

<https://tbj.ui.ac.ir/?lang=en>

Taxonomy and Biosystematics

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 14, Issue 1, No.50, Spring 2022, P:7-10

Received: 20/06/2022 Accepted: 04/07/2022

Molecular Phylogeny and Divergence Time Estimation of *Onobrychis* sect. *Onobrychis* (Fabaceae) based on nrDNA ITS

Anahita Hadadi

Ph. D. Student of Plant Systematics, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
anahitahadadi@gmail.com

Akram Kaveh

Ph. D. Graduate of Plant Systematics, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
akramkavehak@gmail.com

Hanyieh Nafisi

Postdoctoral Fellowship of Plant Systematics, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Shahrokh Kazempour-Osaloo*

Professor of Systematic and Evolutionary Botany, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
skosaloo@modares.ac.ir

Abstract

This study examined the phylogenetic analysis and estimating divergence time of *O.* sect. *Onobrychis* by using nrDNA ITS sequence data. A total of 60 species from the section *Onobrychis*, seven species of the five sister sections belonging to *O.* subgen. *Sisyrosema* and eight species of other genera of the tribe Hedysareae (*Eversmannia subspinosa*, *Greuteria argyreum*, *Corethroedendron multijugum*, *Taverniera cuneifolia*, *Hedysarum polybotrys*, *Sulla spinosissima*, *Alhagi maurorum*) were chosen as outgroups. Phylogenetic analyses were performed by maximum likelihood and Bayesian methods. The results showed that *O.* sect. *Onobrychis* was monophyletic and composed of two main well-supported clades. The first clade included annual and perennial species with long wings, often with the basic chromosome number $x=8$. The second clade comprised of perennial species with short wings and two annuals with long wings, having the basic chromosome number $x=7$. Sect. The divergence time estimation of this section was analyzed with BEAST.

*Corresponding author

Hadadi, A., Kaveh, A., Nafisi, H. & Kazempour-Osaloo, SH. (2021). Molecular Phylogeny and Divergence Time Estimation of *Onobrychis* sect. *Onobrychis* (Fabaceae) based on nrDNA ITS. *Taxonomy and Biosystematics*, 14(1), 95-114.



2322-2190 / © 2022

This is an open access article under the BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



<http://dx.doi.org/10.22108/TBJ.2022.134107.1204>



<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20088906.1401.14.50.3.2>

The section originated from 11.96 Mya in middle Miocene and subsequently diverged into two lineages at 9.29-9.58 Mya.

Key words: Divergence Time, Fabaceae, nrDNA ITS, *Onobrychis*, Phylogeny.

Introduction

The genus *Onobrychis* Mill. comprises ca. 170 annual or perennial herbs divided into two subgenera and nine sections. At the current status, *O.* sect. *Onobrychis* with merging sects. of *Lophobrychis* and *Dendrobrychis* is the largest section of the genus.

Materials and Methods

In the present study, the phylogenetic analysis and estimating divergence time of *O.* sect. *Onobrychis* were conducted using nrDNA ITS. A total of 60 species from the section *Onobrychis*, seven species of the five sister sections belonging to *O.* subgen. *Sisyrosema* and eight species of other genera of the tribe Hedysareae (*Eversmannia subspinoso*, *Greuteria argyreum*, *Corethrodendron multijugum*, *Taverniera cuneifolia*, *Hedysarum polybotrys*, *Sulla spinosissima*, and *Alhagi maurorum*) were chosen as outgroups. The phylogenetic analyses were performed via maximum likelihood and Bayesian methods. The divergence times estimation of this section was analyzed with BEAST.

Findings

The results showed that *O.* sect. *Onobrychis* was monophyletic and composed of two main well-supported clades including clade “A” and clade “B”. Each clad was divided into several subclades.

Results and Conclusions

The first clade included annual and perennial species with long wings, often with the basic chromosome number $x=8$, and the second one involved species with the basic chromosome number $x=7$. It was also found that the annual species previously classified in the sect. *Lophobrychis* were not monophyletic, and three long-winged annual species were placed in clade “A”, and two annual long-winged species were related to short-winged perennial species, are placed in clade “B”. However, the two long-winged species *O. cornuta* and *O. elymaitica*, which were previously classified in the sect. *Dendrobrychis*, were placed in the clade “A”. Sect. *Onobrychis* originated from 11.96 Mya in the middle Miocene and was subsequently diverged into two lineages at 9.29-9.58 Mya.

References

- Aber, J. S., Pavri, F., & Aber, S. (2012). *Wetland environments: A global perspective*. Hoboken: John Wiley and Sons.
- Anderson, M. K. (2006). *Plant fact sheet: Narrowleaf cattail, Typha angustifolia L.* USA: United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Archibold, O. W. (1995). *Ecology of world vegetation*. London: Chapman and Hall.
- Asri, Y., & Eftekhari, T. (2002). Introducing the flora and vegetation of Siah Kashim wetland. *Journal of Environmental Science*, 29, 1-19 (in Persian).
- Assadi, M., Maassoumi, A. A., Khatamsaz, M., & Mozaffarian, V. (Eds.) (1988-2021). *Flora of Iran*. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands (in Persian).
- Carpenter, S. R., Fisher, S. G., Grimm, N. B., & Kitchell, J. F. (1992). Global change and freshwater ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 119-139.

- COL (2022). *Catalogue of life*. Retrieved from <https://www.catalogueoflife.org/index?taxonKey=P>. On: 31 March 2022.
- Cronk, J. K., & Fennessy, M. S. (2001). *Wetland plants: Biology and ecology*. First Edition. USA: CRC Press.
- Cronk, J. K., & Fennessy, M. S. (2016). *Wetland plants: Biology and ecology*. USA: CRC Press.
- Davis, P. H. (Ed.) (1965-1988). *Flora of Turkey*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Dinarvand, M. (2021) Wetland plants of Iran. *Iran Nature*, 6(2), 63-83.
- Dolatkhahi, M., & Yousofi, M. (2009). Study on the aquatic and semi-aquatic plants of Parishan International Wetland in the Fars province. *Journal of Wetland Ecobiology*, 1(1), 91-104.
- Ehsani, J., Romiani, L., & Maniat, M. (2010). Investigation of aquatic plants in some important aquatic ecosystems of Khuzestan province. *Journal of Wetland Ecobiology (wetland)*, 2(6), 25-32.
- Gahreman, A., & Attar, F. (2002). Anzali wetland in a coma of death (floristic ecological study). *Journal of Environmental Science*, 28(Special Issue), 1-38 (in Persian).
- Gahreman, A., Naghinejad, A., & Attar, F. (2004). Habitats and flora of Chamkhaleh coastal area- Jirbagh and Amir Kalayeh coastal wetland. *Journal of Environmental Science*, 30(33), 46-67.
- Guntenspergen, G. R., Peterson, S. A., Leibowitz, S. G., & Cowardin, L. M. (2002). Indicators of wetland condition for the Prairie Pothole Region of the United States. *Journal of Environmental Monitoring and Assessment*, 78(3), 229-252.
- IPNI (2022). *The International Plant Names Index*. Retrieved from <http://www.ipni.org>. On: 31 March 2022.
- Iranmanesh, Y., Jalili, A., Shirmoardi, H., & Jahanbazi Goujani, H. (2017). Flora, life form and chorology of plants in the important wetlands of Chaharmahal and Bakhtiari province. *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 9(30), 83-104.
- Kamrani, A., Naqinezhad, A., Attar, F., Jalili, A., & Charlet, D. (2011). Wetland flora and diversity of the western Alborz mountains north Iran. *Phytologia Balcanica*, (17), 53-66.
- Kar, D. (2013). *Wetlands and Lakes of the World*. New Delhi, India: Springer.
- Karami, M., Kasmani, M. E., & Alamesh, A. (2001). Plants of Hashilan wetland, Kermanshah, Iran. *Journal of Sciences of Islamic Republic of Iran*, 12(3), 201-207.
- Keddy, P. A. (1976). Lakes as islands: The distributional ecology of two aquatic plants, *Lemna minor* L. and *trisolca* L. *Journal of Ecology*, 57(2), 353-359.
- Khanhasani, M., Khodakarami, Y., Jalilian, N., & Jalili, A. (2018). The habitat of *Nuphar lutea* in Kermanshah province. *Journal of Iran Nature*, 3(3), 86-93.
- Lacoul, P., & Freedman, B. (2006). Environmental influences on aquatic plants in freshwater ecosystems. *Journal of Environmental Reviews*, 14(2), 89-136.
- Léonard, J. (1988). Contribution à l'étude de la flore et de la végétation des desert d'Iran, Fascicule 8: Etude des aries de distribution, Les phytochories, Les chorotypes. *Bulletin of the Jardin Botanique Nacional de Belgique, Meise*.
- Lopez, R. D., Lyon, J. G., Lyon, L. K., & Lopez, D. K. (2013). *Wetland landscape characterization: Practical tools, methods, and approaches for landscape ecology*. USA: CRC Press.
- Mehrnia, M. (2018). The habitat of *Nuphar lutea* in Lorestan province. *Iran Nature*, 3(3), 78-85.

