

## بررسی روابط تبارزایی در همتافت گونه‌های گلپر (*Heracleum sp.*) ایران با استفاده از نشانگر ITS و *rnl-rpl32*

مریم عیدی<sup>۱</sup>، محمدتقی عبادی<sup>۱\*</sup>، محسن فلاحتی عنبران<sup>۲</sup> و عبدالعلی شجاعیان<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده زیست‌شناسی، گروه علوم گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۳



### چکیده

تیره کرفسیان (*Apiaceae*) یکی از تیره‌های بزرگ گیاهی با پراکنش گسترده بوده که در ایران حدود ۱۱۴ سرده شامل ۳۶۳ گونه گزارش شده است. سرده گلپر (*Heracleum*) با دارا بودن بیش از ۱۰۰ گونه در جهان، دارای هشت گونه در ایران است که سه گونه آن اختصاصی می‌باشد. بر اساس تشریح آرایه‌شناسی در فلور ایرانیکا گونه‌های گزارش شده گلپر در ایران در بخش‌های *Pubescentia* و *Wendia* شباهت‌های ریخت‌شناسی زیادی داشته به طوری که برخی از صفات، تنوع جغرافیایی وسیعی را نشان داده که شناسایی دقیق گونه‌ها مشکل می‌باشد. به همین منظور، از نشانگرهای مولکولی شامل توالی هسته‌ای ITS و کلروپلاستی *rpl32-trnL* برای ارزیابی روابط ژنتیکی جمعیت‌های مختلف از گونه‌های ایران و همچنین گونه‌های دیگر این سرده استفاده شد. تجزیه و تحلیل تبارزایی به روش استنباط بیزی انجام شد. نتایج نشان داد که توپولوژی درخت تبارزایی حاصل از دو توالی نسبتاً مشابه بود با این تفاوت که تعداد جایگاه‌های اطلاع‌رسان در نشانگر ITS به مراتب بیشتر از *rpl32-trnL* بود و ترکیب دو توالی توانست گونه‌های مربوط به بخش‌های مختلف را از هم جدا کند ولی نتوانست به صورت کامل گونه‌های داخل بخش‌ها را از یکدیگر جدا کند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که اطلاعات مولکولی، طبقه‌بندی مورفولوژی در سطح بخش‌های موجود در فلور ایرانیکا را تأیید می‌کند. علاوه بر این جمعیت‌های گونه‌های مختلف داخل هر بخش به غیر از گونه *H. gorganicum* از یکدیگر قابل تمایز نیستند. به منظور تأیید هر یک از گونه‌های معرفی شده انحصاری ایران از جمله *H. rechingeri* و *H. anisactis* به عنوان گونه یکتا تهیه کلید جدید آرایه‌شناسی ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: همتافت گونه‌ای، روابط تبارزایی، *Heracleum*، توالی هسته‌ای ITS، توالی کلروپلاستی *rpl32-trnL*

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۸۲۹۲۰۸۷، پست الکترونیکی: mt.ebadi@modares.ac.ir

### مقدمه

در نواحی مرطوب در چمنزارها و کنار جویبارها، باغها و رودخانه‌ها در اکثر استانهای شمالی، شمال غربی و شمال شرقی و مرکزی از جمله خراسان، سمنان، گلستان، تهران، مازندران، گیلان، قزوین، اردبیل، آذربایجان شرقی و غربی، زنجان، کردستان، چهارمحال و بختیاری، لرستان، کهگیلویه و بویراحمد، فارس و یزد می‌روید (۴). اثرات و خواص درمانی اندامهای هوایی گیاه شامل برگها و عمدتاً میوه در

سرده گلپر (*Heracleum*) از لحاظ تنوع گونه‌ای یک سرده بزرگ از تیره کرفسیان (*Apiaceae*) و بزرگ‌ترین سرده در طایفه *Tordylieae* است که برطبق تحقیقات انجام شده شامل حدود ۹۰ تا ۱۲۰ گونه است (۱۷). از هشت گونه گزارش شده در ایران، سه گونه از آنها شامل *H. gorganicum*، *H. rechingeri* و *H. anisactis* انحصاری هستند (۳). در ایران گونه‌های این سرده اغلب

ژنوم هسته‌ای و یا ژنوم اندامکها برای ترسیم روابط تبارزایی موجودات زنده از جمله گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. Logacheva و همکاران روابط تبارزایی ۴۰ گونه آسیای غربی *Heracleum* را با استفاده از توالیهای ITS1 و ITS2 مورد مطالعه قرار دادند و بخشه *Pubescentia* به‌عنوان یک گروه تک‌نیا (Monophyletic) تأیید شد، در مقابل بخشه‌های *Villosa* و *Heracleum* هر کدام چندنیا (Polyphyletic) و بخشه *Wendia* پارافیلیتیک (Paraphyletic) بودند و به‌طور کلی گونه‌های گلپر در دو کلاد مختلف قرار گرفتند (۱۷). Yu و همکاران روابط تبارزایی گونه‌های گلپر از مبداء چین و همچنین گونه‌های *Heracleum* از منشاء منطقه هیمالیا را با استفاده از توالیهای ITS و همچنین پنج منطقه غیررمزکننده DNA کلروپلاست (شامل *rps16-intron*، *rps16-trmQ*، *rps16-trmH* و *rpl32-trnL*) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که سرده *Heracleum* چندنیاست و تعدادی از اعضایش وابسته به سرده‌های دیگر زیرقبیله *Tordyliinae* می‌باشد (۲۶).

