

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ - NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Rezumatul tezei de doctorat

**Studii de filogenie moleculară la speciile europene de
Astragalus L. aparținând secției *Dissitiflora***

Conducător științific

Prof. Dr. Nicolae Dragoș

Doctorand

Bartha László

Cluj - Napoca

2012

Cuprinsul tezei de doctorat

1 ABREVIERI	5
2 INTRODUCERE	6
3 CONSIDERAȚII TEORETICE	7
3.1 INFERENȚA ÎNRUDIRII SPECIILOR FOLOSIND SECVENȚE ADN	7
3.2 PREZENTAREA GENERALĂ A GENULUI <i>ASTRAGALUS</i>	9
3.2.1 <i>ASTRAGALUS</i> : o poveste de succes din punct de vedere al evoluției	9
3.2.2 Poziția filogenetică a genului <i>ASTRAGALUS</i>	9
3.2.3 Evoluția numărului de cromozom la genul <i>ASTRAGALUS</i>	12
3.3 CLASIFICAREA GENULUI <i>ASTRAGALUS</i>	14
3.4 SECȚIA <i>DISSITIFLORI</i> A GENULUI <i>ASTRAGALUS</i> CU REFERIRE SPECIALĂ LA SPECIILE EUROPENE	15
3.4.1 Incertitudini taxonomice la speciile europene de <i>ASTRAGALUS</i> aparținând secției Dissitiflori	16
3.4.2 Problema originii și înrudirii al endemitului local <i>ASTRAGALUS PETERFII</i>	16
3.5 STUDII ANTERIOARE DE FILOGENIE MOLECULARĂ PENTRU GENUL <i>ASTRAGALUS</i> ȘI MARKERII MOLECULARI FOLOSIȚI	19
4 PRINCIPALELE OBIECTIVE ALE TEZEI	21
5 MATERIALE ȘI METODE	22
5.1 EȘANTIONAREA TAXONILOR	22
5.2 MATERIAL VEGETAL ȘI EXTRAȚIA ADN-ULUI	23
5.3 DEZVOLTAREA ȘI SELECȚIA MARKERILOR MOLECULARI. AMPLIFICAREA PCR	27
5.3.1 Dezvoltarea și selecția markerilor moleculari	27
5.3.2 Amplificarea PCR	28
5.4 CLONAREA ȘI SECVENȚAREA	32
5.5 ANALIZE FILOGENETICE	33
5.5.1 Alinierea secvențelor ADN	33
5.5.2 Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale	33
5.5.3 Ceasul molecular pe baza secvențelor plastidiale	35
5.5.4 Analiza rețelelor de secvențe nrITS clonate	35
5.5.5 Analiza arborilor filogenetici ale secvențelor nrITS clonate	36
5.6 ANALIZA MULTIVARIATĂ A CARACTERELOR MORFOMETRICE	36
6 REZULTATE	39
6.1 SUCCESUL SECVENȚĂRII ȘI ALINIAREA SECVENȚELOR	39
6.1.1 Regiunile plastidiale <i>ycf1</i> , <i>ndhF-rpl32</i> și <i>rpl32-trnL</i>	39
6.1.2 nrITS	40
6.2 RECONSTRUCȚIA ARBORILOR FILOGENETICI A SECVENȚELOR PLASTIDIALE	49

6.2.1	Analiza parcimoniei maxime a matricelor de <i>ycf1</i> , <i>ndhF-rpl32</i> și <i>rpl32-trnL</i>	49
6.2.2	Analiza parcimoniei maxime și analiza Bayesiană ale secvențelor plastidiale combinate.....	50
6.2.3	Analiza Maximum Likelihood ale secvențelor plastidiale combinate.....	52
6.3	ANALIZA CEASULUI MOLECULAR	57
6.4	ANALIZA REȚELELOR DE SECVENȚE NRITS	59
6.4.1	Reconstrucția rețelei de parcimonie statistică a ribotipurilor.....	59
6.4.2	Analiza NeighborNet a ribotipurilor	61
6.5	ANALIZA ARBORILOR FILOGENETICI BAZAȚI PE SECVENȚE NRITS.....	63
6.6	ANALIZA MULTIVARIATĂ MORFOMETRICĂ A SPECIILOR <i>DISSITIFLORI</i> SELECTATE	65
7	DISCUȚII	68
7.1	FILOGENIA SPECIILOR <i>ASTRAGALUS</i> APARTINÂND SECȚIEI <i>DISSITIFLORI</i> DIN EUROPA: IMPLICAȚII BIOGEOGRAFICE ȘI ESTIMAREA DIVERSIFICĂRII DE-A LUNGUL TIMPULUI.....	68
7.2	STATUTUL NE-MONOFIETIC AL SECȚIILOR <i>DISSITIFLORI</i> ȘI <i>ERIOCERAS</i>	72
7.3	SPECIAȚIE RETICULATĂ ȘI EVOLUȚIA INCOMPLETĂ CONJUGATĂ A NRITS-ULUI ÎN <i>ASTRAGALUS</i> SECȚIA <i>DISSITIFLORI</i>	75
7.4	ORIGINEA ȘI ÎNRUDIREA SPECIEI <i>A. PETERFII</i>	77
7.5	IMPLICAȚII TAXONOMICE PENTRU SPECII SELECTATE ALE SECȚIEI <i>DISSITIFLORI</i>	78
7.6	IMPORTANȚA UTILIZĂRII COMBinate ALE SECVENȚELOR <i>YCF1</i> , <i>NDHF-RPL32</i> ȘI <i>RPL32-TRNL</i> ÎN FILOGENIA SPECIILOR DE <i>ASTRAGALUS</i>	79
8	CONCLUZII.....	80
9	BIBLIOGRAFIE.....	81
10	APENDICE	91
10.1	APPENDIX 1. DISTRIBUȚIA SECVENȚELOR CLONATE NRITS DIN CADRUL GRUPURILOR DE RIBOTIP IDENTIFICATE ÎN ANALIZA REȚELELOR FILOGENETICE	91
10.2	APPENDIX 2. SCHEMA BLOC A TESTULUI ILD IMPLEMENTAT ÎN PAUP	93
10.3	APPENDIX 3. SCHEMA BLOC A ANALIZEI BAYESIENE A SECVENȚELOR PLASTIDIALE	93
10.4	APPENDIX 4. SCHEMA BLOC A ANALIZEI PARCIMONIEI MAXIME A SECVENȚELOR PLASTIDIALE	94
10.5	APPENDIX 5. ARBORELE STRICT CONSENS A CELOR CEI MAI PARCIMONIOȘI 34 DE ARBORI DERIVAȚI DIN ANALIZA PARCIMONIEI MAXIME A 35 SECVENȚE <i>YCF1</i>	95
10.6	APPENDIX 6. ARBORELE STRICT CONSENS A CELOR CEI MAI PARCIMONIOȘI 9 ARBORI DERIVAȚI DIN ANALIZA PARCIMONIEI MAXIME A 35 SECVENȚE <i>NDHF-RPL32</i>	96
10.7	APPENDIX 7. ARBORELE STRICT CONSENS A CELOR CEI MAI PARCIMONIOȘI 312 DE ARBORI DERIVAȚI DIN ANALIZA PARCIMONIEI MAXIME A 35 SECVENȚE <i>RPL32-TRNL</i>	97
10.8	APPENDIX 8. ARBORELE STRICT CONSENS A CELOR CEI MAI PARCIMONIOȘI 669 DE ARBORI DERIVAȚI DIN ANALIZA PARCIMONIEI MAXIME A 47 SECVENȚE <i>YCF1</i>	98
11	MULȚUMIRI.....	99
12	PUBLICAȚII ȘI PREZENTĂRI PE BAZA TEZEI	100

Introducere

Astragalus este genul cu cel mare număr de specii (ca. 2500 spp.) al angiospermelor.

Pe lângă numărul mare de specii, diversitate genului se reflectă și prin numărul mare al endemitelor locale în lume sau radiația speciilor în Anzi sau Asia Centrală.

Flora României, de exemplu, conține trei specii endemice de *Astragalus*: *A. peterfii* Jáv., *A. roemeri* Simonk., și *A. pseudopurpureus* Guşul. Acestea sunt specii emblematice ale conservării naturii, ele având distribuții geografice restrânse. Prima crește în habitate stepice ale Câmpiei Transilvane, în timp ce ultimele două cresc în habitate montane ale Carpaților Orientali.

Explorarea înrudirilor acestor specii constituie obligația studiilor botanice curente. Cu ajutorul secvențării ADN-ului și a metodelor folosite pentru reconstrucția arborilor filogenetici, îndeplinirea acestor necesități pare relativ simplă. În general, cu cât speciile sunt mai strâns înrudite, cu atât mai mult se aseamănă secvențele lor. Diferitele metode utilizate pentru inferența filogenetică se bazează pe acest principiu. Un important aspect pe care astfel de studii îl întâlnesc este eșantionarea taxonilor. Ce specii din cele aprox. 2500 să fie incluse? Tratările taxonomice anterioare bazate pe investigații morfologice ori studii de filogenie moleculară anterioare pot servi ca referință în acest scop.

Interesul autorului în inferența filogenetică a plantelor a apărut în timpul studiilor sale de masterat și a fost influențat de cercetătorii Universității Babeş-Bolyai și cei de ai Universității din Debrecen. La începutul studiilor de doctorat investigațiile lui aveau ca principalul obiect reconstrucția relațiilor filogenetice ale endemitului local *Astragalus peterfii*. Între timp, autorul a extins prelevare taxonilor la toată Europa, în ceea ce privește secția taxonomică de care *A. peterfii* aparține. Obiectivul final al studiilor sale de doctorat a devenit reconstrucția filogeniei speciilor europene de *Astragalus* aparținând secției *Dissitiflori*. În această teză cele mai importante rezultate ale acestui studiu de trei ani sunt prezentate.

Considerații teoretice

Inferența înrudirii speciilor folosind secvențe de ADN

De mai mult de două decenii secvențele ADN reprezintă sursa cea mai importantă de informație pentru stabilirea înrudirilor speciilor la diferite nivele taxonomice și acest fapt pare să nu se schimbe în viitor (Baldwin, 1992; Shaw *et al.*, 2005). Un antecedent pentru acesta a fost recunoașterea faptului că variația secvențelor între specii reflectă cu o certitudine mai bună relațiile de înrudire ale acestora decât caracterele morfologice care înclină a fi foarte homeoplastice datorită convergenței evolutive (Downie *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2000). Autenticitatea lor e valabilă în special în cazul markerilor filogenetici necodificatori care în general nu sunt supuși selecției, și de aceea descriu cu o acuratețe mai mare istoria speciilor (Kolarčik *et al.*, 2010).

Doi factori cheie adiționali au mai contribuit la popularitatea inferenței filogenetice bazată pe secvențe: obținerea secvențelor prin tehnici de rutină și dezvoltare metodelor computaționale, respectiv a algoritmilor.

Filogeniile au implicații directe asupra clasificării filogenetice: o cladă a unui arbore este o unitate filogenetică căreia i se poate asocia un grad taxonomic dacă clada respectivă e susținută și morfologic (Chatrou *et al.*, 2012). Un important considerent al acestei abordări este confidența statistică a cladei. În general numai cladele bine susținute statistic se iau în considerare. Pe de altă parte suportul statistic, rezoluția și conținutul de specii al oricărei clade poate varia în funcție de metoda filogenetică aplicată sau când markeri adiționali sunt incluși în analize. De aceea, pe lângă suportul statistic și morfologic, congruența și stabilitatea cladelor este de asemenea importantă când unei clade i se asociază o unitate taxonomică.

