفاده شد که در نهایت سه درخت به عنوان کوتاه‌ترین درخت با طول ۲۶ گام و شاخص پایداری برابر ۰/۷۳۰ و شاخص ابقا برابر با ۰/۸۱۱ به دست آمد. درخت مطلق مرکزی این سه درخت همراه با ارزش‌های بوتسترپ در شکل ۱ ارائه شده است. توپولوژی کلی این درخت با درخت حاصل از آنالیز صفات هم‌وزن یکسان است، با این تفاوت که رابطه برخی گونه‌ها با یکدیگر حل شده است. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، تمام گونه‌های بخش‌های *Ornithopodium* و *Onobrychoidei* در کنسار یکدیگر قرار داشته و از اعضای بخش *Dissitiflori* جدا شده‌اند. در اینجا نیز گونه‌های دو بخش اول، به صورت آمیخته با یکدیگر قرار دارند. به طوری که در برخی موارد دو گونه با هم تشکیل گروه خواهری داده، رابطه بعضی دیگر، به صورت حل نشده باقیمانده است (شکل ۱).

و با استفاده از برنامه MrBayes نسخه ۳/۱۲ آنالیزهای فیلوژنتیک انجام شد. برای هر ماتریس، دو اجرای جداگانه به منظور دستیابی به نمونه‌های خوبی از توزیع احتمال پسین (حمایت شاخه‌ای) (PP, Posterior Probability)، برای دو میلیون نسل اجرا شد و هر صد نسل، یک درخت نمونه‌برداری شد. پس از پایان اجرای برنامه، میانگین انحراف معیار برای توالی‌های هسته‌ای، ژن *matK* کلروپلاستی و ماتریس ترکیبی، به ترتیب ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۳ بود. در نهایت، پس از تکمیل آنالیزهای مربوطه، ۲۵ درصد درختان جمع‌آوری شده، سوزانده و باقیمانده آنها به صورت درخت اجمالی ۵۰ درصد همراه با مقادیر مربوط به حمایت شاخه‌ای (PP) در بخش نتایج ارائه شدند. حمایت شاخه‌ها در روش Bayesian با اعداد مربوط به احتمال پسین بیان می‌شود. به منظور ارزیابی ترکیب‌پذیری داده‌های مربوط به دو ناحیه مختلف ژنومی، آزمون تفاوت طول ناسازگاری (ILD test) به وسیله نرم‌افزار Paup انجام شد (Farris et al., 1995).

نتایج

مطالعه داده‌های ریخت‌شناختی

آنالیز فیلوژنتیک ویژگی‌های ریخت‌شناختی به روش بیشینه صرفه‌جویی در ابتدا به ایجاد ۸ کوتاه‌ترین درخت (most parsimonious) به طول ۸۳ گام و شاخص پایداری (CI, Consistency Index) برابر با ۰/۵۳۸ و شاخص ابقا (RI, Retention Index) برابر با



داده، باقیمانده گونه‌ها تشکیل تباری دیگر را می‌دهند (شکل ۳). درون تبار اخیر، که گونه‌های بخش *Ornithopodium* و *Onobrychoidei* را شامل می‌شود، دو زیرشاخه تشکیل شده که یکی دیکوتومی *A. glochideus* و *A. brachyodontus* با حمایت ۸۸/۰ و دیگری یک تبار چند شاخه از گونه‌های هر دو بخش است. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، گونه‌های دو بخش مذکور بر اساس اطلاعات حاصل از توالی ژن *matK* به صورت آمیخته با هم قرار گرفته‌اند و درصد بالایی از تشابه را نشان می‌دهند. نتیجه این آنالیز بسیار شبیه به آنالیز داده‌های ITS است با این تفاوت که در آنالیز مربوط به ITS گونه *A. onobrychis* گروه خواری بقیه گونه‌های این بخش‌هاست.