گونه‌های *Heracleum* ایران در فلور ایرانیکا که مرجع اصلی شناسایی و طبقه‌بندی این گونه‌ها می‌باشد بر اساس خصوصیات ریختی مانند ارتفاع، شکل میوه، شکل برگ، ضخامت ساقه و رنگ بساک به سه بخشه (Division) یعنی *Pubescentia* (شامل گونه‌های *H. persicum*، *H. rechingeri* و *H. gorganicum*)، *Villosa* (شامل گونه‌های *H. antasiaticum*) و *Wendia* (شامل گونه‌های *H. rawianum*، *H. pastinacifolium*، *H. transcausicum* و *H. anisactis*) تقسیم بندی شده است (۲۰). در بررسی ترکیبات اصلی متابولیت‌های ثانویه اسانس میوه شش گونه گلپر (*H. persicum*، *H. gorganicum*، *H. rechingeri*، *H. rawianum*، *H. pastinacifolium* و *H. anisactis*) که از ایران گزارش شده است، گونه‌های *H. persicum*، *H. gorganicum* و *H. rechingeri* با محتویات بالای اکتیل‌استات و هگزیل

تعداد زیادی از گونه‌های این سرده گزارش شده است (۲). برای مثال از گونه *H. persicum* (گلپر ایرانی)، در ایران علاوه بر استفاده درمانی، به صورت ادویه، برای عطر و طعم‌دادن به غذاها و همچنین تعلیف دامها استفاده می‌شود (۵ و ۹).

تا به حال طبقه‌بندی‌های آرایه‌شناسی متفاوتی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی برای گونه‌های این سرده انجام شده است، به‌طور مثال گونه‌های منطقه شمال‌غرب آسیا و مدیترانه شرقی در مقیاس وسیع (۲۷ گونه) برای اولین بار توسط Boissier تنها در دو بخشه با بخشه تک‌گونه‌ای *Pseudotragium* و بخشه (*Euheracleum*) *Heracleum* با ۲۶ گونه تقسیم‌بندی شد (۷). Boissier بخشه *Euheracleum* را بر اساس برش برگ، حضور برگه‌ها (Bracts) و برگک (Bracteoles)، تعداد و شکل لوله حاوی اسانس (*Mericaip vittae*) در نظر گرفت. Mandenova گونه‌های *Heracleum* را عمدتاً براساس وجود و ریخت‌شناسی لوله حاوی اسانس به بخشه‌های *Pubescentia*، *Villosa* Manden.، *Heracleum* L.، *Wendia* (Hoffm.)، *Apiifolia* Manden.، Manden.، *Lasiopetala*، *Vocontia* (Calest.) Thell.، Manden.، *Pseudotragium* Boiss. و Manden. طبقه‌بندی کرد (۱۷).

شواهد سیستماتیک قابل توجهی برای گونه‌های *Heracleum* به‌خصوص در زمینه کاربولوجی (به‌طور عمده تعداد کروموزومها)، فیتوشیمی (۱۲ و ۲۳)، مورفولوجی دانه‌گرده (۱۳) و آناتومی (۱۴ و ۱۵) به‌دست آمده است. ناپایداری درون گونه‌ای تعداد کروموزومها در تعدادی از گونه‌های این سرده، باعث شده است که تعداد کروموزومها ارزش طبقه‌بندی گیاه‌شناسی (Taxonomic) کمی داشته باشد. علی‌رغم اینکه دورگه‌گیری (هیبریداسیون) در تیره چتریان نادر می‌باشد، ولی این پدیده در این سرده گزارش شده است (۲۶).

نشانه‌های مولکولی مبتنی بر توالیهای نوکلئوتیدی کوتاه

نظر می‌رسد. برای پاسخ به این سوال، روابط تبارزایی گونه‌های گلپر ایران با لحاظ نمودن چندین جمعیت از هر گونه با استفاده از هسته‌ای نشانگرهای هسته‌ای ITS و همچنین کلروپلاستی *rpl32-trnI* در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفته است.

### مواد و روشها

**مواد گیاهی:** نمونه‌های ۱۹ جمعیت از سرده گلپر جمع‌آوری شده از نواحی مختلف ایران و نروژ مورد بررسی مولکولی قرار گرفت که مشخصات جغرافیایی مربوط به آنها در جدول یک ذکر شده است. با توجه به اینکه در خصوص منشا گونه‌های اروپایی گلپر به ویژه گونه *H. persicum* و گونه *H. mantegazzianum* که گونه‌های مهاجم در کشور نروژ بوده و در شباهت آن به گونه متداول ایران اختلاف نظرهایی وجود دارد، تعدادی از گونه‌های متداول در مناطق شمالی نروژ نیز مورد بررسی قرار گرفتند. برای ایجاد درخت تبارزایی ریشه‌دار از گونه *Heracleum lasiopetalum* به‌عنوان برون‌گروه استفاده گردید که در برخی منابع، آن را در سرده *Tetrataenium* قرار می‌دهند.