La angiosperme rata substituției nucleotodice a genomului plastidial depășește în general de trei ori pe cea a genomului mitocondrial, în timp ce rata substituției nucleotodice a genomului nuclear depășește de 12–16 ori pe cea a genomului mitocondrial (Weng *et al.*, 2012)), și referințele incluse). Prin urmare, în contrast cu animalele, secvențele mitocondriale beneficiază de mai puțină importanță în filogenia moleculară a plantelor.

Markerii ADN plastidiali, chiar dacă sunt mai puțin variabili decât cei nucleari, prezintă anumite avantaje față de aceștia. Ei în mod normal reflectă modul clasic (bifurcat) al speciației pe un arbore filogenetic datorită trăsăturii lor *single-copy* ceea ce asigură și inexistența recombinăției. Un alt avantaj îl constituie accesul la amorse universale (Xu *et al.*, 2012). Acestea fac acești tipuri de markeri ideali pentru testarea monofiliei (în special deasupra la nivelul speciilor) chiar dacă ei se moștesc doar maternal.

Filogeniile bazate pe secvențe plastidiale conduc însă frecvent la arbori bogați în politomii din cauza variației lor insuficiente. Astfel de cazuri se explică prin diversificația recentă sau/și rapidă a respectivelor grupuri de plante sau prin utilizarea markerilor inadecvați.

Relațiile filogenetice, în special cele apropiate de vârfurile unui arbore filogenetic (la nivel de specie), nu se pot dezvălui din plin cu markeri moșteniți uniparental atunci când hibridarea, introgresarea, transferul de genuri (precum și alte procese de *output* similar) au ajustat speciația.

Hibridarea și aloploidizarea (hibridare urmată de poliploidizare) sunt cunoscute ca și forțe majore care au ajustat evoluția și speciația plantelor (Grant, 1981; Soltis and Soltis, 2009). Astfel de procese se pot identifica prin filogenii derivate cu markeri moșteniți biparental dacă copiile unei regiuni nucleare provenind din diferite specii părinte sunt regăsite într-un organism hibrid și ele fiind suficient divergente înaintea hibridării. Dacă una dintre copii este omogenizată față de cealaltă copie – un fenomen frecvent întâlnit în cazul regiunii nrITS (*'internal transcribed spacer'*) al ADN-ului nuclear ribozomal – incongruențele dintre filogeniile bazate pe secvențe plastidiale respectiv nucleare încă mai pot servi ca dovadă pentru hibridare sau eventual aloploidizare. Incongruențele dintre filogeniile bazate pe secvențele nucleare și cele plastidiale (sau paralogia oricărui marker nuclear) poate fi însă cauzată și de *'incomplete lineage sorting'* (reținerea polimorfismului ancestral) și recombinare (Rieseberg and Brunsfeld, 1992; Xu *et al.*, 2012). Discriminarea speciației prin hibridare (reticulație) de retenția polimorfismului ancestral este de multe ori dificilă și reprezintă o provocare pentru specialiștii în domeniul filogeniei (Wendel and Doyle, 1998; Willyard *et al.*, 2009).

În ciuda popularității în creștere a markerilor nucleari *low/single-copy*, regiunea nrITS este încă unul din cei mai utilizați markeri filogenetici. Se compune din regiunile ITS1 și ITS2 legate între ele de gena pentru ARNr 5.8S (Calonje *et al.*, 2008). ITS1 și ITS2 se transcriu în decursul transcrierii ARN-ului dar se degradează după, de aceea pot fi considerați markeri nucleari neutri. Datorită numărului mare de copii în genom, lungimii relativ scurte și existenței amorsoarelor universale, amplificarea regiunii nrITS prin PCR e relativ simplă chiar și din probe ADN parțial degradate (de exemplu extrase din material de ierbar). Cu toate acestea, copiile ale acestui marker nu sunt mereu omogenizate din deplin sau nu urmăresc cele două genomuri în hibridi (Zimmer și Wen, 2012), și referințele incluse) datorită procesului evoluției în conjugate (*concerted evolution*) făcând acest marker un instrument mai puțin promițătoare decât genele nucleare *low-copy*.

Prezentarea generală a genului *Astragalus*

***Astragalus*: o poveste de succes din punct de vedere al evoluției**

Genul *Astragalus* cuprinde în jur de 2,500 de specii fiind cel mai mare gen al angiospermelor (Lock and Schrire, 2005). Majoritatea speciilor *Astragalus* sunt pereniale, altele fiind și anuale. Speciile ale acestui gen sunt prezente pe aproape toate continentele (excluzând Australia) și ocupă mai mult regiunile răcoroase, aride și continentale ale emisferei nordice și ale Americii de Sud (Lock and Schrire, 2005). Genul ajunge la cea mai mare diversitate în Asia centrală și sud-estică (ca. 1500 specii), regiunea Sino-Himalaia (ca. 500 specii), partea vestică a Americii de Nord (ca. 400-500 specii) și în Anzi în America de Sud (ca. 100 specii) (Kazempour Osaloo *et al.*, 2003). *Astragalus* este divers și în regiunile climatice tip mediteraneene în Europa de sud (incluzând Asia Mică) și zona de coastă din vestul Americii de Nord.

Deși numărul de bază al cromozomilor este $2n=16$ pentru *Astragalus*, numere mari de cromozomi au fost raportate în studii citologice din toate părțile arealului genului (Ledingham, 1960; Ledingham and Rever, 1963; Masoud *et al.*, 2009). Aceasta sugerează un rol important al poliploidizării în evoluția genului. Pe lângă poliploidizarea, radiația adaptativă la o scară globală (Kazempour Osaloo *et al.*, 2003) probabil a contribuit la numărul mare de specii și rata mare al endemitelor în genul *Astragalus*. Un al treilea factor care poate avea un rol semnificativ în diversificarea speciilor îl constituie raritatea sau chiar absența hibridării (Liston, 1992; Judd *et al.*, 2008; Kazemi *et al.*, 2009) în combinație cu autogamia larg răspândită în gen (D. Podlech, *personal communication* (2010)), ceea ce putea facilita izolarea speciilor. Deoarece hibridarea nu a fost încă raportată pentru gen, putem presupune că nici hibridarea nici aloploidizarea nu au contribuit încă la speciație în *Astragalus*. Aceste fenomene, au ajustat astfel, în profunzime evoluția angiospermelor (Grant, 1981; Soltis and Soltis, 2009).

Secția *Dissitiflora* a genului *Astragalus* cu referire specială la speciile europene

Secția *Dissitiflora* este una din secțiile cu cel mai mare număr de specii (ca. 160 spp.) ale genului *Astragalus*. Face parte din subgenul parafiletic *Cercidothrix* care cuprinde speciile cu indumentum bifurcat (Ranjbar, 2004). Această secție a fost întemeiată de A. P. de Candolle în anul 1825. Mai târziu (1868) Bunge a introdus aceeași secție sub numele *Xiphidium* (Ranjbar, 2004). Lectotipizare a fost îndeplinită de Podlech (1990). Prin urmare secția o are pe *A. varius* ca specie tip.

Principalul centru de speciație al secției *Dissitiflora* se află în munții Asiei Centrale (Goncharov *et al.*, 1946), însă arealul său acoperă întreaga Eurasia (Ghahremani-Nejad, 2004). În

Europa secția prezintă a distribuție disinctă și cuprinde aprox. 50 de specii, în timp ce Flora României cuprinde 7-8 taxoni (Ciocârlan, 2009). Diverse endemite locale europene de *Astragalus* aparțin acestei secții, cum ar fi *A. hispanicus* Coss. ex Bunge în Spania, *A. aquilanus* Anzal. și *A. vesicarius* L. subsp. *pastellianus* Pollini (Arcang.) în Italia, *A. peterfii* Jáv. în România, *A. tarchankuticus* Boriss. în Ucraina. Sect. *Dissitiflori* e considerabil de diversă pe Peninsula Balcanică și în Asia Mică.

Imaginile inflorescenței speciilor selectate aparținând secției sunt prezentate pe Fig. 3.

Relațiile de înrudire, fie morfologice, fie filogenetice, ale speciilor aparținând acestei secții nu au fost încă studiate. De altfel, taxonomia secției, în special din Europa, prezintă numeroase neclarități generate de nomenclatura controversată a unor specii.

Incertitudini taxonomice la speciile europene de *Astragalus* aparținând secției *Dissitiflori*

Unul din grupurile de specii problematice ale secției din punct de vedere taxonomic îl constituie agregatul *A. vesicarius* L. care, conform celei mai recente circumscrieri incluzând Europa, dar excluzând fosta Uniunea Sovietică, include trei subspecii: *A. vesicarius* L. subsp. *vesicarius* (incl. *A. albidus* Waldst. & Kit.), *A. vesicarius* subsp. *pastellianus* și *A. vesicarius* subsp. *carniolicus* (A. Kern.) Chater (Podlech, 2008). Dintre acestea *A. vesicarius* subsp. *vesicarius* are cea mai vastă (însă disiunctă) distribuție, din Peninsula Iberică până în Ucraina, în timp ce *A. vesicarius* subsp. *pastellianus* este endemic pentru Nord-estul Italiei și *A. vesicarius* subsp. *carniolicus* este limitată la Italia Nord-estică, Croația și Slovenia. Pe lângă cele trei subspecii menționate mai sus, doi taxoni au fost afiliați repetat cu (ori chiar incluși în) grupul *vesicarius*: *A. pseudoglaucus* Klokov și *A. tarchankuticus* Boriss. *A. pseudoglaucus* este limitată la țărmul Nord-vestic al Mării Negre (Bulgaria, România, Ucraina și probabil Republica Moldova), și *A. tarchankuticus*, crește exclusiv în Crimeea, pe Peninsula Tarkut, de unde a fost original descrisă (Borissova, 1951). În Flora Europaea ele sunt tratate ca posibile subspecii al taxonului *A. vesicarius* (Chater, 1968). Mai târziu, combinația nouă de *A. vesicarius* subsp. *pseudoglaucus* (Klokov) Ciocârlan a fost introdusă (Ciocârlan and Sârbu, 2001). Mai recent, *A. tarchankuticus* a fost sinonimizată cu *A. albicaulis* D.C. în timp ce *A. pseudoglaucus* a fost sinonimizată cu *A. vesicarius* (Podlech, 2011), astfel confirmând opinia lui Ciocârlan și Sârbu (2001) asupra acestui taxon bazată pe considerații morfologice.

Problema originii și înruderii al endemitului local *Astragalus peterfii*

Fiind o specie emblematică de a conservare naturii din România, *Astragalus peterfii* Jáv. este un endemit local al Câmpiei Transilvane. A fost descoperită în anul 1916 de briologul Péterfi Márton lângă satul Suatu (jud. Cluj), fiind dedicată celui care a gasit-o, de către autorul speciei

Jávorka Sándor. O rezervație botanică a fost înființată pentru protejarea speciei în anul 1932 pe locul clasic al acesteia de către profesorul Alexandru Borza. Pentru câteva deceni acest sit a rămas singura ocurență cunoscută a speciei, iar în anul 1962 o a doua populație a fost identificată la câțiva kilometri depărtare, lângă satul Căianu (Bădărău *et al.*, 2000). *Astragalus peterfii* figurează pe o serie de liste roșii și în cadrul unor acorduri pentru conservarea biodiversității (Directiva Habitate, Lista Roșie IUCN, Convenția din Berna și Lista Roșie Națională a României). Este o specie octoploidă ($2n=64$) (Ledingham and Rever, 1963) a secției *Dissitiflori* (Podlech, 2008).

