

Phylogeny and Character Evolution of the Genus *Geum* L. (Family Rosaceae) from Iran: Evidence from Analyses of Plastid and Nuclear DNA Sequences

Marzieh Beygom Faghir ^{1*}, Reyhaneh Pourmojib ², Robabeh Shahi Shahvan ³

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

² M. S. Student of Ecological systematic_ plant biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

³ Ph. D. Student of Ecological systematic_ plant biology, Faculty of Biology, University of Tarbiat Modares, Tehran, Iran

Abstract

In the present study, molecular phylogeny of the genus *Geum* L. in Iran, including 5 species (*G. kokanicum*, *G. iranicum*, *G. heterocarpum*, *G. rivale* and *G. urbanum*) from two subgenera (*Orthostylus* Fisch & Mey and *Geum*) were studied using nrDNA ITS and cpDNA *rpl32-trnL*_(UAG) and combined sequence data. Phylogenetic analyses were performed using maximum parsimony approach as implemented in PAUP*, Bayesian method using MrBayes program and Maximum Likelihood analysis using RaxmlGUI software. The parsimony analysis led to the formation of nrDNA ITS majority-rule consensus tree with a main clade (A), comprising *Geum* species and its related genera especially *Coluria* R. Br., *Acomastylis* Greene, *Erythrocoma* Greene and *Novosieversia* F. Bolle., arranged in two monophyletic groups. In all obtained trees, the two representatives of subgenus *Geum* completely were resolved and formed monophyletic group. While 3 species of the subgenus *Orthostylus* formed both tritomy (in nrDNA ITS sequence data analysis) and monophyletic group (in cpDNA *rpl32-trnL*_(UAG) and combined sequence data analysis). The results of the present study showed that phylogenetic relationship of the genus is strongly under the influence of hybridization and polyploidy (allopolyploidy). The current result support circumscriptions of the genus presented in flora Iranica and flora of Iran. In this study, the evolutionary trends of fruits morphology, exin sculpturing, seed micromorphology and petiole anatomy were evaluated.

Keywords: Phylogeny, *Geum*, Rosaceae, nrDNA ITS, cpDNA *rpl32-trnL*_(UAG).

* marziehbeygomfaghir@gmail.com

فیلوژنی و تکامل صفت‌ها در سرده *Geum* L. از تیره گل‌سرخیان در ایران: شواهدی بر اساس تجزیه و تحلیل‌های توالی DNA کلروپلاستی و هسته‌ای

مرضیه بیگم فقیر^{۱*}، ریحانه پورمجیب^۲، ربابه شاهی شاووان^۳

^۱ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوسیستماتیک اکولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۳ دانشجوی دکتری بیوسیستماتیک اکولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

در پژوهش حاضر، فیلوژنی مولکولی سرده *Geum* L. از ایران شامل ۵ گونه *G. iranicum*، *G. kokanicum*، *G. urbanum* و *G. rivale*، *G. heterocarpum* متعلق به دو زیرسرده (*Orthostylus* Fisch and Mey و *Geum*) با استفاده از داده‌های حاصل از توالی nrDNA ITS، cpDNA *rpl32-trnL*(UAG) و ترکیبی مطالعه شدند. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی با استفاده از روش‌های بیشینه صرفه‌جویی تعبیه‌شده در نرم‌افزار PAUP*، بایزین با استفاده از نرم‌افزار MrBayes و بیشینه درست‌نمایی در نرم‌افزار RaxmlGUI اجرا شدند. نتایج تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی به تشکیل درخت مرکزی ITS ریوزوم هسته‌ای منجر شد که دارای شاخه اصلی A حامل گونه‌های *Geum* و سرده‌های مرتبط نزدیک به آن (به‌ویژه *Erythrocoma* Greene، *Acomastylis* Greene، *Coluria* R. Br. و *Novosieversia* F. Bolle) در دو گروه تک‌نیاست. در تمام درختان حاصل، دو گونه از زیرسرده *Geum* گروهی تک‌نی تشکیل دادند؛ در حالی که گونه‌های زیرسرده *Orthostylus* به‌شکل تری‌تومی (در تجزیه و تحلیل داده‌های nrDNA ITS) و یا گروه تک‌نی (در تجزیه و تحلیل داده‌های کلروپلاستی و ترکیبی) ظاهر شدند. نتایج بررسی حاضر نشان دادند فیلوژنی مولکولی این سرده‌ها به شدت از دورگه‌گیری و پلی‌پلوئیدی (آلوپلی‌پلوئیدی) تأثیر می‌گیرد. یافته‌های بررسی حاضر محدوده سیستماتیک گونه‌های این سرده در فلورا ایرانیکا و فلورا ایران را حمایت می‌کند. در بررسی حاضر، تکامل صفت‌های ریخت‌شناسی میوه، تزئینات اگزین دانه گرده، ریزریخت‌شناسی بذر و صفت‌های تشریحی دمبرگ ارزیابی شد.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، *Geum* L.، Rosaceae، nrDNA ITS، cpDNA *rpl32-trnL*(UAG).

مقدمه

پیچیدگی آشکارا در مطالعه‌های تاکسونومیک پیشین (Linnaeus, 1735; Bolle, 1933; Focke, 1894; Rydberg, 1913; Juel, 1918; Hutchinson, 1967; Robertson, 1974; Schulze-menz, 1964) به‌ویژه

Geum L. یکی از پیچیده‌ترین سرده‌های تیره گل‌سرخیان از نظر سیستماتیک محسوب می‌شود. این

* marziehbeygomfaghir@gmail.com

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

(*Novosieversia* F. Bolle و *Coluria* R. Br., Greene گیاهان علفی چندساله‌اند که روی درخت فیلوژنی تجزیه و تحلیل ITS nrDNA در درون گروه بزرگ طایفه *Colurieae* و زیرطایفه *Geinae* قرار می‌گیرند (Smedmark and Eriksson, 2002). نتایج مطالعه‌های مولکولی پیشین محدوده سیستماتیکی *Geum* و سرده‌های جدا شده از آن (به‌غیر از *Orthostylus* (Schlecht.) F. Bolle که در نیمکره جنوبی انتشار دارد) را حمایت نمی‌کنند (Eriksson, 2002؛ این پژوهشگران ابهامات تاکسونومیکی موجود را ناشی از پدیده آلپلی پلوئیدی می‌دانند و نظریه تکامل شبکه را مطرح می‌کنند (Smedmark et al., 2005; Smedmark and Eriksson, 2006). تبارشناسی و تشخیص روابط بین دو زیرسرده و گونه‌های *Geum* در ایران با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی هسته‌ای و کلروپلاستی از جمله اهداف پژوهش حاضر است؛ همچنین بررسی شیوه تکامل صفت‌های ریخت‌شناسی میوه، تزیینات اگزین دانه‌گرده، ریزریخت‌شناسی بذر و صفت‌های تشریحی دمبرگ از دیگر اهداف مطالعه حاضرند.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، روابط فیلوژنی مولکولی ۵ گونه *Geum* شامل *G. kokanicum*, *G. heterocarpum* Khatamsaz و *G. rivale*, *G. iranica* Khatamsaz در ایران تجزیه و تحلیل شد. به این منظور، ابتدا نمونه‌های گیاهی طی بهار و تابستان سال‌های ۹۳ و ۹۴ از طبیعت جمع‌آوری و با مراجعه به فلورا ایرانیکا (Schönbech-Temsey, 1969) و فلور ایران (Khatamsaz, 1993) شناسایی شدند؛ نمونه‌های

در تعیین حد و مرز سرده و گونه‌ها منعکس شده است. گونه‌های این سرده در نواحی معتدله و قطبی دنیا و عمدتاً در ارتفاعات و بیشتر در نیمکره شمالی پراکنش دارند (Smedmark and Eriksson, 2002). پراکنش این گیاهان در ایران به مناطق شمال، شمال غرب و غرب (با ۴ گونه) و شمال شرق و مرکز (با ۱ گونه) مربوط می‌شود (جدول ۱). از میان این گونه‌ها، *G. urbanum* L. در کمترین ارتفاع (۲۰۰ متر) و *G. kokanicum* Regel and Schmalh ex Descr. در بیشترین ارتفاع (۳۴۰۰ متر) از سطح دریا رشد می‌کند (Schönbech-Temsey, 1969; Khatamsaz, 1993). گونه‌های *Geum* ریزوم، برگ‌های طوقه‌ای و بن ساقه ضخیم دارند، گلبرگ‌ها بیشتر زرد، سفید، نارنجی، قرمز تا ارغوانی‌اند، کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها ۵ عدد، پرچم‌ها ۲۰ عدد و میوه فندقه است. خامه مفصل‌دار، دارای رأس پایا و یا زودافت و قلاب‌دار است. خامه در گونه‌های *G. rivale* L. و *G. urbanum* L. مفصل انتهایی و قلاب افتان دارد که اصطلاحاً آن را Fish hook یا قلاب ماهیگیری می‌نامند (Iltis, 1913) (جدول ۲). مطالعه‌های یاخته‌شناسی پیشین نشان می‌دهند آلپلوئیدی، دورگه‌گیری بین گونه‌ای و دوبرابردن کروموزوم‌ها نقش بسزایی در شکل‌گیری و تکامل گیاهان زیرطایفه *Geinae* دارند (Gajewski, 1958). اعداد کروموزومی پایه در این سرده بسیار متغیرند (۲۸، ۴۲، ۵۶، ۷۰ و ۸۴) و تعدادی از گونه‌های این سرده هگزاپلوئید (مانند *G. rivale* و *G. urbanum*) و برخی تتراپلوئید (*G. heterocarpum*) گزارش شده‌اند (Bioss. Kalkman, 2004; Arens et al., 2004). گونه‌های *Geum* و خویشاوندان نزدیک آن (شامل *Erythrocoma* Greene، *Acomastylis*

جمع‌آوری شده در هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان نگهداری می‌شوند. در این تجزیه و تحلیل از نمونه‌های گیاهی موجود در هرباریوم‌های دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان (GUH) و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران (THE) استفاده شد.