بوتیرات از دیگر گونه‌های (*H. rawianum*)، *H. pastinacifolium* و *H. anisactis* با محتویات همگزیل بوتیرات پایین‌تر و محتویات اکتیل‌استات بالاتر متمایز شده‌اند (۱۸). تفاوت در ترکیب اسانس در میان شش گونه نشان داد که ترکیبات اسانس به خوبی طبقه‌بندی گیاه‌شناسی بخش‌های گلپر را بر پایه داده‌های مورفولوژیک تأیید می‌کنند. بررسی تنوع فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف *H. persicum* و همچنین سایر گونه‌های این همتافت (Species Complex) نیز نشان داده است که تنوع زیادی بین جمعیتها وجود دارد؛ به طوری که شناسایی برخی گونه‌های اندمیک ایران از جمله گونه‌های ساقه ضخیم *H. persicum*، *H. gorganicum* و *H. rechingeri* و همچنین گونه‌های ساقه نازک شامل *H. pastinacifolium* و *H. anisactis* به علت شباهت زیاد ترکیبات شیمیایی اسانس میوه قابل تفکیک از سایر گونه‌ها نمی‌باشد (۱۲).

با توجه به تنوع قابل‌ملاحظه ریختی در بین جمعیت‌های وحشی و مشکل شناسایی گونه‌های گزارش شده بر اساس منابع گیاه‌شناسی موجود برای تأیید کارایی طبقه‌بندی گیاه‌شناسی گونه‌های *Heracleum* ایران بر اساس داده‌های ریخت‌شناسی، انجام بررسی‌هایی بر روی تنوع ژنتیک درون و بین گونه‌ها و مطالعات تبارزایی در این سرده ضروری به

جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی جمعیت‌های گونه‌های مختلف *Heracleum* مطالعه شده در این تحقیق

گونه‌ها	محل جمع‌آوری	استان	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	علامت اختصاری
<i>H. transcaucasicum</i> *	کلپر-قلعه بابک	آذربایجان شرقی	38°50'12.87" N	46°58'50.65" E	2122	Aza
<i>H. gorganicum</i>	شیرین‌آباد	گلستان	36°50'25.43" N	55°5'31.47" E	1180	Shi
<i>H. pastinacifolium</i>	گردنه اسالم-سخلخال	اردبیل	37°34'15.59" N	48°40'13.53" E	2210	Asa
<i>H. pastinacifolium</i>	نیر	اردبیل	37°59'3.27" N	47°53'57.66" E	1820	Nir
<i>H. pastinacifolium</i> **	علم‌کوه	مازندران	36°25'8.32" N	51° 22.22" E	2850	Ala
<i>H. persicum</i> *	مراغه	آذربایجان شرقی	37°30'15.59" N	46°18'16.05" E	1752	Mar
<i>H. persicum</i>	تروندهایم	نروژ	63°25'41.77" N	10°24'33.53" E	40	Nor
<i>H. persicum</i>	عنبران	اردبیل	38°31'27.68" N	48°27'44.83" E	1711	Anb
<i>H. rechingeri</i>	غندوفلو	اردبیل	38°24'57.37" N	48°34'18.81" E	1575	Gar

Asa	1155	E 48°49'7.42"	N 37°39'20.28"	گیلان	جاده اسالم-خلخال	<i>H. rechingeri</i>
Kan	2350	E 46°15'45.40"	N 37°47'03.89"	آذربایجان شرقی	کندوان	<i>H. anisactis</i> *
Lig	2051	E 46°28'02.37"	N 37°47'43.79"	آذربایجان شرقی	لیقوان	<i>H. anisactis</i> *
Dam	3210	E 52°6'46.33"	N 35°54'3.92"	تهران	دماوند	<i>H. anisactis</i>
Har	2462	E 51°22'47.76"	N 36°13'15.62"	مازندران	پل زنگوله به سمت جاده هراز از	<i>H. antasiaticum</i>
Nor	10	E 10°23'26.67"	N 63°24'42.83"	نور	تروندهایم	<i>H. mantegazzianum</i>
Nor	48	E 10°24'36.43"	N 63°25'42.98"	نور	تروندهایم	<i>H. sphondylium</i>
-	48	E 10°24'36.43"	N 63°25'42.98"	نور	تروندهایم	<i>H. Hybrid<sub>1</sub></i>
-	48	E 10°24'36.43"	N 63°25'42.98"	نور	تروندهایم	<i>H. Hybrid<sub>2</sub></i>
Koh	2750	E 50°2'57.78"	N 32°27'4.68"	چهارمحال و بختیاری	کوهرنگ	<i>H. lasiopetalum</i>

نمونه‌های \* و \*\* به ترتیب توسط آقای مهدی دائمی سعید آباد و آقای امیر طالبی در دسترس قرار گرفته شده است.

چرخه‌های حرارتی برای واکنش زنجیره پلیمرز برای توالی ITS شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه: در دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، و به مدت ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. برای قطعه *trnL-rpl32* از دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. برای تأیید تکثیر قطعات، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. محصولات PCR تک بانندی قوی و بدون کشیدگی توسط شرکت ماکروژن Macrogen (کره جنوبی) با استفاده از آغازگر ITS-p5 برای قطعه ITS و آغازگر *rpl32* برای قطعه *rpl32-trnL* در جهت پیشرو توالی‌یابی شدند. هم‌ردیفی چندگانه توسط نرم‌افزار آنالین Clustal Omega انجام شد و نتایج هم‌ردیفی بصورت چشمی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

برای ترسیم درخت تبارزایی، ماتریس داده‌های هم‌ردیف شده مورد استفاده قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی ITS