- Mehrnia, M., & Jalili, A. (2020). *Final report of the project: Study of ecological conditions of wetlands in Iran*. Series number: 5646. Tehran: Agricultural Information Technology Center of the Ministry of Jihad Agriculture (in Persian).
- Mesdagi, M. (2001). *Vegetation description and analysis*. Mashhad: Mashhad Jahad Daneshgahi Press (in Persian).
- Misra, K. C. (1980). *Manual of plant ecology*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Company.
- Raunkiaer, C. (1934). *The life forms of plants and statistical plant geography*. (n.p)
- Rechinger, K. H. (Ed.) (1963-2018). *Flora Iranica*. Graz: Akademische Druck-U Verlagsanstalt.
- Safikhani, K., Jalili, A., & Jamzad, Z. (2018). Wetlands flora of Hamedan province (Iran). *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 10(37), 23-46 (in Persian).
- Sculthorpe, C. C. (1967). The biology of aquatic vascular plants. *BioScience*, 18(6).
- Slack, K. V., Nauman, J. W., & Tilley, L. J. (1979). Benthic invertebrates in a north- flowing stream and a south- flowing stream, Brooks Range, Alaska 1. *Jawra Journal of the American Water Resources Association*, 15(1), 108-135.
- Stromberg, J. C., & Patten, D. T. (1996). Instream flow and cottonwood growth in the eastern Sierra Nevada of California, USA. *Regulated Rivers: Research and Management*, 12(1), 1-12.
- Takhtajan, A. (1986). *Floristic regions of the world*. Berkley: University of California Press.
- Whitley, J. R., Bassett, B., Dillard, J. G., & Haefner, R. A. (1999). *Water plants for Missouri ponds*. Jefferson City, Missouri: Missouri Department Conservation.
- Zohary, M. (1966-1978). *Flora palestina*. The Jerusalem Academic Press.

تبارزایی مولکولی و تخمین زمان واگرایی بخشه *Onobrychis* از سرده *Onobrychis* (تیره باقلانیان) براساس توالی‌های nrDNA ITS

آناهیتا حدادی، دانشجوی دکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

anahitahadadi@gmail.com

اکرم کاوه، دانش‌آموخته دکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

akramkavehak@gmail.com

هانیه نفیسی، پژوهشگر پسادکتری سیستماتیک گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

hanienafisi@yahoo.com

شاهرخ کاظم پور اصلو*، استاد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

skosaloo@modares.ac.ir

چکیده

تجزیه و تحلیل روابط تبارزایی و تخمین زمان واگرایی بخشه *Onobrychis* با استفاده از نواحی فاصله‌گذار رونویسی‌شده داخلی DNA ریپوزومی هسته‌ای (nrDNA ITS) انجام شد. ۶۰ گونه از بخشه *Onobrychis*، هفت گونه از بخشه‌های خواهری از زیرسرده *O. subgen. Sisyrosema* و هشت گونه از سایر سرده‌های قبیله *Hedysareae* شامل *Corethrodedron multijugum*, *Greuteria argyreum*, *Eversmannia subspinoso*, *Taverniera cuenifolia*, *Sulla spinosissima* و *Alhagi maurorum* در جایگاه برون‌گروه انتخاب شد. آنالیزهای تبارزایی به روش‌های پیشینه‌درست‌نمایی و بایزین انجام شد. نتایج نشان داد بخشه *Onobrychis* تک‌تبار و متشکل از دو کلاد اصلی با حمایت زیاد است. کلاد اول شامل گونه‌های یک‌ساله و چندساله با بال‌های بلند و اغلب با عدد کروموزوم پایه $x=8$ است. کلاد دوم گونه‌هایی را با عدد کروموزوم پایه $x=7$ تشکیل می‌دهد که در آن دو گونه یک‌ساله با بال‌های بلند با گونه‌های چندساله دارای بال کوتاه مرتبط است. زمان واگرایی این بخشه با استفاده از نرم‌افزار BEAST تخمین زده شد. این بخشه در ۱۱/۹۶ میلیون سال پیش در میوسن میانی به وجود آمده و سپس به دو دودمان در ۹/۲۹ - ۹/۵۸ میلیون سال پیش واگرایی یافته است.

واژه‌های کلیدی: اسپرس، تبارزایی، تیره باقلانیان، زمان واگرایی، nrDNA ITS.

مقدمه

آسیای مرکزی و معتدل غربی، در سراسر مناطق معتدل

و نیمه‌گرمسیری اوراسیا و شمال آفریقا پراکنده شده

سرده *Onobrychis* Mill. در منطقه‌ای از جنوب

اروپا، منطقه مدیترانه تا قفقاز، رشته‌کوه‌های زاگرس،

* مسئول مکاتبات

حدادی، آناهیتا، کاوه، اکرم، نفیسی، هانیه، و کاظم پور اصلو، شاهرخ. (۱۴۰۱). تبارزایی مولکولی و تخمین زمان واگرایی بخشه *Onobrychis* از سرده *Onobrychis* (تیره باقلانیان) براساس توالی‌های nrDNA ITS تاکسونومی و بیوسستماتیک، ۱۴(۵۰)، ۹۵-۱۱۴.



دو عدد پایه کروموزومی $x=7$ و $x=8$ و دو سطح پلویدی دیپلوئید و تتراپلوئید در این بخش گزارش شده است (Baltisberger, 1991; Abou-El-Enain, 2002; Hejazi *et al.*, 2010; Ranjbar *et al.*, 2010; Sepet *et al.*, 2011; Karamian *et al.*, 2012; Akchlik, 2012). هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تک‌نیایی و روابط بین گونه‌ای در بخش *Onobrychis* و تجزیه و تحلیل روابط تبارزایی با استفاده از نواحی فاصله‌گذار رونویسی شده داخلی DNA ریوزومی هسته‌ای (nrDNA ITS) به روش‌های پیشینه‌درست‌نمایی و بایزین (Bayesian) و همچنین تخمین زمان واگرایی *Onobrychis* است.

مواد و روش‌ها

۷۴ نمونه از ۶۰ گونه *Onobrychis*، هفت گونه از زیرسرده *Sisyrosema* و هشت برون‌گروه از قبیله *Hedysareae* در این مطالعه استفاده شد. علاوه بر nrDNA ITS (۵۱) که در مطالعات قبلی به دست آمده بود (Amirahmadi *et al.*, 2014a, 2016) و از GenBank بازیابی شد، توالی‌یابی ۴۰ نمونه جدید نیز صورت گرفت. اطلاعات مربوط به گونه‌های مطالعه شده در جدول ۱ ارائه شده است.

DNA کل ژنوم با روش CTAB اصلاح شده (Doyle and Doyle, 1987) استخراج شد. نواحی nrDNA با استفاده از پرایمر ITS5m (Sang *et al.*, 1995) و ITS4 (White *et al.*, 1990) تکثیر شد. واکنش زنجیری پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۸ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی $\times 2$ Taq DNA پلیمرز Red (Amplicon)، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰

است (Širjaev, 1925, 1926; Townsend, 1974; Rechinger, 1984; Abou-El-Enain, 2002). این سرده شامل ۳۶۰ گونه چندساله و یک‌ساله است (Nixon, 2006). در فلورا ایرانیکا ۵۴ گونه از ایران در هشت بخش قرار گرفته است که شامل *Onobrychis*، *Lophobrychis*، *Dendrobrychis*، *Afghanicae*، *Anthyllium*، *Laxiflorae*، *Heliobrychis* و *Hymenobrychis* (Rechinger, 1984) می‌شود؛ اما براساس مطالعات تبارزایی اخیر (Amirahmadi *et al.*, 2016)، محدوده رده‌بندی *Onobrychis* دستخوش تغییرات اساسی شده است. زیرسرده *Onobrychis* شامل دو بخش *Onobrychis* و *Sisyrosema* و زیرسرده *Hemicyclobrychis* Širj. شامل هفت بخش *Laxiflorae*، *Afghanicae* Širj.، *Heliobrychis* (Bunge ex Boiss.) (Širj.) Rech.f.، *Insignes* (Širj.) DC.، *Hymenobrychis* DC.، *Lipskyanae* (Širj.) Amirah. & Kaz. Rech.f. و *Litvinoviana* (Širj.) Amirah. & Kaz. و Osaloo می‌شود.

Onobrychis sect. *Onobrychis* با گیاهان یک‌ساله یا چندساله و گاهی اوقات بوته‌های بالشتکی، از حدود ۱۰۴ گونه تشکیل شده است که طبق مطالعه تبارزایی Amirahmadi و همکاران (۲۰۱۶)، پرگونه‌ترین بخش از سرده *Onobrychis* شناخته شده است. پراکنش جغرافیایی این بخش از آسیای مرکزی تا اروپا و تا شمال آفریقا را شامل می‌شود (Boissier, 1843; Širjaev, 1925, 1926; Ball, 1968; Grossheim, 1972; Townsend, 1974; Rechinger, 1984; Ranjbar *et al.* 2007, 2008, 2009, 2011, 2012; Amirahmadi *et al.*, 2014b; Ghanavati and Amirabadizadeh, 2018; Amirahmadi and Khoshokhan-Mozaffar, 2021).

از مدل GTR+G با برنامه (Ronquist *et al.*, 2012) MrBayes version 3.2 برای آنالیزهای تبارزایی بایزین استفاده شد. احتمالات ثانویه روی پارامترهای مدل از داده‌ها با استفاده از پیش‌فرض‌های اولیه برآورد شد. آنالیزها در هشت میلیون نسل تکرار شد. چهار زنجیره مارکوف مونته کارلو (MCMC) در یک زمان از یک درخت به‌طور تصادفی شروع به کار کرد. یک درخت در هر ۱۰۰ نسل نمونه‌برداری و بعد از رسیدن به فاز همگرایی (خطی) (بعد از سوختن ۲۵ درصد نسل‌ها) جمع‌آوری شد؛ سپس یک درخت اجماعی مبتنی بر قاعده ۵۰ درصد اکثریت همراه با مقادیر احتمال پسین برای نمایش با Treeview (Page, 2001) استفاده شد.

برنامه Bayesian برای تخمین زمان واگرایی بین گونه‌ها براساس مدل ساعت مولکولی ثابت یا آزاد استفاده می‌شود (Rambaut and Drummond, 2007). بسته نرم‌افزاری BEAST شامل BEAUTi، Tree Annotator، Tracer و Figtree است. ابتدا با استفاده از برنامه BEAUTi توالی‌هایی به‌شکل اجراشدنی درمی‌آید؛ در ادامه پس از انتخاب برون‌گروه و مدل جایگزینی، مدل آزاد ساعت مولکولی براساس برنامه Mrmodeltest2 انتخاب می‌شود.