آنالیز داده‌های ترکیبی حاصل از توالی‌های ITS و *matK*

نتیجه آزمون ILD تا حدودی نشان‌دهنده عدم تجانس فیلوژنی میان داده‌های این دو ناحیه است ($P=0.04$)، اما با توجه نظر برخی از پژوهشگران مبنی بر غیرقابل اعتماد بودن این آزمون در بیشتر موارد

مطالعه داده‌های مولکولی

داده‌های حاصل از nrDNA ITS

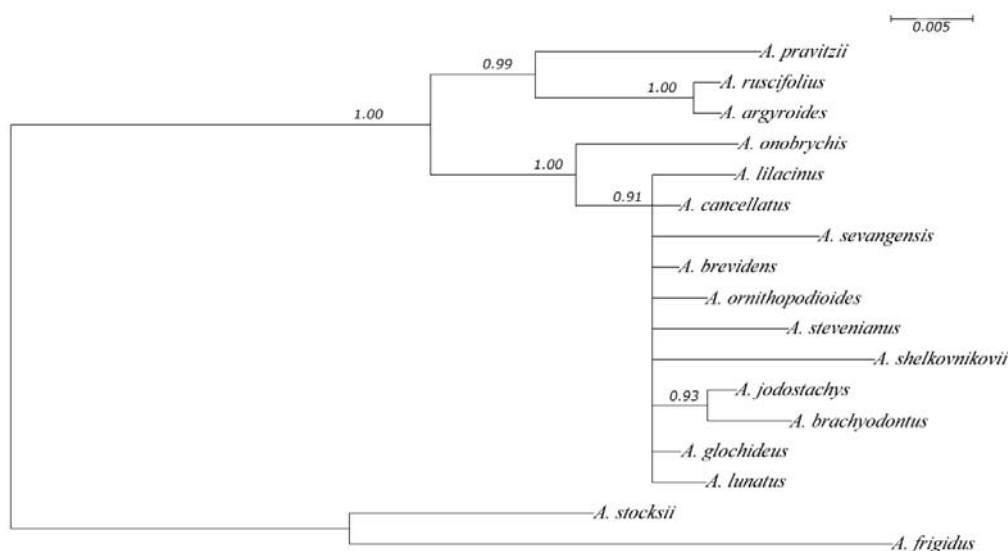
آنالیز داده‌های مربوط به توالی nrDNA ITS به روش Bayesian، یک درخت فیلوژنی با دو کلاد اصلی ایجاد کرد که سه گونه *A. argyroides*، *A. pravitzii* و *A. ruscifolius* در یک تبار با هم و بقیه گونه‌ها در تبار دوم قرار می‌گیرند (شکل ۲). توپولوژی کلی این درخت، مشابه درخت به دست آمده از آنالیز صفات ریخت‌شناختی است. با توجه به نتیجه این آنالیز، گونه *A. onobrychis* با حمایت ۹۱/۰ از سایر گونه‌های مطالعه شده جدا شده، به عنوان گروه خواری در کنار گونه‌های خویشاوند خود قرار می‌گیرد. همچنین، دو گونه *A. brachyodontus* و *A. jodostachys* گروه خواری تشکیل داده‌اند. به هر حال، روابط میان بقیه گونه‌های این دو بخش از جنس گون به صورت حل نشده باقی مانده است (شکل ۲).