تجزیه و تحلیل مولکولی: نمونه‌های برگ خشک‌شده، توسط دستگاه Mixer mill مدل Retsch MM 200 شرکت Qiagen پودر شدند. استخراج DNA از برگ با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA گیاهی (Sp Plant DNA Kit) شرکت Omega Bio-Tek صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ITS با آغازگرهای رو به جلو ITS-p5 (5'-CCTTATCAYTTAGAGGAAGGAG-3') و رو به عقب ITS-p4 (CCGCTTAKTGATATGCTTAAA) (۸) و برای تکثیر قطعه *trnL-rpl32* از آغازگرهای رو به جلو *rpl32* (3'-CAGTTCCAAAAAACGTACTTC-3') و رو به عقب *trnL* (5'-CTGCTTCTTAAGAGCAGCGT-3') (۲۴) با استفاده از دستگاه GeneAmp 9700 شرکت Applied Biosystems انجام شد. با توجه به مطالعات قبلی به خصوص مطالعه تبارزایی گلپه‌های چین با استفاده از نشانگر ITS و ۵ نشانگر کلروپلاستی و تنوع نسبتاً بالای نشانگرهای ITS و *trnL-rpl32* در بین نشانگرهای مورد بررسی، از این دو قطعه در این مطالعه استفاده گردید (۲۶).

نوکلئوتید بود (جدول ۲)، که تعداد جایگاه‌های نوکلئوتیدی متغیر (Number of variable sites) در توالی ITS و *trnl-rpl32* به ترتیب ۴۲ (شکل ۱) و ۱۱۲ بودند. تعداد مکان‌های اطلاع‌رسان صرفه‌جویی (Number of parsimony informative positions) از بین جایگاه‌های نوکلئوتیدی متغیر، در توالی ITS و توالی *trnl-rpl32* به ترتیب ۲۸ و ۱۴ بود. تعداد جایگاه‌های یگانه یا دارای تفاوت مشاهده شده در تنها یک نمونه در توالی ITS و *trnl-rpl32* به ترتیب ۱۴ و ۹۸ متغیر بود.

**تجزیه و تحلیل تبارزایی:** در زمانی که درخت تبارزایی توالی ITS برای ۱۹ جمعیت از نه گونه سرده *Heracleum* با روش استنباط بیزی ترسیم شد، گونه‌های *H. transcaucasicum*، *H. anisactis* و *H. pastinacifolium* در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲). گونه‌های *H. persicum*، *H. mantegazzianum* و *H. rechingeri* نیز در یک گروه جدا قرار گرفتند، گونه *H. gorganicum* از شیرین‌آباد با حمایت شاخه‌ای (Branch support) بالا در بیرون از این گروه قرار گرفت. گونه *H. sphondylium* و Hybrid2 و Hybrid1 در یک گروه قرار گرفتند به طوری که گونه *H. antasiaticum* در گروه خواهری این گونه و هیبریدهای احتمالی آنها قرار گرفت (شکل ۲).

شامل ITS1، 5.8s و ITS2 و توالی *trnl-rpl32* ۱۹ جمعیت از نه گونه سرده *Heracleum* و ترکیب توالی ITS و *rpl32-trnl* ۱۹ جمعیت از نه گونه از سرده *Heracleum* برای آنالیز تبارزایی استفاده شد. برای رسم درخت تبارزایی از روش آنالیز بیزی با نرم‌افزار MRBAYES استفاده شد (۱۶). برای تأیید همگرایی نتایج پارامترهای آنالیز بیزی از برنامه Tracer v1.6 (۱۹) و برای تعیین نوع مدل جانیشینی نوکلئوتیدی مناسب برای داده‌ها از نرم‌افزار jModeltest 2.1.9 استفاده شد (۱۱). بهترین مدل جانیشینی برای توالی ITS، و توالی *trnl-rpl32* مربوط به ۱۹ جمعیت از سرده *Heracleum* به ترتیب مدل‌های SYM + I و TPM3uf + G بودند. برای ترسیم درخت تبارزایی از نرم‌افزار FigTree استفاده گردید. برای تعیین انواع هاپلوتایپ به عنوان یکی از آماره‌های توصیف کننده تنوع ژنتیک از نرم‌افزار DnaSp 5.0 استفاده گردید (۲۲) آنالیز شبکه‌ای هاپلوتایپ‌ها بر اساس روش اتصال میانه MJ (Median-Joining) به وسیله نرم‌افزار Network 4.6 انجام گردید (۶).

## نتایج

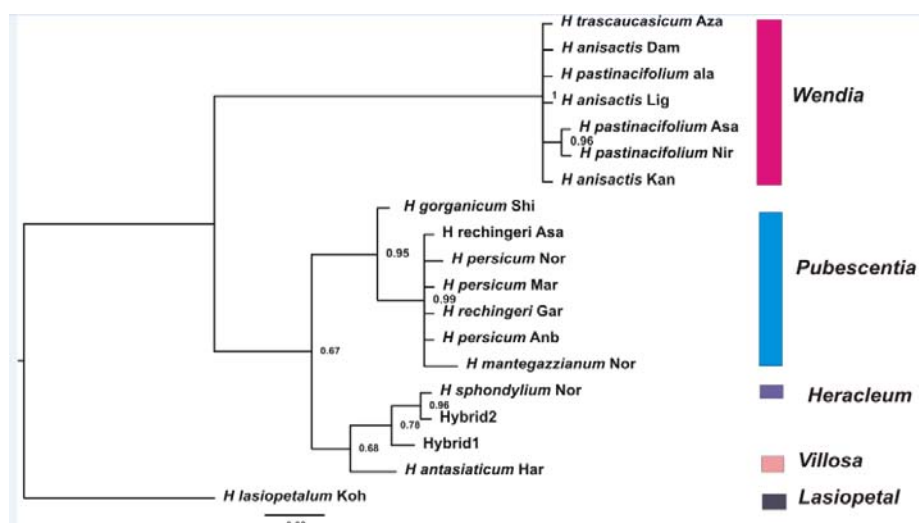
تنوع نوکلئوتیدی در قطعات ITS و *trnl-rpl32*: طول توالیها بعد از هم‌ردیفی چندگانه برای ۱۹ جمعیت از گونه‌های سرده *Heracleum* برای هر دو قطعه مورد استفاده ITS و *trnl-rpl32* به ترتیب برابر ۶۱۰ و ۹۸۱