احتمال اولیه یا پیشین به‌صورت نرمال بود و زمان کالیبراسیون براساس مطالعات پیشین (Lavin *et al.*, 2005) ۲۹/۳ میلیون سال تعیین و دو اجرای جداگانه MCMC برای ۱۰ میلیون نسل در نظر گرفته شد؛ سپس از هر ۲۰۰ نسل، یک درخت نمونه‌برداری شد. با استفاده از Tracer v 1.5، توزیع احتمالات ثانویه و effective sample size داده‌ها مشاهده و با Tree Annotator، ۱۰ درصد درخت‌ها سوزانده شد؛ در ادامه با Figtree درخت اجمالی ۵۰ درصد به دست آمد.

و یک میکرولیتر از هر پرایمر انجام شد. DNA الگوی چرخه‌های PCR شامل: ۱. پیش‌دنا توره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه؛ ۲. ۲۸ تا ۳۵ چرخه، هر یک شامل دنا توره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه؛ ۳. annealing در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه؛ ۴. طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه؛ ۵. یک مرحله افزایش طول نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. کیفیت محصولات PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد (w/v) (با استفاده از 1X TBE در جایگاه بافر ژل) و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد. محصولات PCR به همراه پرایمرهای استفاده‌شده برای توالی‌یابی Sanger در Macrogen (Seoul, South Korea) ارسال شد. کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نواحی هسته‌ای با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ویرایش شد و فایل‌ها به‌صورت فستا (Fasta) درآمد؛ سپس با استفاده از نرم‌افزار Muscle v4.0 (Edgar, 2004) و همچنین به‌صورت چشمی، هم‌ردیف‌سازی (alignment) شد.

بازسازی روابط فیلوژنی توالی هسته‌ای ITS براساس روش maximum likelihood (ML) و Bayesian صورت گرفت.

برای آنالیز داده‌ها به روش بیشینه درست‌نمایی از برنامه RaxmlGUI ver 1.1 (Silvestro and Michalak 2012) استفاده شد.

به‌منظور آنالیز داده‌ها، مدل‌های تکاملی با استفاده از برنامه MrModeltest (Nylander, 2004) و براساس معیار اطلاعاتی Akaike information criterion (AIC) (Posada and Buckley, 2004) انتخاب شد.

نتایج

اندازه ماتریس داده‌های nrDNA ITS، ۷۰ جایگاه نوکلئوتیدی است که ۱۴۰ صفات اطلاعاتی و ۵۴۱ صفات غیر اطلاعاتی دارد و ایندلهای اطلاعاتی ۳۳ و غیر اطلاعاتی ۳۱ جفت باز است؛ همچنین CI برابر ۰/۵۶۲ و RI برابر با ۰/۸۹۷ است. در بررسی بصری درختان، روابط بین کلادها و گروه خواهری، تفاوتی بین توپولوژی‌های درختان به دست آمده از ML، MP و BI دیده نشد.

تک‌نیایی بودن بخشه *Onobrychis* با حمایت زیاد ($PP = 1, ML = 100$) نشان داده شده است (شکل ۱). سایر بخشه‌های سرده *Onobrychis* مانند *Heliobrychis* و *Hymenobrychis* در جایگاه گروه خواهری برای بخش *Onobrychis* قرار می‌گیرند.

بخشه اسپرس به دو کلاد اصلی و مشخص شامل کلاد A با حمایت $PP = 0.99$ و $BS = 65$ و کلاد B با حمایت $PP = 1$ و $BS = 88$ (شکل ۱) تقسیم می‌شود.

کلاد A شامل (*O. pulchella* (Schrenk)، *O. micrantha* (Schrenk) و *O. cristagalli* (L.)) از بخشه *Lophobrychis* است که در مطالعه Amirahmadi و همکاران (۲۰۱۶) در بخشه *Onobrychis* ادغام شده‌اند؛ به علاوه حاوی گونه‌های بال بلند بخشه *Onobrychis* (*O. densijuga* Hedge) (*O. saxatilis*، *O. sosnovskyi* Grossh. & Hub (L.)، *O. petrae*، *O. stenostachya* Freyn & Sint. (L.)، *O. alamutensis* (M. Bieb., ex villoid Fish.)، *O. verae*، Amirah., Kaz.Osaloo & Charkhch *O. ptychophylla* و *O. gontscharovii* vas, Sirj. است که در واقع با تعریف زیربخشه *Macropterae* مطابقت دارند؛ همچنین دارای دو گونه

از بخشه *Dendrobrychis* شامل *O. elymaitica* و *O. cornuta* (Boiss. & Hausskn. Ex Boiss.) (L.) است.

این کلاد خود به دو زیر کلاد اصلی تقسیم می‌شود. زیر کلاد اول شامل *O. pulchella* و *O. micrantha* با حمایت $PP = 0.99$ و $BS = 82$ است و زیر کلاد دوم دربرگیرنده سایر گونه‌های کلاد A با حمایت $PP = 1$ و $BS = 71$ و متشکل از دو گروه است؛ به طوری که در گروه اول گونه‌های *O. saxatilis*، *O. sosnovskyi*، *O. stenostachya*، *O. densijuga*، *araxina* و *O. cristagalli* با حمایت متوسط ($PP = 0.88, BS = 50$) قرار می‌گیرند و گروه دوم شامل *O. cornuta* و *O. elymaitica* از بخش *Dendrobrychis* و *O. ptychophylla*، *O. verae*، *alamutensis* و *O. gontscharovii* با حمایت زیاد ($PP = 0.99, BS = 76$) است.

کلاد B دربرگیرنده تمام گونه‌های بال کوتاه همراه با دو گونه از بخشه *Lophobrychis* شامل (Sibth. & *O. caputgalli* (L.) Lam. و *O. aequidentata* Sm) است.

O. aequidentata با حمایت زیاد ($PP = 1, BS = 88$) یک کلاد تشکیل می‌دهد؛ همین‌طور *O. caputgalli* با حمایت زیاد ($PP = 1, ML = 96$) یک کلاد مجزا تشکیل می‌دهد و سپس سایر گونه‌ها در یک کلاد با حمایت $PP = 1$ و $ML = 70$ قرار می‌گیرند. در میان این گونه‌ها، گروههایی با حمایت کم و مقدار زیاد polytomy مشاهده می‌شود.

تخمین زمان واگرایی

کرونوگرام BEAST (شکل ۲) از نظر توپولوژیکی با درختان به دست آمده از تجزیه و تحلیل بیزی غیر ساعتی nrDNA ITS سازگار بود. میانگین سنی برآورد شده و میانگین نرخ تکامل در جدول ۲ آورده شده است. میانگین زمان واگرایی کلاد *Taverniera* 21.44 Ma (13.5_30.88 Ma 95% HPD) برآورد شد.

میانگین سن کلاد «CEGO» شامل *Onobrychis*، *Greuteria* و *Corethroedendron*، *Eversmannia* 15.69 Ma (9.9_21.53 Ma 95% HPD) که در مقایسه با مطالعه قبلی (Nafisi et al., 2019) با میانگین سنی 13.07 Ma (8.48_18.48 Ma 95% HPD) با نمونه گیری تاکسونی کم از گروه های خواهری *Heliobrychis* و *Hymenobrychis* در 9.63 Ma (4.89_14.17 Ma 95% HPD) از سرده های همسایه اشتقاق پیدا کرده اند. سن برآورد شده برای زمان واگرایی سرده *Onobrychis* 14.14 Ma (8.89_19.73 Ma 95% HPD) و برای بخشه *Onobrychis* 11.95 Ma (7.60_17.99 Ma 95% HPD) است. کلاد A از کلاد B در 9.85 Ma (5.45_14.90 Ma 95% HPD) جدا شده است. بال بلندهای چندساله این بخشه با عدد پایه کروموزومی اغلب $x=8$ در 7.45 Ma (4.04_11.43 Ma 95% HPD) نمایان شده است. یک ساله های بال بلند شامل *O. pulchella* و *O. micrantha* در 6.37 Ma (2.70_10.80 Ma 95% HPD) تکامل یافته است. بال بلندهای شمال غرب با عدد پایه کروموزومی $x=7$ در 2.88 Ma (1.04_5.45 Ma 95% HPD) و بال بلندهای شمال شرق در 2.69 Ma (2.52_8.47 Ma 95% HPD) ظاهر شده است.

در کلاد B، *O. aequidentata* با بال بلند و یک ساله در 7.45 Ma (4.04_11.43 Ma 95% HPD) جدا شده که با *O. caputgalli* دنبال می شود و سن واگرایی آن 7.41 Ma (4.13_11.14 Ma 95% HPD) برآورد شده است. آخرین زیر کلاد به بال کوتاه های چندساله مربوط است و زمان واگرایی آنها 5.84 Ma (4.13_11.14 Ma 95% HPD) تخمین زده می شود.

بحث

براساس اطلاعات حاصل از توالی nrDNA ITS هسته ای، تک تبار بودن بخشه *Onobrychis* با حمایت زیاد مشخص می شود. تک نیایی بخشه *Onobrychis* در مطالعات پیشین نیز تأیید شده بود (Safaei Chaei Kar et al., 2014; Amirahmadi et al., 2016)؛ همچنین بخشه *Onobrychis* در مفهوم جدید Amirahmadi و همکاران (۲۰۱۶) متشکل از اعضای بخشه *Lophobrychis* و دو عضو از بخشه *Dendrobrychis* است. همان طور که از قبل در مطالعه Carbonero و همکاران (۲۰۱۲) به طور کلی از تمایز بین بخشه های *Hymenobrychis*، *Lophobrychis*، *Heliobrychis* و *Onobrychis* حمایت شده بود، احتمال هم پوشانی هایی بین آنها نیز پیشنهاد شد. در مطالعه Safaei Chaei Kar و همکاران (۲۰۱۴) نیز گونه های بخشه *Lophobrychis* و دو گونه از بخشه *Dendrobrychis* در میان گونه های بخشه *Onobrychis* قرار گرفتند؛ ولی گونه *O. arnacantha* در کلاد جداگانه و خارج از بخشه *Onobrychis* واقع شد؛ سپس در مطالعه Amirahmadi و همکاران (۲۰۱۶)، این دو بخشه در بخشه *Onobrychis* ادغام شد.