داده‌های حاصل از توالی‌های *matK* کلروپلاستی

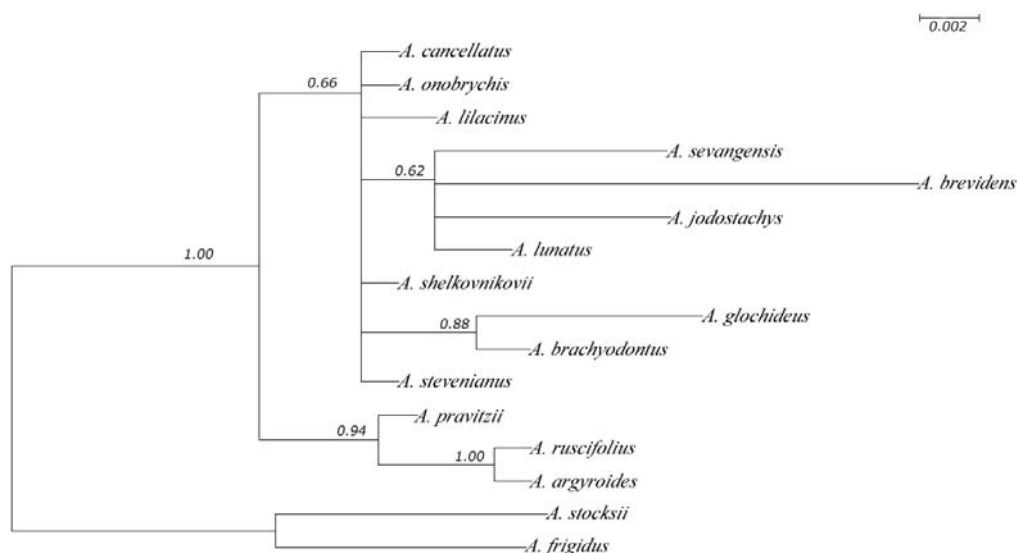
درخت فیلوژنی حاصل از این آنالیز دارای دو تبار عمده است، به طوری که سه گونه متعلق به بخش *Dissitiflori* با حمایت ۹۴/۰ تشکیل یک تبار مستقل

گرفته‌اند و تبار دوم که تبار بزرگتری است، گونه‌های *A. ruscifolius* و *A. pravitzii*، *A. argyroides* مطالعه شده از دو بخش *Ornithopodium* و *Onobrychoidei* را شامل می‌شود (شکل ۴). جدایی گونه‌های دو بخش اخیر از بخش *Dissitiflora* با عدد احتمال پسین ۱/۱۰۰ حمایت می‌شود.

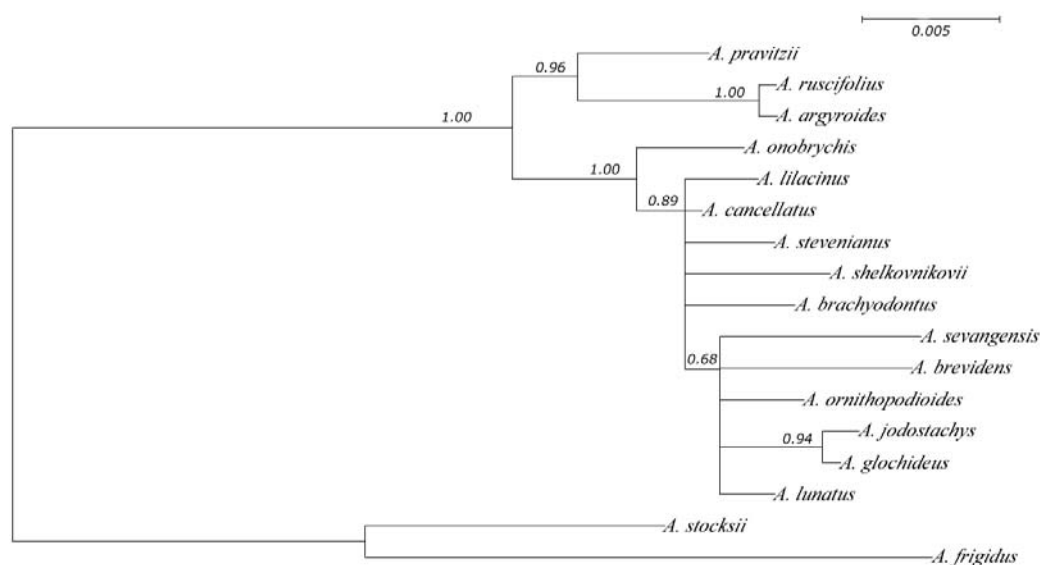
(Seelanan *et al.*, 1997; Wiens, 1998; Yoder *et al.*, 2001) و همچنین، شباهت کلی در توپولوژی درختان به دست آمده از ماتریس‌های داده‌ای منفرد، تصمیم گرفتیم داده‌های حاصل از این دو ناحیه ژنومی را به صورت ترکیب شده نیز آنالیز کنیم. درخت فیلوژنی حاصل از این آنالیز (شکل ۴)، شامل دو تبار اصلی است: درون یکی از این شاخه‌ها، سه گونه



شکل ۲- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه ITS به روش Bayesian. اعداد بالای شاخه به احتمال پسین (PP) مربوط هستند.



