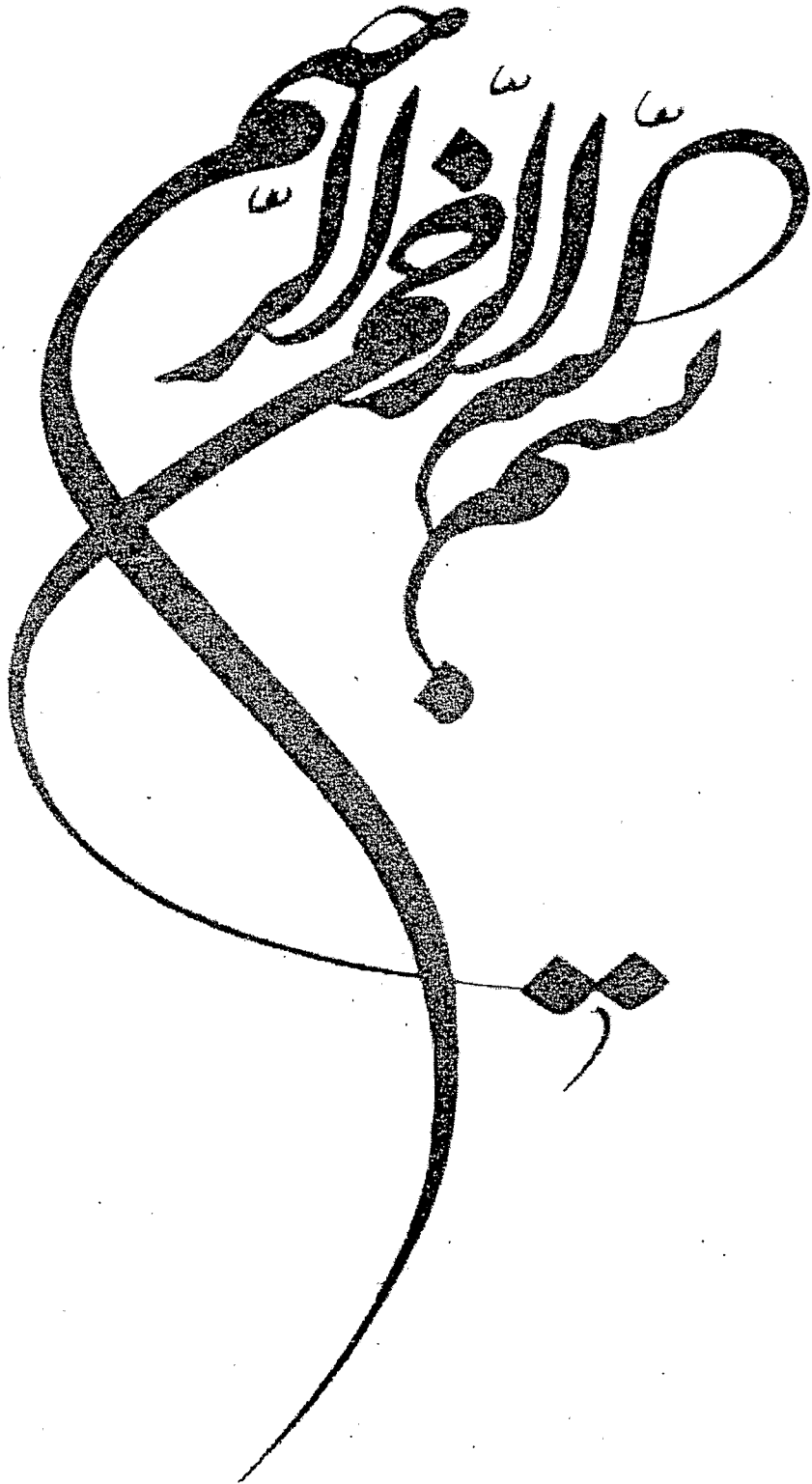
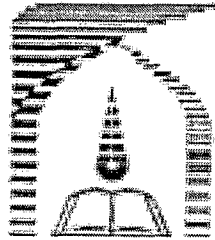


بزرگوار



79710



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه
پایان نامه دوره کارشناسی ارشد
زیست‌شناسی (علوم گیاهی)

فیلوژنی مولکولی گون‌های ایران براساس توالی‌های اینترون
ژن کلروپلاستی *trnL*

نگارنده
مرضیه کاظمی نورعینی

استاد راهنما
دکتر شاهرخ کاظم‌پور اوصالو

استاد مشاور
دکتر علی اصغر معصومی

تیر ۱۳۸۶

۱۳۸۶/۹/۳

کتابخانه تخصصی زیست‌شناسی
دانشگاه تربیت مدرس

۷۹۷۸۸

تقدیم به

زیباترین بهانه‌های زندگی

پدر و مادر عزیزم

آنانکه وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر
با دلی مملو از عشق و خضوع در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین

می‌نهم

سرو وجودشان همیشه سبز و استوار باد

سپاس بیکران شایسته پروردگار بی‌همتاست که نعمت شعور و شور آموختن را به انسان ارزانی داشت، ضمیر تشنه‌اش را به چشمه‌سار زلال معرفت مهمان کرد و مشقت طریق عشق و وصالش را به شهید دانستن بر وی گوارا گرداند که اوست مهربانترین

در ابتدا بر خود می‌دانم از راهنمایان و تمامی عزیزانی که در این راه همراهیم کردند سپاسگزاری کنم.

از استاد راهنمای ارجمندم، جناب آقای دکتر شاهرخ کاظم‌پور اوصالو که همواره از راهنمایی‌هایشان بهره‌مند بودم، بی‌نهایت سپاسگزارم.