O. elymaitica و *O. cornuta* با عدد پایه کروموزومی $x=8$ (Astanova *et al.*, 1981; Abou-El-Enain, 2002) در گروه دوم با حمایت زیاد قرار می‌گیرند. *O. cornuta* در ایران، ترکیه، قفقاز، سوریه، افغانستان، پاکستان، فلسطین، لبنان و آسیای مرکزی پراکنش دارد و به صورت کپه‌ای خاردار و ارتفاع‌پسند است. *O. elymaitica* که گونه انحصاری ایران از کوه نور لرستان است، به صورت درختچه‌ای تا درختچه‌ای خاردار مشاهده می‌شود (Ball, 1968; Hedge, 1970; Grossheim, 1972; Rechinger, 1984). گونه *O. alamutensis* به زیرکلاد *O. cornuta* و *O. elymaitica* متصل می‌شود.

گروه سوم، گونه‌های *O. gontscharovii*، *O. verae* و *O. ptychophylla* را در بر می‌گیرد. این گونه‌ها همگی بال بلند و چندساله با عدد پایه کروموزومی $x=8$ هستند، در آسیای مرکزی و شمال شرق ایران پراکنش دارند (بال بلندهای شمال شرق) و براساس داده‌های حاضر با حمایت قوی در یک زیرکلاد قرار می‌گیرند. ویژگی‌های بارز این زیرکلاد شامل شکل برگچه‌های مستطیل، بیضوی تا تخم‌مرغی، طول میوه ۵ تا ۷ میلی‌متر، کاسه ۴/۵ تا ۷ میلی‌متر و گل‌آذین در میوه طویل‌نشده و فشرده، می‌شود (Grossheim, 1972; Kliphuis, 1977; Rechinger, 1984; Amirahmadi *et al.*, 2014b).

اعضای کلاد B همگی عدد پایه کروموزومی $x=7$ دارند (Baltisberger, 1991; Lifante *et al.*, 1992; Magulaev, 1989; Favarger, 1997; Abou-El-Enain, 2002; Hadadi, 2008; Ranjbar *et al.*, 2009, 2010, 2011; Hejazi *et al.*, 2010; Sepet *et al.*, 2011; Ghanavati and Nematpajoo, 2012; Akchlik *et al.*, 2012; Zarrabian, 2015). این کلاد متشکل از سه زیرکلاد است. نخستین زیرکلاد *O.*

بخش *Onobrychis* با حمایت قوی به دو کلاد اصلی A و B تقسیم می‌شود و گونه‌های بخش‌های *Heliobrychis* و *Hymenobrychis* در جایگاه گروه خواهری این بخش قرار می‌گیرند (شکل ۱).

کلاد A شامل گونه‌هایی بال بلند با عدد پایه کروموزومی به طور عمده $x=8$ است که پیش‌تر در زیر بخش *Macropterae* (Hand. – Mazz., 1910) تعریف می‌شد؛ به علاوه شامل *O. pulchella*، *O. micrantha* و *O. cristagalli* از بخش *O. Lophobrychis* و همچنین *O. cornuta* و *O. elymaitica* از بخش *Dendrobrychis* است. خود کلاد A به دو زیرکلاد تقسیم می‌شود. زیرکلاد اول شامل گونه‌های *O. pulchella* و *O. micrantha* از بخش *Lophobrychis* است که یک‌ساله، کم‌گل و با عدد پایه کروموزومی $x=8$ است. زیرکلاد دیگر شامل *O. crista-galli* و گونه‌های چندساله بال بلند با دو گروه عدد پایه کروموزومی متفاوت $x=8$ و $x=7$ و بیشتر مختص فلات ایران و آناتولی و آسیای مرکزی و خود متشکل از سه گروه است. گروه اول شامل گونه‌های *O. densijuga*، *O. araxina*، *O. saxatilis*، *O. sosnovskyi*، *O. petrae* و *O. stenostachya* همگی با عدد پایه کروموزومی $x=7$ است که در شمال غرب ایران، ترکیه، آذربایجان و ارمنستان پراکنش دارند و از این میان تنها گونه *O. saxatilis* اروپایی است. مشخصه ریخت‌شناسی این گروه برگچه‌های مستطیلی - خطی، طول میوه ۵ تا ۶ میلی‌متر و طویل‌شدن گل‌آذین در میوه (به جز *O. densijuga*) است. (Širjaev, 1925, 1926; Ball, 1968; Hedge, 1970; Grossheim 1972; Rechinger, 1984; Magulaev, 1989; Garnatje *et al.*, 1988).

viciifolia در مقایسه با گونه‌هایی با عدد پایه کروموزومی $x=8$ ، قرابت بیشتری دارند. *O. viciifolia* دارای پراکنش وسیعی از آسیای مرکزی تا روسیه و مناطق مدیترانه است. در مطالعه مورفولوژیکی و شمارش کروموزومی Ranjbar و همکاران (۲۰۱۰) پیشنهاد شد که به دلیل شباهت ریخت‌شناختی و خاستگاه جغرافیایی و پراکنش نزدیک به هم، سه گونه *O. transcaucasica* دیپلوئید، *O. viciifolia* و *O. altissima* (براساس شواهد دارای تقسیم میوز آلوتراپلوئید) با یکدیگر قرابت دارند. در مطالعه حاضر نیز این سه گونه براساس داده‌های هسته‌ای در یک گروه و البته در کنار تعدادی گونه دیگر واقع شده‌اند و قرابت آنها تأیید می‌شود؛ با این حال به دلیل کشت زیاد در جایگاه محصولات علوفه‌ای، گستره توزیع *O. viciifolia* مشخص نیست (Hedge, 1970). این گونه تتراپلوئید شباهت‌های مورفولوژیکی چشمگیری با گونه دیپلوئیدی *O. transcaucasica* Grossh دارد.

O. gracilis و *Onobrychis armena* Boiss Besser در یک کلاد قرار می‌گیرند. این دو گونه از ماورای قفقاز تا آناتولی و جنوب شرقی اروپا دارای ویژگی‌های مورفولوژیکی مشابهی هستند (Hedge, 1970; Grossheim, 1972). از نظر مورفولوژیکی، *O. gracilis* بسیار نزدیک به *O. elata* Boiss & Balansa است (Hedge, 1970)؛ با این حال با کمال تعجب، براساس مطالعه مورفولوژیکی Safaei Chaei Kar و همکاران (۲۰۱۴)، گونه دوم در بخشه *Hymenobrychis* قرار گرفته است که ممکن است به شناسایی نادرست نمونه یا آلودگی حین PCR ارتباط داشته باشد.

aequidentata از بخشه *Lophobrychis* است. این زیرکلاد یک ساله و بال بلند با میوه‌های بزرگ حاوی دندانه‌ای بزرگ و مثلثی روی تاج میوه است و در اروپا، ترکیه، قفقاز، ایران، عراق، سوریه، فلسطین، لبنان و Cyprus پراکنش دارد. دومین زیرکلاد مربوط به *O. caputgalli* از بخشه *Lophobrychis* (گونه‌ای با گل‌های کوچک، بال بلند و یک ساله) است و در اروپا، ایران، ترکیه، قفقاز و آسیای مرکزی یافت می‌شود (Sirjaev 1925; Ball, 1968; Hedge, 1970; Grossheim 1972; Jafri, 1980; Reching, 1984)؛ بنابراین در مطالعه حاضر گونه‌های بخشه *Lophobrychis* که با بخشه *Onobrychis* ادغام شده‌اند، کنار یکدیگر قرار نمی‌گیرند و آنهایی که عدد پایه کروموزومی $x=8$ دارند در کلاد A و آنهایی که عدد پایه کروموزومی $x=7$ دارند در کلاد B واقع شده‌اند؛ اما در مطالعه Safaei Chaei Kar و همکاران (۲۰۱۴) گونه‌های بخشه *Lophobrychis* در کنار هم واقع شده‌اند که ممکن است مربوط به تعداد گونه‌های کمتر از بخشه *Onobrychis* در آن مطالعه باشد؛ ولی در مطالعه حاضر با حضور بیشتر گونه‌های بخشه *Onobrychis*، توپولوژی دقیق‌تری به دست آمد. سومین زیرکلاد شامل گونه‌های بال کوتاه چندساله است. براساس جمع‌بندی نهایی مطالعه Carbonero و همکاران (۲۰۱۲)، گونه‌های بال کوتاه اغلب رابطه نزدیکی با گونه *O. viciifolia* دارند که نتایج آن با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد و گونه یادشده با حمایت زیاد در زیرکلاد سوم مربوط به گونه‌های بال کوتاه قرار می‌گیرد؛ به علاوه با نتایج حاصل از مطالعه Zarrabian و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی دارد که اظهار می‌کند گونه‌های *Onobrychis* با عدد پایه کروموزومی $x=7$ با گونه *O.*

کلاد با حمایت متوسط قرار گرفته‌اند. گروه مورفولوژیکی بسیار یکنواختی از این گونه‌ها، گیاهان چندساله با گل‌های صورتی در گل‌آذین‌های پرگل از آسیای مرکزی تا جنوب اروپا است (Ball, 1968; Hedge, 1970; Rechinger, 1984).

