

بیوسیستماتیک و فیلوژنی مولکولی (*Cousinia* sect. *Lachnosphaerae*)

در ایران (Asteraceae)

مژگان صادقی رشتی* (نویسنده مسئول) smozhgan11@yahoo.com، مصطفی اسدی^۱، طاهر نژادستاری^۱ و ایرج مهرگان^۱

۱: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲: بخش گیاهشناسی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، ایران.

Biosystematics and molecular phylogeny of *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* (Asteraceae)

Mozhgan Sadeghi-Rashti (corresponding author)*1, Mostafa Assadi2, Taher Nejadstari1 & Iraj Mehregan1

1. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Botany, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran.

* E-mail: smozhgan11@yahoo.com

Abstract

Cousinia sect. *Lachnosphaerae* in Iran includes a small group of herbs with intermediate forms. In this study, herbarium specimens collected from different part of its distribution range were studied morphologically and molecularly. Maximum parsimony (MP) and Bayesian (BA) analysis of ITS and ETS datasets showed that all Iranian species of this section formed a monophyletic group. Our results also showed that the using ETS marker was resulted in a better resolution of species and closely related taxa. Monophyletic groups formed in the analysis of ITS+ETS markers of the section, showed a distinct geographical pattern including: 1) a clade formed by two samples of *C. lachnosphaera* from NE Iran, 2) a clade formed by three samples of *C. eriobasis* from C Iran, and 3) a clade formed by samples of three species *C. gabriellae*, *C. chrysochlora* and *C. gedrosiaca* from SE Iran. Based on our results, we suggest reducing the number of Iranian species of the section from six to three.

Keywords: Molecular Phylogeny, Iran, Taxonomy, *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae*.

چکیده

Cousinia sect. *Lachnosphaerae* در ایران شامل گروهی کوچک از گونه‌های علفی با اشکال حدواسط است. در این مطالعه، نمونه‌هایی از مناطق مختلف پراکنش آن جمع‌آوری و مورد بررسی‌های مورفولوژی و مولکولی قرار گرفت. آنالیزهای پارسیمونی (Maximum Parsimony) و بایسی (Bayesian) داده‌های دو مارکر هسته‌ای ITS و ETS نشان داد که گونه‌های این بخش همگی گروهی تک‌نیا را تشکیل می‌دهند. نتایج نشان داد که مارکر ETS قابلیت بیشتری نسبت به ITS در تفکیک گونه‌ها و گروه‌های نزدیک به هم دارد. گروه‌های بازایی شده در آنالیز مارکرهای ETS + ITS و ETS الگوی جغرافیایی مشخصی را نشان داد. این الگو به صورت شاخه‌ای شامل دو نمونه از گونه *C. lachnosphaera* از شمال شرقی ایران، شاخه‌ای دوم شامل سه نمونه از گونه *C. eriobasis* از مناطق مرکزی ایران و شاخه سوم شامل سه گونه *C. gabriellae*، *C. chrysochlora* و *C. gedrosiaca* از شرق و جنوب شرقی ایران بود. نتایج بدست آمده در کنار سایر شواهد، تعداد گونه‌های پذیرفته شده این بخش در ایران را به سه گونه کاهش داد.

کلمات کلیدی: فیلوژنی مولکولی، ایران، تاکسونومی، *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae*

است. مارکرهای کلروپلاستی قدرت تفکیکی به مراتب کمتر از مارکر ITS (Internal Transcribed Spacer) نشان داده است (López-Vinyallonga & al. 2009) و استفاده از آن برای سطوح تاکسونومیک پایین مناسب نیست. با توجه به اینکه مارکر ITS به تنهایی قدرت تفکیک کافی در سطح پایین‌تر از جنس در شاخه Cousinioid را ندارد، به همین دلیل استفاده از مارکر مولکولی مناسب با قدرت تفکیک بالاتر ضروری است.

Cousinia sect. *Lachnosphaerae* Rech. f. بخش‌های متعلق به گروه Cousinioid است که اکثر گونه‌های آن محدود به ایران بوده، مرزبندی دقیق و تعداد گونه‌های آن مشخص نیست (Rechinger, 1972, 1979). این بخش شامل گونه‌های معمولاً چندساله، با برگ‌های خاردار چرمی-علفی، کپه‌های کمابیش گرد، با بیش از ۵۰ برگه خطی خارمانند و بیش از ۶۰ گل معمولاً رنگ روشن است. مطالعه دقیق این بخش می‌تواند به حل مشکلات تاکسونومیک کل جنس *Cousinia* کمک کند.

هدف این مطالعه بررسی فیلوژنی گونه‌های *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* در ایران با کمک دو مارکر ITS و ETS (External Transcribed Spacer) استفاده از بررسی سطح دانه‌گرده بوسیله میکروسکوپ الکترونی SEM است. مارکر مولکولی ETS همانند مارکر ITS دارای توارث دو والدی و با الگوی تکاملی مشابه است (Baldwin & Markos, 1998). بررسی این مارکر در گیاهان دیگر نشان داده که نرخ جانمایی بازها در آن همسان و یا سریع‌تر از مارکر ITS است. این مقاله هم‌چنین بر آن است که با بررسی مارکر ETS نشان دهد تا چه میزان از آن برای کمک به بهبود فیلوژنی گروه Cousinioid استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد بررسی شامل نمونه‌های هرباریومی و یا جمع‌آوری شده از طبیعت متعلق به ۵ گونه از *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* بود. از هر گونه بین ۱ تا ۳ نمونه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). علاوه بر

جنس *Cousinia* Cass. از خانواده Asteraceae که دارای بیش از ۶۳۰ گونه در دنیا است، یکی از ۵۰ جنس بزرگ گیاهان گلدار به شمار می‌آید (Sussana & Garcia-Jacas, 2006 و Frodin, 2004). این جنس به عنوان دومین جنس بزرگ گیاهان گلدار در ایران (با بیش از ۲۰۰ گونه) می‌باشد که اهمیت زیادی در پوشش مناطق خشک و نیمه خشک ایران دارد (Rechinger, 1972, 1979). مطالعات مورفولوژیک سنتی تاکنون در حل مسائل تاکسونومیک این جنس ناکام مانده است (López-Vinyallonga & al. 2009). با توجه به ناکافی بودن شواهد مورفولوژیک و دیگر مطالعات سنتی در حل مسائل تاکسونومیک گروه‌های مختلف این جنس، استفاده از ابزارهای مدرن شامل مطالعات مولکولی و گرده‌شناسی در این مورد ضروری می‌نماید.