سپاس فراوان از استاد مشاور ارجمندم، جناب آقای دکتر علی‌اصغر معصومی، به پاس راهنمایی‌ها و همراهی‌های گرانقدرشان.

تقدیر و تشکر فراوان از جناب آقای دکتر شاهین زارع به پاس کمک‌ها و راهنمایی‌های بی‌دریغشان که زحمت ارزیابی این پایان‌نامه را نیز پذیرفتند.

بی‌نهایت سپاسگزارم از جناب آقای دکتر اسکندر رستگار پویانی که در تمام طول راه از یاری‌ها و راهنمایی‌های ارزنده‌شان برخوردار بوده‌ام.

بسیار سپاسگزارم از سرکار خانم دکتر فائزه قناتی که با دلبسوزی فراوان، زحمت ارزیابی این پایان‌نامه را پذیرفتند.

سپاسگزارم از جناب آقای دکتر حمید کاظمی به پاس همه همراهی‌های دلسوزانه‌شان.

تشکر فراوان از سرکار خانم خرمی‌شاد، مسئول محترم آزمایشگاه علوم گیاهی و سرکار خانم دیداری، مسئول محترم آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس.

سپاسگزارم از دوستان عزیزی که در طول انجام کار از همراهیشان بهره‌مند بوده‌ام: خانم‌ها معصومه قادری، فرزانه موحدیان، نرجس سلگی و سولماز توکلی

سپاس بی‌پایان از خانواده بزرگوaram که بدون همراهی و پشتیبانی آنها طی این مسیر برایم غیرممکن

بود.

در این مطالعه، فیلوژنی تعدادی از گونه‌های دنیای قدیم و نمایندگانی از جنس‌های خویشاوند از کلاد Astragalean و نیز موقعیت فیلوژنتیکی *Astragalus memoriosus* از *Caraganella* براساس توالی کلروپلاستی *trnL-F* و nrDNA ITS ارائه می‌گردد. روابط فیلوژنی بین ۲۷ گونه از گونه‌های دنیای قدیم بعلاوه نمایندگانی از گونه‌های آنیوپلوئید کلاد Neo-Astragalus به همراه جنس‌های خویشاوند از کلاد Astragalean شامل دو گونه *Phyllobium*، *Oxytropis*، *Colutea*، *Podlechiella* (*P. vogelii*)، *Oreophysa* (*O. microphylla*) و *Chesneya astragalina* و دو گونه از جنس *Caragana* به عنوان برون‌گروه با استفاده از ماکزیمم پارسیمونی در برنامه PAUP*4.0b10 بررسی شد. در مجموع ۱۰۸۹ و ۶۴۵ جایگاه نوکلئوتیدی به ترتیب برای cpDNA *trnL-F* و nrDNA ITS آنالیز شد که از این میان به ترتیب ۱۲۳ و ۱۶۹ جایگاه از نظر پارسیمونی (اطلاعاتی) *informative* می‌باشند. براساس نتایج مطالعه حاضر، مجموع گونه‌های گون در کلادی که در مطالعات قبلی براساس nrDNA ITS و cpDNA *ndhF* کلاد *Astragalus* s. str. نامیده شده، قرار نمی‌گیرند. همچنین این نتایج همانند مطالعات فیلوژنی مولکولی پیشین نشان می‌دهد که گونه‌های یکساله در داخل گونه‌های چندساله پراکنده‌اند، بنابراین تک‌تباری این گروه مجدداً تأیید نمی‌گردد. بعلاوه براساس این مطالعه ۲ گونه *A. ophiocarpus* و *A. hemsleyi* همانند داده‌های حاصل از ژن *ndhF* کلروپلاستی با هم خویشاوند نزدیک هستند ولی این روابط با داده‌های nrDNA ITS ناسازگار است. در مقابل درحالیکه رابطه خوهری *Biserrula pelecinus* با زیرکلاد *A. annularis* براساس داده‌های cpDNA *trnL-F* با nrDNA ITS سازگار است، موقعیت فیلوژنی کلاد در بر دارنده این سه تاکسون در فیلوژنی‌های حاصل از این داده‌ها یکسان نیست. ناسازگاری دیگر بین این دو فیلوژنی مربوط به موقعیت فیلوژنتیکی *Phyllobium* sp. می‌باشد. همچنین موقعیت فیلوژنی زیرکلاد *A. grammocalyx* و *A. coelicolor* و *A. capito* حاصل از توالی‌های cpDNA *trnL-F* با nrDNA ITS همخوانی دارد، درحالیکه این روابط با داده‌های حاصل از ژن *ndhF* کلروپلاستی ناسازگار است هرچند رابطه خوهری این تاکسون‌ها در هر سه فیلوژنی حمایت می‌شود. همچنین این مطالعه قرارگیری *A. memoriosus* از بخش *Caraganella* را به همراه *A. stocksii* عضو دیگری از این بخش، در یک کلاد واحد، براساس هر دو توالی nrDNA ITS و cpDNA *trnL-F* نشان می‌دهد. همچنین براساس هر دو مجموعه داده‌ها، *Podlechiella vogelii* زیرکلادی در قاعده کلاد Coluteoid می‌سازد و *Oreophysa microphylla* نیز همراه با دیگر گونه‌های جنس *Colutea* و به‌عنوان تاکسون خوهری *Colutea persica* در کلاد Coluteoid قرار می‌گیرد.