جدول ۲- تنوع نوکلئوتیدی در توالی نوکلئوتیدی ITS و *rpl32-trnl* و توالی ادغام شده آنها در گونه‌های *Heracleum*

ترکیب دو توالی ITS و <i>trnl-rpl32</i>	<i>rpl32-trnl</i>	ITS	
۱۹	۱۹	۱۹	تعداد نمونه
۱۵۹۱	۹۸۱	۶۱۰	طول توالی هم‌ردیف شده
۴۲	۱۴	۲۸	تعداد جایگاه‌های اطلاع‌رسان صرفه‌جویی
۱۵۴	۱۱۲	۴۲	تعداد جایگاه‌های متغیر
۱۴۱۱	۸۴۳	۵۶۸	تعداد جایگاه‌های محافظت شده (Number of conserved sites)
۱۱۲	۹۸	۱۴	جایگاه‌های دارای تک نوکلئوتید متفاوت (Number of singleton)

Taxon \ Character	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		
1 H_trascaucas_Kal	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	T	T	A	C	C	C	T	
2 H_anisactis_Dama	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	T	T	A	C	C	C	T	
3 H_anisactis_Ligh	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	T	T	A	C	C	C	T	
4 H_anisactis_Kan	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	T	T	A	C	C	C	T	
5 H_pastin_alam	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	T	T	A	C	C	C	T	
6 H_pastin_Nir	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	A	T	A	C	C	C	T	
7 H_pastin_Asaleem	C	T	G	T	G	A	C	T	G	G	C	T	G	C	T	G	C	C	C	G	A	C	C	G	C	C	C	T	G	T	C	C	G	C	G	A	T	A	C	C	C	T	
8 H_antasiat_Har	C	T	T	C	G	A	C	G	G	G	T	C	G	C	C	G	C	C	C	G	A	C	T	T	G	T	C	C	G	T	T	T	T	C	A	T	C	A	C	C	C	C	
9 H_gorganicum_Shiri	C	T	G	C	G	A	T	G	G	T	C	G	C	C	G	T	C	C	C	G	A	C	T	T	G	T	C	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	C	G	C	C	C	C
10 H_mantegaz	T	T	G	C	G	T	T	G	G	T	C	T	C	C	G	T	C	C	A	C	T	T	G	T	T	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	C	C
11 H_rechin_Asal	T	T	G	C	G	T	T	G	G	T	C	G	C	C	G	T	C	C	A	C	T	T	G	T	C	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	C	C
12 H_rechin_Garda	T	T	G	C	G	T	T	G	G	T	C	G	C	C	G	T	C	C	A	C	T	T	G	T	C	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	C	C
13 H_persic_Maragh	T	T	G	C	G	T	T	G	G	T	C	G	C	C	G	T	C	C	A	C	T	T	G	T	C	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	C	C
14 H_persic_Anba	T	T	G	C	G	T	T	G	G	T	C	G	C	C	G	T	C	C	A	C	T	T	G	T	C	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	C	C
15 H_persic_Nor	T	T	G	C	G	T	T	G	A	T	C	G	C	C	G	T	C	C	A	C	T	T	G	T	C	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	T	G	C	C	C	C	C	C
16 H_sphondylium_Nor	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	C	G	C	C	A	C	C	A	G	C	T	T	A	T	C	C	C	A	T	T	T	G	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17 Hybrid1	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	C	G	C	C	A	C	C	A	G	C	T	T	A	T	C	C	C	A	T	T	T	G	C	A	T	C	G	C	C	C	C	C	
18 Hybrid2	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	C	G	C	C	A	C	C	A	G	C	T	T	A	T	C	C	C	A	T	T	T	G	C	A	T	C	G	A	C	C	C	C	C
19 H_lasiopet_Koh	C	G	G	C	G	A	C	G	G	T	T	A	A	T	G	C	A	T	G	C	C	T	G	T	C	T	T	G	C	C	G	T	A	T	C	A	T	A	T	T	T	C	C