شکل ۳- درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های مربوط به ناحیه *matK* به روش Bayesian. اعداد بالای شاخه‌ها احتمال پسین (PP) یا همان اعداد مربوط به حمایت شاخه‌ها هستند.



شکل ۴- آنالیز داده‌های ترکیبی حاصل از توالی‌های ITS و *matK* به روش Bayesian. اعداد بالای شاخه‌ها، احتمال پسین (PP) یا همان اعداد مربوط به حمایت شاخه‌ها هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

بخش *Ornithopodium* از جنس گون، در اصل به وسیلهٔ Bunge (۱۸۶۸-۱۸۶۹) با ۹ گونه معرفی شد. این بخش امروزه حدود ۱۷ گونه در آسیای میانه و غربی و بخش‌هایی از اروپا را داراست و ۷ گونه از آنها در ایران می‌روید. بخش غربی حوزه ارمنی-ایرانی از ناحیه ایرانی-تورانی، به عنوان مرکز گونه‌زایی و تنوع این بخش در نظر گرفته می‌شود (Podlech, 1999).

این بخش از جنس گون بر اساس ویژگی‌هایی، همچون ساقه‌های علفی با میان‌گره‌های بلند؛ کرک‌های دو شاخه‌ای متقارن و خوابیده در سطح گیاه؛ کاسه استکانی شکل و میوه‌های خطی و طویل، قابل تشخیص است (Maassoumi, 2005). بخش *Ornithopodium* به علت دارا بودن میوه‌های خطی و طویل، و میانگره‌های بلند دارای اشتراکاتی با بخش *Dissitiflori* است، اما بر اساس صفات مربوط به کاسه و جام گل به راحتی از هم جدا می‌شوند (Ranjbar, 2004). بخش *Onobrychoidei* از جنس گون نیز یک

بخش بسیار نزدیک از نظر ریخت‌شناختی به بخش *Ornithopodium* است. این بخش شامل گیاهانی چندساله با ساقه‌های علفی و میانگره‌های طویل، کاسه گل استکانی شکل و میوه‌های بیضوی یا بیضی کشیده است. بارزترین تفاوت این بخش با بخش *Ornithopodium* در شکل میوه است، به طوری که میوه در بخش اخیر، خطی-هلالی است. با توجه به این صفت، ارتباط اورنیتوپودیوم با بخش دیسیتی فلوری بیشتر مشخص می‌شود، اما از نظر شکل و اندازه کاسه و گل، بیشتر به بخش *Onobrychoidei* ارتباط می‌یابد (Ghahremani-Nejad, 2004; Maassoumi, 2005). آنالیزهای تبارشناختی روی صفات ریخت‌شناختی در تحقیق حاضر، نشان داد که اعضای بخش *Ornithopodium* در ارتباط بسیار نزدیک با بخش *Onobrychoidei* هستند (شکل ۱). به هر حال، در هر دو آنالیز تبارشناختی روی صفات هم‌وزن و وزن‌دهی شده، تمام گونه‌های مربوط به این دو بخش به صورت آمیخته با هم، تشکیل یک تبار واحد را می‌دهند، که

بنابراین، نتایج ما، نشان‌دهنده ارتباط بسیار نزدیک خویشاوندی و تبارشناختی دو بخش اخیر است. این یافته، در انطباق با مطالعات قبلی کلاسیک و مولکولی است که با استفاده از میکرومورفولوژی بذر و یا توالی nrDNA ITS بر روی بخش‌های مذکور از جنس *Astragalus* انجام شده است.