Problema originii și a afinităților lui *A. peterfii* a provocat o serie de ipoteze, derivate mai mult din investigații morfologice. Prima remarcă pe acest subiect a fost făcută chiar de autorul speciei. După Jávorka (1916), *Astragalus peterfii* este strâns înrudită cu *A. glaucus* M. B., crescând lângă orașul Odessa (Ucraina). Studiind variabilitatea genetică a speciei folosind analize biochimice, Borza (1998) a găsit un tipar al izoenzimelor sugerând o origine aloploidă pentru *A. peterfii*. El a mai comparat *A. peterfii* cu zece alte specii de *Astragalus* din România pe baza polimorfismului proteinelor din semințe pentru a studia relațiile filogenetice dintre ele (Borza *et al.*, 1994). Niciuna dintre speciile studiate nu a fost dezvăluită ca fiind strâns înrudită cu *A. peterfii*, rezultat așteptat, deoarece niciuna dintre taxonii investigați nu aparținea secției *Dissitiflori*. Pânzaru (2006) a avansat o nouă teorie referitoare la taxonomia speciei, susținând că *Astragalus peterfii* este de fapt sinonimul taxonului *A. vesicarius* subsp. *pastellianus*, endemitul local Nord-Italian.

Considerațiile anterioare confirmă interesul general în problema originii și a înrudirilor speciei *A. peterfii*.

Studiul literaturii taxonomice sugerează prezența unui posibil complex de specie în secția *Dissitiflori* a genului *Astragalus* incluzând probabil *A. pseudoglaucus*, *A. tarchankuticus*, *A. peterfii* și membrii ai agregatului *A. vesicarius*. Lămurirea complexelor de specii este de obicei dificilă și necesită integrarea informațiilor din diferite surse, de ex. genomul plastidial și cel nuclear, sau morfometrie.

Studiile de filogenie moleculară asupra genului *Astragalus* din ultimele două decenii au avut ca obiectiv circumscrierea genului, incluzând studiile exploratoare care au reconstruit afinitățile principale a genului și relațiile intersecționale (Wojciechowski *et al.*, 1993; Wojciechowski *et al.*, 1999; Kazempour Osaloo *et al.*, 2003, 2005; Wojciechowski, 2005; Kazemi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Aceste studii inițiale ajută la înțelegerea relațiilor filogenetice la un nivel profund, exemplificat de exemplu prin studiul lui Rihai *et al.* (2011) care a vizat reconstrucția filogeniei secției *Caprini* al genului *Astragalus*. Această tendință a fost menținută de Javanmardi *et al.* (2012) ai cărui studiu avea ca scop reconstrucția filogeniei secției *Alopecuroidei* al genului

Astragalus. Prezenta teză încearcă să-și continue și ea sus-numita direcție prin tentativa de a reconstrui filogenia speciilor (europene) de *Astragalus* aparținând secției *Dissitiflori*.

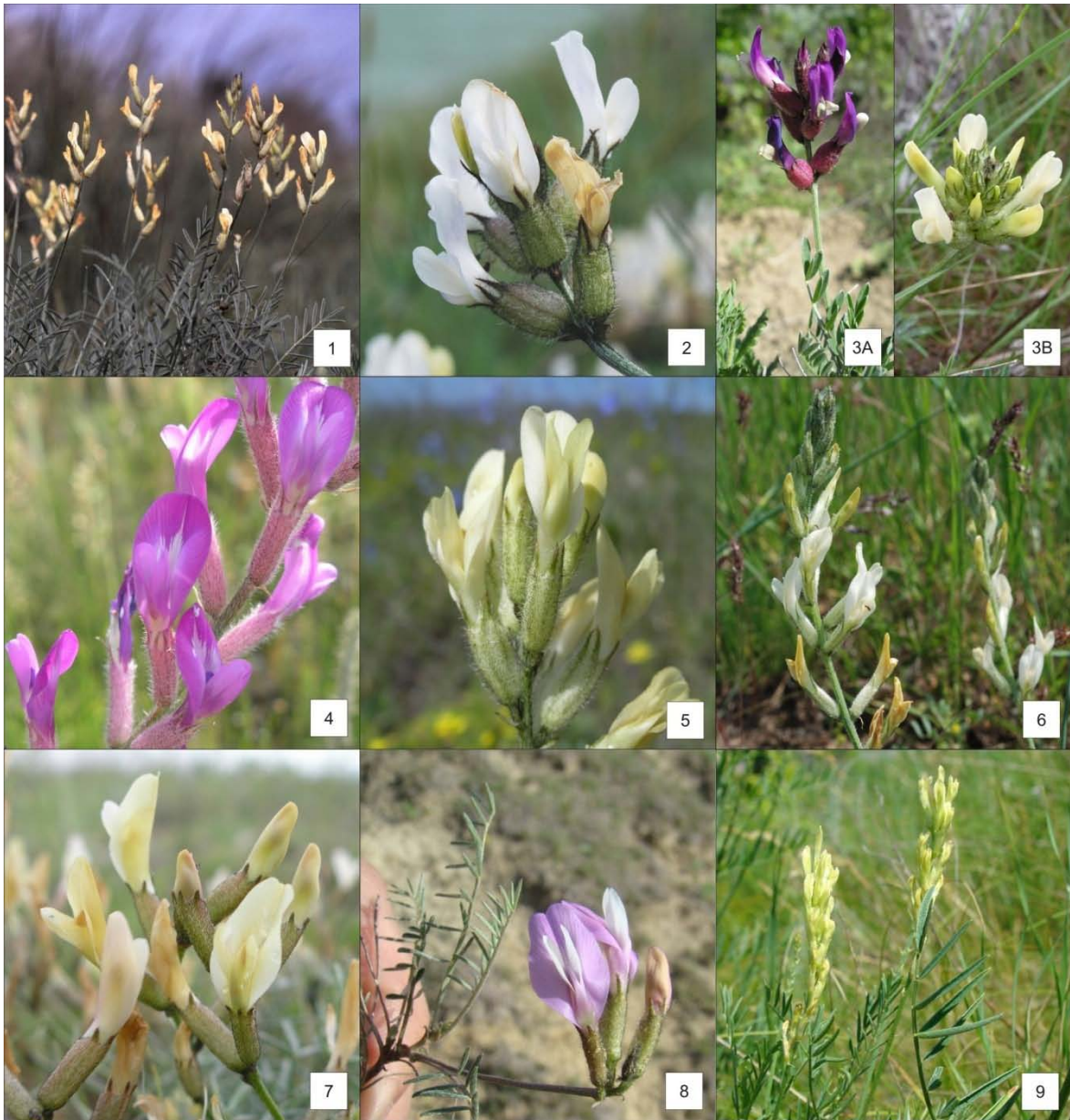


Fig. 3. Imaginile inflorescenței taxonilor selectați aparținând secției *Dissitiflori* a genului *Astragalus*. 1 - *A. peterfii*, 2 - *A. pseudoglaucus*, 3A - *A. vesicarius* subsp. *albidus*, 3B - *A. vesicarius* subsp. *pastellianus*, 4 - *A. varius*, 5 - *A. tarchankuticus*, 6 - *A. pallescens*, 7 - *A. ucrainicus*, 8 - *A. subuliformis*, 9 - *A. asper*. (Fotografiile făcute de Bartha László cu excepția celei de *A. peterfii* făcută de Molnár V. Attila)

Principalele obiective ale tezei:

- găsirea sau dezvoltarea de markeri moleculari pentru genul *Astragalus* suficient de variabili pentru rezolvarea înrudirilor speciilor la nivel de secție.
- avansarea unei prime ipoteze filogenetice pentru speciile europene de *Astragalus* aparținând secției *Dissitiflora* bazată pe secvențe plastidiale.
- estimarea diversificației secției din Europa în timp.
- examinarea existenței speciației reticulate în secție/gen utilizând markeri moleculari nucleari.
- explorarea rudelor endemitului local *A. peterfii*.
- lămurirea/decelarea unui complex probabil de specii cu ajutorul filogeniei de plastidă, date de secvența nucleară și morfometrie multivariată.

Material și metode

Eșantionarea taxonilor

Planul de eșantionare al taxonilor a vizat includerea a cât mai multor taxoni europeni aparținând secției *Dissitiflori*. Pentru a crea un ‘cadru filogenetic’ mai bun a fost necesară includerea unor specii din Asia (Asia Mică, Caucaz, Asia Centrală). Pentru selectarea taxonilor au fost urmate clasificările lui Podlech (2008, 2011) și a lui Sytin (2009). Au mai fost incluse două specii (*A. reduncus* și *A. subarcuatus*) care aparțin unei secții strâns înrudite cu secț. *Dissitiflori*, cea *Erioceras*. Pentru selectarea outgrupurilor s-au luat în considerare studiile anterioare de filogenie moleculară asupra genului *Astragalus*, cele ale lui Kazempour Osaloo *et al.* (2003, 2005). Conform acestor studii, una din speciile strâns înrudite cu secția *Dissitiflori* este *A. dolichophyllus* Pall. (sect. *Trachycercis*), iar una din speciile înrudite la distanță de secț. *Dissitiflori* o constituie *A. glycyphyllus* L. (sect. *Glycyphyllus*). Datorită accesului la materialul vegetal al ambelor specii, acestea au fost selectate pentru outgroupuri.

Materialul vegetal și extracția ADN-ului

Pentru extracția ADN-ului genomic am folosit atât material provenind din ierbare cât și material proaspăt colectat. În ultimul caz, frunzele au fost uscate și stocate în silicagel până la momentul extragerii. În cazul unei probe de *Astragalus vesicarius* subsp. *pastellianus*, ADN-ul a fost comandat din banca ADN (Botanical Garden, Berlin-Dahlem). Pentru extracția ADN-ului am folosit kitul ZR Plant/Seed DNA Kit (Zymo Research).

Dezvoltarea și selecția markerilor moleculari

Selecția markerilor plastidiali a fost precedată de testarea a cinci regiuni candidate (*ndhF-rpl32*, *rpl32-trnL*, *trnH-psbA*, *accD-psaI* and *petA-psbJ*) folosind amorsele regăsite de la Shaw *et al.* (2007). Amplificarea și secvențarea regiunelor *trnH-psbA*, *accD-psaI* and *petA-psbJ* s-a reușit cu amorsele regăsite din literatură. Amplificarea markerilor *ndhF-rpl32* and *rpl32-trnL* s-a efectuat cu o eficiență foarte scăzută, însă suficientă pentru conceperea unor amorse noi tip *forward* și *reverse* pentru aceste două regiuni. În plus, față de cele cinci regiuni menționate până acum, au mai fost concepute amorse noi specifice familiei *Fabaceae* pentru o porțiune de aprox. 1.5 kb de la sfârșitul 3' a regiunii plastidiale *ycf1* (*hypothetical open reading frame 1*) pe baza secvențelor *ycf1* de *Cicer* L., *Glycine* L., *Medicago* L. and *Phaseolus* L. *ycf1* regăsite în GenBank.

Dintre cele șase regiuni testate *ycf1*, *ndhF-rpl32* și *rpl32-trnL* au părut a fi cele mai variabile, prin urmare ele au fost alese pentru investigații următoare.