به منظور مقایسه موقعیت فیلوژنتیک گونه‌های ایرانی *Geum* (جدول ۱)، اطلاعات توالی‌یابی شده ناحیه nrDNA ITS ۲۱ تاکسون از بانک ژن (NCBI) نیز استفاده شد (جدول ۳).

جدول ۱- ویژگی‌های نمونه‌های مطالعه شده

نام گونه/نام زیرسرده	محل جمع‌آوری	Accession. No nr DNA ITS/ <i>rpl32-trnL</i> ^(UAG)
<i>Orthostylus</i>	خراسان: سرخ‌چشمه، روئین، ۲۱۰۰ متر؛	LC336370/ LC336375
1.1. <i>G. heterocarpum</i>	منصف (THE) 6738	
1.2. <i>G. kokanicum</i>	خراسان: جادهٔ بجنورد به اسفراین، گردنه اسدی، ۱۷۳۸ متر؛	LC336371/ LC336376
	شاهی (GUH) 5751	
1.3. <i>G. iranicum</i>	خراسان: منطقهٔ گرایل، امامزاده ذکریا، شیروان؛	LC336372/ LC336377
	منصف (THE) 6714	
2. <i>Geum</i>	گیلان: ۱۴ کیلومتری لنگرود به اطاقور؛	LC336373/ LC336378
2.1. <i>G. rivale</i>	شاهی (GUH) 5753	
2.2. <i>G. urbanum</i>	گیلان: لاهیجان، سیاهکل، روستای لونک، ۴۷۶ متر؛	LC336374/ LC336379
	فقیر و عاشوری (GUH) 5749	

مطالعهٔ فیلوژنی مولکولی

(White, 1990) و به منظور انجام واکنش PCR برای توالی کلروپلاستی *rpl32-trnL*^(UAG) از آغازگرهای *rpl32* و *trnL*^(UAG) (Shaw et al., 2007) استفاده شد. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول (۴)، مواد استفاده شده برای انجام واکنش PCR در جدول (۵) و برنامهٔ PCR استفاده شده برای تکثیر قطعه‌های nrDNA ITS و *rpl32-trnL*^(UAG) در جدول (۶) آورده شده است.

مطالعهٔ فیلوژنی مولکولی شامل مراحل استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction: PCR)، تعیین توالی و هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها، تجزیه و تحلیل فیلوژنی داده‌ها و ترسیم درخت فیلوژنتیک است. DNA کل ژنوم از برگ‌های خشک شده و تازه با استفاده از کیت استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی Qiagene استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

به منظور تکثیر توالی‌های nrDNA ITS از آغازگرهای ITS_{5m} (Sang et al., 1995) و ITS₄

جدول ۲- رویشگاه و صفت‌های کلیدی نمونه‌های مطالعه‌شده

صفت‌های کلیدی متمایزکننده	رویشگاه گونه‌های مطالعه‌شده	نام گونه/نام زیرسرده
میوه دارای قلاب، فقط قسمت بالای خامه پایا و بدون کرک، بند تقریباً وسط خامه	آذربایجان و گلستان: ۱۷۰۰-۲۰۰۰ متر	<i>Orthostylus</i> 1.1 <i>G. heterocarpum</i>
میوه دارای قلاب، خامه پایا و کرک‌دار، بند تقریباً وسط خامه	تهران، خراسان و مازندران: ۱۷۰۰-۳۰۰۰ متر	1.2. <i>G. kokanicum</i>
میوه دارای قلاب، خامه پایا و کرک‌دار، بند خامه تقریباً قاعده‌ای	خراسان: ۲۳۰۰-۳۰۰۰ متر	1.3. <i>G. iranicum</i>
میوه دارای قلاب ماهیگیری، قلاب عمودی، خامه دارای بند انتهایی	آذربایجان، مازندران، تهران، گلستان و مازندران: ۲۰۰۰-۳۰۰۰ متر	2. <i>Geum</i> 2.1. <i>G. rivale</i>
میوه دارای قلاب ماهیگیری، قلاب افقی، خامه دارای بند انتهایی	گیلان، آذربایجان، گلستان، کردستان، کرمانشاه و مازندران: ۲۸۰۰-۲۰۰۰ متر	2.2. <i>G. urbanum</i>

جدول ۳- نمونه‌های استفاده‌شده از بانک ژن برای تجزیه و تحلیل فیلوژنی

Species	DNA source	Accession no. nr DNA ITS/ <i>rpl32-trnL</i> (UAG)
1. <i>Acaena cylindristachya</i> Ruiz and Pav.	Eriksson <i>et al.</i> , 2003	27524340/—
2. <i>Acaena laevigata</i> W.T. Aiton	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	27524340/—
3. <i>Agrimonia eupatoria</i> Michx.	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	U90798/—
4. <i>Alchemilla stuhmannii</i>	Gehrke <i>et al.</i> , 2008	EU072564/KT322072.1
5. <i>Aphanes arvensis</i> L.	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	AJ511770/—
6. <i>Aremonia agrimonioides</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	U90799/—
7. <i>Chamaerhodos erecta</i> (L.) Bunge	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	U90794/AJ512219
8. <i>Fallugia paradoxa</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	U90805/AJ297331
9. <i>Filipendula vulgaris</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	AJ416467/—
10. <i>Leucosidea sericea</i>	Helfgott <i>et al.</i> , 2000	AF183547/AF183524
11. <i>Polylepis hieronymi</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 2003	AJ512774/—
12. <i>Polylepis tarapacana</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 2003	AJ512773/—
13. <i>Rosa majalis</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 2003	U90801/—
14. <i>Rosa persica</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	AJ416468 /—
15. <i>Rubus chamaemorus</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 1998	U90803/—
16. <i>Sanguisorba officinalis</i>	Helfgott <i>et al.</i> , 2000 Zhang <i>et al.</i> , 2017	AF183533, AF183556/ KY419975.1
17. <i>Tetraglochin cristatum</i>	Eriksson <i>et al.</i> , 2003	AJ512777/—
18. <i>Waldsteinia geoides</i>	Smedmark and Eriksson, 2002	AJ302362/—
19. <i>Sibbaldia parviflora</i>	Lundberg <i>et al.</i> , 2009	226858232/—

جدول ۴- توالی آغازگرهای استفاده‌شده در تکثیر قطعه هسته‌ای ITS (White *et al.* 1990; Sang *et al.*, 1995) و قطعه کلروپلاستی (*rpl32-trnL*(UAG) (Shaw *et al.*, 2007))

توالی آغازگر	جهت حرکت آغازگر	نام آغازگر
5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'	آغازگر رفت	ITS _{5M}
5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	آغازگر برگشت	ITS ₄
5'-CAG TTCCAAAAAACGTACTTC-3'	آغازگر رفت	<i>rpl32</i>
5'-CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT-3'	آغازگر برگشت	<i>trnL</i> (UAG)

جدول ۵- مواد موجود در محلول نهایی PCR قطعه‌های هسته‌ای nrDNA ITS و کلروپلاستی *rpl32-trnL*_(UAG)

مقدار استفاده شده	غلظت	نام ماده	آغازگر
۱۰ میکرولیتر	—	آب دیونیزه	nrDNA ITS
۱۰ میکرولیتر	2X	PCR Master Mix	
۰/۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول بر میکرولیتر	آغازگر رفت	
۰/۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول بر میکرولیتر	آغازگر برگشت	
۱ میکرولیتر	—	دی‌متیل سولفو کساید (DMSO)	
۰/۸ میکرولیتر	۲۰-۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر	DNA الگو	
۱۰ میکرولیتر	—	آب دیونیزه	<i>rpl32-trnL</i> _(UAG)
۱۰ میکرولیتر	2X	PCR Master Mix	
۰/۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول بر میکرولیتر	آغازگر رفت	
۰/۵ میکرولیتر	۱۰ پیکومول بر میکرولیتر	آغازگر برگشت	
۱/۵ میکرولیتر	۲۰-۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر	DNA الگو	

word در آمدند؛ سپس هم‌ردیف‌سازی آنها با استفاده از برنامه Clustal X (Larkin *et al.*, 2007)، نرم‌افزار Muscle v4.0 (Edgar, 2004) و به‌طور چشمی انجام شد.

به‌منظور اطمینان یافتن از تکثیر درست قطعه مدنظر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شدند. توالی‌های حاصل از ناحیه کلروپلاستی و هسته‌ای با نرم‌افزار Bio Edit مشاهده و با فرمت Fasta به‌شکل

 جدول ۶- برنامه PCR استفاده شده برای تکثیر قطعه nrDNA ITS/*rpl32-trnL*_(UAG)

زمان	دما	مرحله واکنش
۲:۳۰"/۲:۳۰"	۹۴/۹۴ درجه سانتی‌گراد	واسرشتگی اولیه
۱'/۱'	۹۴/۹۴ درجه سانتی‌گراد	واسرشتگی
۱'/۱'	۴۷/۴۶ درجه سانتی‌گراد	اتصال آغازگرها
۱:۳۰"/۱'	۷۲/۷۲ درجه سانتی‌گراد	گسترش اولیه
۷'/۷'	۷۲/۷۲ درجه سانتی‌گراد	گسترش نهایی

از نرم‌افزار PAUP* 4.b10 (Swofford, 2002) و روش بایزین با استفاده از نرم‌افزارهای Mrbayes نسخه ۳/۲ (Ronquist *et al.*, 2012) و raxmlGUI نسخه ۱/۳ (Silvestro and Michalak, 2012) و در سایت <http://www.phylo.org/> (Miller *et al.*, 2010) اجرا شد. در روش بیشینه صرفه‌جویی با به‌کارگیری روش

تجزیه و تحلیل فیلوژنی

در پژوهش حاضر، داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده موجود در ماتریس به روش‌های بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony)، بایزین (Bayesian) و بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) تجزیه و تحلیل شدند. روش بیشینه صرفه‌جویی با استفاده