جنس *Cousinia* متعلق به کمپلکس تک نیایی *Arctium-Cousinia* complex است که در آن بر مبنای داده‌های مولکولی هسته‌ای و کلروپلاستی، صفات دانه‌گرده و عدد کروموزومی، دو شاخه قابل تشخیص است: الف: شاخه *Arctium* مانند با حدود ۳۰ گونه که در آن گروه‌های مختلف از هم قابل تفکیک هستند و ب: شاخه *Cousinia* مانند (Cousinioid) با حدود ۶۰۰ گونه که در آن گروه‌ها و گونه‌های مختلف بخوبی از یکدیگر قابل تفکیک نیستند (López-Vinyallonga & al. 2009) و (Mehregan & Kadereit, 2009). اکثر گونه‌های ایرانی این جنس (به جز ۳ گونه) متعلق به شاخه Cousinioid است که به تعداد زیادی بخش، با حدود گونه‌ای معمولاً ناواضح تقسیم شده است. به علاوه، در مواردی مرز بین بخش‌ها نیز روشن نیست. طبقه‌بندی کنونی جنس *Cousinia* عمدتاً بر پایه مطالعات مورفولوژیک است و تنها برخی از بخش‌هایی که در آن تشخیص داده شده، گروه‌های طبیعی به نظر می‌رسند. از جمله دلایلی که می‌توان برای این عدم تفکیک در شاخه Cousinioid بر شمرده، سن کم آن در مقایسه با تعداد بسیار زیاد گونه‌ها

سانتیگراد، ۴۵ ثانیه اتصال (annealing) در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و ۴۰ ثانیه امتداد (extention) در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. در پایان یک مرحله امتداد نهایی (final extension) ۷ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد (Linder et al., 2000).

به منظور اطمینان از وجود DNA تکثیر شده در واکنش PCR، از الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی با GelRed استفاده شد. پس از توالی‌یابی جهت یافتن و ویرایش خطاهای احتمالی، توالی نوکلئوتیدها ابتدا با استفاده از نرم افزار Sequencher و به صورت چشمی دقیقاً بررسی گردید. هم‌ردیف سازی توالی‌ها (Aligning) با استفاده از نرم افزار Mac Clade انجام شد.

از آنالیز توالی‌های ITS بدست آمده از این مطالعه در کنار توالی‌های ITS دیگر گونه‌های دیگر این جنس و سایر جنس‌های نزدیک، حاصل از مطالعات قبلی (López-Mehregan & Kadereit, 2009؛ Vinyallonga & al. 2009) و موجود در بانک ژن، برای یافتن جایگاه و بررسی تک نیا بودن اعضای این بخش استفاده گردید. پس از تعیین جایگاه گروه و یافتن گروه خواهری، آنالیز داده‌های ITS و ETS به صورت جداگانه و نیز با هم انجام شد.

آنالیز ماکزیمم پارسیمونی (Maximum Parsimony) ماتریس داده‌های هم‌ردیف سازی شده با استفاده از نرم افزار PAUP 4.0 (Swofford, 2002)، یافتن مدل تکاملی باها با استفاده از نرم افزار Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) و آنالیز بایسی (Bayesian) آن‌ها با استفاده از نرم افزار MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) 3.12 انجام شد. دانه‌های گرده گل‌های بالغ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره S.E.M بررسی و عکسبرداری شدند. عکس‌ها از مناظر قطبی و استوایی و سطوح مختلف دانه گرده تهیه گردید. صفات مورد اندازه‌گیری در این تحقیق شامل اندازه دانه گرده، قطرمنفذ، پهنای شیار، تزئینات

گونه‌های این بخش، گونه *C. turkmenorum* Bornm. از *Cousinia* sect. *Chrysoptera* Tscherneva که بر اساس نتایج آنالیز ITS به عنوان گروه خواهری در کنار گونه‌های این بخش قرار گرفته بود، به عنوان برون‌گروه (outgroup) انتخاب و بررسی شد.

ژنوم کامل بوسیله کیت استخراج Qiagen DNeasy plant mini kit و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده از برگ نمونه‌ها استخراج شد. تکثیر ناحیه ITS شامل (ITS1+5.8S+ITS2) به صورت یکپارچه و با کمک زوج پرایمر 18S-ITS (5'CCT TMT CAT YTA) (GAG GAA GGA G3' به عنوان رفت و پرایمر 28S-ITS (5'CCG CTT ATT KAT ATG CTT) (AAA3' به عنوان برگشت انجام شد. واکنش PCR شامل پیش تیمار حرارتی (preheating) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و متعاقباً ۳۵ چرخه حرارتی هر کدام شامل ۱۸ ثانیه واسرشتگی (denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه اتصال (annealing) در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد و ۶۰ ثانیه امتداد (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بود. پس از پایان چرخه‌ها، یک تیمار حرارتی (post-treatment) ۷۸ ثانیه‌ای در دمای ۵۲ درجه سانتیگراد و یک مرحله امتداد نهایی (final extension) ۸ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد (López-Mehregan & al. 2009). جهت تکثیر ناحیه ETS از پرایمر رفت ETS-1F (5'CTT TTT GTG CAT) (AAT GTA TAT ATA GGG GG3' و پرایمر برگشت 18S-2L (5'TGA CTA CTG GCA GGA) (TCA ACC AG3' استفاده شد (Linder et al., 2000). واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه شامل یک پیش تیمار حرارتی (preheating) اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، یک پیش تیمار حرارتی (preheating) ثانویه در دمای ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه، متعاقباً ۳۰ چرخه حرارتی هر کدام شامل ۴۵ ثانیه واسرشتگی (denaturation) در دمای ۹۴ درجه

از *C. eriobasis* با حمایت کم ۶۲٪ کنار هم قرار گرفته اند و یک گروه تک نیا را تشکیل داده اند. از گونه‌های نزدیک به اعضای این بخش که در موقعیت خواهری قرار گرفته اند، گونه *C. turkmenorum* از بخش *Chrysoptera* به عنوان برون گروه برای مطالعات دقیق تر در نظر گرفته شد.