În ceea ce privește markerii nucleari, am început să lucrez cu regiunea populară nrITS și am încercat să dezvolt un marker nuclear tip single/low-copy pentru genul *Astragalus*. Acesta a fost regiunea LEAFY (LFY) care s-a demonstrat a fi singly-copy în studii anterioare la diferite grupe de plante (Zimmer and Wen, 2012), și referințele incluse). Trăsătura *single-copy* a markerului LFY a fost testată pentru câteva specii diploide (*A. hispanicus*, *A. varius*, *A. vesicarius* subsp. *albidus*). După primele reacții PCR, secvențări și clonări, a rezultat că acest marker nu este *single-copy* în genul *Astragalus*: trei copii/paraloage au fost identificate în cazul celor trei specii menționate mai sus. Prin urmare, utilizarea acestui marker a fost omisă din investigații următoare.

Au fost analizați markerii plastidiali ADN provenind de la câte un specimen pentru fiecare specie, în timp ce regiunea nrITS a fost eșantionată de la cel puțin două specimene per specie. Datele ADN plastidiale au fost suplimentate cu date ADN nucleare provenind de la specii cu taxonomie incertă sau poziție filogenetică necunoscută (vezi secțiunea Considerații teoretice).

Clonarea și secvențarea

Secvențarea directă a regiunii nrITS a relevat *peak*-uri duble clar vizibile pentru majoritatea probelor sugerând astfel prezența a mai multor tipuri de sevență în individul respectiv. Pentru a detecta variabilitatea intra-individuală a regiunii nrITS, s-a realizat clonarea folosind kitul pGEM-T Vector System I (Promega) pentru ligare și kitul GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) pentru izolarea ADN-ului plazmidial. Regiunea nrITS a fost clonată din 23 probe aparținând a 21 populații (12 taxoni) cu o medie de 7.8 ± 2.5 secvențe clonate per specimen.

Toate secvențările ADN au fost efectuate la MacroGen Inc. (Coreea de Sud).

Analize filogenetice

Alinierea secvențelor ADN

Secvențele *ndhF-rpl32*, *rpl32-trnL* și clonele nrITS au fost exportate direct din cromatograme în fișiere de format FASTA folosind ChromasLite v.2.01 (Technelysium Pty). Fragmentele *ycf1* ale aceleiași probe taxonomice (obținute cu diferite amorese interne de secvențare) au fost asamblate utilizând BioEdit (Hall, 1999).

Secvențele au fost alinate în MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) pe baza algoritmului ClustalW urmat de editări manuale în cazul regiunilor ADN plastidiale. În cazul *ycf1*, pe parcursul corecțiilor manuale ale alinierii, pozițiile codon au fost luate în considerare. Translația pentru aceasta

regiune a fost realizată în MEGA5 folosind codul plastidului plantei și a condus la o aliniere neconținând codoni STOP.

Secvențele nrITS clonate care au prezentat deleții neașteptat de lungi și/sau multe mutații punctiforme au fost clasificate ca pseudogene și excluse din analizele următoare.

Reconstrucția arborilor filogenetici pe baza secvențelor plastidiale

Pentru o mai simplă abordare, matricile plastidiale separate au fost analizate doar pe baza criteriului parcimoniei cu scopul de a înțelege capacitatea de rezolvare a acestor markeri și de a releva posibilele semnalele conflictuale dintre acestea. Prin urmare, topologiile arborilor strict consensus derivate din analiza PM matricilor plastidiale separate au fost în primul rând comparate. Strategia a constat în aplicarea diferitelor metode de reconstrucție (parcimonie maximă (PM), inferență Bayesiană (IB) și maximum likelihood (ML)) doar pentru un set final combinat care exclude speciile cu poziții puternic contrastante între arborii strict consensus a regiunilor plastidiale separate (cu sau fără suport statistic).

MrModeltest v2. (Nylander, 2004) a fost utilizat pentru selectarea modelelor de substituție a nucleotidelor pentru cele trei regiuni ADN folosind criteriul AIC. Analiza Bayesiană a fost făcută pe un set partiționat cu modele de substituție a nucleotidelor date în Tabelul 5, constând în două analize simultane de 10.000.000 generații de Monte Carlo Markov lanțuri, salvând fiecare al 10.000 arbore într-un fișier. Fiecare analiză a folosit 4 lanțuri simultane (unul rece și altele trei încălzite la un parametru de încălzire de 0.2). Phylograma consens Majority Rule de 50% a fost generată în MrBayes folosind 25% ca *burn-in*.

Analiza parcimoniei maxime s-a realizat în *PAUP** și a fost bazată pe căutarea euristică utilizând 1000 de adiții aleatorii de secvențe replicate și cu setările 'tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping' și cu opțiunea 'MULTREES' activă, 'MAXTREES' setată la 50.000 și o limită de 10 arbori reținuți pentru fiecare replică. Caracterele au fost tratate egal iar breșele au fost tratate ca informații lipsă. Suportul statistic al nodurilor arborilor a fost evaluată pe baza metodei Bootstrapp; 1000 pseudo-replici au fost realizate în *PAUP** cu MAXTREES (re-)setată la 1000 și cu reținerea unui arbore per replică.

Analiza maximum likelihood s-a bazat pe RAXML (Stamatakis, 2006) folosind RAXML GUI versiunea 1.2 (Silvestro and Michalak, 2011) utilizând modelul GTR + Γ a evoluției secvențelor.

Toate căutările euristice și analizele Bayesiene au fost realizate pe University of Oslo Bioportal (<https://www.bioportal.uio.no/>). Arborii filogenetici au fost vizualizați și editați în TreeView (Page, 1996), versiunea FigTree 1.3.1 (A. Rambaut; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), MrEnt (Zuccon and Zuccon, 2006) și CorelDRAW X3.

Analiza rețelelor nrITS

Datorită numărului mare de clone și prezenței paraloagelor nrITS divergente în unele probe, s-au abordat prioritar rețelele filogenetice în analiza nrITS înaintea arborilor filogenetici.

Programul Collapse v.1.2 (Posada, 2006) a fost folosit pentru definirea tipurilor unice de secvențe (ribotipuri) în setul nrITS și pentru evaluarea distribuției acestor ribotipuri în și între indivizi. Tipurile unice de ribotipuri definite au fost mai apoi incluse în analiza parcimoniei rețelei.

Analiza *distance network (split graphs)* a fost făcută pentru matricea ribotipurilor cu scopul de a contura posibilele grupări din setul nrITS și pentru a evalua încrederea în grupări folosind Bootstrapping cu 1000 de replicații. Rețeaua filogenetică construită în acest scop a fost bazată pe algoritmul NeighborNet (NN)(Bryant and Moulton, 2004) așa cum a fost implementat în SplitsTree v.4.10 (Huson and Bryant, 2006) folosind distanțe necorectate *pairwise (p)*, excluzând caracterele constante și irelevante (*non-informative*).

Rezultate

Succesul secvențării și alinierea secvențelor

Regiunile plastidiale *ycf1*, *ndhF-rpl32* și *rpl32-trnL*

Amplificarea și secvențarea *ycf1* a fost făcută cu succes în cazul fiecărei (47) specii țintă *Astragalus* plus *Oxytropis pilosa*. Regiunea *ycf1* flancată de amorsele de amplificare a fost complet recuperată prin asamblarea fragmentelor obținute prin secvențarea internă a primerilor care aparțineau aceleași probei taxonomice. Lungimea regiunii asamblate a variat de la 1460 de perechi de baze (*A. argyroides*) la 1517 perechi de baze (*A. zingeri*).

Amplificarea *ndhF-rpl32* și *rpl32-trnL* a eșuat în cazul mai multor, în principal probe de la ierbar, conducând la un număr maxim de 11 secvențe lipsă în cazul *rpl32-trnL*. Caracteristicile secvențelor regiunilor plastidiale și evaluările căutărilor euristice PM sunt prezentate pe scurt în Tabelul 5.

nrITS

Matricea originală nrITS aliniată conținea 181 secvențe, 598 caractere și 56 situri nucleotidice variabile. Programul Collapse a recuperat 54 ribotipuri unice din cele 181 de clone nrITS.

Table 5. Caracteristicile secvențelor și evaluarea căutărilor euristice a setului de plastid

	ycf1	ndhF-rpl32	rpl32-trnL	combinat
lungimea secvenței	1460–1517	630–704	738–809	–
lungimea alinierii	1553	803	915	3271
nr. de secvențe lipsă	0	7	11	18
nr. de situri variabile	128	51	45	159
nr. de situri informative parcimonice	45	11	9	65
nr. arborilor cei mai parcimonioși	–	–	–	27559
lungimea arborelui	–	–	–	276
CI	–	–	–	0.8696
RI	–	–	–	0.9130
modelul evolutiv al secvențelor (sub AIC)	GTR+G+I	GTR	GTR	GTR+G+I/GTR/GTR

Reconstrucția arborilor filogenetici bazată pe secvențele plastidiale

Căutarea euristică a setului de date plastidiale combinat și complet, conform criteriului parcimoniei a furnizat 27559 arbori egali parcimonie cu 276 pași în lungime. Cladele A și B (revelate deja de analizele anterioare a matricilor de date separate) au fost recuperate cu un procentaj Bootstrap mare (87% și respectiv 96%). Includerea/excluderea *A. medius*, *A. reduncus* și *A. ucrainicus* în clada A nu a fost consistentă pe parcursul analizelor parcimonice a datelor plastidiale separate. Pentru acest arbore, totuși, aceste specii sunt ferm excluse din foarte bine confirmata cladă A. Cladele A și B împreună cu o a treia cladă (cuprinzând *A. fissuralis*, *A. subuliformis* și *A. ucrainicus*) plus trei specii adiționale (*A. balkaricus*, *A. medius* și *A. reduncus*) aparțin unei politomii bazele nesuținute statistic. Această politomie este soră cu *A. argyroides* care însăși se ramifică după *A. dolichophyllus* și prin urmare *A. argyroides* constituie prima genealogie divergentă a speciei *Dissitiflora*. Clada A se ramifică în mai multe subclade unele dintre ele fiind denumite într-o manieră succesivă (de exemplu cladele A, A1, A1.1). Clada B nu fost rezolvată la fel de bine precum clada A.

În ambele clade A și B există numeroase relații surprinzătoare ce merită a fi menționate. *Astragalus subarcuatus* (clasificată tradițional în sect. *Erioceras*) a fost dedusă cu o încredere statistică înaltă (BS=94%) ca soră cu *A. temirensis*. Alt taxon *Erioceras* (*A. reduncus*) este parte a anterior menționatei politomii bazale.

Cea mai surprinzătoare relație din clada B constă în relația de înrudire puternic susținută (BS=91) a celor două specii (fiind egal cu clada B1).

Examinarea atentă a cladelor (și a distribuției speciilor) a dus la recunoașterea faptului că cladele A, B și B1 indică a largă structură geografică: clada A are o distribuție predominant Est Europeană ('clada estică') în timp ce clada B (excluzând clada B1) are o distribuție majoritar Mediterraneană ('cladă sud-vestică'), iar clada B1 este clar limitată la Europa de Est și Asia.

Topologia filogramei consens derivată din analiza Bayesiană este larg congruentă cu cea a arborelui PM strict consensus. Cladele A, B și B1 sunt puternic consistente în ceea ce privește arborii parcimoniei și analizei Bayesiene din punctul de vedere al conținutului speciei și a suportului statistic al înrudirilor intrinseci. Ramura lungă a arborelui Bayesian ce o duce la politomia cladei B is este evident mult mai lungă față de restul ramificațiilor interne ale arborelui.