جستجوی ابتکاری (Heuristic search)، تبادل شاخه (Branch Swapping) با استفاده از الگوریتم دونیمه‌سازی و اتصال مجدد درخت (Tree Bisection) (Reconnection: TBR) و انتخاب گزینه‌های MulTrees و Simple addition sequence و با Maxtree=10000 انجام شد. تعیین شاخص سازگاری (Rescaled Consistency Index: RC)، شاخص پایداری (Consistency Index: CI) و شاخص گروه‌پذیری (Retention Index: RI) نیز در نرم‌افزار PAUP* 4.b10 (Swofford, 2002) اجرا شد. به‌منظور تعیین مدل تکاملی مناسب برای داده‌های مدنظر از برنامه MrModeltest نسخه ۲/۳ (Nylander, 2004) استفاده شد؛ به‌این‌ترتیب که MrModeltest با استفاده از PAUP*، درخت الحاق همسایگان (Neighbour-joining) را بر اساس فاصله ژنتیکی Jukes-Cantor برای داده‌های مدنظر ساخت و سپس ۲۴ مدل تکاملی متفاوت تعبیه‌شده روی درخت ارزیابی شدند و بهترین مدل بر اساس مقادیر بیشینه درست‌نمایی ارائه و درنهایت بر اساس معیار اطلاعاتی (Akaike Information Criterion: AIC) (Posada and Buckley, 2004) انتخاب شد. تجزیه و تحلیل Bayesian بر اساس قاعده آماری مدل‌های مختلفی بنا نهاده شده است که به‌عنوان احتمالات اولیه یا پیشین (posterior probabilities) در نظر گرفته می‌شوند؛ بنابراین بر اساس معیار اطلاعاتی Akaike (AIC)، مدل GTR+G برای داده‌های cpDNA *rpl32* و مدل GTR+G برای داده‌های ترکیبی *trnL(UAG)* و توالی‌های nrDNA ITS انتخاب شدند. پیش‌فرض برنامه برای تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی زنجیره مارکوف مونت کارلو (Markov chain Monte Carlo) شامل

سه زنجیره گرم و یک زنجیره سرد بود که برای ۱۰ میلیون نسل اجرا و هر ۱۰۰۰ نسل، یک درخت نمونه‌برداری شد؛ سپس ۲۵ درصد درختان، یعنی درختانی که به مرحله همگرایی نرسیده بودند و احتمال پسین خوبی نداشتند، سوزانده شدند و همگرایی زنجیره‌ها بر اساس مقدار (Potential Scale Reduction Factor: PSRF) (Gelman and Rubin, 1992) بررسی شد؛ این مقدار، واریانس بین و درون دو اجرا را مقایسه می‌کند و باید به یک که نشان‌دهنده نمونه‌برداری مناسب برای توزیع احتمالات ثانویه است نزدیک باشد (Ronquist et al., 2009). درختان باقیمانده برای مشاهده یک درخت اجماعی ۵۰ درصد استفاده و در Treeview version نسخه ۱/۶/۶ (Page, 2001) مشاهده شدند.

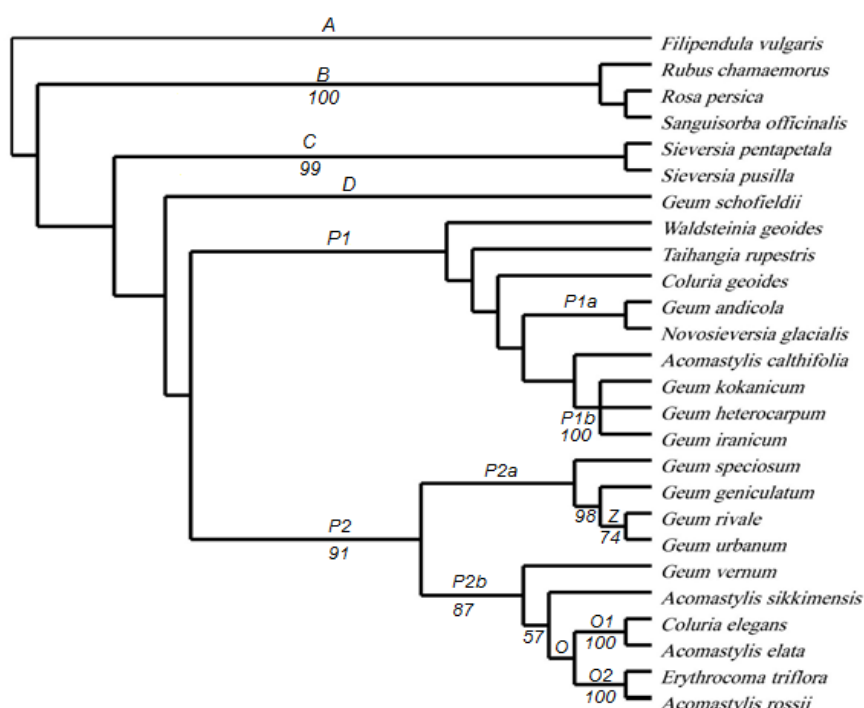
نتایج

تجزیه و تحلیل کلادیستیک داده‌های قطعه nrDNA ITS به روش بیشینه صرفه جویی

در این تجزیه و تحلیل، ۵ گونه از *Geum* در ایران و گونه‌های خویشاوند آن ارزیابی شدند و درخت مرکزی به طول ۶۳۱ با شاخص سازگاری یا پایداری ۰/۶۲۲۸ (Consistency index (CI)=0.6228)، شاخص اتکا یا گروه‌پذیری ۰/۶۹۱۷ (RI)=0.6917، شاخص همپلازی ۰/۳۷۷۲ (Retention index)، شاخص (Homoplasy index (HI)=0.3772) و شاخص سازگاری ارزش‌گذاری‌شده ۰/۴۳۰۸ (Rescaled consistency index (Rci)=0.4308) حاصل شد. در این تجزیه و تحلیل، شاخه‌های حامل *Filipendula vulgaris* (A)، *Rubus chamaemorus* (B)، *Rosa persica*

و *Sieversia pusilla*، *Sieversia pentapetala* (C) و شاخه مستقل *Geum schofieldii* به ترتیب به شکل پارافیلیتیک در قسمت پایین درخت دیده می‌شوند و در این بین، شاخه‌های A و B برون‌گروه در نظر گرفته می‌شوند. این درخت، یک گره اصلی P دارد که به طور تفکیک‌شده حامل شاخه‌های P1 و P2 متشکل از دو درون‌گروه است. P1 شامل گونه‌های *Waldsteinia*، *Coluria geoides*، *Taihangia rupestris*، *geoides*، *Novosieversia glacialis*، *Geum andicula*، *Geum kokanicum*، *Acomastylis calthifolia*، *Geum heterocarpum*، *Geum iranikum* است که در این بین، *Waldsteinia geoides*، *Taihangia*، *Coluria geoides*، *rupestris* و *Acomastylis calthifolia* به شکل شاخه‌های مستقل و پارافیلیتیک قرار دارند؛ درحالی که *Geum andicula* و *Novosieversia glacialis* یک گروه کوچک تک‌تبار تشکیل داده‌اند (P1a) و سه گونه *Geum kokanicum*، *Geum heterocarpum* و *Geum iranikum* به حالت پلی‌تومی (P1b) مشاهده می‌شوند. P2 شامل دو درون‌گروه است: در زیرگروه P2a، *Geum speciosum* و *Geum geniculatum* روی شاخه‌ای مستقل با *Geum rivale* و *Geum urbanum* که به شکل یک گروه تک‌تبار دیده می‌شوند، نسبت خواهری برقرار

کرده‌اند؛ P2b شامل گونه‌های *Geum vernum* و *Acumastylis sikkimensis* روی شاخه‌های پارافیلیتیک است و این دو گونه با گروهی که شامل *Coluria elegans* و *Acomastylis elata* (O1) و *Erythrocoma triflora* و *Acomatylis rossii* (O2) است، نسبت خواهری دارند (شکل ۱). به منظور مقایسه موقعیت فیلوژنتیک گونه‌های ایرانی *Geum*، تجزیه و تحلیل مشابهی بدون حضور وابستگان نزدیک انجام شد (شکل نشان داده نشده است) که به درخت مرکزی به طول ۱۰۴ با شاخص سازگاری یا پایداری ۰/۹۳۲۷، شاخص اتکا یا گروه‌پذیری ۰/۹۲۷۱، شاخص هم‌پلازی ۰/۰۶۷۳ و شاخص سازگاری ارزش‌گذاری شده ۰/۸۶۴۷ منتج شد. در این درخت فیلوژنی، دو گونه *Sanguisorba officinalis* و *Alchemilla stuhmannii* از گیاهان طایفه *Potentilleae* به عنوان برون‌گروه قرار دارند. این درخت، یک گره اصلی A و دو کلاد کاملاً تفکیک‌شده A1 و A2 با ارزش ۱۰۰ دارد. شاخه A1 متشکل از دو گونه *G. rivale* و *G. urbanum* است که به طور تفکیک‌شده یک گروه تک‌تبار تشکیل داده‌اند و شاخه A2 شامل سه گونه *G. kokanicum*، *G. heterocarpum* و *G. iranikum* است که به شکل تری‌تومی قرار گرفته‌اند.