آنالیز بایسی (Bayesian) داده‌های ITS گروه

Cousinia

پارامترهای بیشینه احتمال (ML) مجموعه داده‌ها شامل ۲۴۰ تاکسون به صورت زیر به دست آمده است: مدل انتخابی توسط نرم‌افزار (Model selected): SYM+I+G؛ با نرخ جانیشینی A-C = 0.7670؛ نرخ جانیشینی A-G = 2.8792؛ نرخ جانیشینی A-T = 1.5591؛ نرخ جانیشینی C-G = 0.3186؛ نرخ جانیشینی C-T = 11.8796؛ نرخ جانیشینی G-T = 1.0000؛ میزان جایگاه‌های غیرمتغیر (I) (Proportion of invariable site): 0.1775؛ پارامتر شکل پراکنش گاما (G) (Gamma distribution shape) parameter): 0.6229. آنالیز این مجموعه داده‌های بوسیله نرم افزار MrBayes و مطابق با روش ذکر شده در Mehregan & Kadereit (2009) انجام شد. درخت توافقی ۵۰ درصد به دست آمده از این آنالیز کاملاً مطابق با درخت اجماع قاطع حاصل از آنالیز پارسیمونی بود و در اینجا آورده نمی‌شود. در این درخت تک نیا بودن بخش *Lachnosphaera* را با احتمال پسین ۰.۹۹ تأیید شد. بخش *Lachnosphaera* شامل گونه‌های *lachnosphaera*, *C. chrysochlora*, *C. eriobasis*, *C. gabriellae*, *C. gedrosiaca*، است. در این بخش چهارنمونه از گونه از *C. eriobasis* با احتمال پسین ۰.۹۸ کنار هم واقع شده اند و یک گروه تک نیا تشکیل داده اند (شکل ۱). در این درخت گونه‌های *C. lachnosphaera*, *C. chrysochlora*, *C. gabriellae*, *C. gedrosiaca*، در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند و *C. turkmenorum* از بخش *Chrysoptera* در موقعیت خواهری نسبت به آنها قرار گرفته است.

سطح گرده می‌باشد که در جدول ۲ آمده است. صفات کمی مربوط به اندازه گیری دانه گرده با استفاده از نرم افزار Carnoy 2 (Leuven, Belgium) به دقت اندازه گیری شد.

نتایج

تعیین موقعیت *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* در

گروه *Cousinia*

آنالیز ماکزیمم پارسیمونی داده‌های ITS

(ITS1+5.8S+ITS2) گروه *Cousinia*

ابتدا آنالیز جامعی بر اساس داده‌های ITS برای تعیین موقعیت *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* در گروه *Cousinia* انجام شد. ماتریس داده‌های ITS شامل ۲۴۰ تاکسون بود. از این بین ۹ تاکسون متعلق به این مطالعه (جدول شماره ۱) و بقیه متعلق به مطالعات قبلی بود که در بانک ژن موجود است (Mehregan & Kadereit, 2009). ماتریس داده‌های ITS مجموعاً شامل ۴۹۰ کاراکتر (جایگاه)، از این میان ۲۰۸ جایگاه ثابت (constant)، ۹۰ جایگاه از نظر پارسیمونی غیراطلاعاتی (parsimony uninformative) و ۱۹۲ جایگاه باقیمانده از نظر پارسیمونی اطلاعاتی (parsimony informative) بودند. از مجمع ۱۰۰۰۰ درخت حاصل از آنالیز ماکزیمم پارسیمونی داده‌های ITS که به عنوان کوتاهترین درختان به دست آمد، درخت فیلوژنی توافقی اجماع قاطع (strict consensus) به طول ۱۲۱۶ گام (step)، با شاخص ثبات (CI) = ۰/۳۲۳ و شاخص پایداری (RI) = ۰/۷۲۹ به دست آمد که توپولوژی آن کاملاً مطابق با نتایج Mehregan & Kadereit (2009) بود و در اینجا آورده نمی‌شود. شکل ساده شده‌ای از درخت به دست آمده در شکل شماره ۱ آورده شده است. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده، تمامی گونه‌های ایرانی متعلق به بخش *Lachnosphaera* گروهی تک نیا با حمایت خوب ۷۹٪ تشکیل داده اند. این شاخه شامل گونه‌های *C. eriobasis*, *C. chrysochlora*, *C. gabriellae*, *C. gedrosiaca*، *C. lachnosphaera* و *C. turkmenorum* است. در این بخش چهارنمونه از گونه

فیلوژنی *Cousinia sect. Lachnosphaerae*

برای بررسی فیلوژنی گونه‌های بخش *Cousinia sect. Lachnosphaerae* ماتریس داده‌هایی شامل تمامی گونه‌های این بخش که در آنالیز قبلی به صورت یک گروه تک نیا مشاهده شده بود، در کنار گونه *C. turkmenorum* به عنوان برون گروه تشکیل شد و مورد آنالیز ماکزیموم پارسیمونی قرار گرفت.

آنالیز ماکزیموم پارسیمونی داده‌های ITS گروه *Lachnosphaerae* ماتریس داده‌های ITS شامل ۹ تاکسون (جدول ۱) و ۴۷۸ کاراکتر (جایگاه) بود. از این میان، ۴۵۴ جایگاه ثابت (۹۵٪)، ۲۲ جایگاه از نظر پارسیمونی غیراطلاعاتی (۴.۵٪) و ۲ جایگاه باقیمانده از نظر پارسیمونی اطلاعاتی (۰.۴٪) بودند. بر اساس نتایج، درخت فیلوژنی توافقی (strict consensus) از ۶ درخت به طول ۲۴ گام (step) دارای شاخص‌های آماری با شاخص ثبات (CI) = ۱ و شاخص پایداری (RI) = ۱ به دست آمد. در این درخت سه نمونه مورد مطالعه از گونه شاخه‌ای تک نیا با حمایت بوت استراپ ۷۸٪ را تشکیل دادند (شکل ۲).

آنالیز ماکزیموم پارسیمونی داده‌های ETS گروه *Lachnosphaerae*

ماتریس داده‌های ETS شامل ۹ تاکسون و ۱۰۳۷ کاراکتر (جایگاه) بود. از این میان، ۱۰۱۱ جایگاه ثابت (۹۷.۵٪)، ۱۸ جایگاه از نظر پارسیمونی غیراطلاعاتی (۱.۷٪) و ۸ جایگاه باقیمانده از نظر پارسیمونی اطلاعاتی (۰.۸٪) بودند. بر اساس نتایج، کوتاه ترین درخت‌های به دست آمده ۲ درخت به طول ۲۶ گام بود از ترکیب این دو، درختی به طول ۳۰ گام (step) با شاخص ثبات (CI) = ۰.۸۶۷ و شاخص پایداری (RI) = ۰.۷۱۴ بدست آمد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده، در درخت اجماع قاطع بدست آمده از این آنالیز گونه‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۲): ۱) زیر شاخه A شامل گروهی تک نیا متشکل از دو نمونه متعلق به گونه *lachnosphaera* C.، با حمایت بوت استراپ ۸۸٪؛ ۲) زیر شاخه B شامل گروهی تک نیا متشکل از سه گونه *C. chrysochlora*، *C. gabriellae* و *C. gedrosiaca* با حمایت بوت استراپ ۶۴٪.