A. pravitzii نخستین بار توسط Podlech به عنوان یک گونه جدید و بوم‌زاد از فلور ایران و متعلق به بخش *Dissitiflora* معرفی شد (Podlech, 2001). در جدیدترین بازنگری انجام شده بر روی گونه‌های منطقه فلورا ایرانیکا، Podlech و Sytin (۲۰۱۰) گونه *A. pravitzii* را از بخش مذکور جدا و به بخش *Ornithopodium* منتقل کردند. نتیجه آنالیز تبارشناختی صفات ریخت‌شناختی و همچنین، نتایج کلیه آنالیزهای فیلوژنی مولکولی انجام شده در این تحقیق، نشان می‌دهند که این گونه هیچ وابستگی به بخش *Ornithopodium* نداشته و بنابراین، انتقال آن به این بخش تأیید نشده است و این گونه مجدداً به بخش *Dissitiflora* منتقل می‌شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی به خاطر حمایت مادی بخشی از این تحقیق، طی طرح پژوهشی مصوب آن معاونت محترم، تشکر می‌شود.

اگرچه روابط درون این تبار به خوبی حل نشده، اما نشان‌دهنده ارتباط نزدیک مورفولوژیک این دو بخش با هم و تمایز آنها از اعضای بخش *Dissitiflora* است. در مطالعه جامعی که چارچوب فیلوژنی کل جنس *Astragalus* را بررسی کرده است، نماینده‌های استفاده شده از دو بخش *Ornithopodium* و *Onobrychoidei*، بدون هیچ گونه تفکیک قابل ملاحظه‌ای درون یک زیرشاخه از تبار بزرگ "F" قرار دارند (Kazempour Osaloo et al., 2003, 2005). همچنین، در مطالعه‌ای که اخیراً بر اساس صفات مربوط به ریخت‌شناسی و ریزریخت‌شناسی دانه روی اعضای این دو بخش انجام شده، بیان شد که اعضای این دو بخش از نظر صفات مذکور، کاملاً وابسته به هم بوده، هیچ تمایزی را بر اساس ویژگی‌های دانه نشان نمی‌دهند (Vural et al., 2008). آنالیز دو ناحیه مختلف ژنومی در این مطالعه، به صورت جداگانه و ترکیب شده دارای نتایج تقریباً مشابهی است. در کلیه آنالیزهای مولکولی انجام شده در تحقیق حاضر، گونه‌های مربوط به بخش *Dissitiflora* (*A. ruscifolius* و *A. argyroides*) به همراه گونه *A. pravitzii*، با هم تشکیل یک تبار واحد و جدا از بقیه گونه‌ها را می‌دهند (شکل‌های ۲، ۳ و ۴) و اعضای دو بخش *Ornithopodium* و *Onobrychoidei* نیز به صورت پراکنده در بین یکدیگر و درون دیگر تبار مجزا قرار می‌گیرند.

منابع

- Bunge, A. (1868-1969) *Generis Astragali species gerontogae*. Académie Impériale des Sciences Publications, St. Pétersbourg.
- Douzery, E., Pridgeon, A., Kores, P., Linder, H. P., Kurzweil, H. and Chase, M. (1999) Molecular phylogenetics of *Diesaea* (Orchidaceae): A contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *American Journal of Botany* 86(6): 887-899.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf

- tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Farris, J. S. (1989) The Retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-419.
- Farris, J. S., Kallersjo, M., Kluge, A. G. and Bult, C. (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ghahremani-Nejad, F. (2004) The Sections of *Astragalus* L. with bifurcating hairs in Iran. *Turkish Journal of Botany* 28: 101-117.
- Gontscharov, N. F., Borissova, A. G., Gorschkova, S. G., Popov, M. G. and Vassilczenko, I. T. (1946) *Astragalus*. In: Flora of USSR (eds. Komarov, V. L. and Shishkin, B. K.) 12: 1-681. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow.
- Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A. and Murakami, N. (2003) Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences. *Plant Systematics and Evolution* 242: 1-32.
- Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A. and Murakami, N. (2005) Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia* 57: 367-381.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lock, J. M. and Simpson, K. (1991) Legumes of West Asia. A Check-List. Royal Botanical Gardens, Kew.
- Maassoumi, A. A. (1998) New findings on the genus *Astragalus* L. in Iran. *Iranian Journal of Botany* 7: 221-226.
- Maassoumi, A. A. (2003) Papilionaceae (*Astragalus* I). In: Flora of Iran, the genus *Astragalus* in Iran (eds. Assadi, M. and Maassoumi, A. A.) 43: 1-386. Research Institute of Forests and Rangelands Publications, Tehran.
- Maassoumi, A. A. (2005) The Genus *Astragalus* in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran, Iran.
- Maddison, W. P., Donoghue, M. J. and Maddison, D. R. (1984) Outgroup analysis and parsimony. *Systematic Zoology* 33: 83-103.
- Ooi, K., Endo, Y., Yokoyama, J. and Murakami, N. (1995) Useful primer designs to amplify DNA fragment of the plastid gene *matK* from angiosperm plants. *Journal of Japanese Botany* 70: 328-333.
- Podlech, D. (1982) Neue aspekte zur evolution und gliederung der gattung *Astragalus* L.. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung Munchen* 18: 359-378.
- Podlech, D. (1999) New Astragali and Oxytropis from North Africa and Asia, including some new combinations and remarks on some species. *Sendtnera* 6: 135-147.
- Podlech, D. (2001) Contribution to the knowledge of the genus *Astragalus* L. (Leguminosae) VII-X. *Sendtnera* 7: 163-201
- Podlech, D. and Sytin, A. (2010) Papilionaceae VI: *Astragalus* section *Ornithopodium*. In: Flora Iranica (ed. Rechinger, K.H.) 178: 173-184. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz-Austria.
- Posada, D. and Buckley, T. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systems*

- Biology 7 53: 793-808.
- Ranjbar, M. (2004) *Astragalus* sect. *Dissitiflora* (Fabaceae) in Iran. Nordic Journal of Botany 24(5): 523-531.
- Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Seelanan, T., Schnabel, A. and Wendel, J. F. (1997) Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). Systematic Botany 22: 259-290.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), ver. 4.0b10. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.
- Tiele, A. (1993) The holy grail of the perfect characters: the cladistics treatment of morphometric data. Cladistics 9: 275-304.
- Vural, C., Ekici, M., Akan, H. and Aytac, Z. (2008) Seed morphology and its systematic implications for genus *Astragalus* L. sections *Onobrychoidei* DC., *Uliginosi* Gray and *Ornithopodium* Bunge (Fabaceae). Plant systematics and evolution 274: 255-263.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications (eds. Innis, M., Gelfand D., Sninsky, J. and White, T.) 315-322. Academic Press, San Diego.
- Wiens, J. J. (1998) Combining data sets with different phylogenetic histories. Systems Biology 47: 568-581.
- Wojciechowski, M. F., Sanderson, M. J. and Hu, J. M. (1999) Evidence on the monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL intron data. Systematic Botany 24: 409-437.
- Yakovlev, G. P., Sytin, A. K. and Roskov, Y. R. (1996) Legumes of Eurasia, a check-list. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Yoder, A. D., Irwin, J. A. and Payseur, B. A. (2001) Failure of the ILD to determine data combinability for slow Loris phylogeny. Systems Biology 50: 408-424.

**Phylogenetic study of some bifurcate hairy sections belonging to
Astragalus L. with emphasis on sect. *Ornithopodium*, based on
morphological and molecular data in Iran**

**Abbas Saidi^{1*}, Reza Sheikh Akbari Mehr², Shahrokh Kazempour Osaloo³
Ali Asghar Maassoumi⁴ and Majid Ghorbani Nahooji²**

¹ Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

² Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴ Research Institutes of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

Abstract

In this research, total of 15 species belonging to *Astragalus* section *Ornithopodium* as well as its closely related ones were analyzed using morphological and molecular data. *A. frigidus* and *A. stocksii* were selected as outgroups based on previous studies. Based upon our results, species of sect. *Ornithopodium* along with those of sect. *Onobrychoidei* were placed within a single large clade with high support and are closely related taxa. Species from section *Dissitiflori* formed a distinct clade from the two other studied sections. Based on our molecular and morphological data, *Astragalus pravitzii* Podlech, which had been recently transferred to the section *Ornithopodium* from the section *Dissitiflori*, was not affiliated with that section.

Key words: Phylogeny, Cladistic, *Astragalus*, *Dissitiflori*, *Ornithopodium*, *Onobrychoidei*

*Corresponding Author: abbas.saidi@gmail.com