شکل ۱- درخت مرکزی مطلق اطلاعات nrDNA ITS حاصل از تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه جویی؛ A. ۵ گونه *Geum* و گونه های خویشاوند آن

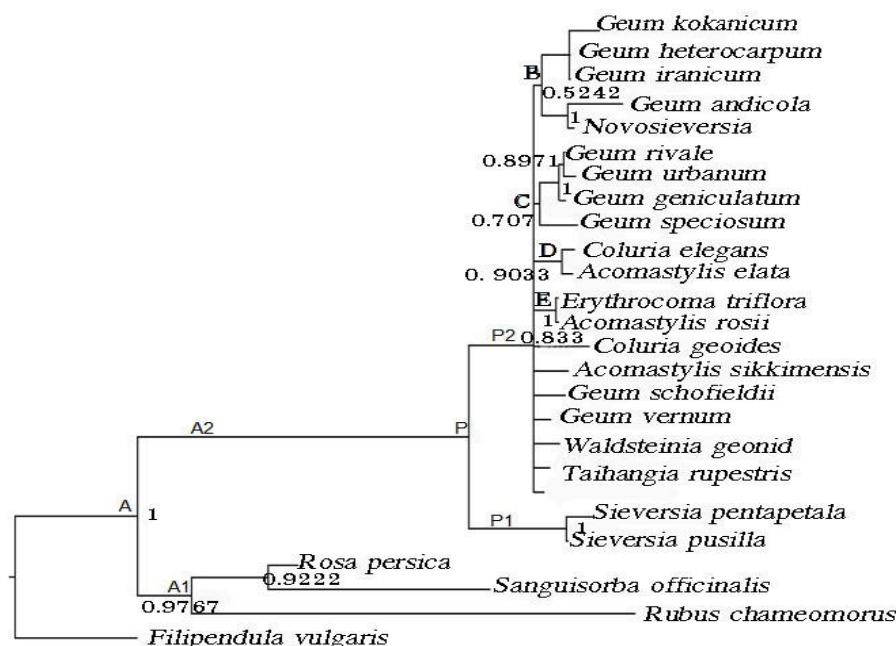
تجزیه و تحلیل کلادیستیک داده های قطعه بین ژنی ITS nrDNA به روش بایزین (Bayesian)

روی درخت مرکزی ITS، از گره A که روی شاخه ای با احتمال پسین یک قرار دارد، دو شاخه اصلی A1 و A2 منشأ می گیرند. شاخه A1 حامل برون گروهی متشکل از سه گونه *Rosa persica*، *Sanguisorba officinalis* (احتمال پسین ۰/۹۲۲۷) و *Rubus chamaemorus* (احتمال پسین ۰/۹۷۶۵) است؛ ضمن اینکه *Filipendula vulgaris* به شکل شاخه ای مستقل در قاعده درخت مشاهده می شود. در شاخه A2، گره P با احتمال پسین یک شامل دو زیرشاخه P1 و P2 است که P1 گره کوچک تک تباری متشکل از دو گونه *Sieversia pentapetala* و *Sieversia pusilla* است (احتمال پسین یک) و گره P2 با احتمال پسین ۰/۶۳ بزرگ ترین درون گروه این درخت است که

متشکل از ۴ زیرگروه تک تبار B (*G. kokanicum*) و *G. andicola*، *G. heterocarpum*، *G. iranicum* با احتمال پسین ۰/۵۲۲۴ (*Novosieversia*) با (*Coluria elegans* و *Acomastylis elata*) D احتمال پسین ۰/۹۰۹۸، C (*G. urbanum*، *G. rivale*) با احتمال پسین ۰/۷۹۰۷ و E (*Erythrocoma triflora*) و (*Acomastylis rossii*) با احتمال پسین یک و ۷ گونه *Waldsteinia geoides*، *Taihangia rupestris*، *Geum schofieldii*، *Geum vernum*، *Acomastylis calthifolia*، *Coluria* و *Acomastylis sikkimensis* است که شاخه های پارافلیتیک به شکل پلی تومی و تفکیک نشده دیده می شوند؛ در این بین، گروه تک تبار B متشکل از ۵ گونه است که سه گونه *G. kokanicum*، *G. heterocarpum*، *G. iranicum* یک گروه را روی انتهایی ترین شاخه های درخت

G. urbanum و *G. rivale* به شکل شاخه‌های تفکیک شده با احتمال پسین ۰/۸۹ هستند (شکل ۲).

تشکیل داده‌اند و دومین زیرگروه B شامل *G. Andicola* و *Novosieversia* با احتمال پسین یک است. زیرگروه C شامل ۴ گونه است که از میان آنها



شکل ۲- درخت حاصل از اطلاعات قطعه بین ژنی nrDNA ITS گونه‌های *Geum* و خویشاوندان آن به روش بایزین؛ احتمال پسین روی شاخه‌ها و نام شاخه‌ها با حروف الفبای زیر آنها نشان داده شده‌اند.

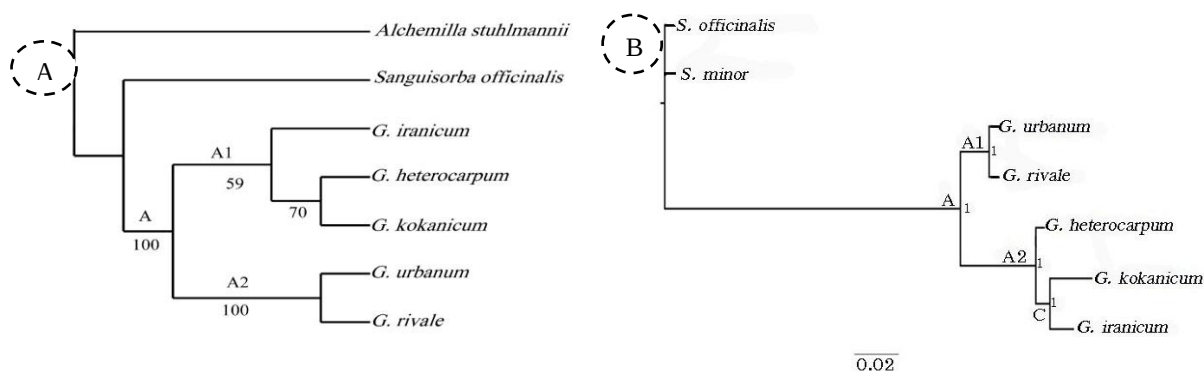
ارزش ۱۰۰ منشأ می‌گیرند. شاخه A1 حامل درون‌گروهی متشکل از سه گونه *G. heterocarpum*، *G. kokanicum* و *G. iranicum* با حمایت ۵۷ درصد است. در این بین، *G. iranicum* با دو گونه دیگر نسبت خواهری نشان می‌دهد و روی یک شاخه پارافیلیتیک به طور مستقل قرار می‌گیرد؛ ضمن اینکه دو گونه *G. kokanicum* و *G. heterocarpum* روی یک شاخه با ارزش ۷۰ درصد قرار می‌گیرند. شاخه A2 نیز با حمایت ۱۰۰ درصد حامل دو گونه کاملاً تفکیک شده از گونه‌های *G. urbanum* و *G. rivale* است (شکل ۳، A).

تجزیه و تحلیل کلادیستیک داده‌های قطعه ژنوم کلروپلاستی *rpl32-trnL*(UAG) به روش بیشینه صرفه جویی

اطلاعات توالی *rpl32-trnL*(UAG) ردیف خوانی شده برای ۷ تاکسون شامل ۲ برون‌گروه و ۵ درون‌گروه و ۵۷۳ صفت اجرا شد که از میان آنها، ۷۰ صفت اطلاعاتی بودند. از تجزیه و تحلیل فیلوژنی، درخت مرکزی به طول ۹۷، شاخص پایداری ۰/۸۱۴۴، شاخص همپلازی ۰/۱۸۵۶، شاخص اتکا یا گروه‌پذیری ۰/۷۷۵۰ و شاخص ارزش گذاری ۰/۶۳۱۲ به دست آمد. درخت مرکزی مطلق دو شاخه اصلی حامل درون‌گروه‌های تک‌نیا دارد که از گره اصلی A با

تجزیه و تحلیل کلادیستیک داده‌های قطعه بین‌ژنی کلروپلاستی $rpl32-trnL_{(UAG)}$ به روش بایزین (Bayesian)

روی درخت مرکزی ITS، گره اصلی A با احتمال پسین یک دیده می‌شود که از آن دو شاخه A1 و A2 منشأ می‌گیرند. شاخه A1 شامل گونه‌های *G. urbanum* و *G. rivale* است که با احتمال پسین یک به‌طور کاملاً حل‌شده دیده می‌شوند. سه گونه *G. iranica*، *G. kokanica*، *G. heterocarpum* روی شاخه A2 دیده می‌شوند که در این بین، گونه‌های



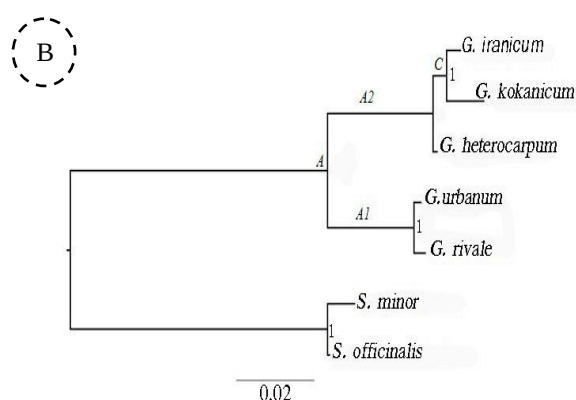
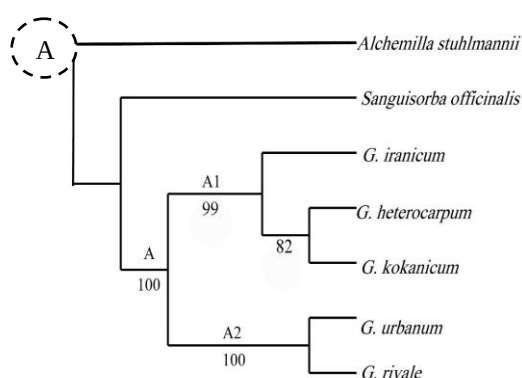
شکل ۳- درختان حاصل از داده‌های قطعه بین‌ژنی کلروپلاستی $rpl32-trnL_{(UAG)}$ گونه‌های *Geum* و وابستگان نزدیک آن؛ A. درخت مرکزی مطلق به روش بیشینه صرفه‌جویی، B. درخت مرکزی مطلق به روش بایزین. احتمال پسین روی شاخه‌ها و نام شاخه‌ها با حروف الفبای زیر آنها نشان داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل کلادیستیک ترکیبی دو قطعه بین‌ژنی $rpl32-trnL_{(UAG)}$ و ITS به روش بیشینه صرفه‌جویی

نتیجه تجزیه و تحلیل ردیف‌خوانی اطلاعات ترکیبی شامل ۷ تاکسون متشکل از ۲ برون‌گروه و ۵ درون‌گروه و ۱۳۴۱ صفت بود که در میان این صفت‌ها، ۱۱۷۲ صفت غیراطلاعاتی و ۱۶۹ صفت اطلاعاتی وجود داشت. از تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنی مطلق ترکیبی، درخت مرکزی به طول ۲۱۷، شاخص پایداری

۰/۸۸۹۴، شاخص هموپلازی ۰/۱۱۰۶، شاخص اتکا ۰/۸۷۸۸ و شاخص ارزش‌گذاری ۰/۸۷۱۶ به دست آمد. درخت مرکزی مطلق دارای دو شاخه اصلی حامل درون‌گروه‌های تک‌نیاست که از گره اصلی A با ارزش ۱۰۰ منشأ می‌گیرند. شاخه A1 با حمایت ۹۹ درصد حامل درون‌گروهی متشکل از سه گونه *G. iranica*، *G. kokanica*، *G. heterocarpum* است که گونه آخر با دو گونه دیگر نسبت خواهری نشان می‌دهد و به‌طور مستقل روی یک شاخه

حل شده دیده می‌شوند. روی شاخه A2، سه گونه *G. iranicum* و *G. kokanicum*، *G. heterocarpum* دیده می‌شوند که در این بین، گونه‌های *G. iranicum* و *G. kokanicum* روی شاخه کوچک‌تر C با احتمال پسین یک قرار گرفته‌اند؛ درحالی‌که *G. heterocarpum* روی شاخه مستقل دیده می‌شود. دو گونه *G. iranicum* و *G. kokanicum* با *G. heterocarpum* نسبت خواهری برقرار کرده‌اند؛ در ضمن، گونه‌های *Sanguisorba officinalis* و *Sanguisorba minor* به‌عنوان برون‌گروه در قاعده درخت دیده می‌شوند (شکل ۴، B).