زمان تخمینی واگرایی گونه‌های *Onobrychis* چندساله، که بیشتر به فلات ایران محدود می‌شود، با برخی از رویدادها شامل بال‌آمدن فلات ترکیه - ایران (۱۲ تا ۱۴/۵ میلیون سال قبل) و تشکیل رشته کوه در میوسن (۸ تا ۱۰ میلیون سال قبل) مطابقت دارد؛ همچنین با سازماندهی مجدد صفحات تکتونیک و بال‌آمدن بیشتر فلات ایران در حدود ۴ تا ۶ میلیون سال قبل همخوانی دارد (Djamali et al., 2012). در منطقه ایران و تورانی، رشته کوه‌های ایران (برای مثال البرز و زاگرس) با نواحی کوهسری و فلور متنوع مختص مناطق کوهسری مشخص می‌شود (Noroozi et al., 2007). زیستگاه‌های کوهسری، میزبان تعداد شایان توجهی از گونه‌های اندمیک شناخته شده است (Noroozi et al., 2018)؛ همچنین ممکن است از نوسان‌های آب و هوایی پس از خشک شدن دریای مدیترانه در اواخر میوسن تأثیر گرفته باشد (Görür and Sakinc, 1995)؛ علاوه بر این در همان دوره، گونه‌های یک‌ساله که از قبل با نام بخشه *Lophobrychis* یاد می‌شدند با $x=7$ و $x=8$ دوبار به‌طور مستقل، در قاعده کلادهای اصلی در درخت، تکامل یافته‌اند که با یافته‌های Amirahmadi و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت دارد.

به نظر می‌رسد گونه‌های یک‌ساله با عدد پایه کروموزومی $x=8$ از آسیای مرکزی و شمال غربی آسیا، در فلات ایران متحمل گونه‌زایی دگرجایی

O. Onobrychis avanakensis Amirahm.
O. cyri Grossh *bunnei* Boiss.
transcaspica V.Nikitin در یک زیرکلاد با پشتیبانی متوسط قرار می‌گیرند و در آسیای مرکزی، ایران و ماورای قفقاز توزیع شده‌اند. براساس مطالعه Lewke Bandara و همکاران (۲۰۱۳)، *O. Cyri* در موقعیت‌های مختلف قرار می‌گیرد؛ با این حال این گونه دارای شباهت ریخت‌شناختی چشمگیری به *O. bunnei* مانند طول ساقه، اندازه و رنگ گلبرگ، کاسه گل و ویژگی‌های میوه است (Rechinger, 1984). برخی گونه‌های بال کوتاه این بخش در اروپا و برخی در فلات ایران و آناتولی و آسیای مرکزی یافت می‌شوند.

براساس داده‌های حاصل از nrDNA ITS، زیرکلاد سوم از کلاد B خود به سه گروه تقسیم می‌شود. زیرکلاد سوم شامل *O. luristanica*، *O. shahpurensis*، *O. fallax*، *carduchorum* و *avanakensis* است که با حمایت قوی در یک گروه قرار می‌گیرند، ویژگی‌های مورفولوژیکی مشابهی نیز دارند (از جمله طول جام ۷ تا ۱۰ میلی‌متر، داشتن میوه بزرگ با طول میوه ۶ میلی‌متر و دارابودن شکل میوه مشابه) و در غرب ایران، ترکیه، سوریه و عراق پراکنش دارند. *O. carduchorum* مربوط به *O. fallax* است؛ اما بر گچه‌های بزرگ‌تر، موهای بلندتر پخش شده روی کاسه گل و میوه‌های بزرگ‌تر دارد (Hedge, 1970) و توسط مطالعه حاضر تأیید شده است.

O. ebenoides، *Onobrychis argentea* Boiss.
O. ferganica (Slrjaev) Boiss & Spruner
O. minata Steven ex Boiss. Grossh.
O. pindicola Hausskn و *montana* DC در یک

یک ساله، یک گروه تک تبار تشکیل نداده اند و تکامل موازی نشان می دهند.

ظهور بخشه *Onobrychis* به ۱۱/۹۵ میلیون سال پیش در میوسن میانی بازمی گردد و وقوع هر دو کلاد اصلی در زمان های تقریبی مشابهی رخ داده است. گونه زایی و تنوع یابی گونه های بال کوتاه با سرعت بیشتر رخ داده است و جوان تر هستند؛ بنابراین فرصت کافی برای اشتقاق کامل کل ژنوم وجود نداشته است؛ همچنین گفتنی است که دورگ گیری های مکرر در بین گونه های بال کوتاه منجر به ایجاد گونه های آلپلی پلوئید شده است؛ بنابراین با وجود تفاوت های ریخت شناسی، گروه بندی براساس داده های مولکولی تا حدودی متفاوت است. پدیدار شدن گونه های چندساله بال بلند شمال غرب و گونه های چندساله بال بلند شمال شرق به طور تقریبی در زمان های مشابه و به صورت جداگانه در نواحی جغرافیایی مجزا از طریق تکامل موازی است.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می کنند.

(Allopathric speciation) در غرب (آذربایجان، ترکیه، ارمنستان، عراق و شمال غرب ایران) و شرق (خراسان، افغانستان، ترکمنستان و آسیای مرکزی) شده باشند. گونه های بال بلند شمال غربی و شمال شرقی به طور تقریبی موازی با یکدیگر در دو ناحیه جغرافیایی مختلف تکامل یافته اند؛ در نتیجه به صورت گونه های جانشین (vicariant) هستند. گونه های بال بلند غربی *O. densijuga*، *O. stenostachya*، *O. saxatilis*، *O. araxina* و *O. sosnovskyi* در کلاد «A» متحمل کاهش در تعداد عدد پایه کروموزومی شده اند. گونه *O. saxatilis* تنها گونه این گروه است که در غرب اروپا مشاهده می شود و در واقع تنها گونه چندساله بال بلند اروپایی است.

جمع بندی

گروه بندی بخشه *Onobrychis* براساس طول بال و عدد کروموزومی با داده های مولکولی نسبت به سایر صفات ریخت شناسی مانند گل و میوه یا صفات رویشی مطابقت بیشتری دارد. با توجه به طول بال، بخشه *Onobrychis* به دو گروه تقسیم می شود که گونه های بال کوتاه تک تبار است؛ اما گونه های بال بلند پیراتبار است. گونه هایی که عدد پایه کروموزومی $x=7$ دارند، مستقل از هم تکامل یافته اند؛ همین طور گونه های

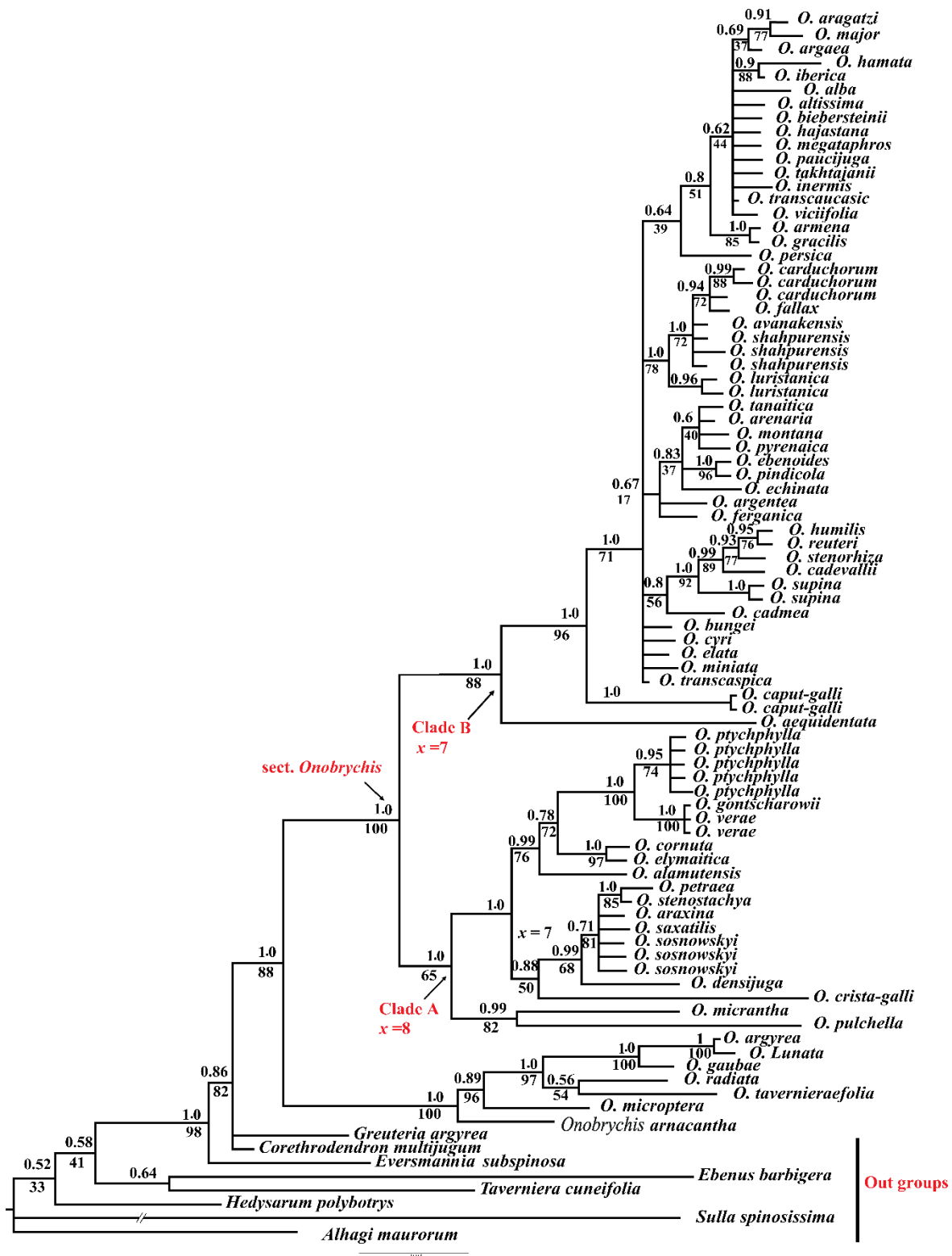
منابع

- Abou-El-Enain, M. M. (2002). Chromosomal criteria and their phylogenetic implications in the genus *Onobrychis* Mill. sect. *Lophobrychis* (Leguminosae), with special reference to Egyptian species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139, 409-414.
- Akchlik, E.S., Avci, S., Uzun, S., & Sancak, C. K. (2012). Analysis of some *Onobrychis* (SAINFOIN) species in Turkey. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 64(2), 567-571.
- Amirahmadi, A., Kazempour Osaloo, Sh., Moein, F., Kaveh, A., & Maassoumi, A. A. (2014a). Molecular systematic of the tribe Hedysareae (Fabaceae) based on nrDNA ITS and plastid trnL-F and matK sequences. *Journal of Plant Systematics and Evolution*, 300, 729-747.