C. eriobasis با حمایت بوت استراپ ۹۹٪؛ و ۳) زیرشاخه C شامل گروهی تک نیا متشکل از سه گونه *C. gedrosiaca*، *C. chrysochlora* و *C. gabriellae* با حمایت بوت استراپ ۶۳٪.

آنالیز ماکزیموم پارسیمونی داده‌های ترکیبی ITS + ETS گروه *Lachnosphaerae*

ماتریس داده‌های ترکیبی ITS + ETS شامل ۹ تاکسون و ۱۵۱۵ کاراکتر (جایگاه) بود. از این میان، ۱۴۶۵ جایگاه ثابت (۹۶.۷٪)، ۴۰ جایگاه از نظر پارسیمونی غیراطلاعاتی (۲.۶٪) و ۱۰ جایگاه باقیمانده از نظر پارسیمونی اطلاعاتی (۰.۶۶٪) بودند. درخت فیلوژنی اجماع قاطع (strict consensus) به طول ۵۰ گام با شاخص ثبات (CI) = ۱ و شاخص پایداری (RI) = ۱ بود که از ترکیب ۲ درخت هریک به طول ۵۰ گام (step) به دست آمد.

در درخت بدست آمده حاصل از آنالیز ماکسیموم پارسیمونی داده‌های ITS + ETS (شکل ۵)، کاملاً شبیه به درخت به دست آمده از آنالیز ماکزیموم پارسیمونی مارکر ETS (شکل ۲) ولی با میزان حمایت بوت استراپ کمی بالاتر از آن می‌باشد. در این درخت نیز گونه‌ها در سه زیر شاخه اصلی قرار گرفته اند: ۱) زیر شاخه A شامل گروهی تک نیا متشکل از دو نمونه متعلق به گونه *C. lachnosphaera*، با حمایت بوت استراپ ۸۸٪؛ ۲) زیر شاخه B شامل گروهی تک نیا متشکل از سه نمونه متعلق به گونه *C. eriobasis* با حمایت بوت استراپ ۱۰۰٪؛ و ۳) زیر شاخه C شامل گروهی تک نیا متشکل از سه گونه *C. chrysochlora*، *C. gabriellae* و *C. gedrosiaca* با حمایت بوت استراپ ۶۴٪.

نتایج مطالعات ریخت شناسی دانه گرده گونه‌های گروه *Lachnosphaerae*

در مطالعات گرده شناسی این گروه، مورفولوژی دانه‌ها در گونه‌های مختلف کمابیش یکسان بوده، تفاوت‌هایی در صفات کمی مشاهده شد (جدول ۲). دانه‌های گرده در همه گونه‌های مورد مطالعه بیضی شکل، سه شیاره، با سطح زیر و پوشیده از منافذ کوچک بودند (شکل ۴).

و مارکر ETS این دو را می‌توان در کنار یکدیگر مورد آنالیز قرار داد. در حالی که به علت یکسان نبودن الگوی تکاملی مارکرهای هسته‌ای و مارکرهای کلروپلاستی آنالیز این مارکرها در کنار هم با مشکل هموزن نبودن مواجه است.

نتایج حاصل از آنالیز مجموعه داده‌های آنالیز ماکسیمم پارسیمونی و بایسی داده‌های ITS تک نیا بودن گونه‌های ایرانی بخش *Lachnosphaerae* را تأیید می‌کند. از جنبه مورفولوژیک نیز اعضای این بخش به صورت گروهی همگن با محدوده پراکنش مشخص در ناحیه‌ای نیمه بیابانی از شمال شرق تا جنوب شرقی و نواحی مرکزی ایران دیده می‌شوند (Rechinger, 1972, 1979). اعضای این گروه معمولاً به خوبی از یکدیگر قابل تفکیک نبوده و حالات حدواسط زیادی مشاهده می‌شود. به همین دلیل عقاید یکسانی در مورد تعداد گونه‌های این بخش در ایران وجود نداشته و تاکسونومی آن مورد سوال بوده است. چنانچه مطابق یک عقیده می‌توان تمامی اعضای آن را به عنوان یک گونه منفرد با تنوع در صفات مورفولوژیک در نظر گرفت، در حالیکه مطابق با عقیده‌ای دیگر می‌توان آن را به گونه‌های زیاد بر پایه تفاوت‌های خرد در صفات مورفولوژیک تقسیم کرد. بررسی منابع مرزهای دقیقی برای گونه‌های معرفی شده مشخص نکرده است (Rechinger, 1972, 1979). به عنوان مثال دو گونه *C. gedrosiaca* و *C. gabriellae* هر دو از ناحیه تفتان معرفی شده‌اند. بررسی صفات نشان داد که پیدا کردن صفات تفکیک کننده قطعی برای مرزبندی گونه‌ها در این بخش دشوار است. به عنوان مثال قطر خار کلپرک در گونه *C. lachnosphaera*، ۲.۵ تا ۳.۵ سانتی متر، در گونه *C. eriobasis*، ۳ تا ۶ سانتی متر، در گونه *C. gedrosiaca*، ۳ تا ۴ سانتی متر، در گونه *C. gabriellae*، ۳ تا ۵ سانتی متر و در گونه *C. chrysochlora*، ۲ تا ۵ سانتی متر می‌باشد.