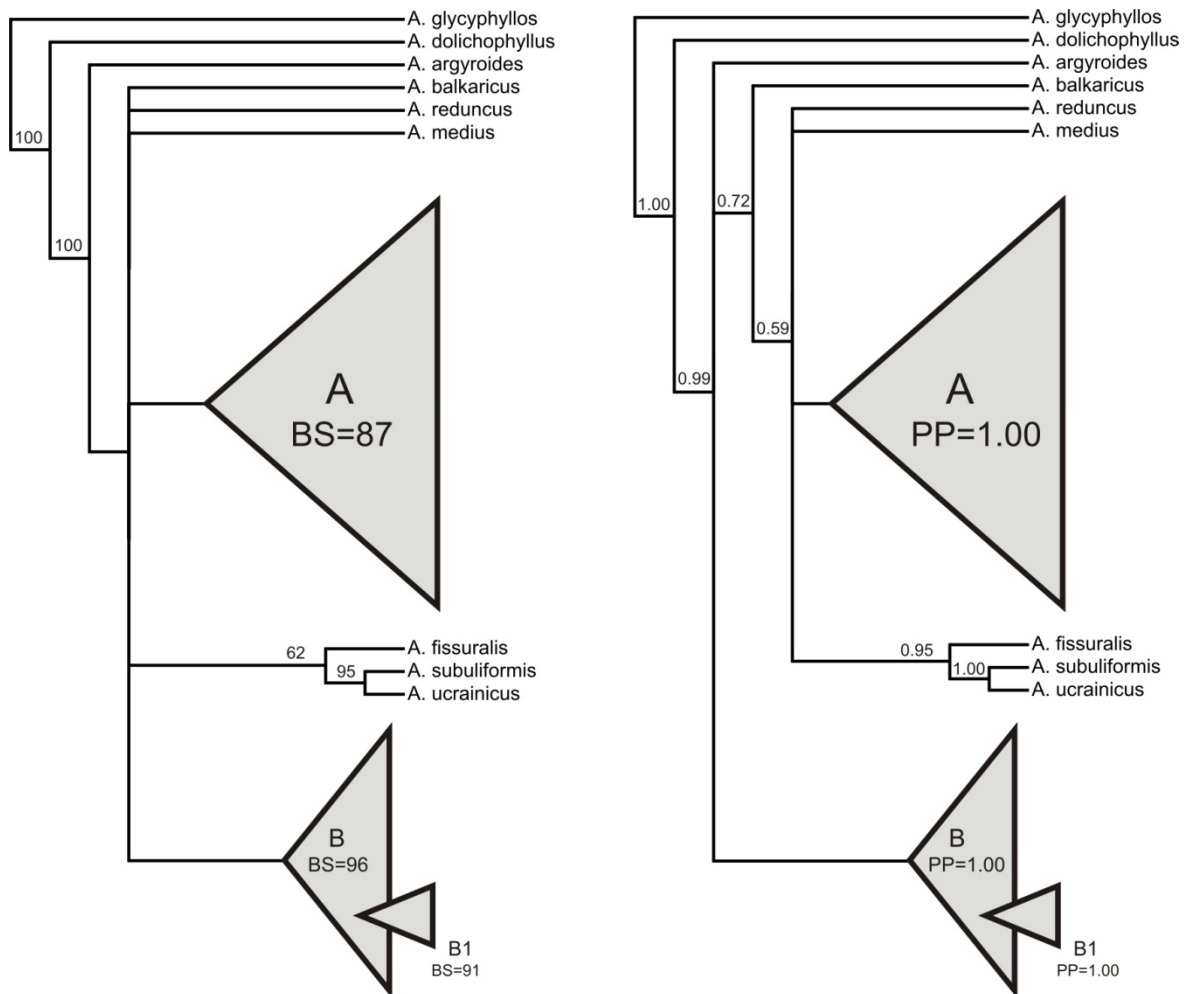


Fig. 9. Compararea schematică a topologiilor parcimoniei maxime și a celei Bayesiene. Numerele adiacente ramurilor/cladelor reprezintă procentajul Bootstrap și valorile probabilității posterioare Bayesiane. Speciile cuprinse și înrudirile dintre acestea în cadrul cladelor A, B și B1 sunt prezentate în amănunt în teza de doctorat ele fiind confidentiale.

Network analysis of nrITS sequences

Analiza NeighborNet a ribotipurilor (Fig. 13) a indicat o evoluție 'non-tree-like' a secvențelor indicând că procese evoluționare mai complexe au acționat. Șapte grupuri pot fi separate în rețea (denumite de la A la G), care corespund cu grupările delimitate în rețeaua TCS. Astfel, conținutul secvențelor grupărilor din rețelele TCS și NeighborNet au corespuns.

Valorile Bootstrap au fost mari (BS=89-100%) pentru cinci din cele 7 grupuri și joase pentru grupurile de ribotipuri E (BS=64%) și (BS=66%).

Grupul A a fost cel mai segregat din punct de vedere topologic în graficele split NeighborNet și cel mai susținut din punct de vedere statistic (BS=100%) dintre toate grupările.

Secvențele nrITS obținute de la *A. asper*, *A. ucrainicus* și *A. vesicarius* au aparținut fiecare unui singur grup de ribotip (C, G, și respectiv E), în timp ce secvențele celorlalte 5 specii s-au

grupat în 2-4 grupuri diferite. *Astragalus peterfii* conține cel mai mare număr de grupuri de ribotipuri identificate; cu toate acestea, un număr incomparabil mai mare de clone a fost secvențat în cazul acestei specii.

Numărul speciilor diferite care au în comun un grup de ribotip au variat de la două la patru. Secvențele din grupurile de ribotipuri C și F au aparținut exclusiv unei specii (*A. asper*, și respectiv *A. varius*) în timp ce restul grupurilor de ribotip au fost comune pentru specii diferite. Interesant de menționat, este că grupurile A și B sunt grupurile de ribotip dominante a *A. pallescens*, *A. peterfii* și *A. pseudoglaucus*.

Frecvența secvențelor nrITS aparținând unui grup dat de ribotip în cadrul speciei a indicat diferențe considerabile. Unele grupuri au fost mai caracteristice pentru anumite specii prin includerea mai multor secvențe din specia respectivă, de exemplu grupul de ribotip E cuprinde secvențele recuperate în special de la *A. vesicarius* (grupul de ribotip 'specific vesicarius').

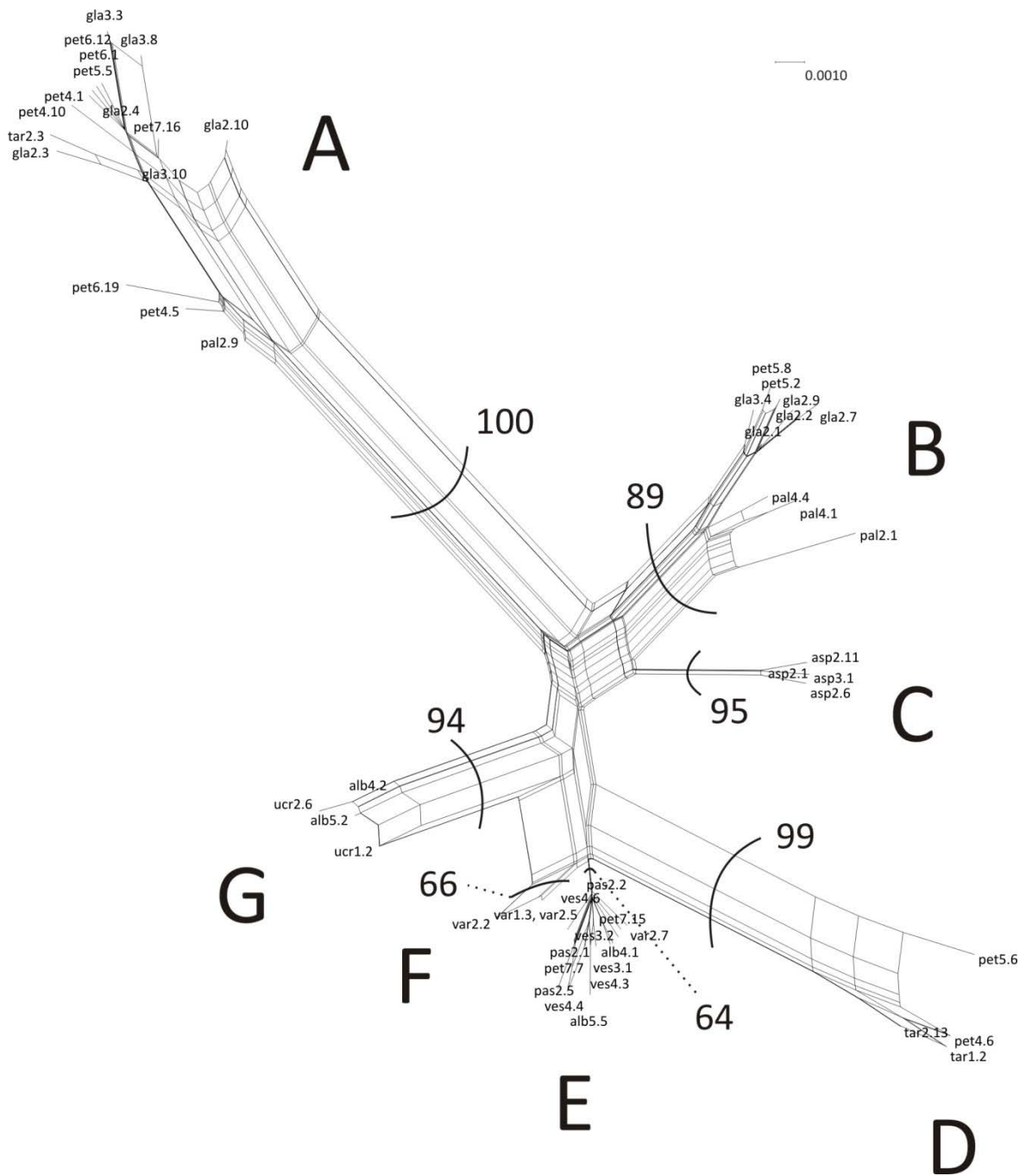


Fig. 13. Rețeaua filogenetică bazată pe analiza NeighborNet a ribotipurilor. Secvențele au fost grupate pe baza similarității genetice și sunt redată cu majuscule de la A la G. Valorile reprezintă procentajele Bootstrap a 1000 replicații Bootstrap.

Discuții

Filogenia speciilor *Astragalus* aparținând secției *Dissitiflori* din Europa: implicații biogeografice și estimarea diversificării de-a lungul timpului

Prima ipoteză filogenetică plastidială pentru speciile Europene ale genului *Astragalus* sect. *Dissitiflori* s-a bazat pe o eșantionare comprehensivă și a relevat mai multe aspecte neașteptate ale diversificării acestui grup. Structura geografică largă dezvăluită pentru cladele A, B și B1 a indicat trei mari *patternuri* biogeografice pentru această secție: o distribuție majoră Est europeană și asiatică reprezentată de clada A, o distribuție majoritar mediteraneană (care se extinde până în Europa Central-Vestică și în Caucaz) reprezentată de clada B (exclzând clada B1) și o minoră ramificație a cladei B (clada B1) reprezentând distribuția Est europeană și asiatică a celor două specii surori. Inițial a fost tentantă avansarea ipotezei unei diversificării mai timpurii pentru clada A spre deosebire de clada B, și a unei diversificării mai rapide a cladei B comparate cu clada A. Argumentele acestei ipoteze sunt următoarele: rezoluția mai mare (cu înrudiri mai puternic susținute) a cladei A comparate cu politomia nerezolvată a cladei B și ramura lungă ducând la clada B comparată cu ramurile interne scurte ale cladei A (reflectate de ex. de filograma maximum likelihood a secvențelor plastidiale).