شکل ۴- درختان مرکزی مطلق حاصل از اطلاعات ترکیبی دو قطعه بین‌ژنی *rpl32-trnL*(UAG) و *ITS* DNA. به روش بیشینه صرفه‌جویی، B. به روش بایزین. احتمال پسین روی شاخه‌ها و نام شاخه‌ها با حروف الفبای زیر آنها نشان داده شده‌اند.

Sanguisorba minor و *Sanguisorba officinalis* برون‌گروه انتخاب شدند.

در این تجزیه و تحلیل، گونه‌های خویشاوند سرده *Taihangia*، *Waldsteinia geoides*، *Geum* L.، *Novosieversia*، *Geum andicula*، *rupestris*، *Geum*، *Acomastylis calthifolia*، *glacialis*، *Acomastylis elata*، *Coluria elegans*، *vernum*

پارافیلتیک قرار می‌گیرد؛ ضمن اینکه دو گونه *G. urbanum* و *G. rivale* روی یک شاخه با ارزش ۱۰۰ درصد قرار می‌گیرند. توپولوژی درخت ترکیبی با درخت کلروپلاستی مطابقت دارد (شکل ۴، A).

تجزیه و تحلیل اطلاعات ترکیبی *rpl32-trnL*(UAG) و *ITS* و رسم درخت ترکیبی به روش بایزین

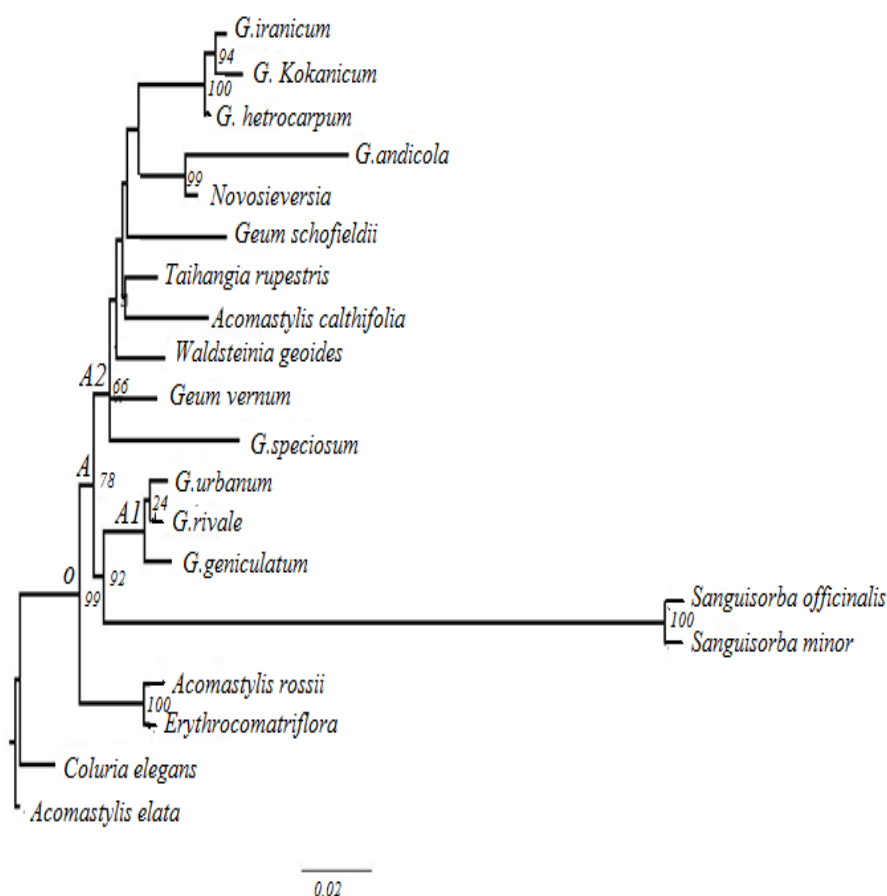
روی درخت مرکزی، گره اصلی A با احتمال پسین یک دیده می‌شود که از آن دو شاخه A1 و A2 منشأ می‌گیرند. شاخه A1 شامل گونه‌های *G. urbanum* و *G. rivale* است که با احتمال پسین یک به‌طور کاملاً

نتایج تجزیه و تحلیل ترکیبی دو قطعه بین‌ژنی *rpl32-trnL*(UAG) و *ITS* nrDNA به روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum likelihood)

نتایج تجزیه و تحلیل به روش بیشینه درست‌نمایی تا حدودی مشابه دو روش بیشینه صرفه‌جویی و بایزین (شکل ۵) و شاخه‌بندی کلادها مشابه درخت حاصل از تجزیه و تحلیل بایزین بود. در این روش نیز انتخاب برون‌گروه همانند دو روش پیشین انجام شد و دو گونه

می‌شوند و *Taihangia rupestris* و *Acomastylis calthifolia* گروه کوچکی تشکیل می‌دهند. در قسمت بالاتر درخت، *G. schofieldii* شاخه منفردی ایجاد کرده است که با دو گونه *G. andicola* و *Novosieversia glacialis* که در مجاورت هم روی شاخه‌ای با حمایت ۹۹ درصد قرار گرفته‌اند، نسبت خواهری نشان می‌دهد. در درخت حاصل از تجزیه و تحلیل بیشینه درست‌نمایی، انتهایی‌ترین شاخه به گروهی متشکل از سه گونه *G. kokanicum*، *G. iranikum* و *G. hetercarpum* مربوط است که در این بین، *G. hetercarpum* با دو گونه *G. kokanicum* و *G. iranikum* نسبت خواهری نشان می‌دهد.

Geum Acomatylis rossii، *Erythrocuma triflora* و *Geum speciosum*، *schofieldii* و *Geum geniculatum* شرکت داشتند. گونه‌های *Coluria elegans*، *Acomastylis elata* در *Acomatylis rossii* و *Erythrocuma triflora* در گروه کوچک پارافلیتیک دیده می‌شوند. از گره اصلی A دو شاخه اصلی A1 و A2 منشأ می‌گیرند. در شاخه A1، گونه‌های *G. rivale*، *G. urbanum* و *G. geniculatum* در یک گروه قرار می‌گیرند و *Sanguisorba minor* و *Sanguisorba officinalis* با آنها نسبت خواهری نشان می‌دهند. در درون گروه A2، گونه‌های *G. vernum*، *G. speciosum* و *Waldsteinia geoides* روی شاخه‌های منفرد دیده

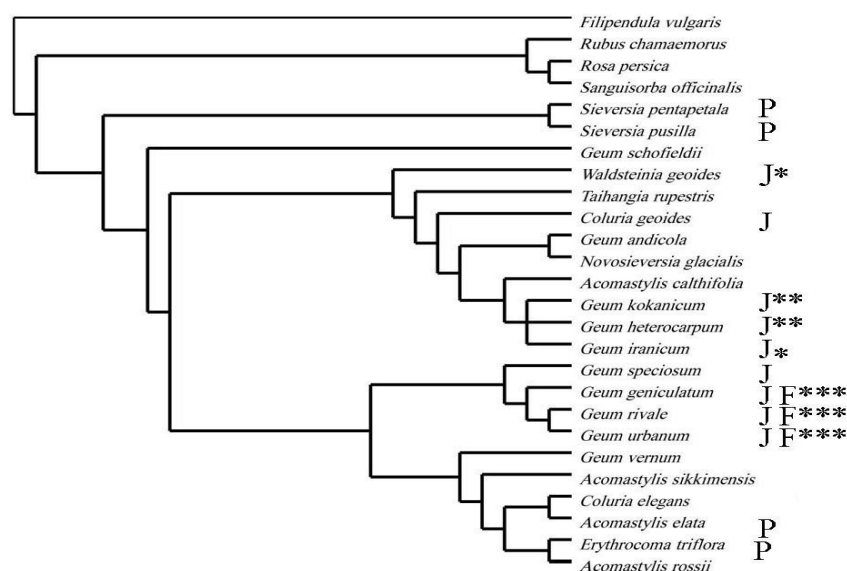


شکل ۵-درخت حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های ترکیبی به روش بیشینه درست‌نمایی؛ ارزش‌های کمتر از ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

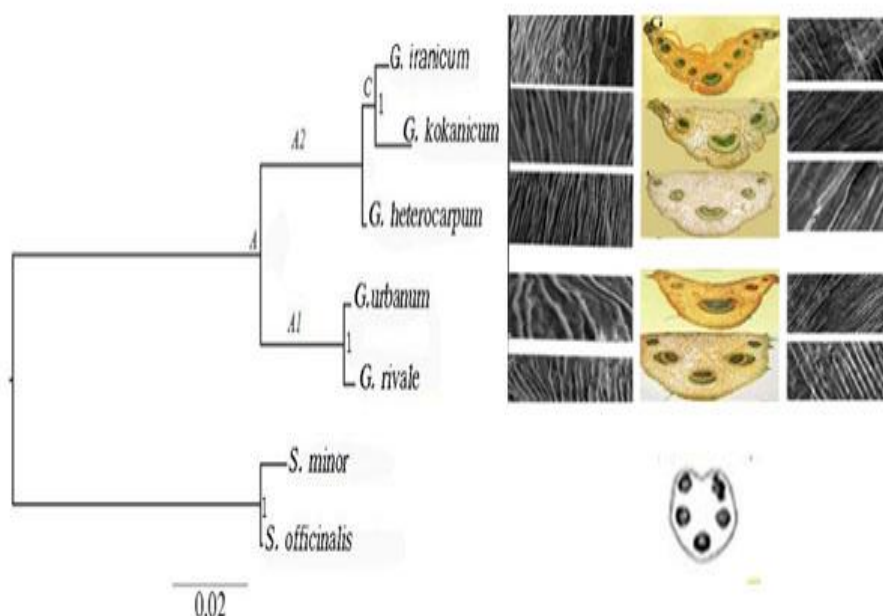
تکامل صفت‌های ریخت‌شناسی شامل میوه، گرده و ساختار تشریحی دمبرگ

باتوجه به اهمیتی که این صفت‌ها از نظر سیستماتیک
سرده *Geum* L. دارند، روی درخت مرکزی

تجزیه و تحلیل ITS nrDNA بیشینه صرفه‌جویی و
درخت حاصل از تجزیه و تحلیل ترکیبی بایزین منطبق
شدند.