در پایان، روند تکامل ۲۲ صفت مورفولوژیک انتخابی در چارچوب فیلوژنی nrDNA ITS بررسی می‌گردد. این صفات هوموپلازی بالایی نشان می‌دهند و هیچیک صفت پیشرفته مشترک برای جنس *Astragalus* نیستند. این صفات ارزش تاکسونومیک پایینی در جنس دارند، هرچند برخی از آنها تک‌تباری برخی کلادهای تشخیص داده شده را حمایت می‌کنند.

فهرست مطالب

۱	فصل یکم. مقدمه
۲	۱- مقدمه
۲	۱-۱- تیره (Leguminosae) Fabaceae
۵	۱-۲- کلاد علفی‌های منطقه معتدله (THC) Temperate Herbaceous Clade
۹	۱-۳- فیلوژنی Galegeae
۱۲	۱-۴- کلاد Astragalean
۱۲	۱-۵- تاریخچه رده‌بندی <i>Astragalus</i>
۲۱	۱-۶- کلاد <i>Astragalus sensu stricto</i> (<i>Astragalus s. str.</i>)
۲۲	۱-۷- <i>Astragalus memoriosus</i>
۲۳	۱-۸- بررسی روند تکامل صفات مورفولوژی در کلاد <i>Astragalus s. str.</i>
۲۶	فصل دوم. مواد و روش‌ها
۲۷	۲- مواد و روش‌ها
۲۷	۲-۱- Chloroplast DNA <i>trnL-trnF</i> (cpDNA <i>trnL-trnF</i>)
۲۹	۲-۲- Nuclear ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (nrDNA ITS)
۳۱	۲-۳- انتخاب گونه‌ها و نمونه برداری
۴۱	۲-۴- استخراج DNA
۴۲	۲-۵- بررسی وجود DNA در ویال
۴۴	۲-۶- Polymerase Chain Reaction (PCR)
۴۶	۲-۷- الکتروفورز محصولات PCR
۴۶	۲-۸- DNA Sequencing
۴۷	۲-۹- آنالیز فیلوژنتیکی
۴۸	۲-۱۰- تکامل صفات مورفولوژی در گروه <i>Astragalus s. str.</i>

فصل سوم. نتایج.....	۵۳
۳- نتایج.....	۵۴
۳-۱- آنالیز کلادیستیک داده‌های مولکولی nrDNA ITS.....	۵۴
۳-۲- آنالیز کلادیستیک داده‌های مولکولی cpDNA <i>ndhF</i>	۵۸
۳-۳- آنالیز کلادیستیک داده‌های مولکولی cpDNA <i>trnL-F</i>	۶۱
۳-۴- روند تکامل صفات مورفولوژی در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های nrDNA ITS ...	۶۹
فصل چهارم. بحث.....	۸۵
۴- بحث.....	۸۶
۴-۱- فیلوژنی گون‌ها و خویشاوندانش براساس داده‌های cpDNA <i>trnL-F</i>	۸۶
۴-۱-۱- مروری بر سازگاری‌های فیلوژنی‌های بررسی شده در این مطالعه.....	۸۶
۴-۱-۲- ناسازگاری‌های فیلوژنی‌های مورد بررسی.....	۸۸
۴-۱-۲-۱- ناسازگاری‌های فیلوژنی‌های <i>trnL-F</i> و cpDNA ITS.....	۸۹
۴-۱-۲-۲- ناسازگاری‌های فیلوژنی‌های <i>trnL-F</i> و cpDNA <i>ndhF</i>	۹۳
۴-۲- موقعیت فیلوژنتیکی و بیوژئوگرافی <i>A. memoriosus</i> و بخش <i>Caraganella</i>	۹۵
۴-۳- روند تکامل صفات مورفولوژی.....	۹۶
استنتاج و پیشنهادات.....	۹۸
فصل پنجم. منابع.....	۹۹
۵- منابع.....	۱۰۰
پیوست الف- طرز تهیه بافرها.....	۱۰۷
پیوست ب- توالی‌های هم‌ردیف سازی شده nrDNA ITS تاکسون‌های مورد آنالیز در مطالعه حاضر.....	۱۰۸
پیوست ج- توالی‌های هم‌ردیف سازی شده cpDNA <i>trnL-F</i> تاکسون‌های مورد آنالیز در مطالعه حاضر.....	۱۲۱

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۲- نمونه‌های شرکت داده شده در آنالیزهای <i>nrDNA</i> ، <i>cpDNA trn L-F</i> . <i>cpDNA ndhF</i>	
ITS	۳۲.....
جدول ۲-۲- صفات و حالات صفات نقشه‌بندی شده در چارچوب فیلوژنی	۴۹.....
جدول ۳-۲- ماتریس داده‌های مورفولوژی	۵۰.....
جدول ۱-۳- طول <i>nrDNA ITS</i> ، <i>cpDNA trnL intron</i> ، <i>cpDNA trnL-F Inter genic Spacer</i>	
(IGS)	۶۵.....
جدول ۲-۳- ضرایب و شاخص‌های صفات مورفولوژیکی نقشه‌بندی شده روی با صرغه‌ترین درخت	
حاصل از آنالیز داده‌های <i>nrDNA ITS</i>	۸۴.....