Politomiile (lipsa rezoluției) arborilor filogenetici (în special la noduri adânci) sunt în general privite drept consecințe a speciației rapide, utilizarea markerilor inadecvați (insuficient variabili) sau conflicte de caractere date de speciația multifurcată (Riggins and Seigler, 2012). În cazul cladei B, speciația multifurcată este exclusă deoarece markerii plastidiali aparțin aceluiași grup de *linkage* și este foarte posibil să împărtășească aceeași istorie filogenetică. Combinația a trei markeri plastidiali folosiți a fost eficientă pentru o cladă (A) dar nepotrivită pentru cealaltă cladă (B) a unui moderat de mare grup taxonomic. Aceasta implică o mai rapidă speciație a speciilor din clada B comparată cu speciile din clada A sau eterogenitatea în rata de substituție a nucleotidelor specifică cladelor, un fenomen întâlnit la plante (Weng *et al.*, 2012). Caracteristica în general mai puțin rezolvată a cladei B se datorează de fapt divergenței (variației) secvențelor din această cladă, fapt confirmat de asemenea de analiza *pairwise* a distanțelor între secvențe. Distanțele *pairwise* – calculate în Mega 5.0 cu modelul *Maximum Composite Likelihood* – au variat între 0.001–0.005 (medie generală 0.003) în cazul cladei B, pe când în cazul cladei A această valoare s-a înscris între 0.001–0.012 (media generală 0.005).

În final, un cadru temporal mai restrâns în care clada B e posibil să se fi divergat nu a fost confirmat de analiza ceasului molecular. Conform uneia dintre cronogramele rezultate diversificarea ambelor clade a avut loc în Pleistocen. În cadrul cladei B vârsta cea mai tânără

(*crown*) a fost dată cladei B1 (aproximativ 500.000 ani), în concordanță cu ipotetizata ramificare 'secundară' a cladei B conform diversificării a două specii din Europa de Est/Asia.

Statutul non-monofiletic al secțiilor *Dissitiflora* și *Erioceras*

Ambele specii ale sect. *Erioceras*, selectate inițial pentru outgroup, sunt înserate în sect. *Dissitiflora* determinând caracterul non-monofiletic (parafiletic) al celei din urmă. *Astragalus subarcuatus* este profund înserată în clada A și a fost rezolvată cu un mare suport statistic (MP BS=94%, BI PP=1.00, ML BS=98%) ca soră a *A. temirensis*, în timp ce *A. reduncuse* este printre cele mai devreme derivate specii a filogeniilor plastidiale, ramificate mai târziu decât specii *Dissitiflora* (e.g. *A. argyroides* și *A. balkaricus*) pe baza filogramei maximum likelihood. Cu scopul de a obține monofilia sect. *Dissitiflora*, ambele specii trebuie transferate în această secție. Dar investigații mai comprehensive sunt necesare pentru delimitarea acestor secții înainte de a se realiza redefinirea lor. Mai multe specii din centrul de diversificare a secției *Dissitiflora* trebuie incluse și secția *Erioceras* trebuie de asemenea eșantionată mai detaliat.

În cazul unei eventuale redefiniri a sect. *Dissitiflora*, trebuie luată în considerare diferitele alternative ce conduc la o secție mai larg vs. mai restrâns definită. O abordarea mai largă ar implica includerea speciilor de *Erioceras* taxa, în timp ce divizarea secției recunoscute actual în secții/subsecții ar implica asociații taxonomice, de exemplu foarte compactei clade B. Urmând monofilia, diagnosticabilitatea morfologică este un important criteriu auxiliar pentru clasificarea grupurilor (Chatrou *et al.*, 2012). Astfel până la identificarea unui caracter morfologic sau unei combinații de caractere care să susțină această cladă, orice încercări de a-i acorda un poziție taxonomică cladei B nu are fundament. Pe de altă parte, deciziile taxonomice nu ar trebui luate exclusiv pe baza filogeniilor plastidiale. Crearea unei filogenii fundamentale bazate pe cel puțin un marker nuclear *low-copy* este foarte recomandată.

Urmărirea unor caractere morfologice pe clada B nu a dus la recunoașterea a cel puțin unui caracter constant care să poată servi ca sinapomorfie pentru această cladă în comparațiile membrilor cu, de exemplu speciile cladei A. Ca un pas următor, astfel de caractere adiționale (calitative) morfo-anatomice, care sunt considerate a nu fi influențate de factorii ambientali, ar trebui investigate. Micromorfologia polenului întrunește acest criteriu și este recomandat în studiul comparativ al speciilor cuprinse în cladele A și B.



Fig. 17. Fotografii a foliolelor speciilor selectate a sect. *Erioceras* (1 - *A. reduncus*; 2 - *A. subarcuatus*) și sect. *Dissitiflori* (3 - *A. temirensis*; 4 - *A. pseudoglaucus*; 5 - *A. vesicarius*; și *A. peterfii*) pentru a evidenția diferențele de caractere în indumentum dintre cele două secții.

Speciație reticulată și evoluția incompletă conjugată a nrITS-ului în *Astragalus* secția *Dissitiflori*

În ciuda contribuțiilor majore în filogenia *Astragalus* și genului soră *Oxytropis*, bazată parțial sau total pe nrITS, studiile (Wojciechowski *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2003; Kazempour Osaloo *et al.*, 2003, 2005; Wojciechowski, 2005; Kazemi *et al.*, 2009; Archambault and Strömvik, 2012), nu raportează clonarea acestui marker. Astfel, prezentul studiu poate fi considerat ca prima lucrare ce prezintă paralogie serioasă a regiunii nrITS într-un grup *Astragalus* folosind clonare extensivă. Scherson *et al.* (2005) a investigat noi regiuni nucleare pentru reconstrucția filogeniei la nivele taxonomice joase în *Astragalus* din Lumea Nouă. Au confirmat prin clonare, prezența unor diferite copii a două regiuni nucleare (ARG10 și FENR) și SNPs în locusul nuclear tRALS în unele specii *Astragalus* din America. Acest tipar a fost interpretat totuși, ca o consecință a

evenimentelor de duplicație, și prezența alelor la regiunile date, fără semnificație filogenetică. Prin urmare, interpretarea noastră a prezenței paralogiei în nrITS în *Astragalus* este prima care ia în considerare reticulația ca o posibilă sursă a paralogiei. Mai mult, structura reticulată a nrITS în poliploidii *A. pallescens* ($2n=32$ (Philippov *et al.*, 2008)), *A. peterfii* ($2n=64$ (Ledingham and Rever, 1963)) și *A. pseudoglaucus* ($2n=64$ (Pavlova and Kozhuharov (1993), under *A. glaucus*)) este sugestivă pentru originea lor alopoliploidă. Astfel, alopoliploidia la *Astragalus* este pentru prima dată avansată ca ipoteză bazată pe informațiile moleculare.

Structura reticulată a setului de date nrITS sugerează puternic că procesele evoluționare diferite de ramificații dihotoamice au avut loc în secția *Dissitiflori*. Persistența simultană a grupurilor dominante de ribotipuri A și B într-un singur genom indică evoluția incomplet conjugată (Campbell *et al.*, 1997) a nrITS. Copiile A și B pot persista în posibilitățile parentale sau în descendenții lor formând un grup unic de ribotip (un singur grup per specie, conform conceptului actual). Evoluția întârziată sau incomplet conjugată a fost îndelung cunoscută la alte grupuri de plante (ambele cu diploide sau poliploide). Exemple clasice ale evoluției incomplet conjugate în ceea ce privește ADN ribozomal nuclear includ *Amelanchier* (Campbell *et al.*, 1997), *Arabidopsis suecica* (O'Kane *et al.*, 1996), *Brassica napus* (Bennett and Smith, 1991), *Paeonia* (Sang *et al.*, 1995) dar noi cazuri sunt în continuare descoperite și se pare că omogenizarea incompletă a nrITS este regula mai curând decât excepția (Liu *et al.*, 2006). Factori precum prezența *array*-urilor diferite de nrITS la diferiți cromozomi (de exemplu datorită alopoliploidiei), reproducerea asexuată, și habitatul peren (Sang *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1997) pot promova susținerea polimorfismului nrITS (de exemplu prin mitigarea *crossing over*-ului (Hillis *et al.*, 1991)).

Originea și înruderile la *A. peterfii*

Rezultatele prezentului studiu sugerează o origine alopoliploidă a *Astragalus peterfii* datorită prezenței a patru grupuri de ribotipuri distincte nrITS în genomul acestei specii octoploide care este slab compatibil cu o origine exclusiv autopoliploidă. În ceea ce privește înruderile moleculare filogenetice, filogenia plastidială a plasat *A. peterfii* cu *A. pallescens* și *A. tarchankuticus*. Din aceste două specii, totuși, doar *A. pallescens* împărtășește grupurile dominante de ribotipuri nrITS (tip A și B) cu *A. peterfii*, și mai mult, cu un aparent similar raport. Analiza multiplă discriminantă a 14 caractere cantitative morfologice ale plantelor colectate de pe teren, totuși, a relevat suprapunere substanțială morfologică între *A. peterfii* și *A. pallescens*, și o distincție completă între *A. peterfii* și *A. pseudoglaucus*, și *A. peterfii* vs. *A. tarchankuticus*. Considerând cele trei tipuri de informații date mai sus, se poate concluziona că din setul de taxoni studiați, *A. pallescens* este cea mai apropiată rudă a *A. peterfii*. Pentru crearea unei ipoteze mai puternice pentru înruderile filogenetice a *A. peterfii* este necesară folosirea genelor nucleare

low-copy, care sunt mai puțin susceptibile de a avea o evoluție conjugată (Zimmer *et al.*, 1980; Hillis *et al.*, 1991).

Implicații taxonomice pentru specii selectate din sect. *Dissitiflori*

Distribuția grupurilor de ribotipuri specifice în cadrul speciilor, în legătură cu filogenia plastidială și informațiile derivate din analiza morfometriei multivariate, permit formularea unor concluzii asupra taxonomiei acelor specii pentru care incertitudinile taxonomice au fost evidențiate în capitolul Introducere. De exemplu, toate secvențele nrITS a *A. vesicarius* aparțin grupului de ribotipuri E, secvențele nrITS a *A. pseudoglaucus* și *A. pallescens* sunt regăsite în principal în cadrul grupurilor A și B, ultimele două specii diferă în ceea ce privește plasarea în filogenia plastidială și sunt degredate prin analiza morfometrică multivariată.

Sinonimizarea speciei *A. peterfii* cu taxonul *A. vesicarius* subsp. *pastellianus* este nu este susținută nici de plastidă, nici de secvențele de nrITS. Aceasta, totuși, nu infirmă faptul că *A. vesicarius* a putut contribui la formarea speciei de interes deoarece grupul de ribotipuri E (într-o mică măsură) a fost recuperat de asemenea de la *A. peterfii*.

Situația este oarecum similară în cazul taxonilor *A. pseudoglaucus* și *A. tarchankuticus*. *A. pseudoglaucus* a fost sinonimizat cu *A. vesicarius* de Ciocârlan și Sârbu (2001) și Podlech (2011). După părerea mea, includerea taxonului *A. pseudoglaucus* în *A. vesicarius* este înșelătoare și infirmată de secvențele nrITS. Cu toate acestea, *A. vesicarius* poate fi implicată în formarea speciei având rolul de donor de plastid ADN. Diferența semnificativă între *A. pseudoglaucus* și *A. vesicarius* cu privire la structura nrITS și poziția filogenetică este compensată de suprapunerea lor în morfologie care susține diversitatea genetică ascunsă în acest grup taxonomic.