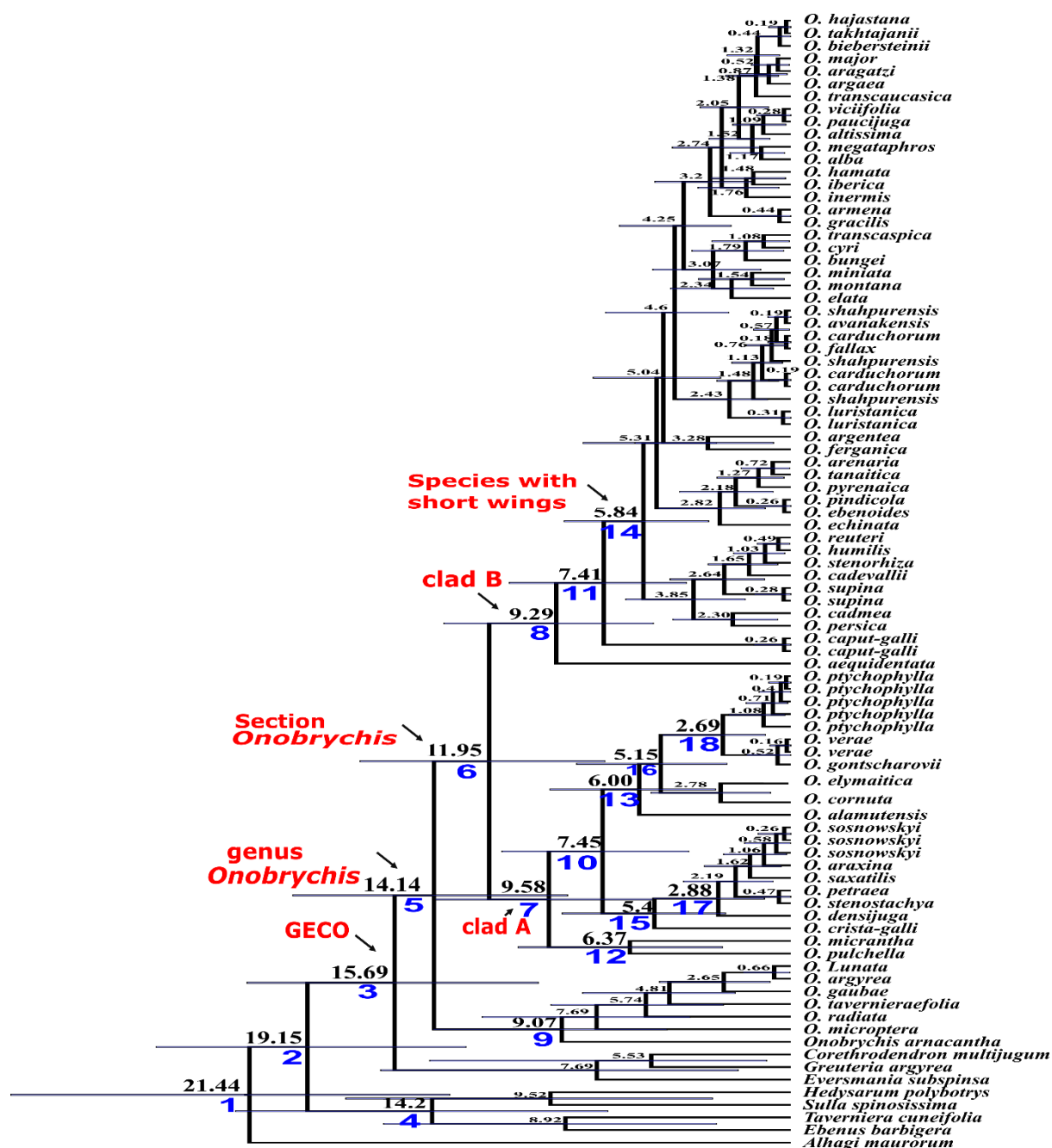
- Amirahmadi, A., Kazempour osaloo, SH., Khoshokhan Mozaffar, M. & Charkhchian, M., (2014b). A new species of *Onobrychis* sect. *Onobrychis* (Fabaceae) from Iran. *Turkish Journal of Botany*, 38, 658-664.
- Amirahmadi, A., Kazempour Osaloo, Sh., Kaveh, A. Maassoumi, A. A. & Naderi R. (2016). The phylogeny and new classification of the genus *Onobrychis* (Fabaceae-Hedysareae): evidence from molecular data. *Journal of Plant Systematics and Evolution*, 302, 1445-1456.
- Amirahmadi, A. & Khoshokhan-Mozaffar, M. (2021). Molecular and morphological evidence of *Onobrychis avanakensis*, a new species from Iran. *Phytotaxa*, 487(1), 75-82
- Astanova, S. B. & Abdusaljamova, L.N. (1981). Chisla khromosom nekotorych vidov rodov *Oxytropis* DC., *Onobrychis* Mill. (semejstvo Leguminosae Juss.) flory Tadzhikistana. *Izvestiia Akademii Nauk Tadzhikskoi SSR: Otdelenie Biologicheskikh Nauk*, 4(85), 38-41.
- Ball, P. W. (1968). *Onobrychis* (Leguminosae). In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. & Webb, D. A. (Eds.) *Flora Europaea*, Vol. 2. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 187-191.
- Baltisberger, M. (1991b). IOPB chromosome data 3. *IOPB Newsletter* 17, 5-7.
- Boissier, E. (1843). Leguminosae in Diagnoses plantarum Orientalium novarum. *Genevae Typographia Ferd. Ramboz* 2, 6-107
- Djamali, M., Baumel, A., Brewer, S., Jackson, S. T., Kadereit, J. W., LópezVinyallonga, S., Mehregan, I., Shabaniyan, E., & Simakova, A. (2012). Ecological implications of *Cousinia* Cass. (Asteraceae) persistence through the last two glacial–interglacial cycles in the continental Middle East for the Irano-Turanian flora. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 172, 10-20.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue. *Journal of Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Edgar, R.C. (2004). Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Journal of Nucleic Acids Research*, 32, 1792-1797.
- Favarger, C. (1997). Notes of alpine caryology VI. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles*, 120, 19-33 (in French). Garnatje, T., & Cardona, A. (1988). Fitodermologia I cariologia d'*Onobrychis viciifolia* Scop., *O. supina* (Chaix) DC.i *O. saxatilis* Lam. *De Catalunya. Orsis* 3, 55-65.
- Ghanavati, F., & Nematpajoo, N. (2012). Study of ploidy level of annual species of *Onobrychis* in Iran. *Caryologia*, 65, 328-334.
- Ghanavati, F., & Amirabadizadeh, H. (2018). 12. 30: A new species of *Onobrychis* (Papilionaceae) form Iran. *Iranian Journal of Botany*, 24 (2), 114-118.
- Grossheim, A. A. (1972). *Onobrychis* Adans. (Leguminosae). In: Komarov, V. L., Shishkin, B. K. & Bobrov, E. G. (Eds.) *Flora of the USSR*. Vol. 13. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, pp. 244-281.
- Görür, N., & Sakinc, M. (1995). Miocene to Pliocene palaeogeographic evolution of Turkey and its surroundings. *Journal of Human Evolution*, 28, 309-324.
- Hadadi, A. (2008). *Cytotaxonomic study on the genus Onobrychis sect. Onobrychis in Iran*. MSc Thesis. Bu-Ali Sina University, Hamedan (in Persian).
- Hedge, I.C. (1970). *Onobrychis*. In: Davis, P.H. (Ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 3. Edinburgh: University Press, pp. 560–589.
- Hedge, I. C. (1970). *Hedysarum, Onobrychis and Sartoria*. In: Davis P. H. (Ed.). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 3. Edinburgh, University Press.