شکل ۶- صفت‌های میوه روی درخت بیشینه صرفه‌جویی مرکزی مطلق حاصل از تجزیه و تحلیل nrDNAITS گونه‌های *Geum* و خویشاوندان آن منطبق شده است؛ صفت‌های میوه: J. میوه قلاب‌دار، JF. میوه قلاب ماهیگیری، * بند قاعده‌ای، ** بند مرکزی، *** بند انتهایی



شکل ۷- تزیینات اگزین دانه گرده (ردیف اول از سمت چپ)، ساختار تشریحی دمبرگ و صفت‌های ریزریخت‌شناسی پوسته بذر (ردیف اول از سمت راست) روی درخت ترکیبی حاصل از تجزیه و تحلیل بایزین منطبق شده‌اند (تصاویر از مطالعه Faghir et al., 2015 اقتباس شده‌اند).

بحث

تجزیه و تحلیل فیلوژنی سرده *Geum* در چهارچوب فیلوژنی تیره گل سرخیان یا زیرتیره *Rosiodea* و با دخالت تعداد محدودی از گونه‌های این سرده مانند *G. urbanum* و خویشاوندان نزدیک آن مانند *Fallugia* و *Waldsteinia* انجام شد (Morgan et al., 1994; Smedmark et al., 2003). بر این اساس، این تاکسون‌ها روی شاخه‌ای پارافلیتیک با گیاهان زیرتیره *Rosoidea* نسبت خواهری نشان دادند و دو گونه سرده *Geum* و *Waldsteinia* در وضعیت تک‌تبار قرار گرفتند. سپس تجزیه و تحلیل فیلوژنی مولکولی سرده *Geum* با شرکت تعداد بیشتری از گونه‌های این سرده و وابستگان نزدیک آن انجام شد. درحقیقت، خویشاوندان نزدیک به سرده *Geum* از گروهی موسوم به طایفه *Dryadeae* جدا شده‌اند (Focke, 1894; Schulze-Menz, 1964; Hutchinson, 1967; Robertson, 1974; Kalkman, 2004) و به‌غیراز *Dryas* شامل گونه‌های *Sieversia*، *Fallugia*، *Coluria*، *Taihangia*، *Waldsteinia* و *Geum* می‌شوند. این گروه عمده‌تاً در ارتفاعات نواحی معتدله و قطبی نیمکره شمالی انتشار دارند، علفی چندساله‌اند و برگ‌های شانهای نامنظم، گلبرگ‌های زرد، نارنجی، سفید، قرمز تا بنفش و میوه‌هایی با خامه پایا (منقاردار) و قلاب‌دار، راست، طویل یا پردار دارند. Smedmark و Eriksson در سال ۲۰۰۲ ضمن بازسازی درختان فیلوژنی nrDNAITS و *trnL-trnF* کلروپلاستی و ترکیبی، شاخه اصلی حامل این گروه را *Colurieae* و گروه گیاهان علفی چندساله آن را *Geinae* نام‌گذاری کردند که شامل *Waldsteinia* Willd.، *Coluria*، *Taihangia* Yu، R.Br. و گونه‌های سرده *Geum*

است؛ هرچند در مطالعه بعدی Smedmark و همکاران (۲۰۰۳) روابط فیلوژنی این گروه حل نشده گزارش شد. نتایج حاصل از داده‌های توالی nrDNAITS ۵ گونه *Geum* در ایران و ۲۱ گونه از وابستگان نزدیک آن به تشکیل درختانی با گره اصلی کاملاً حمایت‌شده منجر شد که از آن، سه شاخه قاعده‌ای پارافلیتیک و یک درون‌گروه اصلی منشأ می‌گیرد. شاخه‌های قاعده‌ای حامل گونه‌های *Rubus*، *Filipendula vulgaris* و *Sanguisorba*، *Rosa persica*، *chamaemorus* و *officinalis* (که برون‌گروه در نظر گرفته می‌شوند) و دو گونه *Sieversia pentapetala* و *Sieversia pusilla* هستند. این گیاهان روی درختان پژوهش‌های پیشین نیز وضعیت مشابهی (Smedmark and Eriksson, 2002) دارند؛ برخی صفت‌های مشترک ابتدایی (شکل رویشی، ریخت‌شناسی میوه) علت قرارگرفتن این گیاهان روی شاخه‌های پارافلیتیک قاعده‌ای‌اند (Smedmark et al., 2003, 2005; Smedmark and Eriksson, 2006). گونه‌های سرده *Geum* در موقعیت کنونی تک‌تبار نیستند. این تاکسون‌ها همراه با گونه‌های وابسته در درون‌گروه بزرگی روی شاخه *P* و درون شاخه‌های *P1* و *P2* تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی و *B* و *C* تجزیه و تحلیل بایزین تجمع یافته‌اند. شاخه‌های درختان ITS حاصل از این تجزیه و تحلیل‌ها حمایت نسبتاً زیادی دارند؛ درحالی‌که درختان ITS حاصل از مطالعه‌های Smedmark و Eriksson در سال ۲۰۰۲ حمایت ضعیفی دارند. از نظر توپولوژی، درخت ITS تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی حاضر مشابه تجزیه و تحلیل Smedmark و Eriksson در سال ۲۰۰۲ است؛ همچنین گونه‌های مورد مطالعه این درخت به‌ویژه

در درون گروه اصلی تفکیک بهتری را نشان می‌دهند و گروه‌بندی گونه‌ها به شکل روشن‌تری اتفاق افتاده است. موقعیت گونه‌های *Waldsteinia goides*، *Geum Coluria goides*، *Taihangia rupestris* و *schofieldi* و *Acomastylis calthifolia* در درختان حاصل مشابه درختان مطالعه‌های Smedmark و Erikson در سال ۲۰۰۲ و به شکل تفکیک نشده باقی ماند؛ درحالی‌که ارتباط دو گونه *Geum andicola* و *Novosieversia glacialis* به شکل تک‌تبار مشخص شد. ۵ گونه مورد مطالعه بر اساس نتایج داده‌های *trnL-trnF*، *nrDNA ITS* و ترکیبی در گروه‌های مجزا تفکیک می‌شوند. در این بین، دو گونه زیرسرده *Geum* شامل *G. rivale* و *G. urbanum* در مجاورت *G. speciosum* و *G. geniculatum* (شکل‌های ۳ و ۴) و یا در گروه دوتایی (شکل‌های ۳ و ۴) کنار هم دیده می‌شوند؛ این گروه شامل گونه‌های هگزاپلوئید 6x (*G. rivale* و *G. urbanum*) و *G. Speciosum* با عدد کروموزومی 10x (بند قاعده‌ای) است. عدد کروموزومی پایه *G. geniculatum* تاکنون گزارش نشده است، اما مانند گونه‌های هگزاپلوئید یادشده میوه قلاب ماهیگیری دارد. دو گونه *G. rivale* و *G. urbanum* صفت‌های ریخت‌شناسی، تشریحی، ریزریخت‌شناسی و گرده‌شناسی مشترکی دارند (Faghir et al., 2015, 2017)؛ همچنین بر اساس منابع موجود، دو گونه زیرسرده *Geum* به طور مشابه بیشتر در استان‌های شمالی کشور شامل گیلان، مازندران و گلستان و تا حدودی در استان‌های آذربایجان، کرمانشاه و کردستان و در شرایط آب‌وهوایی مرطوب پراکنده‌اند (Schönbech-Temesy, 1969; Khatamsaz, 1993). سه گونه

زیرسرده *Orthostylus* (شامل *G. kokanicum*، *G. heterocarpum* و *G. iranikum*) در مجاورت *Acomastylis calthifolia* و یا در گروه سه‌تایی مشاهده می‌شوند. نتایج یادشده رده‌بندی‌های حاضر را حمایت می‌کنند (Khatamsaz, 1993; Schönbech-Temesy, 1969). این گیاهان به منطقه ایرانی-تورانی تعلق دارند، از نظر رویشگاه عمدتاً در استان‌های خراسان و تهران و در شرایط آب‌وهوایی خشک رشد می‌کنند و صفت‌های مشترکی (به‌ویژه میوه آنها که خامه پایابند دارد و بدون قلاب ماهیگیری است) دارند. از میان سه گونه زیرسرده *Orthostylus*، *G. heterocarpum* دامنه انتشار وسیع‌تری دارد و در نواحی شمال، شمال‌غرب و غرب ایران و در سایر نقاط از جمله کشورهای اروپایی و شوروی سابق، ترکیه، عراق، سوریه و شمال آفریقا انتشار دارد؛ درحالی‌که گونه *G. kokanicum* در نواحی مرکز و شمال‌شرق ایران و در جهان به‌ویژه در آسیای مرکزی می‌روید. *G. iranikum* گونه انحصاری (اندمیک) ایران است که از استان خراسان جمع‌آوری شده است (Khatamsaz, 1993)؛ باوجوداین، روابط بین این گونه‌ها روی درختان *nrDNA ITS* به شکل تری‌تومی و روی درختان کلروپلاستی و ترکیبی به شکل تفکیک شده مشاهده می‌شود. روی درختان کلروپلاستی و ترکیبی حاصل از تجزیه و تحلیل بیشینه صرفه‌جویی، *G. iranikum* با *G. heterocarpum* و *G. kokanicum* روی شاخه پارافیلیتیک قرار می‌گیرند؛ درحالی‌که روی درختان کلروپلاستی و ترکیبی بایزین، *G. iranikum* با *G. kokanicum* در یک کلاد قرار می‌گیرند و *G. heterocarpum* روی شاخه منفرد دیده می‌شود. به منظور اطمینان یافتن، تجزیه و تحلیل سومی از طریق بیشینه درست‌نمایی انجام شد و نتیجه مشابه

روند تکامل صفت‌های ریخت‌شناسی میوه (شامل موقعیت بند، منقار و قلاب)، تزئینات اگزین دانه گرده و الگوی آرایش دستجات آوندی دمبرگ روی درخت مرکزی نشانگر هسته‌ای تجزیه و تحلیل صرفه‌جویی و درخت مرکزی مطلق بایزین پژوهش حاضر منطبق و بررسی شد (شکل‌های ۶ و ۷).