Independența taxonomică a taxonului *A. tarchankuticus* este de asemenea sprijinită în ceea ce privește *A. albicualis* cu care a fost sinonimizat (Podlech, 2011). Cele două probe de *A. tarchankuticus* au o secvență nrITS clonată în grupul de ribotipuri E și au majoritatea secvențelor nrITS în grupul G. Contrar acesteia, secvențele nrITS ale celor două probe *A. tarchankuticus* sunt grupate majoritar în grupurile A și D într-un raport similar.

O altă consecință a diferențierii grupurilor de ribotipuri este confirmarea moleculară a complexului de specii din secția *Dissitiflori*, format din *A. pallescens*, *A. peterfii*, *A. pseudoglaucus*, și *A. tarchankuticus*. Toate aceste specii au grupul de ribotipuri A ca presupus 'miez' al *array*-urilor nrITS și sunt cunoscute ca poliploizi cu excepția *A. tarchankuticus*.

Importanța utilizării combinate ale secvențelor *ycf1*, *ndhF-rpl32* și *rpl32-trnL* în filogenia speciilor de *Astragalus*

În prezentul studiu, regiunile plastidiale *ycf1*, *ndhF-rpl32* și *rpl32-trnL* au fost folosite la filogenia *Astragalus* pentru prima dată. Scopul principal al folosirii acestor markeri a fost inferența relațiilor de înrudire exclusiv la nivele taxonomice reduse (de exemplu la nivel intrasecție). Prin urmare, variabilitatea lor este greu comparabilă cu cea a markerilor plastidiali deja folosiți la nivele taxonomice mai înalte (de exemplu la nivele generice ori inter-secționale) în filogenia *Astragalus*: *trnL* intron (Wojciechowski *et al.*, 1999), *ndhF* gene (Kazempour Osaloo *et al.*, 2003), *trnL-F* region (Kazemi *et al.*, 2009). Comparația recent realizată de Dong *et al.* (2012) între 23 de regiuni plastidiale (printre altele, *ycf1* și *rpl32-trnL*, dar omițând *ndhF-rpl32*) a determinat *ycf1* ca cel mai variabil, urmat de *trnK* și *rpl32-trnL*, confirmând astfel potențialul acestor regiuni în inferența filogenetică la plante.

În ciuda faptului că *ycf1+ndhF-rpl32+rpl32-trnL* nu au putut decela speciile clar divergente precum *A. tarchankuticus* de *A. peterfii*, au fost suficient de variabili pentru a delimita o serie de clade bine susținute din secția *Dissitiflori* (vezi capitolul Rezultate) și chiar în complexul recunoscut de specii. În opinia noastră, cele trei regiuni plastidiale folosite în acest studiu prezintă potențial pentru studii filogenetice în *Astragalus*, cum ar fi delimitările secțiilor.

Concluzii

- Analiza filogenetică combinată a trei regiuni plastidiale eşantionate în speciile europene de *Astragalus* aparținând secției *Dissitiflori* a furnizat o rezoluție suficientă pentru deducerea concluziilor ferme referitoare la diversificarea acestui grup taxonomic în Europa.
- Trăsătura cea mai importantă a filogeniei o constituie o ramificație evolutivă ancestrală rezultând în două clade principale (A și B). Apartenența speciilor la cladele A, B și B1 este congruentă cu distribuția lor geografică: clada A reflectă înrudirea unor specii distribuite mai mult în Europa de Est și Asia; clada B (exclusiv clada B1) reprezintă înrudirea unor specii de distribuție predominant mediteraneeană, în timp ce clada B1 (a ramificație secundară a cladei B) reprezintă înrudirea surprinzătoare a două specii, ambele cu o distribuție contrastă de Europa de Est și Asia.
- Incongruența între filogenia plastidială și poziția filogenetică a speciilor aparținând taxonului *A. vesicarius* s.l. pe arborele filogenetic bazat pe secvențe nrITS sugerează că cladele A și B au interacționat în trecut sub forma hibridării.
- Secția *Dissitiflori* nu e monofiletică pentru că cele două specii incluse din secț. *Erioceras* sunt înserate în filogenia secției *Dissitiflori*.
- Structura reticulată a markerului nrITS într-un grup de specii poliploide cu istorie controversată a nomenclurii lor (*A. peterfii*, *A. pallescens*, *A. pseudoglaucus*, *A. tarchankuticus*) susține originea lor aloploidă. Structura reticulată a markerului nrITS a fost dezvăluită pentru prima dată la genul *Astragalus* în cadrul acestei teze de doctorat, iar paralogia unui marker nuclear a fost explicată prin hibridare din trecut pentru prima dată aici.
- Diferențierea grupelor ribotipurilor în combinație cu filogenia de plastidă și analiza multivariată a caracterelor morfologice s-au dovedit în combinație a fi o unealtă utilă în justificarea independenței taxonomice a unor specii cu statut taxonomic incert în secția *Dissitiflori* a genului *Astragalus*.

Referințe

- Alfaro, M. E., and Holder, M. T. 2006. The posterior and the prior in Bayesian phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. **37**: 19-42.
- Álvarez, I., and Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **29**(3): 417-434.
- Archambault, A., and Strömvik, M. V. 2012. Evolutionary relationships in *Oxytropis* species, as estimated from the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences point to multiple expansions into the Arctic. *Botany*.
- Bădărău, A. S., Dezsi, Ș., and Comes, O. 2000. Cercetări biogeografice asupra speciilor stepice-silvostepice de *Astragalus* L. din Depresiunea Transilvaniei (I) [A biogeographical study upon the steppe and steppe-woodland species of *Astragalus* L. from the Transylvanian Depression (I)]. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Series Geografica*. **45**: 117-130.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **1**(1): 3-16.
- Bennett, K. D., Tzedakis, P. C., and Willis, K. J. 1991. Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography*. **18**: 103-115.
- Bennett, R. I., and Smith, A. G. 1991. Use of a genomic clone for ribosomal RNA from *Brassica oleracea* in RFLP analysis of *Brassica* species. *Plant Molecular Biology*. **16**(4): 685-688.
- Borissova, A. 1951. Astragali et Tragachantae Tauriae. *Botanicheskie Materialy Gerbariya Botanicheskogo Instituti Imeni V L Komarova Akademii Nauk SSSR*. **14**: 213-228.
- Borza, T. 1998. Genetic polymorphism of some rare or endemic plants., Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj Napoca, Romania.
- Borza, T., Dragoș, N., and Clejan, A. 1994. Considerations on some species of *Astragalus* L. genus as revealed by electrophoretic study of seed storage proteins. *Contribuții Botanice*. **97**: 102.
- Bryant, D., and Moulton, V. 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*. **21**(2): 255-265.
- Bunge, A. 1868. Generis Astragali species Gerontogae. Pars prior. Claves diagnosticae. *Mémoires de l'Académie impériale des sciences de St Petersburg*. **11**(16): 1-140.
- Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobeš, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J. R. S., and Koch, M. A. 2008. Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution*. **282**(3-4): 257-280.
- Campbell, C. S., Wojciechowski, M. F., Baldwin, B. G., Alice, L. A., and Donoghue, M. J. 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Molecular Biology and Evolution*. **14**(1): 81-90.
- Chase, M. W., De Bruijn, A. Y., Cox, A. V., Reeves, G., Rudall, P. J., Johnson, M. A. T., and Eguiarte, L. E. 2000. Phylogenetics of Asphodelaceae (Asparagales): an analysis of plastid *rbcl* and *trnL-F* DNA sequences. *Annals of Botany*. **86**(5): 935-951.
- Chase, M. W., Williams, N. H., de Faria, A. D., Neubig, K. M., Amaral, M. d. C. E., and Whitten, W. M. 2009. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany*. **104**(3): 387-402.
- Chater, A. O. 1968. *Astragalus* L. In *Flora Europaea*. Edited by Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., Walters, S. M., and Webb, D. A. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 108-124.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H. J., Couvreur, T. L. P., Neubig, K. M., Abbott, J. R., Mols, J. B., Maas, J. W., Saunders, R. M. K., and Chase, M. W. 2012. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **169**(1): 5-40.
- Ciocârlan, V. 2009. Flora ilustrată a României: Pteridophyta et Spermatophyta [Illustrated Flora of Romania: Pteridophytes and Spermatophytes]. Editura Ceres, București.
- Ciocârlan, V., and Sârbu, I. 2001. Taxonomia, variabilitatea și răspândirea unor specii de *Astragalus* L. în Flora României. [Taxonomy, variability, and distribution of certain *Astragalus* L. species in the Flora of Romania]. *Buletinul Grădinii Botanice Iași*. **10**: 59-61.
- Clement, M., Posada, D., and Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. **9**: 1657-1659.
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., and Zhou, S. 2012. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS ONE*. **7**(4): e35071.
- Downie, S. R., Katz-Downie, D. S., and Watson, M. F. 2000. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA *rpl16* and *rpoC1* intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany*. **87**(2): 273-292.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Rauscher, J. T., and Brown, A. H. D. 2004. Diploid and polyploid reticulate evolution throughout the history of the perennial soybeans (*Glycine* subgenus *Glycine*). *New Phytologist*. **161**(1): 121-132.