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- تیره **Fabaceae (Leguminosae)** و زیرکلادهای آن..... ۴
- شکل ۱-۲- کلاسه **IRLC** و زیرکلادهای آن ۷
- شکل ۱-۲- مدلی از ساختار ثانویه فرضی *trnT-trnL-trnF* ژنوم کلروپلاستی ۲۸
- شکل ۲-۲- ساختار کلی هر یک از واحدهای تکراری **rDNA** در گیاهان ۳۰
- شکل ۳-۲- ساختار ناحیه *trnT-trnL-trnF* کلروپلاستی در نهاندانگان و بازدانگان و محل اتصال آغازگرهای **trn-c** (در شکل: C) و **trn-f** (در شکل: F) ۴۴
- شکل ۱-۳- درخت مطلق مرکزی ۹۴۹ کوتاهترین درخت حاصل از آنالیز داده‌های **nrDNA ITS** ۵۵
- شکل ۲-۳- درخت مطلق مرکزی ۲۴ کوتاهترین درخت حاصل از آنالیز داده‌های **cpDNA ndhF** ۵۹
- شکل ۳-۳- درخت مطلق مرکزی ۱۵۰۰۰ کوتاهترین درخت حاصل از آنالیز داده‌های **cpDNA** ۶۲
- شکل ۳-۴- بخشی از کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی *trnL-F* کلروپلاستی گونه *A. ophiocarpus* با استفاده از آغازگرهای **trn-c (A)** و **trn-f (B)** ۶۸
- شکل ۳-۵- روند تکامل صفت ۱ (فرم رویشی) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های **nrDNA ITS** ۷۰
- شکل ۳-۶- روند تکامل صفت ۳ (کرکپوش برگ‌ها) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های **nrDNA ITS** ۷۲
- شکل ۳-۷- روند تکامل صفت ۵ (اتصال گوشوارک‌ها) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های **nrDNA ITS** ۷۳
- شکل ۳-۸- روند تکامل صفت ۹ (نوع گل‌آذین) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های **nrDNA ITS** ۷۴
- شکل ۳-۹- روند تکامل صفت ۱۲ (رنگ جام) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های **nrDNA ITS** ۷۶

شکل ۳-۱۰- روند تکامل صفت ۱۵ (شکل کاسه) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های nrDNA ITS	۷۷.....
شکل ۳-۱۱- روند تکامل صفت ۱۶ (شکل میوه) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های nrDNA ITS	۷۸.....
شکل ۳-۱۲- روند تکامل صفت ۱۹ (جدار طولی میوه) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های nrDNA ITS	۸۱.....
شکل ۳-۱۳- روند تکامل صفت ۲۱ (کانال‌های مولد کتیرا Gum ducts) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های nrDNA ITS	۸۲.....
شکل ۳-۱۴- روند تکامل صفت ۲۲ (ترکیبات ازت‌دار Nitro compounds) در چارچوب فیلوژنی حاصل از داده‌های nrDNA ITS	۸۳.....
شکل ۴-۱- مقایسه درخت حاصل از آنالیز nrDNA ITS (A) با درخت حاصل از آنالیز داده‌های cpDNA trnL-F (B)	۹۰.....

فصل یکم

مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- تیره (Leguminosae) Fabaceae

این تیره با داشتن ۷۳۰ جنس و بیش از ۱۹۴۰۰ گونه، با پراکنش جهانی، سومین تیره بزرگ نهادانگان است (Lock et al. 2005). از نظر اهمیت کشاورزی و اقتصادی بعد از Poaceae در رتبه دوم قرار دارد. این تیره در مناطق معتدل و گرم جهان پراکنش دارد و در عین حال در رویشگاه‌های معتدل و مرطوب حضور ندارد و یا پراکنش ضعیفی دارد. تمایل آنها به زیستگاه‌های نیمه‌خشک تا خشک به متابولیسم وابسته به نیتروژن آنها مربوط می‌شود. به نظر می‌رسد این نوع متابولیسم در تیره سازشی است به زیستگاه‌هایی که از نظر اقلیمی متنوع، تغییرپذیر و یا غیر قابل پیش‌بینی هستند. تثبیت نیتروژن در این تیره به وسیله گرهک‌های ریشه که حاوی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن هستند صورت می‌گیرد. علاوه بر این حضور میکوریزهای آربسکولار، اکتومیکوریزا و نیز جذب نیتروژن غیرآلی سبب جذب سطوح بالایی از نیتروژن مورد نیاز در متابولیسم آنها می‌گردد.