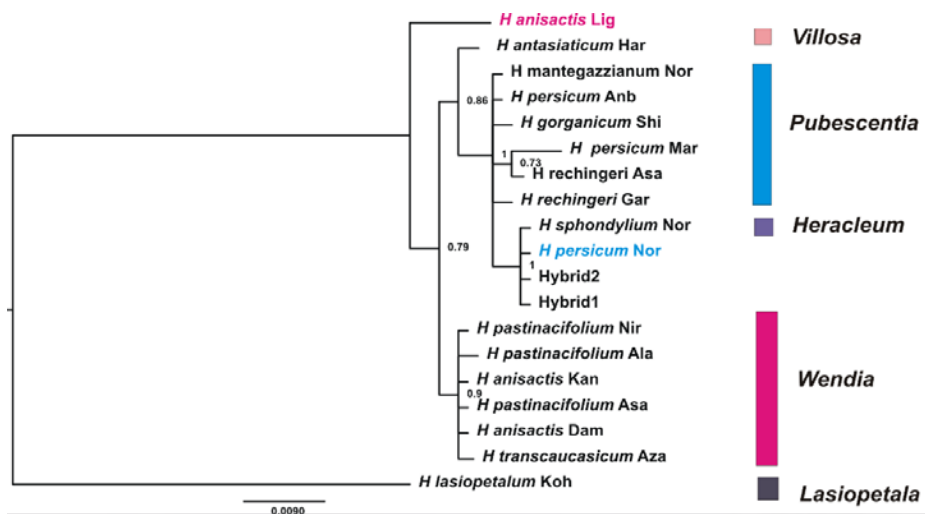
شکل ۱- تنوع نوکلئوتیدی در قطعه ITS در گونه‌های مورد بررسی *Heracleum*. جایگاههای شماره ۱ تا ۱۴، ۱۵ تا ۱۸ و ۱۹ تا ۲۲ به ترتیب نشان‌دهنده منطقه ITS1، 5.8s و ITS2 می‌باشند.



شکل ۲- درخت تبارزایی حاصل از روش استنباط بیزی ۱۹ جمعیت از نه گونه از سرده *Heracleum* بر اساس توالی نوکلئوتیدی ITS اعداد روی شاخه‌ها حمایت شاخه‌ای براساس احتمال پسین (Posterior probability) می‌باشد.

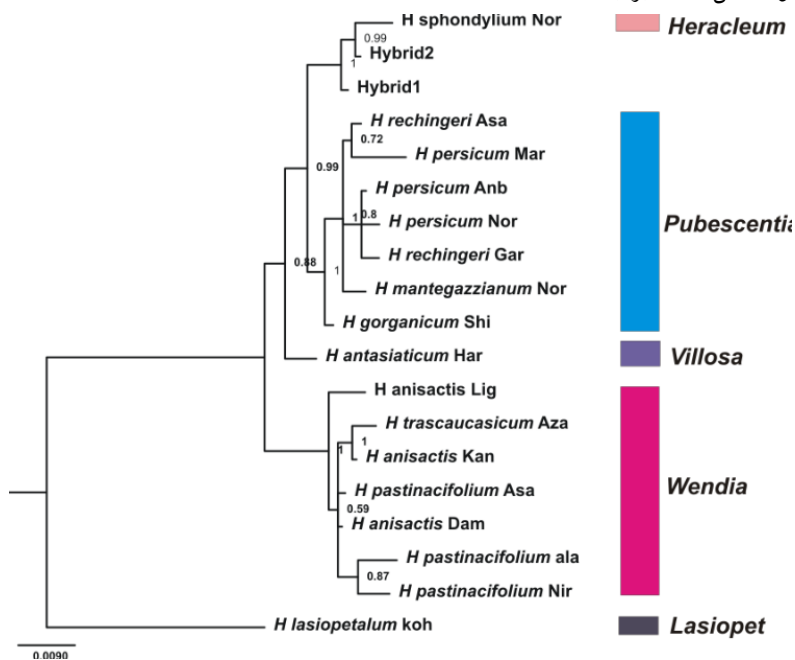
*H. persicum* و *H. sphondylium* نوژ در یک شاخه جدا قرار گرفتند. این روش نتوانست جمعیت‌های گونه‌های *H. pastinacifolium*، *H. anisactis* و *H. transcausicum* را از یکدیگر جدا کند ولی گونه *H. anisactis* ليقوان را در یک گروه جداگانه قرار داد (شکل ۳).

درخت تبارزایی ترسیم شده با روش استنباط بیزی به دست آمده از قطعه *trnl-rpl32* در ۱۹ جمعیت از نه گونه سرده *Heracleum* نشان می‌دهد که گونه‌های *H. rechingeri*، *H. mantegazzianum*، *H. persicum*، *H. sphondylium*، Hybrid2، Hybrid1، *H. gorganicum* و *H. persicum* نوژ در یک گروه قرار دارند، که در بین این گونه‌ها، گونه‌های Hybrid1، Hybrid2،



شکل ۳- درخت تبارزایی حاصل از قطعه *trnl-rpl32* بر اساس ۱۹ جمعیت از نه گونه *Heracleum* با روش استنباط بی‌زی. اعداد روی شاخه‌ها حمایت شاخه‌ای براساس احتمال پسین می‌باشد.

درخت تبارزایی حاصل از ادغام توالیهای ITS و *trnl-rpl32* نشان داد که گونه‌های بخش *Wendia* شامل *H. pastinacifolium*، *H. transcaucasicum* و *H. anisactis* به طور کامل از سایر بخش‌ها جدا شدند. ولی همانند تحلیل‌های قطعات انفرادی، ادغام قطعات نیز نتوانست جمعیت‌های مختلف مربوط به گونه مختلف داخل بخش‌ها را تفکیک کند (شکل ۴).