- Drew, B. T., and Sytsma, K. J. 2011. Testing the monophyly and placement of *Lepechinia* in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *Systematic Botany*. **36**(4): 1038-1049.
- Drummond, A. J., and Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. **7**: 214-222.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., and Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G., and Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*. **10**(3): 315-319.
- Ghahremani-Nejad, F. 2004. The sections of *Astragalus* L. with bifurcating hairs in Iran. *Turkish Journal of Botany*. **28**: 101-117.
- Goncharov, N. F., Borisova, A. G., Gorshkova, S. G., Popov, M. G., and Vasilchenko, I. T. 1946. *Astragalus*. In Flora of the U.S.S.R. Edited by Komarov, V. L., and Shishkin, B. K. Izdatel'stvo Akademii Nauk S.S.S.R., Moscow, Leningrad. pp. 1-918. [Translated from Russian by Israel Prog. Sci. Trans., Jerusalem, 1965.].
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York.
- Gurushidze, M., Fritsch, R. M., and Blattner, F. R. 2010. Species-level phylogeny of *Allium* subgenus *Melanocrommyum*: Incomplete lineage sorting, hybridization and trnF gene duplication. *Taxon*. **59**(3): 829-840.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41**: 95-98.
- Hewitt, G. H. 2000. The genetic legacy of quaternary ice ages. *Nature*. **405**: 907-913.
- Hillis, D., Moritz, C., Porter, C., and Baker, R. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science*. **251**(4991): 308-310.
- Huson, D. H., and Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. **23**: 254-267.
- Javanmardi, F., Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A., and Nejdassatirai, T. 2012. Molecular phylogeny of *Astragalus* section *Alopecuroidei* (Fabaceae) and its allies based on nrDNA ITS and three cpDNAs, matK, trnT-trnY and trnH-psbA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*. **45**: 171-178.
- Jávorka, S. 1916. *Astragalus peterfii* Jáv. spec. nova. *Schedae ad Flora Hungaricae Exsiccatae*. **4**: 38-40.
- Jorgensen, J. L., Stehlik, I., Brochmann, C., and Conti, E. 2003. Implications of ITS sequences and RAPD markers for the taxonomy and biogeography of the *Oxytropis campestris* and *O. arctica* (Fabaceae) complexes in Alaska. *American Journal of Botany*. **90**(10): 1470-1480.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., and Donoghue, M. J. 2008. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Kazemi, M., Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A., and Pouyani, E. R. 2009. Molecular phylogeny of selected Old World *Astragalus* (Fabaceae): incongruence among chloroplast *trnL-F*, *ndhF* and nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Nordic Journal of Botany*. **27**(5): 425-436.
- Kazempour Osaloo, S., Maassoumi, A. A., and Murakami, N. 2003. Molecular systematics of the genus *Astragalus* L. (Fabaceae): Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers and chloroplast gene *ndhF* sequences. *Plant Systematics and Evolution*. **242**: 1-32.
- . 2005. Molecular systematics of the Old World *Astragalus* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequence data. *Brittonia*. **57**(4): 367-381.
- Kolarčík, V., Zozomová-Lihová, J., and Mártonfi, P. 2010. Systematics and evolutionary history of the Asterotricha group of the genus *Onosma* (Boraginaceae) in central and southern Europe inferred from AFLP and nrDNA ITS data. *Plant Systematics and Evolution*. **290**(1): 21-45.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., and Wojciechowski, M. F. 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*. **54**(4): 575-594.
- Ledingham, G. F. 1960. Chromosome numbers in *Astragalus* and *Oxytropis*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. **2**(2): 119-128.
- Ledingham, G. F., and Rever, B. M. 1963. Chromosome numbers of some Southwest Asian species of *Astragalus* and *Oxytropis* (Leguminosae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. **5**(1): 18-32.
- Liston, A. 1992. Isozyme systematics of *Astragalus* L. sect. *Leptocarpus* subsect. *Californici* (Fabaceae). *Systematic Botany*. **17**(3): 367-379.
- Liu, Q., Ge, S., Tang, H., Zhang, X., Zhu, G., and Lu, B.-R. 2006. Phylogenetic relationships in *Elymus* (Poaceae: Triticeae) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* sequences. *New Phytologist*. **170**(2): 411-420.
- Lock, J. M., and Schrire, B. D. 2005. Galegeae. In Legumes of the World. Edited by Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., and Lock, M. Kew, Richmond, Surrey. pp. 475-487.
- Májovský, J., Uhríková, A., Javorčíková, D., Mičieta, K., Králik, E., Dúbravcová, Z., Feráková, V., Murín, A., Černušáková, D., Hindáková, M., Schwarzová, T., and Záborský, J. 2000. Prvý doplnok karyotaxonomického prehľadu flóry Slovenska [Karyotaxonomical review of the flora of Slovakia]. *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae, Botanica*. **Suppl. 1**: 1-127.
- Masoud, S., Zarre, S., and Ismeilzadeh, J. 2009. New chromosome number reports in tragacanthic *Astragalus* species. *Caryologia*. **62**(1): 30-36.
- Neubig, K., Whitten, W., Carlsward, B., Blanco, M., Endara, L., Williams, N., and Moore, M. 2008. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK*. *Plant Systematics and Evolution*. **277**(1): 75-84.

- Neubig, K. M., Whitten, W. M., Williams, N. H., Blanco, M. A., Endara, L., Burleigh, J. G., Silvera, K., Cushman, J. C., and Chase, M. W. 2012. Generic recircumscriptions of *Oncidiinae* (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **168**(2): 117-146.
- Nieto Feliner, G., and Roselló, J. A. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **44**(2): 911-919.
- Nylander, J. A. A. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. In.
- O'Kane, S., Schaal, B., and Al-Shehbaz, I. 1996. The origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as indicated by nuclear rDNA sequences. *Systematic Botany*. **21**(4): 559-566.
- Page, R. D. M. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. **12**(4): 357-358.
- Pânzaru, P. 2006. Note sistematice e distributive relative a *Astragalus pastellianus* Pollini e a *A. peterfii* Jáv. (Leguminosae) [Taxonomic and distributive notes on *Astragalus pastellianus* Pollini and *A. peterfii* Jáv. (Leguminosae)]. *Bollettino del Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino*. **23**: 721-727.
- Parks, M., Cronn, R., and Liston, A. 2009. Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels using massively parallel sequencing of chloroplast genomes. *BMC Biology*. **7**(1): 84.
- Pavlova, D., and Kozhuharov, S. 1993. Chromosome numbers of Bulgarian angiosperms. *Fitologija*. **44**: 75-76.
- Philippov, E. G., Kulikov, P. V., and Knjasev, M. S. 2008. Chisla khromosom vidov *Astragalus* i *Hedysarum* (Fabaceae) flory Rossii [Chromosome numbers of *Astragalus* and *Hedysarum* species of the Russian flora]. *Botanicheskij Zhurnal*. **93**(10): 1614-1619.
- Pirie, M. D., Vargas, M. P. B., Botermans, M., Bakker, F. T., and Chatrou, L. W. 2007. Ancient paralogy in the cpDNA *trnL-F* region in Annonaceae: implications for plant molecular systematics. *American Journal of Botany*. **94**(6): 1003-1016.
- Podlech, D. 1990. Die Typifizierung der altweltlichen Sektionender Gattung *Astragalus* L. (Leguminosae). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* **29**: 461-494.
- 2008. The genus *Astragalus* L. (Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union. *Feddes Repertorium*. **119**(5-6): 310-387.
- 2011. Thesaurus Astragalorum: Index of all taxa described within the genus *Astragalus* L. and other genera but belonging to the genus *Astragalus*. Taxa of the Old World and related taxa of the New World, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Posada, D. (2006) Collapse: Describing haplotypes from sequence alignments, Version 1.2. Available from: <http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html>. In.
- Pretel Martínez, A. 1974. IOPB. Chromosome number reports. XLVI. *Taxon*. **23**(5/6): 804-805.
- Ranjbar, M. 2004. *Astragalus* sect. *Dissitiflora* (Fabaceae) in Iran. *Nordic Journal of Botany*. **24**(5): 523-531.
- Ranjbar, M., and Karamian, R. 2002. Taxonomic study of *Astragalus* sect. *Erioceras* (Fabaceae) in Iran. Additional notes and key to the species. *Nordic Journal of Botany*. **22**(6): 713-717.
- Riahi, M., Zarre, S., Maassoumi, A., Kazempour Osaloo, S., and Wojciechowski, M. F. 2011. Towards a phylogeny for *Astragalus* section *Caprini* (Fabaceae) and its allies based on nuclear and plastid DNA sequences. *Plant Systematics and Evolution*. **293**(1): 119-133.
- Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C. B., Bowman, D., and Chase, M. W. 2000. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*. **87**(9): 1309-1324.
- Rieseberg, L. H., and Brunsfeld, S. J. 1992. Molecular evidence and plant introgression. In *Molecular Systematics of Plants*. Edited by Soltis, P. S., Soltis, D. E., and Doyle, J. J. Chapman & Hall, New York. pp. 151-176.
- Riggins, C. W., and Seigler, D. S. 2012. The genus *Artemisia* (Asteraceae: Anthemideae) at a continental crossroads: Molecular insights into migrations, disjunctions, and reticulations among Old and New World species from a Beringian perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **64**(3): 471-490.
- Sang, T., Crawford, D. J., and Stuessy, T. F. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **92**(15): 6813-6817.
- Scherson, R. A., Choi, H.-K., Cook, D. R., and Sanderson, M. J. 2005. Phylogenetics of New World *Astragalus*: Screening of novel nuclear loci for the reconstruction of phylogenies at low taxonomic levels. *Brittonia*. **57**(4): 354-366.
- Scherson, R. A., Vidal, R., and Sanderson, M. J. 2008. Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations. *American Journal of Botany*. **95**(8): 1030-1039.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E., and Small, R. L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*. **92**(1): 142-166.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., and Small, R. L. 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**(3): 275-288.
- Silvestro, D., and Michalak, I. 2011. RaxmlGUI: a graphical front-end for RAXML. *Organisms, Diversity & Evolution*. <http://dx.doi.org/10.1007/s13127-13011-10056-13120>.

- Soltis, P. S., and Soltis, D. E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*. **60**: 561–588.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. **22**(21): 2688-2690.
- Stamatakis, A., Hoover, P., and Rougemont, J. 2008. A rapid Bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology*. **57**(5): 758-771.
- Stuessy, T. F. 2008. Plant taxonomy: The systematic evaluation of comparative data. Columbia University Press, New York.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland.
- Sytin, A. K. 2009. Milk-vetches (*Astragalus* L., Fabaceae) of Eastern Europe and the Caucasus: systematics, geography, evolution. D.Sc. thesis, Institute of Botany, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**(10): 2731-2739.
- Thompson, J. D. 2005. Plant evolution in the Mediterranean. Oxford University Press, Oxford.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., and Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*. **34**: 275–305.
- Walker, J. D., and Geissman, J. W. 2009. Geologic time scale. *Geological Society of America, GSA Today*. **19**: 60-61.
- Wendel, J. F., and Doyle, J. J. 1998. Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. In *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Edited by Soltis, D. E., Soltis, P. S., and Doyle, J. J. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 265–296.
- Weng, M.-L., Ruhlman, T. A., Gibby, M., and Jansen, R. K. 2012. Phylogeny, rate variation, and genome size evolution of *Pelargonium* (Geraniaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **64**(3): 654-670.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Shinsky, J. J., and White, T. J. Academic Press, San Diego. pp. 315-322.
- Willis, K. J. 1996. Where did all the flowers go? The fate of temperate European flora during glacial periods. *Endeavour*. **20**: 110-114.
- Willyard, A., Cronn, R., and Liston, A. 2009. Reticulate evolution and incomplete lineage sorting among the ponderosa pines. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **52**(2): 498-511.
- Wojciechowski, M. F. 2005. *Astragalus* (Fabaceae): A molecular phylogenetic perspective. *Brittonia*. **57**(4): 382-396.
- Wojciechowski, M. F., Sanderson, M. J., Baldwin, B. G., and Donoghue, M. J. 1993. Monophyly of aneuploid *Astragalus* (Fabaceae): evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany*. **80**(6): 711-722.
- Wojciechowski, M. F., Sanderson, M. J., and Hu, J. 1999. Evidence on monophyly of *Astragalus* (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA *trnL* intron data. *Systematic Botany*. **24**(3): 409-437.
- Xu, B., Wu, N., Gao, X.-F., and Zhang, L.-B. 2012. Analysis of DNA sequences of six chloroplast and nuclear genes suggests incongruence, introgression, and incomplete lineage sorting in the evolution of *Lespedeza* (Fabaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **62**(1): 346-358.
- Zhang, M., Kang, Y., Zhou, L., and Podlech, D. 2009. Phylogenetic origin of *Phyllobium* with a further implication for diversification of *Astragalus* in China. *Journal of Integrative Plant Biology*. **51**(9): 889-899.
- Zimmer, E. A., Martin, S. L., Beverley, S. M., Kan, Y. W., and Wilson, A. C. 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **77**(4): 2158-2162.
- Zimmer, E. A., and Wen, J. 2012. Using nuclear gene data for plant phylogenetics: Progress and prospects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **65**(2): 774-785.
- Zippel, E., and Wilhalm, T. 2009. Origin and relationships of *Astragalus vesicarius* subsp. *pastellianus* (Fabaceae) from the Vinschgau Valley (Val Venosta, Italy). *Gredleriana*. **9**: 119-134.
- Zuccon, A., and Zuccon, D. 2006. MrEnt v2.2. Program distributed by the authors. Department of Vertebrate Zoology & Molecular Systematics Laboratory, Swedish Museum of Natural History, Stockholm.

Cuvinte cheie: *Astragalus*, *Dissitiflora*, *Erioceras*, filogenie, speciație reticulată, *ycf1*.