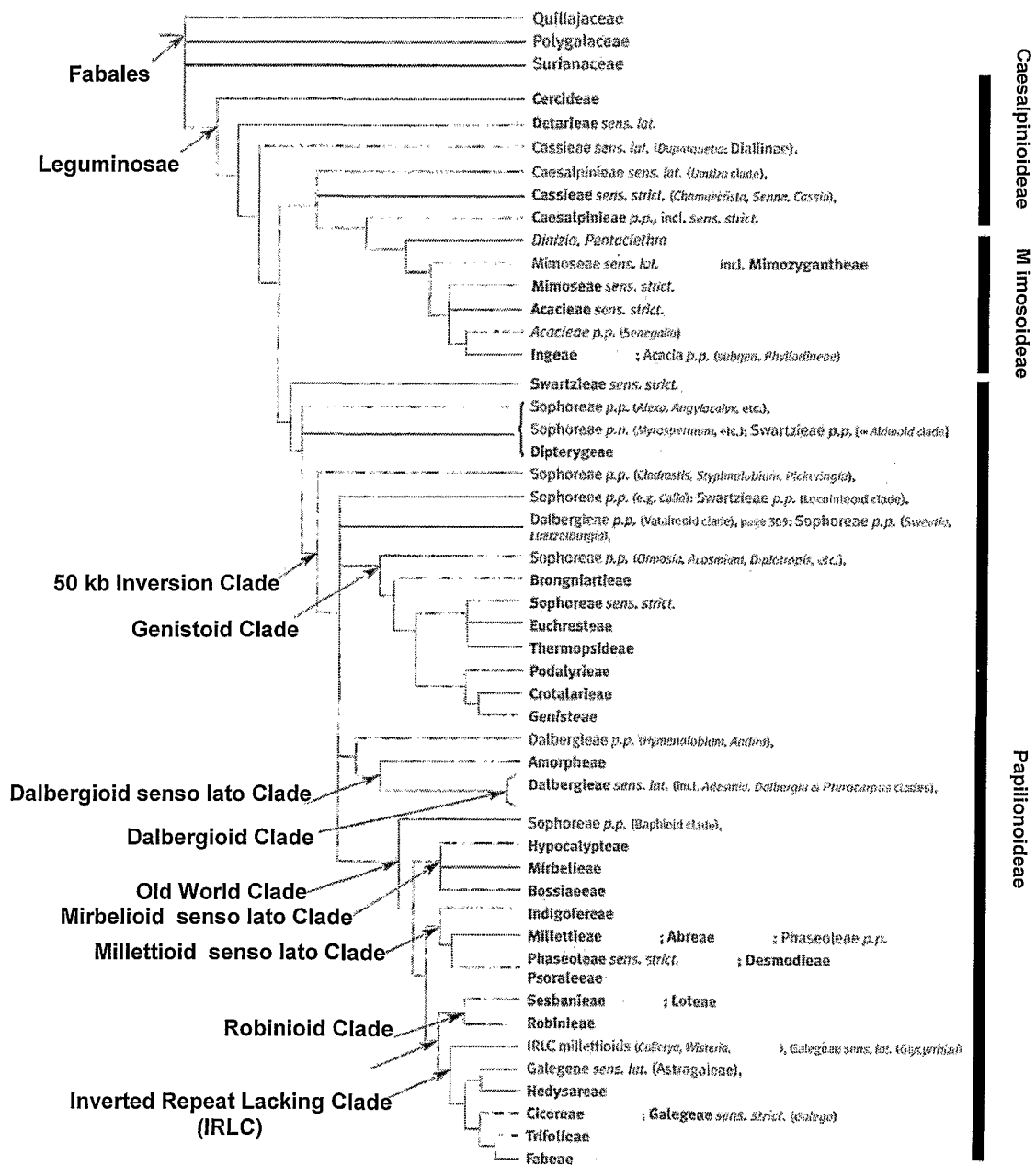
همه لگوم‌ها صرف‌نظر از اینکه گرهک ریشه‌ای دارند یا نه، در چرخه نیتروژن خاک نقش مهمی ایفا می‌کنند. منشأ آنها از نظر زمانی به اواخر کرتاسه یعنی ۶۵-۷۰ میلیون سال پیش برمی‌گردد. فسیل‌های فراوانی از تیره از دوره ترشیری موجود می‌باشد. بازسازی روابط فیلوژنی تیره به لحاظ اهمیتی که از نظر اقتصادی و اکولوژیکی دارند ضروری است.

اولین مطالعات فیلوژنتیکی جامع لگوم‌ها براساس داده‌های مولکولی با آنالیز ژن کلروپلاستی *rbcL* (Kass & Wink 1997, Doyle et al. 1997) شروع شد. این تیره از ۳ زیرتیره

Caesalpinioideae، Mimosoideae و Papilionoideae تشکیل شده است (شکل ۱-۱). از این میان زیرتیره Caesalpinioideae گروهی پارافیل تشکیل می‌دهد که زیرتیره تک‌تبار Mimosoideae در قاعده آن قرار می‌گیرد. زیرتیره تک‌تبار Papilionoideae با داشتن ۴۷۶ جنس و ۱۳۶۸۰ گونه بزرگترین و از نظر پراکنش جهانی گسترده‌ترین زیرتیره است و همین امر سبب شده است که بیشترین توجه را به خود جلب کند. تک‌تباری این زیرتیره با صفات مورفولوژیک از جمله صفات رویشی، زایشی و صفات میوه و داده‌های مولکولی شامل *rbcL* با حمایت پایین و *matK* با حمایت بالا تأیید می‌گردد (Wojciechowski et al. 2004).

ماهیت و روابط بسیاری از کلادهای زیرتیره Papilionoideae اولین بار در مطالعه فیلوژنی لگوم‌ها براساس ژن کلروپلاستی *matK* به‌خوبی آشکار شده است. این مطالعه نشان می‌دهد که زیرتیره Papilionoideae از ۷ کلاد تشکیل شده که عبارتند از کلادهای *Cladrastis*، *Genistoid s.l.*، *Dalbergioid s.l.*، *Mirbelioid*، *Milletioid*، *Robinioid* و کلاد فاقد توالی تکرار معکوس یا (Inverted Repeat Lacking Clade) IRLC.

وجود و روابط بین این کلادها نیز در این مطالعه از حمایت مولکولی بسیار بالایی برخوردار است، بطوریکه ارزش Bootstrap و Bayesian Posterior Probability آنها اغلب به بیش از ۹۵٪ می‌رسد. دو کلاد آخر با هم کلاد *Hologalegina* را می‌سازند که یک کلاد تک‌تبار است (Wojciechowski et al. 2004).



شکل ۱-۱- تیره Fabaceae (Leguminosae) و زیرکلادهای آن. برگرفته از Lock & Schrier

(2005). برای توضیح به متن مراجعه کنید.

۱-۲- کلاد علفی‌های منطقه معتدله

Temperate Herbaceous Clade (THC)

اغلب لگوم‌های منطقه معتدله به کلاد منفرد و درعین‌حال گسترده‌ای تعلق دارند که در بر گیرنده ۵ قبیله، ۴۵ جنس و حدود ۴۶۰۰ گونه می‌باشد. این کلاد متعلق به زیرتیره Papilionoideae است و تحت عنوان Temperate Herbaceous Clade (THC)، کلاد علفی‌های منطقه معتدله، نامیده می‌شود (Sanderson & Wojciechowski 1996). این کلاد اغلب اعضای گروه علفی‌های منطقه معتدله معرفی شده توسط Polhill (1981 b) را در بر می‌گیرد. اعضای سازنده این کلاد عبارتند از قبیله‌های *Cicereae*، *Hedysareae*، *Trifolieae*، *Vicieae* و قبیله چند تبار *Galegeae* (Sanderson 1991) و (Wojciechowski et al. 2000).