نتایج این مقاله نشان می‌دهد که اعضای این بخش به سه گروه مشخص و مطابق با الگوی جغرافیایی واضحی

صفات کیفی مورد مطالعه قادر به تفکیک گونه‌ها نبود. اگرچه تفاوت‌هایی در صفات کمی اندازه گیری شده در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده گردید، ولی این تفاوت‌ها قادر به تفکیک گونه‌ها یا گروه‌های گونه‌ای خاصی نبودند (نتایج نشان داده نشده). بیشترین طول محور قطبی (P) مربوط در نمونه ۳۵۶۱۸ از گونه *C. lachnosphaera* و برابر ۵۳ میکرون و کمترین آن نیز مربوط در نمونه ۲۳۵۱۲ از همان گونه (*C. lachnosphaera*) و برابر ۴۰۸۷ میکرون مشاهده گردید (جدول ۲). بر اساس نتایج، گونه *C. chrysochlora* دارای بزرگترین قطر محور استوایی (E) (۳۶.۵ میکرون) و نمونه ۲۳۵۱۲ از گونه *C. lachnosphaera* دارای کمترین قطر (۲۷ میکرون) بود. نسبت E/P در تمامی گونه‌ها بین ۰.۶ تا ۰.۷ متغیر است که بیشترین آن مربوط به نمونه‌ای از گونه *C. chrysochlora* و کمترین آن مربوط به نمونه ۳۵۶۱۸ از گونه *C. lachnosphaera* بود. بیشترین قطر منافذ گرده‌ای مربوط به گونه *C. gedrosiaca* (۷.۵ میکرون) و کمترین آن مربوط به گونه *C. chrysochlora* (۵ میکرون) بود. بیشترین پهنای شیار مربوط به گونه *C. gabriellae* (۴.۵ میکرون) و کمترین پهنای شیار مربوط به گونه *C. chrysochlora* (۳ میکرون) است.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج، قدرت تفکیک مارکر ITS با تنها ۲ جایگاه اطلاعاتی از مارکر ETS با ۱۰ جایگاه اطلاعاتی کمتر است. بنابر این می‌توان گفت برای روشن کردن ارتباط بین بقیه اعضای گروه *Cousinia* استفاده از مارکر ETS در کنار ITS نتایج بهتری خواهد داشت. با توجه به این نتایج و در مقایسه با نتایج مطالعات قبلی روی کمپلکس *Arctium-Cousinia* (López-Vinyallonga & al. 2009; Mehregan & Kadereit, 2009) می‌توان گفت مارکرهای کلروپلاستی میزان تفکیک کمتری از مارکر ITS و مارکر ETS میزان تفکیک بهتری از ITS در فیلوژنی این گروه را دارد. با توجه به یکسان بودن تکامل ITS و ETS، و هموزن بودن داده‌های مارکر ITS

تقسیم شده اند. چنانچه در یک گروه نمونه‌هایی از گونه *C. lachnosphaera* و از شمال خراسان قرار می‌گیرند. در گروه دوم سه نمونه از گونه *C. eriobasis* که از مناطق مرکزی ایران و حاشیه‌های غربی مناطق کویری مرکز ایران جمع آوری شده اند، قرار گرفتند. گروه سوم هم شامل نمونه‌هایی از سه گونه *C. gabriellae*، *C. chrysochlora* و *C. gedrosiaca* است که در منطقه‌ای از جنوب خراسان تا سیستان پراکنده هستند. مرز بندی این سه گروه را می‌توان با استفاده از تعداد گل‌های کلاپرک تا حدودی مشخص ساخت. تعداد گل درگونه *C. lachnosphaera*، ۴۰ تا ۵۰ گل، درگونه *C. eriobasis*، ۷۰ تا ۱۰۰ گل، در گروه سوم شامل گونه

C. gabriellae، *C. gedrosiaca* و *C. chrysochlora* و *C. lachnosphaera*، ۶۰ تا ۸۰ گل می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از فیلوژنی گروه (شکل ۲)، و الگوی پراکنش آن‌ها، پیشنهاد می‌شود که گونه‌های این بخش به سه گونه کاهش یابد: گونه اول *C. lachnosphaera* شامل تمامی تاکسون‌های شمال شرقی ایران، گونه دوم *C. eriobasis* شامل تمامی تاکسون‌های مرکز ایران و گونه سوم *C. gabriellae* (با انتشار نام قدیمی‌تر از بقیه گروه) شامل تمامی تاکسون‌ها جنوب خراسان و سیستان و بلوچستان (شکل ۴). مطالعات بیشتر برای یافتن صفات بیشتری که در تعیین مرز این سه گروه مفید باشند توصیه می‌شود.

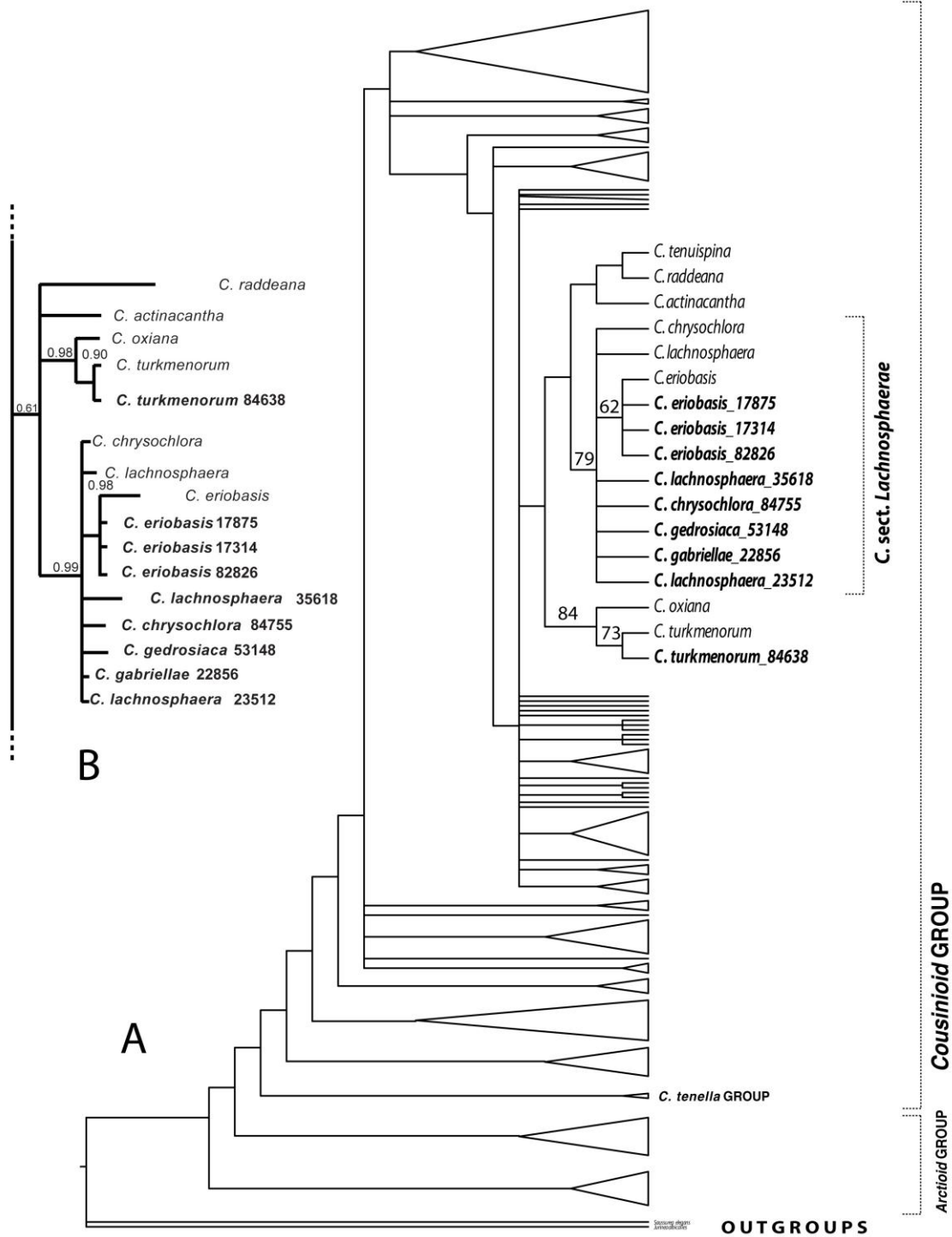
جدول ۱: لیست مشخصات و محل جمع آوری نمونه‌های مورد مطالعه.