صفت‌های ریخت‌شناسی میوه در این سرده اهمیت تاکسونومیکی دارند و در رده‌بندی‌های موجود و تهیه کلیدهای شناسایی استفاده می‌شوند (Schönbech- Temesy, 1969; Khatamsaz, 1993). گونه‌های زیرسرده *Geum* دارای میوه‌هایی با قلاب ماهیگیری، بند در انتهای خامه و منقار پیچ‌خورده‌اند؛ درحالی‌که نمایندگان زیرسرده *Orthostylus* دارای میوه بدون قلاب ماهیگیری، بند در قسمت وسط خامه و منقار افراشته‌اند.

میوه دارای قلاب ماهیگیری و بند در انتهای خامه حالت صفت مشترک پیشرفته (Synapomorph) در طایفه Colurieae محسوب می‌شود؛ این در حالیست که میوه در طایفه Potentilleae (برون‌گروه) به شکل فندقه کوچک بدون پر و منقار است. این نوع میوه در مسیر تکامل از شکل‌های پردار دارای خامه مستقیم (*Sieversia*) به میوه‌های دارای خامه مفصل‌دار قاعده‌ای (*Waldsteinia geoides*) و سپس به میوه‌های دارای خامه با مفصل میانی (*G. heterocarpum*) و *G. kokanicum* و سرانجام به میوه‌های دارای قلاب ماهیگیری و بند انتهایی (*G. rivale* و *G. urbanum*) اشتقاق یافته است. بر اساس مطالعه‌ها (Smedmark and Eriksson, 2002)، روند تکامل میوه در طایفه Colurieae دو بار و از اجداد دارای خامه‌های پردار اتفاق افتاده است؛ البته تکامل میوه در این گیاهان

تجزیه و تحلیل بایزین و با افزایش پشتیبانی شاخه‌ها همراه بود. نتایج و تغییر ترکیب گونه‌ای شاخه‌های درختان کلروپلاستی نشان می‌دهند فیلوژنی مولکولی این گونه‌ها به شدت تحت تأثیر دورگه‌گیری و پلی‌پلوئیدی (آلوپلی‌پلوئیدی) قرار دارد (Smedmark et al., 2006; Smedmark and Eriksson, 2005). طی دورگه‌گیری اولیه‌ای که بین گونه‌های دیپلوئید اجدادی اتفاق افتاده است، گونه‌های دودمانی تتراپلوئید مانند *G. heterocarpum* طی تلاقی برگشتی با دودمان نامشخص دیپلوئید، دودمان گونه‌های هگزاپلوئید را به وجود آورده‌اند (Smedmark et al., 2005). قرارگرفتن *G. heterocarpum* در شاخه قاعده‌ای به علت برخی صفت‌های مشترک ابتدایی ازجمله میوه‌های بدون قلاب ماهیگیری (Smedmark et al., 2006; Smedmark and Eriksson, 2005)، تزئینات اگزین راه‌راه و متراکم و تزئینات سطح بذر پشته‌ای-نواری (Faghir et al., 2015) است؛ درحالی‌که قرارگرفتن گونه‌های *G. kokanicum* و *G. iranikum* در یک گروه تک‌تبار کوچک نشان‌دهنده صفت‌های مشترک و پیشرفته آنها مانند تزئینات اگزین راه‌راه بافاصله، منافذ میکروسکوپی و ... است؛ البته از آنجا که دورگه‌گیری همراه با تلاقی برگشتی وجود دارد، مسیر تکامل حالت مشبک (Smedmark et al., 2005; Smedmark and Eriksson, 2006) به خود می‌گیرد که به شکل حالت‌های برگشتی صفت‌ها منعکس می‌شود (در قسمت تکامل صفت‌ها به آن اشاره می‌شود). به نظر می‌رسد سه گونه یادشده تابع پدیده‌های یادشده باشند؛ بررسی سطح پلوئیدی، کروموزم پایه، دورگه‌گیری و اطلاعات ژنوم کلروپلاستی برای روشن شدن این مطلب ضروریست.

همواره با موضوع آلپولی پلوئیدی پیوند داشته است. دورگه گیری بین یک گونه دیپلوئید از دودمان اجدادی مانند *Waldsteinia* و یک گونه دیپلوئید ناشناس به پیدایش گونه تتراپلوئید *G. heterocarpum* منجر شده است؛ میوه در این گونه دارای قلاب، منقار، کرک دار و بند بالاتر از مرکز است. مطابقت میوه گونه های سرده *Geum* روی درخت مرکزی مطلق ترکیبی تجزیه و تحلیل بایزین حاضر نشان داد (شکل ۶) *G. heterocarpum*. صفات های مشترک ابتدایی و نسبت خواهری با *G. kokanicum* و *G. iranicum* دارد؛ در این بین، گونه *G. iranicum* با داشتن بند خامه تقریباً قاعده ای مشابه اجداد دیپلوئید ظاهر می شود. سطح پلوئیدی این گونه مشخص نیست؛ اما مشابه چنین مواردی در گونه *G. speciosum* که بند قاعده ای و عدد کروموزومی $10x$ دارد نیز دیده شده است. این گونه در تجزیه و تحلیل ناحیه کلروپلاستی (Smedmark and Eriksson, 2002) در کنار *G. heterocarpum* گروه تشکیل داد؛ بنابراین، احتمالاً *G. iranicum* نیز سطح پلوئیدی بیشتر و تکامل برگشتی (بند قاعده ای) را نشان می دهد. *G. kokanicum* نیز با داشتن بند پایین تر از مرکز به *G. iranicum* نزدیک تر است؛ البته سطح پلی پلوئیدی این گونه نیز مشخص نیست. همان طور که گفته شد، دودمان های پیشرفته هگزاپلوئید مانند *G. urbanum* و *G. rivale* در نتیجه تلاقی برگشتی *G. heterocarpum* با یک دیپلوئید اجدادی اشتقاق یافته اند. این گونه ها با داشتن میوه های قلاب ماهیگیری (حالت پیشرفته) در مسیر دوم تکاملی Geinae همراه شده اند.

گیاهان تیره گل سرخیان بر اساس الگوی تزیینات راه راه و قطر منافذ بین پشته به دو زیرگروه (تزیینات

راه راه متراکم و منافذ درشت ۰/۱ تا ۰/۲ میکرومتر (مانند *Rubus*، *Rosa* و *Spiraea*) و تزیینات راه راه با فاصله و منافذ سوزنی شکل ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ میکرومتر (مانند *Geum*، *Potentilla* و *Fragaria*) تقسیم می شوند. مطابقت الگوی تزیینات اگزین گونه های سرده *Geum* روی درخت حاصل از تجزیه و تحلیل بایزین فیلوژنی حاضر (شکل ۷) نشان داد الگوی تزیینات راه راه متراکم دارای منافذ میکروسکوپی درشت، صفت مشترک ابتدایی (Synplesiomorph) برای این گیاهان است. این الگو نیز دو مسیر را در مسیر تکامل طی کرده است: گونه های هگزاپلوئید زیرسرده *Geum* دارای صفات های مشترک پیشرفته اند که این به ویژه در *G. urbanum* (تزیینات سطح اگزین راه راه دارای منافذ کوچک) (Faghir et al., 2015) دیده می شود؛ درحالی که گونه های زیرسرده *Orthostylus* دارای تزیینات راه راه متراکم و منافذ درشتند. تزیینات اگزین در *G. heterocarpum* از نوع راه راه بسیار متراکم است؛ به طوری که منافذ به سختی دیده می شوند؛ درحالی که *G. kokanicum* منافذ درشت و پشته هایی با تراکم کمتر و *G. iranicum* تعداد اندکی منافذ درشت و پشته های متراکم دارد.

شکل و آرایش دستجات آوندی برش عرضی دمبرگ از صفات های مهم در مطالعه های تاکسونومیک است (Metcalf and Chalk, 1957). چهار نوع آرایش دستجات آوندی دمبرگ در تیره گل سرخیان تشخیص داده شده است؛ بر این اساس، گونه های *Geum* همراه با *Waldsteinia*، *Poterium*، *Sanguisorba*، *Agrimonia*، *Potentilla*، *Rosa* و *Rubus* در گروه الف (دمبرگ هایی که دستجات آوندی آنها به شکل قوس مرتب شده اند)

قرار می‌گیرند. مطالعه Faghir و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داد دمبرگ گونه‌های *Geum* دارای الگوی نوع سوم (Metcalf and Chalk, 1957) شامل یک دسته آوند منفرد هلالی درشت و چند دسته آوندی کوچک است که در دو بال دمبرگ قرار دارند.