صفات پیشرفته و مشترکی (سین اپومورف) که تک‌تباری یا طبیعی بودن THC را حمایت می‌کنند، عبارتند از:

۱- داده‌های مورفولوژی و آناتومی برای مثال فرم رویشی غالباً علفی و عدد پایه کروموزومی اغلب ۷-۸ (Polhill 1981 b, 1994, Dormer 1945, 1946) n = ۷-۸

۲- فقدان یک نسخه از توالی‌های تکرار معکوس (IR) ۲۵ kbp در ژنوم کلروپلاستی (Lavin et al. 1990, Liston 1995).

۳- داده‌های حاصل از جایگاه‌های برش DNA کلروپلاستی در ژن‌های *rpoC* (Liston & Wheeler 1994)

۴- داده‌های حاصل از تعیین توالی ایترون گروه I ژن کلروپلاستی (Wojciechowski & Sanderson 1995)

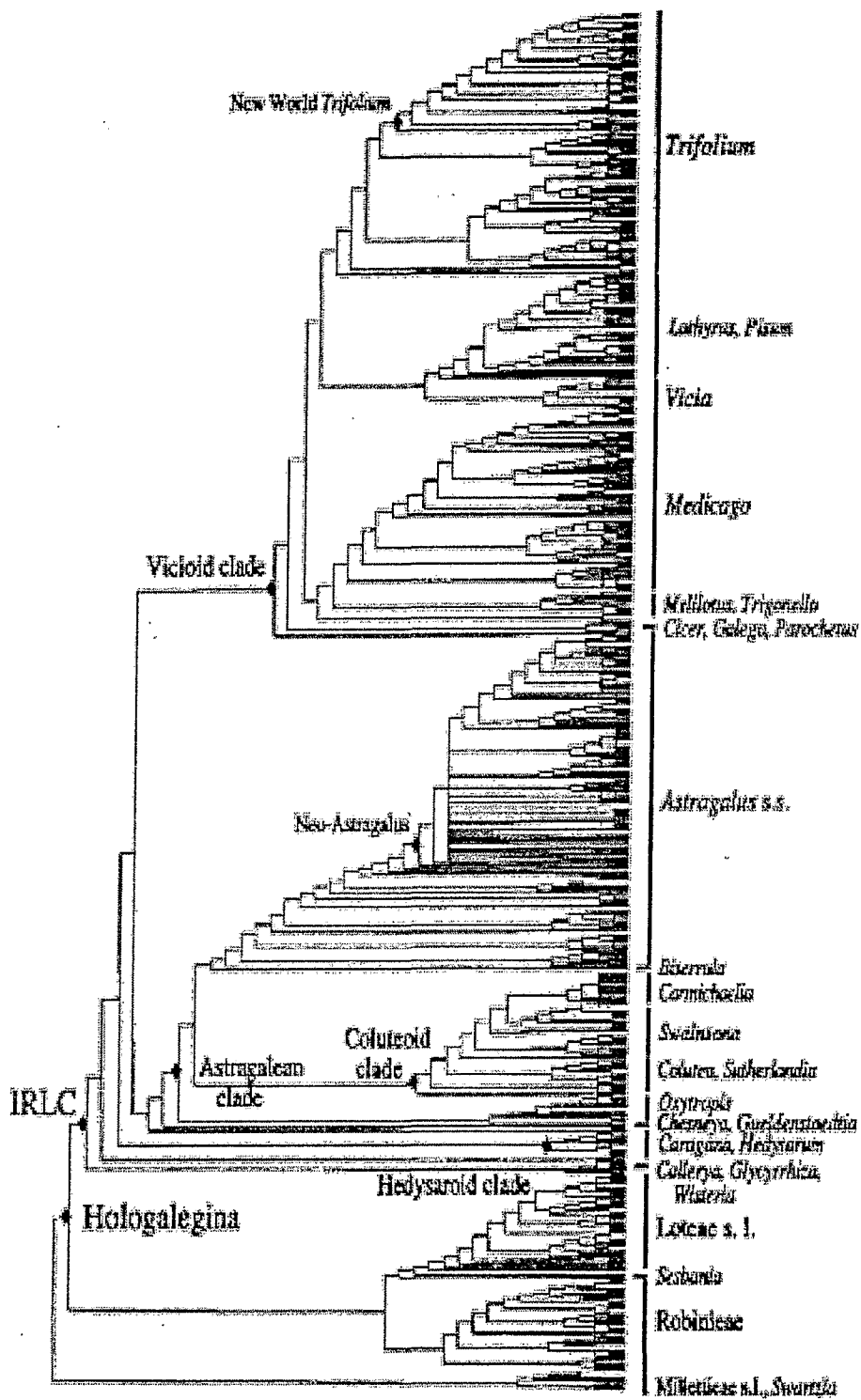
۵- داده‌های حاصل از تعیین توالی nrDNA ITS هسته‌ای (Sanderson & Wojciechowski 1996, Wojciechowski et al. 1999)

آنچه که THC را از سایر قبیله‌های معتدله مثل *Termopsidae*، *Loteae s.l.*، *Robinieae* و *Genisteae* (Adans.) Beneth قابل تشخیص می‌سازد، تجمع اسیدآمینه غیر پروتئینی *Canavanine*

به جای آلکالوئیدها در دانه‌هایشان است (Wojciechowski et al. 2000, 2004). تا سال ۱۹۹۰ و مطالعه توزیع جهش توالی‌های تکرار معکوس، در DNA کلروپلاستی لگوم‌ها، توسط Lavin و همکاران، جامعترین فرضیه درباره سیستماتیک سطوح بالای Papilionoideae، فرضیه (1981 b) Polhill بود.