- Hejazi, H., Mohsen, S., & Ziaei Nasab, M. (2010). Cytotaxonomy of some *Onobrychis* (Fabaceae) species and populations in Iran. *Caryologia*, 63, 1, 18-31.
- Jafri, S. M. (1980). Hedysareae. In: Jafri S. M. H., Gadi A. E. L. (Ed.). *Flora of Libya*. Al Faateh University, Lybia.
- Karamian, R., Ranjbar, M., & Hadadi, A. (2011-2012). Chromosome number reports in five *Onobrychis* species (*O.* sect. *Onobrychis*, Fabaceae) in Iran. *Journal of Cell and Molecular Research* 3(2), 81-92.
- Kliphuis, E. (1977). *Chromosome number reports LVI*. Taxon 26, 257-274.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., & Wojciechowski, M. F. (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Journal of Systematic Biology*, 54, 575-594.
- Lewke Bandara, N., Papini, A., Mosti, S., Brown, T., & Smith, L. M. J. (2013). A phylogenetic analysis of genus *Onobrychis* and its relationships within the tribe Hedysareae (Fabaceae). *Turkish Journal of Botany*, 37, 981-992.
- Lifante, Z. D., Luque, T., & Bárbara, C. S. (1992). Chromosome numbers of plants collected during Iter Mediterraneum II in Israel. *Bocconeia*, 3, 229-250.
- Magulaev, A. J. (1989). Cytotaxonomic study of the Northern Caucasia *Onobrychis*. Tesizy II Symp. *Plant Karyology*, 73-76 (in Russian).
- Nafisi, H., Kazempour-Osaloo, Sh., Mozaffarian, Y., & Schneeweiss, G. M. (2019). Molecular phylogeny and divergence times of the genus *Hedysarum* (Fabaceae) with special reference to section Multicaulia in Southwest Asia. *Journal of Plant Systematics and Evolution*, 305, 1001-1017.
- Nixon, K. (2006). *Diversity of life.org (DOL)*. Cornell University. Available from: <http://www.Plantsystematics.org/> (accessed 6 April 2018).
- Noroozi, J., Akhiani, H., & Breckle, S. W. (2007). Biodiversity and phytogeography of the alpine flora of Iran. *Journal of Biodiversity and Conservation*, 7, 493-521.
- Noroozi, J., Talebi, A., Doostmohammadi, M., Rumpf, S. B., Linder, H. P., & Schneeweiss, G. M. (2018). Hotspots within a global biodiversity hotspot - areas of endemism are associated with high mountain ranges. *Journal of Scientific Reports*, 8, 10345.
- Nylander, J. A. A. (2004). *Mr Modeltest v2*. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala.
- Page, D. M. (2001). *Treeview (Win32) version 1.6.6*. Available at: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Posada, D., & Buckley, T. R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Journal of Systematic Biology*, 53, 793-808.
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2007). *Tracer, version 1.4. Computer program and documentation distributed by the author*. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Ranjbar, M., Karamian, R., & Hadadi, A. (2009). Biosystematic study of *Onobrychis viciifolia* Scop. and *Onobrychis altissima* Grossh. (Fabaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany*, 15, 85-95.
- Ranjbar, M., Karamian, R., Tolui, Z., & Amirabadizadeh, H. (2007). *Onobrychis assadii* (Fabaceae), a new species from Iran. *Annales Botanici Fennici* 44, 481-484.
- Ranjbar, M., Karamian, R., & Hadadi, A. (2008) Biosystematic study of *onobrychis viciifolia* scop. And *onobrychis altissima* grossh. (fabaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany*, 15(1), 85-95.

- Ranjbar, M., Hadadi, A., & Karamian, R. (2011). Systematic study of *Onobrychis shahpurensis* (Fabaceae) in Iran, with the description of *O. neychalanensis* sp. nov. *Nordic Journal of Botany*, 29, 163-174.
- Ranjbar, M., Karamian, R., Hadadi, A., & Johartchi, M. R. (2012). Taxonomic notes on *Onobrychis* sect. *Onobrychis* subsect. *Macropterae* (Fabaceae) from Iran. *Phytotaxa*, 39, 51-60.
- Rechinger, K. H. (1984). *Onobrychis*. In: Rechinger, K.H. (Ed.) *Flora Iranica* 157. Akademische Druck- und Verlags-Anstalt, Graz & Wien, pp. 389-459.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Journal of Systematic Biology*, 61, 539-542.
- Safaei-Chaeikar, S., Ghanavati, F., Naghavi, M. R., Amirabadi-Zadeh, H., & Rabiee, R. (2014). Molecular phylogenetics of the *Onobrychis* genus (Fabaceae: Papilionoideae) using ITS and *trnL-trnF* DNA sequence data. *Australian Journal of Botany*, 62, 235-250.
- Sang, T., Crawford, D. J., & Stuessy, T. (1995). Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implication for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6813-6817.
- Sepehri, S., Emre, I., Kiran, Y., Kursat, M., & Sahin, A. (2011). Karyological studies on eight species of *Onobrychis* genus in Turkey. *Biologia* 66, 996-1002.
- Silvestro, D. & Michalak, I. (2012). RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Journal of Organisms Diversity & Evolution*, 12, 335-337.
- Širjaev, G. (1925). *Onobrychis* generis revisio criteria. *Publications of the Faculty of Science, University of Masaryk* 56, 96-97.
- Širjaev, G. (1926). *Onobrychis* generis revisio critica. Pars prima. *Publications Faculte des Sciences de l' Universite' Masaryk*, 76, 1-165
- Townsend, C. C. (1974). *Onobrychis*. In: *Flora of Iraq*, vol. 3. Published by the Ministry of Agriculture of the Republic of Iraq, Baghdad, pp. 471-493.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press Inc., New York, pp. 315-322.
- Zarrabian, M., & Majidi, M. (2015). Genetic diversity and relationships within and among *Onobrychis* species using molecular markers. *Turkish Journal of Botany*, 39, 681-692.



شکل ۱- درخت اجماعی مبتنی بر قاعده ۵۰ درصد اکثریت حاصل از آنالیز بازرین مجموعه داده nrDNA ITS. اعداد بالای شاخه ها مقادیر احتمال پسین و زیر آنها بوتسترپ حاصل از روش بیشینه درست‌نمایی است. مقادیر >۵۰ درصد نشان داده نمی‌شود.



شکل ۲- کرونوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل BEAST توالی‌های nrDNA ITS. اعداد روی هر گره زمان میانگین و اگرایی را نشان می‌دهد. اعداد در زیر گره‌ها مطابق با گره‌های فهرست شده در جدول ۲ است.

جدول ۱- تاکسون های مطالعه شده برای تحلیل داده های nrDNA ITS

اختصارات استفاده شده در اطلاعات مربوط به جمع آوری نمونه های گیاهی:

BASU: Buali sina University Herbarium, Hamedan, Iran, FUMH: Ferdowsi University of Mashhad Herbarium, Mashhad, Iran, GAZI: Herbarium of Gazi University, HINRRC: Herbarium of Isfahan Natural Resources Research Center, HQNRRC: Herbarium of Qazvin Natural Resource Research Center, MRCH: Mashhad Research Center Herbarium, MSB: Herbarium of Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany, TARI: Herbarium of the Research Institute of, Tehran, Iran, TMUH: Tarbiat Modares University Herbarium, Tehran, Iran, TUH: Tehran University Herbarium, W: Natural History Museum of vienna, WUK: Northwestern Institute of Botany.

(+)nrDNA ITS برای آن دسته که از GenBank بازیابی شد.

* توالی هایی که جدید در این مطالعه ایجاد شد.

Taxa	Source, voucher	GenBank Accession Number
		nrDNA ITS
<i>Alhagi maurorum</i> Medik.	From GenBank	AB854477 ⁺
<i>Corethroedron scoparium</i> (Fisch. & C.A. Me) Fisch. & Basiner	China: Xu et al., 86862 (MSB)	AB854478 ⁺
<i>Corethroedron multijugum</i> (Maxim.) B.H. Choi & H. Ohashi	Chang et al., 2012109 (WUK)	KP338137 ⁺
<i>Ebenus barbigera</i> Boiss.	From GenBank	AB854481 ⁺
<i>Eversmannia subspinosa</i> (Fisch. Ex DC.) B.Fedtsch.	Iran: Freitag & Mozaffarian, 28397 (TARI)	AB329692 ⁺
<i>Greuteria argyrea</i> (Greuter&Burdet) Amirahm. & Kaz.Osaloo (= <i>H. argyreum</i>)	Podlech 48626 (MSB)	AB854487 ⁺
<i>Hedysarum polybotrys</i> Hand. -Mazz.	Chang et al., QZ-042 (WUK)	KP338182 ⁺
<i>Sulla spinosissima</i> (L.) B.H.Choi & H.Ohashi	From GenBank	AB854515 ⁺
<i>Taverniera cuneifolia</i> Arn.	From GenBank	JX 455141 ⁺
<i>Onobrychis aequidentata</i> (Sam.) d'Urv.	France: Auriault 16177 (MSB)	LC137020 ⁺
<i>O. afghanica</i> Širj. & Rech.f.	Afghanistan: Podlech 15931 (MSB)	AB854501 ⁺
<i>O. alamutensis</i> Amirahm., Kaz.Osaloo & Charkhch.	Iran: Kazempour Osaloo & Bahadori 98194 (TARI)	AB911415 ⁺
<i>O. alba</i> (Waldt. & Kit) Desv.	Yugoslavia : Mazedonien Podlech 9654	AB911416⁺
<i>O. altissima</i> Grossh.	Iran: Zarre et al., s.n. (TUH)	LC137021 ⁺
<i>O. aragatzi</i> Arevsch.	Armenia: Tamaian et al, 2009-0020580 (W)	*
<i>O. araxina</i> Schischkin	Azerbaijan: Toluei & Ranjbar 23157 (BASU)	JQ780470 ⁺
<i>O. arenaria</i> (Kit.) DC.	Austria: Handel-Mazzetti s.n.,1932-0005259 (W)	*
<i>O. argaea</i> Boiss & Balansa	Turkey: Sorger 1992-0012458 (W)	*
<i>O. argentea</i> Boiss.	Algeria: Podlech, 96963 (MSB)	LC137023 ⁺