مطابقت شکل و آرایش دستجات آوندی برش عرضی دمبرگ گونه‌های موجود روی درخت ترکیبی بایزین (شکل ۷) نشان داد الگوی نوع الف ازجمله صفت‌های مشترک ابتدایی است که در گیاهان برون‌گروه *Geum* مشاهده می‌شود؛ همچنین شکل دستجات آوندی در گونه‌های مورد مطالعه و دو زیرسردۀ تابع مسیر تکاملی خاصی نیست. طرز قرارگرفتن دستجات آوندی در گونه‌های *G. rivale* و *G. heterocarpum* به شکل قوسی شکل و بدون باله است؛ درحالی که آرایش دستجات آوندی در سه گونه *G. urbanum*، *G. kokanicum* و *G. iranica* الگوی نوع سوم را نشان می‌دهد؛ در این بین، *G. kokanicum* و *G. iranica* به شکل چشمگیری الگوی نوع سوم را نشان می‌دهند. تکامل آرایش دستجات آوندی و تغییرات می‌تواند منعکس‌کننده هیبریداسیون و سطح پلی‌پلوئیدی در گیاهان بررسی شده باشد.

مطابقت صفت‌های ریزریخت‌شناسی بذر (شامل تزئینات اگزین و آرایش سطح بذر) روی درخت ترکیبی بایزین نشان می‌دهد (شکل ۷) گونه‌های سردۀ *Geum* بر اساس نوع تزئینات اگزین و آرایش سطح بذر در دو مسیر تکاملی قرار می‌گیرند: ۱. گونه‌های دارای سلول‌های اپیدرمی با آرایش برخاسته صاف و مستقیم و الگوی تزئینات راه‌راه-نواری که در زیرسردۀ *Orthostylus* دیده می‌شود؛ ۲. گونه‌های دارای

سلول‌های اپیدرمی با آرایش برخاسته صاف و مستقیم-موج‌دار و الگوی تزئینات راه‌راه-موج‌دار که در دو گونه زیرسردۀ *Geum* دیده می‌شود. بر اساس نتایج، الگوی نوع دوم دربرگیرنده صفت‌های مشترک پیشرفته در این گیاهان است که در گونه‌های هگزاپلوئید دیده می‌شوند.

نتیجه‌گیری

مطالعه فیلوژنی مولکولی سردۀ *Geum* نشان داد گونه‌های *Geum* در دو زیرسردۀ *Geum* و *Orthostylus* قرار می‌گیرند و در تمام درختان حاصل از پژوهش حاضر در دو گروه مجزا قرار دارند. وضعیت گونه‌های *Geum* (*G. urbanum* و *G. rivale*) در تمام درختان حاصل مشابه است؛ درحالی که شاخه‌های درختان کلروپلاستی و هسته‌ای در گیاهان زیرسردۀ *Orthostylus* (*G. heterocarpum*، *G. kokanicum* و *G. iranica*) تفاوت نشان می‌دهند. این تغییر در توپولوژی ممکن است به علت هیبریداسیون و آلپلی‌پلوئیدی باشد که پدیده رایجی در گیاهان این سرده است؛ این پدیده به بروز تنوع، تکامل برگشتی و هموپلازی در صفت‌های مورد مطالعه منجر می‌شود.

سپاسگزاری

از همکاران محترمی که ما را در انجام پژوهش حاضر یاری کردند، به ویژه سرکار خانم دکتر زیور صالحی برای دراختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان، جناب آقای دکتر غلامرضا امین، ریاست محترم هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران (THE) برای در اختیار قراردادن نمونه‌های گیاهی قدردانی می‌کنیم.

منابع

- Arens, P., Durka, W., Wernke-Lenting, J. W. and Smulders, M. J. M. (2004) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Geum urbanum* (Rosaceae) and their transferability within the genus *Geum*. *Molecular Ecology* 4: 209-212.
- Bolle, F. (1933) Eine U bersicht u ber die Gattung *Geum* L. und die hrnahestehenden Gattungen. *Feddes Repertorium* 72: 1-119.
- Edgar, R. C. (2004) Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Eriksson, T., Donoghue, M. J. and Hibbs, M. S. (1998) Phylogenetic analysis of *Potentilla* using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), and its implications for the classification of *Rosoideae* (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* 211: 155-179.
- Eriksson, T., Hibbs, M. S., Yoder, A. D., Delwiche, C. F. and Donoghue, M. J. (2003) Phylogenetic of *Rosoideae* (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal and the *trnL-F* region of chloroplast DNA. *International Journal of Plant Science* 164(2):197-211.
- Faghir, M. B., Armodian, M., and Shahi Shavvon, R. (2015) Micro-Macro morphology of the genus *Geum* L. (Rosaceae) in IRAN and their taxonomic significance. *Iranian Journal of Botany* 21(2): 103-117.
- Faghir, M. B., Ashori, F. and Mehrmanesh, A. (2017) Comparative leaf and petiole anatomy and micro morphology of the Genus *Geum* (Rosaceae) from Iran. *Iranian Journal of Plant Biology* 31: 45-58-117.
- Focke, W. O. (1894) Rosaceae. In: *Die Natu rlichen Pflanzenfamilien* (Ed. Engler, A.) 3: 1-60. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Gajewski, W. (1958) Evolution in the genus *Geum*. *Evolution* 13: 378-388.
- Gehrke, B., Bräuchler, C., Romoleroux, K., Lundberg, M., Heubl, G. and Eriksson, T. (2008) Molecular phylogenetics of *Alchemilla*, *Aphanes* and *Lachemilla* (Rosaceae) inferred from plastid and nuclear intron and spacer DNA sequences, with comments on generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 1030-1044.
- Gelman, A. and Rubin, B. (1992) Inference from ilterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science* 7: 457-472.
- Helfgott, D. M., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Jansen, R. K. and Simpson, B. B. (2000) Biogeography and breeding system evolution of the woody bencomia Alliance (Rosaceae) in macaronesia based on ITS Sequence Data. *Systematic Botany* 25 (1): 82-97.
- Hutchinson, J. (1967) *The Genera of Flowering Plants*. Oxford University Press, Oxford.
- Iltis, H. (1913) U ber das gynophor und die Fruchtausbildung beider Gattung *Geum*. *Sitzungsberichte der Königlich Preußischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 122: 1-36.
- Juel, O. H. (1918) Beitrage zur Blu tenanatomie und zur Systematik der Rosaceen. *Kungl. Svenska vetenskapsakademiens handlingar* 58: 1-81.
- Kalkman, C. (2004) Rosaceae: 13. *Alchemilla* group. In: *Flowering Plants. Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cor nales, Ericales* (Ed. Kubitzki, K.) 371-372. Springer, Berlin.
- 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.

- Linnaeus, C. (1753) *Species Plantarum*. Laurentius Salvius, Stockholm.
- Lundberg, M., Topel, M., Eriksen, B., Nylander, J. A. and Eriksson, T. (2009) Allopolyploidy in *Fragariinae* (Rosaceae): comparing four DNA sequence regions, with comments on classification. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 51(2): 269-280.
- Metcalf, C. R. and Chalk, L. (1957) *Anatomy of the Dicotyledons*. vol. 1. Oxford at the Clarendon Press, Oxford.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., and Schwartz, T. (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, USA.
- Morgan, D. R., Soltis, D. E. and Robertson, D. E. (1994) Systematic and evolutionary implication of *rbCL* sequence variation in Rosaceae. *American Journal of Botany* 1(12): 890-903.
- Nylander, J. A. A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. and Nieves Aldrey, J. L. (2004) Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systems Biology* 53: 47-67.
- Page, D. M. (2001) *TreeView (Win32) Version 1.6.6*. Retrieved from <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod>. On: 3 September 2001.
- Posada, D. and Buckley, T. R. (2004) Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53: 793-808.
- Robertson, K. R. (1974) The genera of Rosaceae in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 55: 611-662.
- Ronquist, F., Mark, P. and Huelsenbeck, J. P. (2009) Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. In: *The Phylogenetic Handbook*. 2nd ed. (Eds. Lemey, P., Salemi, M. and Vandamme, A. M.) Cambridge University Press, Cambridge.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark vander, P., Ayres, L. D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, A. M. and Huelsenbeck, P. J. (2012) MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539-542.
- Rydberg, P. A. (1913) Rosaceae. In: *North American Flora*. vol. 22(5). The New York Botanical Garden, New York.
- Sang, T., Crawford, D. J. and Stuessy, T. F. (1995) Documentation of reticulate ribosomal DNA implications for biogeography and concerted evolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, USA.
- Schönbech-Temesy, E. (1969) Rosaceae, *Geum*. In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) 66(30) 4: 116-121. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.
- Schulze-Menz, G. K. (1964) Rosales. In: *A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien* (Ed. Melchior, H.) 193-242. Gebru der Borntraeger, Berlin.
- Shaw, J. B., Lickey, E. E., Schilling, E. and Small, R. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Silvestro, D. and Michalak, I. (2012) RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12: 335-337.
- Smedmark, J. and Eriksson, T. (2002) Phylogenetic elationships of *Geum* (Rosaceae) and relatives inferred from the nrITS and *trnL-trnF* regions. *Systematic Botany* 27(2): 303-317.

- Smedmark, J. E. E., Eriksson, T., Evans, R. C. and Campbell C. S. (2003) Ancient allopolyploid speciation in Geinae (Rosaceae): evidence from nuclear granule-bound starch synthase (GBSSI) gene sequences. *Systematic Biology* 52: 374-385.
- Smedmark, J. E. E., Eriksson, T. and Bremer, B. (2005) Allopolyploid evolution in Geinae (Colurieae: Rosaceae): building reticulate species trees from bifurcating gene trees. *Organism Diversity and Evolution* 5: 275-283.
- Smedmark, J. and Eriksson, T. (2006) Early stage of development shed light on fruit evolution in allopolyploid species of Geum (Rosaceae). *International Journal of Plant Science* 167(4): 791-803.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0b10. Sunderland Massachusetts Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and amplifications (Eds. Innis, M., Sninsky, J. and White, T.) 315-322. Academic press, Sand Diego.
- Zhang, S. D., Jin, J. J., Chen, S. Y., Chase, M. W., Soltis, D. E., Li, H. T., Yang, J. B., Li, D. Z. and Yi, T. S. (2017) Diversification of Rosaceae since the late cretaceous based on plastid phylogenomics. *New Phytologist* 1-13.