مطالعات بعدی (Liston 1995) و (Lavin et al. 1998)، به ترتیب سهم بودن برخی اعضای قبیله Millettieae از جمله *Callerya* Endlicher، *Wisteria* Nutt و *Afgekia* Criab را در جهش DNA کلروپلاستی و فقدان توالی‌های تکرار معکوس (IR) اثبات کرد. ضمناً مطالعات (Liston 1995) نشان داد که این جهش بعد از ایجاد و تنوع زیرتیره و نیز مطمئناً بعد از پیدایش قابلیت سنتز Canavanine صورت گرفته است (Wojciechowski et al. 2000). درحالی‌که هنوز وجود کلاد IRLC براساس آنالیزهای کلادیستیک داده‌های غیرمولکولی در مطالعات (Chappil 1995) آشکار نبود، آنالیز داده‌های مولکولی از جمله *rbcL* کلروپلاستی توسط (Kass & Wink 1997) (1997) Doyle et al.، ژن‌های فیتوکروم هسته‌ای توسط (Lavin et al. 1998)، *trnK/matK* کلروپلاستی توسط (Hu et al. 2000) و آنالیزهای (Wojciechowski et al. 2000)، نشان دادند که اعضای کلاد THC همراه با اعضای نامبرده از قبیله Millettieae کلاد تک‌تبار IRLC را تشکیل می‌دهند (شکل ۱-۲) (Wojciechowski et al. 2004 و Wojciechowski et al. 2000).

بنابراین IRLC در واقع دربردارنده THC (Sanderson & Wojciechowski 1996) بعلاوه ۳ جنس مذکور است (Wojciechowski et al. 2000, 2004). بدنبال مطالعات (Lavin et al. 1990)، مطالعات دیگری به منظور آشکارسازی روابط سطوح بالا در کلاد IRLC و خویشاوندان نزدیکش صورت گرفت. از این مطالعات می‌توان به آنالیز ژن‌های *rpoC* (Liston & Wheeler 1994)، ایترون *trnL* (Wojciechowski et al. 1999) و ITS هسته‌ای (Sanderson & Wojciechowski 1996) و (Wojciechowski et al. 1999) اشاره کرد (Wojciechowski et al. 2000).



شکل ۱-۲- کلاسه IRLC و زیرکلادهای آن. برگرفته از (Wojciechowski et al. 2000) برای

توضیح به متن مراجعه کنید.

این کلاد گروه خواهری کلاد Robinioids (قبیله‌های Robinieae sensu Lavin & Sousa (1995) و Loteae s.l.) را می‌سازد. مجموع این دو کلاد، کلاد تک‌تبار Hologalegina را تشکیل می‌دهند که بزرگترین کلاد در Papilionoids می‌باشد (Wojciechowski 2003) و (Wojciechowski et al. 2000, 2004). این کلاد با داشتن ۸ قبیله و حداقل ۶۷ جنس، سهم بزرگی از زیرتیره را با پراکنش در مناطق معتدله به خود اختصاص داده است و حدود ۲۵٪ تنوع گونه‌ای کل تیره را در خود جای داده است (Wojciechowski et al. 2000, 2004). مطالعه ترکیب و ساختار زیرکلادهای بزرگ Hologalegina که توسط (Wojciechowski et al. 2000, 2004) و (Wojciechowski 2003) صورت گرفته است، نشان می‌دهد که IRLC بزرگترین زیرکلاد Hologalegina می‌باشد و با داشتن حدود ۴۶۰۰ گونه تقریباً ۹۳٪ تنوع گونه‌ای آن را به خود اختصاص می‌دهد.

IRLC خود از ۳ کلاد بزرگ دیگر با حمایت مولکولی بالا تشکیل می‌گردد (Wojciechowski 2006, Kazempour Osaloo et al. 2004) که عبارتند از:

۱- کلاد Astragalean که بزرگترین کلاد در IRLC است. در این کلاد از نظر تعداد گونه غلبه با *Astragalus* L. با ۳۰۰۰-۲۵۰۰ گونه است. پس از آن *Oxytropis* DC. و *Swainsona salisb* هستند که هر سه از قبیله چند تبار Galegeae می‌باشند (Wojciechowski 2003).

۲- کلاد Vicioid که قبیله‌های Cicereae، Trifolieae و Vicieae را در بر می‌گیرد. این کلاد از نظر مورفولوژیکی مجزاترین زیرکلاد IRLC است و بسیاری از جنس‌هایی را که از نظر کشاورزی اهمیت ویژه‌ای دارند (مانند نخود، نخود فرنگی، یونجه، شبدر و باقلا) شامل می‌شود (Wojciechowski 2003، Wojciechowski et al. 2000, 2004 و Steel & Wojciechowski 2003).

۳- کلاد Hedysaroid که از قبیله Hedysareae تشکیل شده و جنس *Caragana* Fabr. خویشاوندان نزدیکش از قبیله Galegeae گروه خواهری آن هستند (Wojciechowski et al. 2004)، (Wojciechowski 2005 و (آهنگریان ۱۳۸۶).