ردیف	نام تاکسون	مشخصات
۱	<i>C. eriobasis</i> Bunge	فارس: آباده، گردنه آیون (Ayon)، ۲۳۰۰ متر، وندلیو و فروغی (TARI) ۱۷۸۷۵.
۲	<i>C. eriobasis</i> Bunge	اصفهان: ۶۰ کیلومتری شهرضا، شاه قنار، ۱۹۰۰ تا ۲۱۵۰ متر، فروغی (TARI) ۱۷۳۱۴.
۳	<i>C. eriobasis</i> Bunge	یزد: کوه‌های بالا روستای ده بالا، اصفهان، ۲۸۲۱ تا ۳۸۰۰ متر، اسدی و رنجبر (TARI) ۸۲۸۲۶.
۴	<i>C. lachnosphaera</i> Bunge	خراسان: شمال تربت سفید، ۱۷۰۰ تا ۲۰۰۰ متر، رونه مارک و سردابی (TARI) ۲۳۵۱۲.
۵	<i>C. lachnosphaera</i> Bunge	خراسان: ۱۴ کیلومتر از کاشمر به نیشابور، ۱۴۰۰ تا ۱۵۰۰ متر، اسدی و مظفریان (TARI) ۳۵۶۱۸.
۶	<i>C. gabriellae</i> Bornm.	بلوچستان: ۴۰ کیلومتری شمال خاش، ترش‌آب، کوه تفتان، ۲۰۰۰ تا ۲۳۰۰ متر، اسدی (TARI) ۲۲۸۵۶.
۷	<i>C. chrysochlora</i> Rech. f.	خراسان: ۱۸ کیلومتر به بیرجند از قائن، ۱۹۰۰ متر، اسدی و امیرآبادی (TARI) ۸۴۷۵۵.
۸	<i>C. gedrosiaca</i> Bornm. & Gauba	بلوچستان: کوه تفتان ناحیه تمندان، ۲۳۰۰ تا ۲۵۰۰ متر، مظفریان (TARI) ۵۳۱۴۸.
۹	<i>C. turkmenorum</i> Bornm.	خراسان: خواف، ۱۴ کیلومتر از جاده قائن، بعد از نشیمن، ۹۰۰ متر، اسدی (TARI) ۸۴۶۳۸.

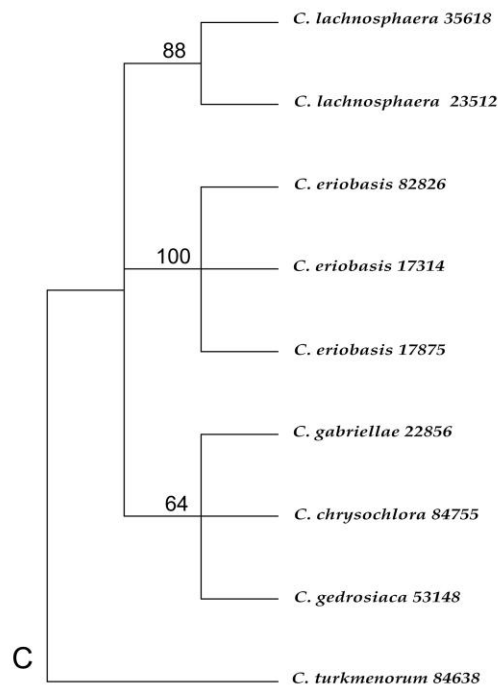
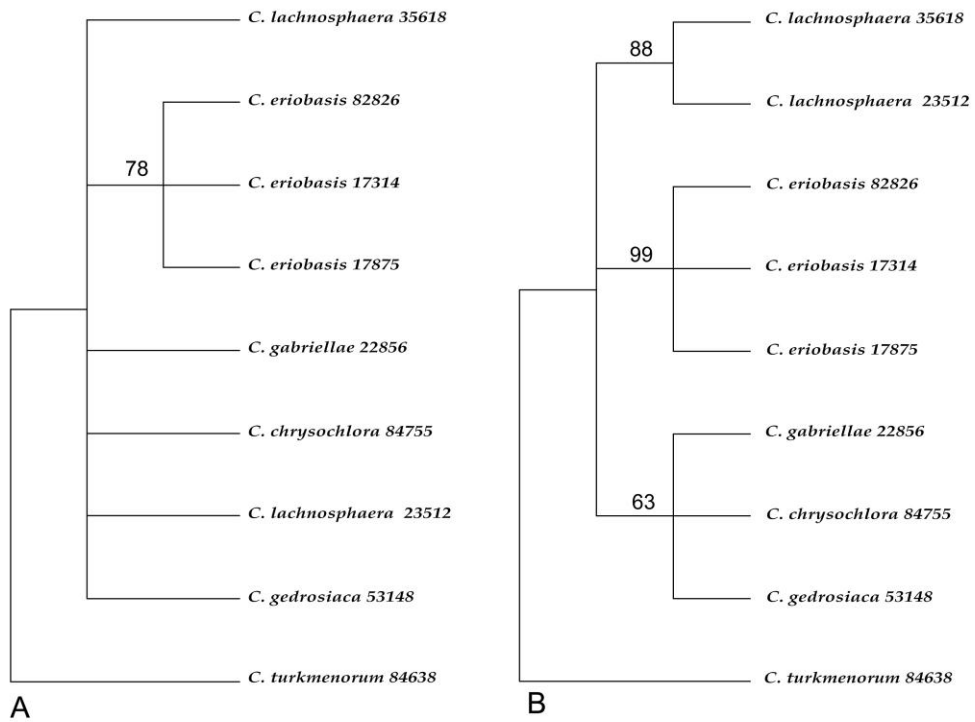
جدول شماره ۲: نتایج بررسی کمی و کیفی دانه‌های دانه‌گرده در گونه‌های مختلف بخش *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* و گونه *C. turkmenorum*. (اختصارات: P:

طول محور قطبی؛ E: قطر محور استوایی؛ E/P: نسبت قطر محور استوایی به طول محور قطبی؛ D: قطر منفذ؛ C: پهنای شیار).

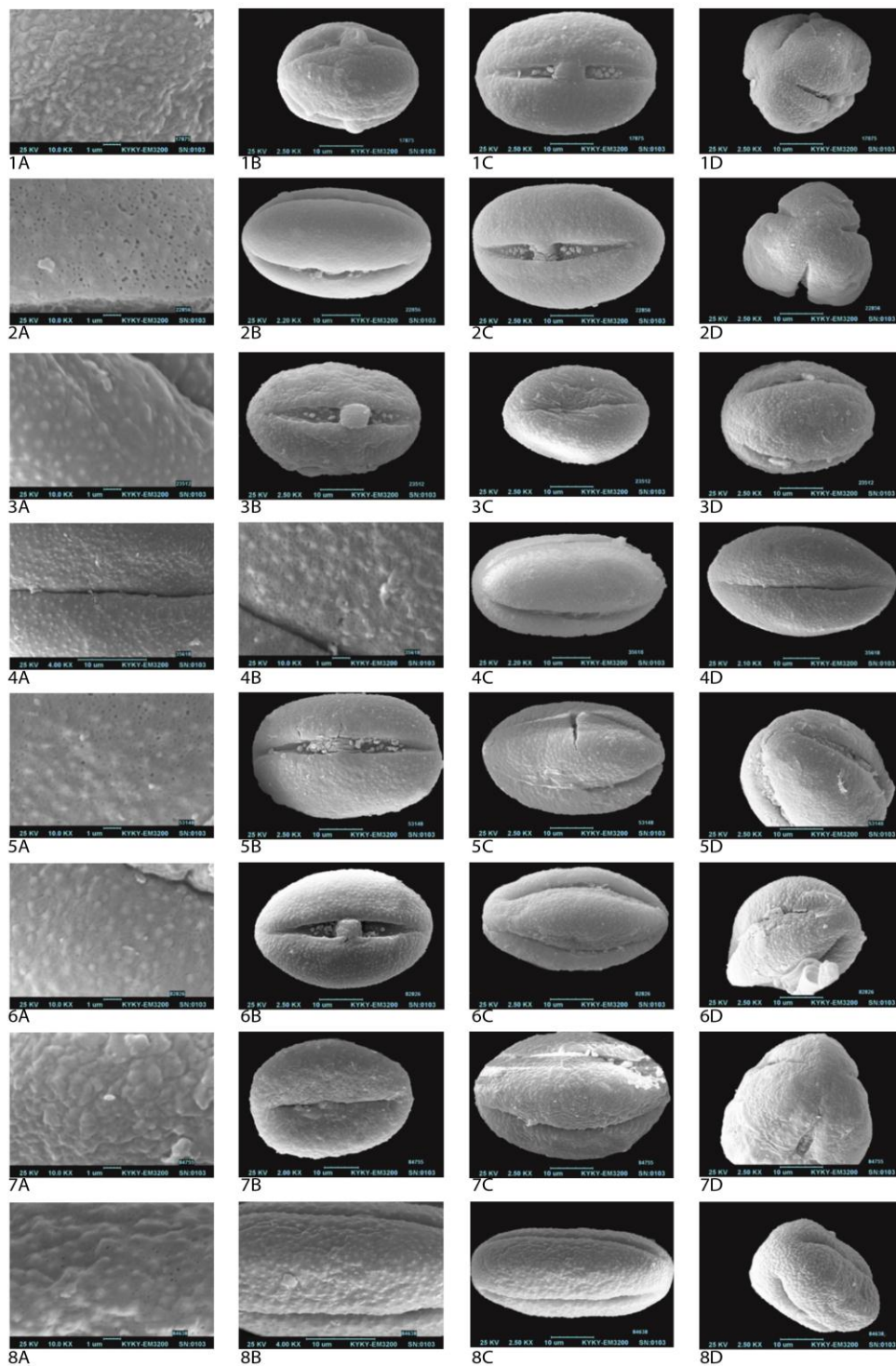
ردیف	نام تاکسون	کد هر پارامتر	E	P	E/P	D	C	شکل گرده	تزیینات گرده
۱	<i>C. eriobasis</i> Bunge	۱۷۸۷۵	۳۰.۹	۴۲.۵	۰.۷۳	۷.۴	۳.۵	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۲	<i>C. eriobasis</i> Bunge	۸۲۸۲۶	۲۹.۲	۴۱.۵۵	۰.۷۰	۶.۱	۴.۲	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۳	<i>C. lachnosphaera</i> Bunge	۲۳۵۱۲	۲۷	۴۰.۸۷	۰.۶۶	۶.۸	۳.۷	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۴	<i>C. lachnosphaera</i> Bunge	۳۵۶۱۸	۳۲	۵۳	۰.۶۰	۶.۳۵	۳.۵	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۵	<i>C. gabriellae</i> Bornm.	۲۲۸۵۶	۳۰.۱۱	۴۵	۰.۶۷	۵.۲	۴.۵	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۶	<i>C. chrysochlora</i> Rech. f.	۸۴۷۵۵	۳۶.۵	۴۷.۸	۰.۷۶	۵	۳	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۷	<i>C. gedrosiaca</i> Bornm. & Gauba	۵۳۱۴۸	۳۰.۹	۴۴.۱۸	۰.۷۰	۷.۵	۳.۸	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز
۸	<i>C. turkmenorum</i> Bornm.	۸۴۶۳۸	۲۲.۳۶	۴۷.۵۱	۰.۴۷	۴	۲	بیضی شکل	زبر با منافذ ریز