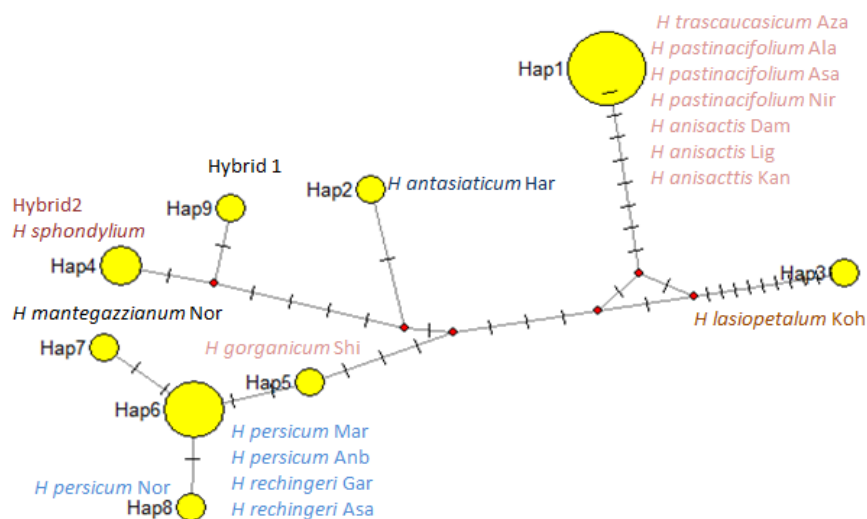


شکل ۴- درخت تبارزایی حاصل از ترکیب توالی ITS و *rpl32-trnl* ۱۹ جمعیت از نه گونه از سرده *Heracleum* به روش استنباط بی‌زی. اعداد روی شاخه‌ها حمایت شاخه‌ای براساس احتمال پسین می‌باشد.

به منظور تأیید نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارزایی، آنالیز شبکه بر اساس هاپلوتیپ‌های شناسایی شده در هر بزرگتر و کوچکتر دایره‌ها به ترتیب نشان‌دهنده فراوانی بالا و پایین ترسیم شد (شکل ۵و۶). در نمودار شبکه، قطر

در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. گونه *H. gorganicum* Shi با هاپلوتیپ شماره پنج با دو جهش و گونه *H. persicum* Nor با هاپلوتیپ شماره هشت با یک جهش از گونه‌های اصلی بخش *Pubescentia* که هاپلوتیپ شش را شامل می‌شوند فاصله گرفته است. گونه‌های بخش *Wendia* همگی در هاپلو گروه یک قرار گرفتند. گونه Hybrid1 در هاپلوتیپ شماره نه توسط یک هاپلوتیپ مفقود شده از هاپلوتیپ شماره چهار که شامل *H. sphondylium* و Hybrid2 جدا شده است (شکل ۵). قابل ذکر است که نمونه‌های Hybrid1 و Hybrid2 از نظر فنوتیپی شباهت زیادی به گونه *H. sphondylium* دارند.

و پایین هاپلوتیپ را نشان می‌دهند. در کل نه هاپلوتیپ در نمونه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق مشخص شد. روابط هاپلوتیپی بر اساس ساختار شبکه در توالی ITS نشان داد که دو گروه هاپلو عمده شامل گونه‌های *H. Aza transcaucasicum* Nir، *H. pastinacifolium* Ala، *H. pastinacifolium* Asa، *H. anisactis* Lig و *H. anisactis* Kan، گروه دیگر شامل گونه‌های *H. persicum* Mar، *H. rechingeri* Gar و *H. persicum* Anb بوده و گونه‌های *H. sphondylium* و Hybrid2 در یک هاپلوگروه کوچکتر و بقیه گونه‌ها به صورت انفرادی

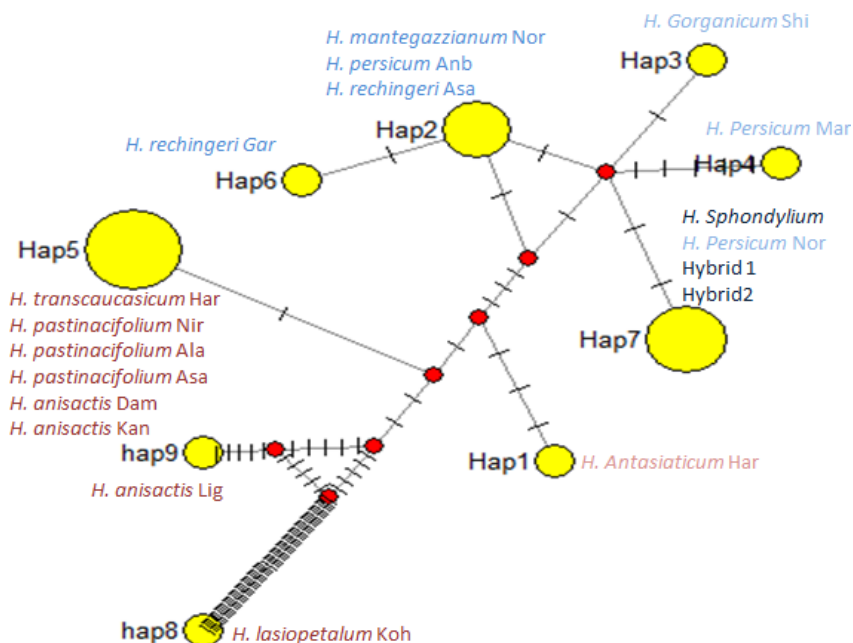


شکل ۵- آنالیز شبکه‌ای بر اساس تنوع هاپلوتیپی در توالی ITS. گونه‌های دارای هاپلوتیپ مشابه در کنار آن نوشته شده است. اندازه هر دایره نشان‌دهنده تعداد نمونه‌های متعلق به آن هاپلوتیپ است و هر خط تیره بین هاپلوتیپ‌ها نشان‌دهنده یک واحد جهش می‌باشد. نقاط قرمز بر روی شبکه هاپلوتیپ‌های مفقود شده را نشان می‌دهد.