۱-۳- فیلوژنی قبیله Galegeae

بنابر (Polhill 1981 a) Galegeae بزرگترین و متنوعترین قبیله کلاد IRLC می‌باشد (Sanderson & Wojciechowski 1996). در مطالعات گذشته، این قبیله به همراه نزدیکترین خویشاوندانش، گروه طبیعی را تشکیل می‌دادند که از قبیله گرمسیری و عمدتاً چوبی Millettieae اشتقاق یافته و در نواحی معتدله اوراسیا در اوایل ترشیری (دوران سوم) بوجود آمده‌اند و سپس در رویشگاه‌های مشابهی در دنیای جدید تنوع یافته‌اند (Wojciechowski et al. 2000).

تاریخچه رده‌بندی Galegeae شاهد دوره‌های تکراری تعیین محدوده‌های وسیع و درحال تغییر و انتقال به محدوده‌های باریکتر بوده است. برای مثال Galegeae از نظر Hooker و Bentham (1865) مجموعه ناهمگنی از ۹ زیرقبیله بوده است. Hutchinson (1964) این مجموعه را با قبیله‌های کم و بیش مشابهی جایگزین کرد و Galegeae مونوتیپیک را با تنها جنس *Galega* ارائه کرد.

(Polhill 1981 a) قبیله‌های Astragaleae، Coluteae و Galegeae معرفی شده توسط Hutchinson را در Galegeae جدیدی با حدود ۲۰ جنس ترکیب کرد. او در ایجاد این فیلوژنی بزرگ، مورفولوژی، بیوشیمی و پراکنش جغرافیایی را نیز به کار گرفت. براساس کار اولیه Dormer (1945, 1946) که برای تشخیص گروهی از قبیله‌های چندساله علفی بالشتکی مناطق معتدله، ویژگی‌های مورفولوژی را به کار برد، Polhill عنوان کرد که Galegeae جدید به مجموعه‌ای از قبیله‌های معتدله دیگر، بسیار نزدیکتر و خویشاوندتر است تا به گروه‌های گرمسیری که قبلاً در Galegeae گنجانده شده بودند. از جمله این گروه‌ها می‌توان به زیرقبیله‌های Termopsieae و Robonieae معرفی شده توسط Bentham اشاره کرد. ایده فیلوژنتیک Polhill در این زمینه با کشف جهش ساختاری بزرگ (از دست دادن یک نسخه از توالی‌های تکرار معکوس (Lavin et al. 1990) در ژنوم کلروپلاستی بسیاری از تاکسون‌های مجموعه‌های بالشتکی Dormer به‌طور قابل توجهی تأیید شد. تا اینجا آنچه که حل نشده باقی ماند، این بود که آیا Galegeae، خود تک‌تبار است؟ و

چگونه این قبیله یا اعضای تک‌تبارش با دیگر قبیله‌های منطقه معتدله خویشاوندند و به آنها نسبت داده می‌شوند؟

موانعی که بر سر راه ارائه تصویر واضحی از فیلوژنی گروه وجود داشت، جنس‌های مشکوکی مثل *Galega*، *Alhagi* و *Glycyrrhiza* بودند که از نظر مورفولوژیکی از مرکز *Galegeae* واگرائیده‌اند. بنابر (Polhill 1981 c)، جنس *Alhagi* معمولاً بیشتر به *Hedysareae* منسوب می‌شود تا به *Galegeae*. جنس *Glycyrrhiza* نیز دارای فرم رویشی بالشتکی است و با در نظر گرفتن صفات رویشی مشخصه قبیله *Galegeae* و کلاً قبیله‌های معتدله، قرارگیری این جنس در این قبیله نابه‌جاست. *Galega* نیز بالشتک کاهش یافته و غلاف پرچمی موندلف نامعمولی دارد. از موانع دیگر می‌توان به وجود جنس‌های بزرگ استثنایی مثل *Astragalus* و *Oxytropis* در مرکز *Galegeae* اشاره کرد (Sanderson & Liston 1995).

(Polhill 1981 b) *Galegeae* و *Carmichaelieae* را به‌عنوان دو قبیله مجزا از هم تشخیص داد و درون *Galegeae* به ۴ زیرقبیله *Coluteineae*، *Astragalineae*، *Glegineae* و *Glycyrrhizineae* اشاره کرد. وی در سال ۱۹۹۴ با توجه به ویژگی‌های غیرعادی و متناقض جنس *Alhagi*، زیرقبیله *Alhagineae* (Yakovlev) را به‌عنوان پنجمین زیرقبیله در *Galegeae* اضافه کرد. Yakovlev در سال ۱۹۹۱ این جنس را در زیرتباری مستقل در *Galegeae* تشخیص داده بود، اما مطالعات Sanderson & Liston (1995) بر اساس داده‌های nrDNA ITS به دنبال آن مطالعات (2000, 2004) Wojciechowski et al. بر اساس داده‌های *matK* و نیز مطالعات آهن‌گریان (۱۳۸۶) بر اساس داده‌های nrDNA ITS این جنس کوچک جنوب آسیای مرکزی را مجدداً با قبیله اوراسیایی *Hedysareae* یکی ساخت، همانطور که Hutchinson هم در سال ۱۹۶۴ براساس شباهت آنها در میوه‌های بندبند ناشکوفه، *Alhagi* را در قبیله مذکور قرار داده بود.

نتایج مطالعات (Wagstaff et al. 1999) براساس داده‌های مولکولی حاصل از تعیین توالی nrDNA ITS در امتداد با نتایج حاصل از مطالعات (Sanderson & Wojciechowski 1996) نشان می‌دهند که بهتر است *Carmichaelieae* به‌عنوان زیرقبیله دیگری در *Galegeae* تحت عنوان