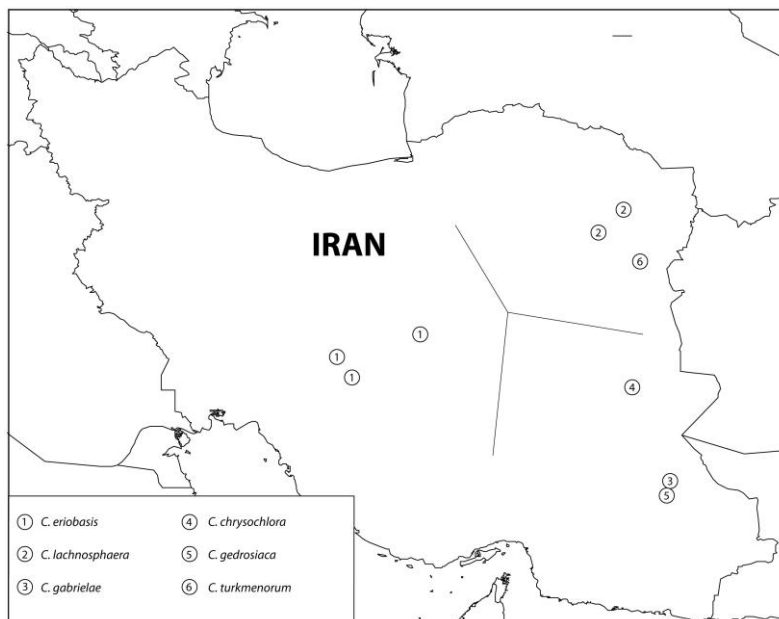
شکل ۱: (A). شکل ساده شده درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ITS ناکسون‌های متعلق به کمپلکس *Arctium-Cousinia* با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی. اعداد حمایت بوت استراپ فقط در مورد شاخه حاوی گونه‌های مورد مطالعه در بالای هر یک از شاخه‌ها ذکر شده است. (B). قسمتی از درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ITS ناکسون‌های متعلق به کمپلکس *Arctium-Cousinia* با استفاده از روش بایسی (Bayesian). (اعداد روی کلادها نشان‌دهنده احتمال پسین است).



شکل ۲: مقایسه درخت‌های به دست آمده از آنالیز مارکرهای مختلف در بخش *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* (A). درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ITS با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی. (B). درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ETS با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی. (C). درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های ترکیبی ITS + ETS با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی (اعداد روی شاخه‌ها نشان دهنده میزان حمایت بوت استرپ است).



شکل ۳: میکرومورفولوژی دانه گرده در گونه‌های مختلف بخش *Cousinia sect. Lachnosphaerae*. 1A، تزئینات سطح، 1C و 1B نمای استوائی، و 1D، نمای قطبی در دانه گرده گونه *Cousinia eriobasis* (شماره هرباریومی ۱۷۸۷۵)؛ 2A، تزئینات سطح، 2C و 2B نمای استوائی، 2D، نمای قطبی دانه گرده گونه *Cousinia gabrielae* (شماره هرباریومی ۲۲۸۵۶)؛ 3A، تزئینات سطح، 3B، 3C و 3D، نمای استوائی در دانه گرده گونه *Cousinia lachnosphaera* (شماره هرباریومی ۲۳۵۱۲)؛ 4A و 4B، تزئینات سطح، 4C و 4D، نمای استوائی در دانه گرده گونه *Cousinia lachnosphaera* (شماره هرباریومی ۳۵۶۱۸)؛ 5A، تزئینات سطح، 5B و 5C، نمای استوائی، 5D، نمای قطبی در دانه گرده گونه *Cousinia gedrosiaca* (شماره هرباریومی ۵۳۱۴۸)؛ 6A، تزئینات سطح، 6B و 6C، نمای استوائی، 6D، نمای قطبی دانه گرده در گونه *Cousinia eriobasis* (شماره هرباریومی ۸۲۸۲۶)؛ 7A، تزئینات سطح، 7B و 7C، نمای استوائی، 7D، نمای قطبی دانه گرده گونه *Cousinia chrysochlora* (شماره هرباریومی ۸۴۷۷۵)؛ 8A، تزئینات سطح، 8B و 8C، نمای استوائی، 8D، نمای قطبی در دانه گرده گونه *Cousinia turkmenorum* (شماره هرباریومی ۸۴۶۳۸).



شکل ۴: محل جمع آوری نمونه‌های متعلق به بخش *Cousinia* sect. *Lachnosphaerae* و گونه *C. turkmenorum* در ایران. اطلاعات دقیق مربوط به محل جمع آوری در جدول شماره ۱ ذکر شده است.

(Compositae, Cardueae-
Carduinae). *Taxon* 58: 153-171.

Maddison, W. P. & Maddison, D. R. (2010) Mesquite (version 2.74): A modular system for evolutionary analysis.

Posada, D., Crandall, K. A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9):817-8.

Rechinger, K. H. (1972) *Compositae-Cynareae* I. *Cousinia*. – In: Rechinger, K. H. (ed.), *Flora iranica* 90. – Graz.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* (Oxford, England). 19 (12): 1572-1574.

Swofford, D. L. (2002) *Phylogenetic analysis using parsimony (PAUP)*. Ver. 4. Sinauer Associated, Sunderland Massachusetts.

منابع

Baldwin, B. & Markos, S. (1998) Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 10: 449-463.

Garcia-Jacas, N. Garnatje, T. Susanna, A. & Vilatersana, R. (2002) Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA Evol. 22: analysis. *Molec. Phylog.* 51-64.

Sussana, A. & Garcia-Jacas, N. (2006) Cardueae in Kubitzki, K. (ed.) *The families and genera of vascular plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Linder, C. R., Goertzen, L. R., Heuvel, B. V., Francisco-Ortega, J. & Jansen, R. K. (2000) The Complete External Transcribed Spacer of 18S-26S rDNA: Amplification and Phylogenetic Utility at Low Taxonomic Levels in Asteraceae and Closely Allied Families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14 (2): 285-303.

López-Vinyallonga, S. Mehregan, I. Garcia-Jacas, N. Tscherneva, O. Susanna, A. & Kadereit, J. W. (2009) Phylogeny and evolution of the *Arctium-Cousinia* complex