<i>O. argyrea</i> Boiss.	Iran: Kazempour-Osaloo et al. 2012-6 (TMUH)	LC388073 ⁺
<i>O. armena</i> Boiss.	Greece: Buttler 18336 (MSB)	*
<i>O. arnacantha</i> Bunge ex Boiss.	Iran: Faghinia and Zangooii 26074 (FUMH)	LC137024 ⁺
<i>O. avanakensis</i> Amirahm.	Iran: Charkhchian 1793 (HQNRRRC)	*
<i>O. biebersteinii</i> Širj.	Georgia: Staudinger 2006-0011273 (W)	*
<i>O. bungei</i> Boiss.	Iran: Reching 43484 (MSB)	LC137026 ⁺
<i>O. cadevallii</i> Jahand., Maire & Pau	Morocco: Podlech 68979 (MSB)	*
<i>O. cadmea</i> Boiss.	Transcaucasia: Vasak s.n. (?)	*
<i>O. caput-galli</i> Lam.	Iran: Kazempour Osaloo et al. 2012-4 (TMUH)	LC137027 ⁺
<i>O. caput-galli</i> Lam.	Greece: Raidel 97479 (MSB)	*
<i>O. carduchorum</i> C.C.Towns	Iran: Kazempour Osaloo et al. 2012-1 (TMUH)	AB911418 ⁺
<i>O. carduchorum</i> C.C. Towns	Iran: Sanandaj, Abidar, fattahi 1273 (TARI)	JX412244 ⁺
<i>O. carduchorum</i> C.C. Towns	Iran: Kazempour Osaloo et al. s.n. (TMUH)	*
<i>O. cornuta</i> (L.) Desv.	Iran: Kazempour Osaloo et al 2012-2 (TMUH)	LC137028 ⁺
<i>O. crista-galli</i> Lam.	Iran: Kazempour Osaloo et al. 2012-3 (TMUH)	LC137029 ⁺
<i>O. cyri</i> Grossh.	Iran: Assadi & Vosugi 24673 (TARI)	*
<i>O. densijuga</i> Hedge & Hub.-Mor.	Turkey: Ehrendorfer 1991-0004254 (W)	*
<i>O. ebenoides</i> Boiss & Spruner	Greece: Reching 1959-0003104 (W)	*
<i>O. echinata</i> (Guss.) G.Don	Italy: Podlech 96960 (MSB)	*
<i>O. elata</i> Boiss. & Balansa	Turkey: Zarre 32 (TARI)	*
<i>O. elymaitica</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	Iran: Mozaffarian 71259 (TARI)	LC137032 ⁺
<i>O. fallax</i> Freyn & Sint.	Iraq: Bornmüller 1895-0001717 (W)	*
<i>O. ferganica</i> (Širj.) Grossh.	Kyrgyzstan: Khokhryakov s.n. 1963-0014392 (W)	*
<i>O. gaubae</i> Bornm.	Iran: Kazempour-Osaloo et al. 2012-12 (TMUH)	LC388084 ⁺
<i>O. gontscharowii</i> Vassilcz.	Iran: Toluei & Ranjbar 23119 (BASU)	JQ780471 ⁺

<i>O. gracilis</i> Besser.	Turkey: Sorger 1992-0012580 (W)	*
<i>O. hajastana</i> Grossh.	Armenia: Geghark'unik' Vlasov s.n. 1972-0007899 (W)	*
<i>O. hamata</i> Vass.	Russia: Vlasov s.n.,1972-0007880 (W)	*
<i>O. humilis</i> (Loefl.) G.López	Spain: Lafnz .s.n. 1958-0002286 (W)	*
<i>O. iberica</i> Grossh.	Russia: Vlasov s.n. 1985-0007286 (W)	*
<i>O. inermis</i> Steven.	Grimus: Ritter s.n. 1966-0005645 (W)	*
<i>O. lunata</i> Boiss.	Iran: Rechinger 42530 (MSB)	LC137039 ⁺
<i>O. luristanica</i> Rech.f.	Iran: Mozaffarian 46064 (TARI)	*
<i>O. luristanica</i> Rech.f.	Iran: Eftekhari 6856 (HINRRC)	*
<i>O. major</i> Boiss. & Kotschy ex Boiss.	Iran: Kazempour-Osaloo et al 2012-6- 15 (TMUH)	*
<i>O. megataphros</i> Boiss.	Iran: Kazempour Osaloo et al. 2008- 01 (TMUH)	*
<i>O. micrantha</i> Schrenk	Iran: Ayatollahi & Joharchii 13063 (TARI)	LC137042 ⁺
<i>O. microptera</i> Baker ex Aitch.	Afghanistan: Podlech 288872 (MSB)	LC137044 ⁺
<i>O. miniata</i> Steven ex Boiss.	Ukraine: Vlasov 11971-0004137 (W)	*
<i>O. montana</i> DC.	Italy: Burri & Krendl s.n. 1994- 0006105 (W)	*
<i>O. paucijuga</i> Bornm.	Turkey: Vural 4897 (GAZI)	*
<i>O. persica</i> Širj. & Rech.f.	Iran: Azarbaijan Kazempour Osaloo et al. 2008 (TMUH)	*
<i>O. petraea</i> (M.Bieb. ex Willd.) Fisch.	From GenBank	KF015315 ⁺
<i>O. pindicola</i> Hausskn.	Greece: Rechinger 1970-0007198 (W)	*
<i>O. ptychophylla</i> Sirjaev K.H.Rechinger	Iran: Kazempour Osaloo et al. 2011- 05 (TMUH)	*
<i>O. ptychophylla</i> Sirjaev K.H.Rechinger .	From GenBank	JQ780472 ⁺
<i>O. ptychophylla</i> Sirjaev K.H.Rechinger	From GenBank	JQ780473 ⁺
<i>O. ptychophylla</i> Sirjaev K.H.Rechinger	From GenBank	JQ780474 ⁺
<i>O. ptychophylla</i> Sirjaev K.H.Rechinger	Iran(From GenBank)	JX455137 ⁺
<i>O. pulchella</i> Schrenk	Iran: Ghahraman et al. 27318 (TUH)	AB854508 ⁺
<i>O. pyrenaica</i> Sennen ex Širj.	Spain(From GenBank)	KF015361 ⁺
<i>O. radiata</i> Fisch.	Iran: Kuorkoba 374 (TARI)	LC137046 ⁺
<i>O. reuteri</i> Leresche	Spain: Segura 68918 (MSB)	*
<i>O. saxatilis</i> Lam.	France: Podlech 57840 (MSB)	*
<i>O. shahpurensis</i> Rech.f.	Iran: Rechinger & Renz 49668 (TARI)	LC137049 ⁺
<i>O. shahpurensis</i> Rech.f.	Iran: Kazempour-Osaloo et al., 2012-	AB911419 ⁺

	2 (TMUH)	
<i>O. shahpurensis</i> Rech.f.	Iran: Kazempour- Osaloo s.n. (TMUH)	*
<i>O. sosnowskyi</i> Grossh.	Iran: Mozaffarian 93762 (TARI)	LC137051 ⁺
<i>O. sosnowskyi</i> Grossh.	Iran: Toluei & Ranjbar 23156 (BASU)	JQ780469 ⁺
<i>O. sosnowskyi</i> Grossh.	Iran: Amirabadi Zadeh & Ghanavati 6065 (MRCH)	JX455132 ⁺
<i>O. stenorrhiza</i> DC.	Spain: Riera 60805 (MSB)	*
<i>O. stenostachya</i> Freyn	Turkey: Gunes s.n. ()	*
<i>O. supina</i> DC.	France: Podlech 57824 (MSB)	LC137055 ⁺
<i>O. supina</i> DC.	France: Sellmair 218a (MSB)	*
<i>O. takhtajanii</i> Sytin	From GenBank	KF015336 ⁺
<i>O. tanaïtica</i> Spreng.	China: Xu et al., 87212 (MSB)	LC137056 ⁺
<i>O. tavernieraefolia</i> Stocks ex Boiss.	Afghanistan: Podlech 97568 (MSB)	AB854510 ⁺
<i>O. transcaspica</i> V.Nikitin	Iran: Ghahraman & Mozaffarian 5859 (TUH)	AB911421 ⁺
<i>O. transcaucasica</i> Grossh.	Turkey: Zarre 58994 (MSB)	*
<i>O. verae</i> Širj.	Iran: Kazempour -Osaloo 2011-1 (TMUH)	AB854511 ⁺
<i>O. verae</i> Širj.	From GenBank	JX426802 ⁺
<i>O. viciifolia</i> Scop.	Spain: Podlech 68902 (MSB)	AB854512 ⁺

جدول ۲- میانگین سن، نرخ و محدوده گره (HPD :٪۹۵) تکامل با احتمال پسین آنالیز nrDNA ITS

Node	Node definition	Mean age (Mya)	Min (Mya)	Max (Mya)	Mean rate (s/s/Ma)	95% HPD (Mya)
1	<i>Alhagi</i>	21.44	13.50	30.88		0.000
	<i>Ebenus</i>					
	<i>Taverniera</i>					
	<i>Sulla</i>					
2	<i>Hedysarum</i>	19.5	12.84	25.13		0.0001
	<i>Everesmania,</i>					
	<i>Coreterdenderon and</i>					
	<i>Greuteria</i>					
	<i>Onobrychis</i>					
3	GECO	15.69	9.99	21.53		0.001
	<i>Ebenus</i>					
	<i>Taverniera</i>					
4	<i>Sulla</i>	14.20	7.24	21.99		0.000
	<i>Hedysarum</i>					
5	Genus <i>Onobrychis</i>	14.14	8.84	19.73		0.003
6	Section <i>Onobrychis</i>	11.95	7.60	17.09		0.001
7	Clade A	9.58	5.45	14.09		0.000
8	Clade B	9.29	5.44	13.73		0.000
9	<i>Heliobrychis</i> and <i>Hymenobrychis</i>	9.07	4.89	14.17		0.001
10	Perennial Long wings	7.45	4.04	11.43		0.000
11	<i>O. caputgalli</i> N=7	7.41	4.13	11.14		0.000
12	<i>O. micrantha</i> <i>O. pulchella</i>	6.37	2.70	10.80		0.000
13	<i>O. alamutensis</i>	6	2.97	9.54		0.000
14	Short wings	5.84	4.13	11.14		0.000
15	<i>O. crista-galli</i>	5.4	2.58	9.05		0.000
16	<i>O. cornuta</i> <i>O. elymaitica</i>	5.15	2.97	9.54		0.000
17	Northwest long wings	2.88	1.04	5.45		0.000
18	Northeast long wings	2.69	2.52	8.47		0.000