روابط هاپلوتیپی بر اساس ساختار شبکه در توالی *trnL-rpl32* نشان داد که سه هاپلو گروه عمده که یکی شامل گونه‌های *H. transcaucasicum* Aza، *H. pastinacifolium* Ala، *H. pastinacifolium* Asa، *H. anisactis* Dam، *H. pastinacifolium* Nir، *H. anisactis* Kan، هاپلو گروه دیگر شامل گونه‌های *H. persicum* Mar، *H. persicum* Anb، *H. persicum* Nor، *H. rechingeri* Gar و Hybrid1، *H. sphondylium* و هاپلو گروه دیگر شامل گونه‌های

*H. mantegazzianum* و *H. persicum* Anb است. بقیه گونه‌ها به صورت انفرادی در هاپلو گروه‌های مجزا قرار گرفتند. اعضای بخش *Wendia* به غیر از گونه *H. anisactis* Lig در یک هاپلوتیپ قرار گرفتند. گونه‌های *H. persicum* Mar با یک هاپلوتیپ مفقود شده از بخش *Pubescentia* در هاپلوتیپ شماره دو فاصله گرفته اند (شکل ۶).





شکل ۶- آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های موجود در توالی *trnL-rpl32* برای جزئیات بیشتر به شکل شماره ۵ مراجعه شود.

## بحث

*H. transcaucasicum*، *H. pastinacifolium* و *H. anisactis* به طور کامل از سایر بخش‌ها جدا شدند. مطالعات دیگر انجام گرفته بر روی گونه‌های ایرانی سرده *Heracleum* با استفاده از داده‌های حاصل از آنالیز اسانس میوه نتایج مشابهی را حاصل کرده است (۱۲ و ۱۸). علاوه بر این داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره معرفی شده با استفاده از روش توالی‌یابی نسل جدیدی RADseq، تنها قادر به شناسایی گونه‌های در سطح بخشه بوده است (۱۰). نتایج این تحقیق توانست طبقه‌بندی سرده را بر اساس داده‌های مورفولوژیک در سطح بخشه تأیید کند ولی جداکردن برخی از گونه‌های مشابه در هم‌تافت‌های گونه‌ای با این داده‌ها میسر نشد.

توپولوژی درخت حاصل از دو توالی ITS و *rpl32-trnL* در جدا کردن بخش‌های اصلی نسبتاً مشابه بود و ترکیب دو توالی توانست بخش‌های مختلف را از یکدیگر جدا کند و نتیجه بهتری را ارائه داد. با این تفاوت که با توجه به تنوع پایین داده‌های *rpl32-trnL* پلی‌تومی نسبتاً زیادی در داخل بخش‌ها در درخت تبارزایی حاصل نسبت به درخت حاصل از داده‌های ITS مشاهده شد. Yu و همکاران

نتایج بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که تعداد جایگاه‌های اطلاع‌رسان صرفه‌جویی در توالی ITS (۴/۶ درصد) بیشتر از توالی *rpl32-trnL* (۱/۴ درصد) است که نشان‌دهند تنوع اطلاع‌رسان بیشتر در توالی ITS نسبت به توالی *rpl32-trnL* است. در مقایسه توالی ITS و *rpl32-trnL*، توالی اولی گونه‌های مربوط به بخش‌ها را در گروه جدا قرار داد ولی جمعیت‌های مختلف داخل گونه‌ها را نتوانست جدا کند، اما توالی کلروپلاستی در جدا کردن بخش‌ها به خوبی عمل نکرده است. توالی ITS که با سرعت بیشتری تکامل پیدا می‌کند، که این موضوع با درصد بیشتر مکان‌های دارای اطلاعات اثبات می‌شود. در تحقیق حیدری و همکاران (۱۳۹۳) توالی ITS توانست زیرگونه‌های گیاه بادرنجبویه و ژنوتیپ‌های درون یک جمعیت را به خوبی تفکیک کند و این نشانگر را برای این هدف بسیار کارآمد معرفی کرد (۱).

درخت تبارزایی حاصل از ادغام توالی‌های ITS و *trnL-rpl32* نشان داد که گونه‌های بخشه *Wendia* شامل

که این نتایج تا حدود زیادی نتایج قبلی حاصل از داده‌های مورفولوژیک را تأیید نمود، اما در آنها تفکیک کامل جمعیت‌های مختلف داخل هر هم‌تافت گونه‌ای صورت نگرفت به جز مواردی از قبیل گونه *H. gorganicum* و *H. anisactis* Lig دیده نمی‌شود و این شباهت بسیار زیاد این گونه‌ها از لحاظ مورفولوژیکی و همچنین عدم توانایی ژنهای مورد مطالعه در تفکیک کامل این گونه‌ها می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که بعضی از گونه‌ها در اصل یک گونه هستند و به خاطر شرایط اکولوژیک از لحاظ مورفولوژیکی تغییر پیدا کرده‌اند و در عرصه جغرافیایی وسیع تنوع قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهند که نیاز به بررسی‌های بیشتر آرایه‌شناسی برای ارائه کلیدهای شناسایی جدید و تأیید نهایی گونه‌های هم‌تافت *H. anisactis* و *H. pastinacifolium* و همچنین گونه‌های خواهری *H. persicum* و *H. rechingeri* است. علاوه بر این باتوجه به رویش برخی از گونه‌ها در رویشگاههای مشترک مثلاً گونه‌های *H. persicum* و *H. sphondylium* در نروژ و همچنین گونه‌های *H. persicum* و *H. antaciaticum* در مناطقی از ایران احتمال وجود دورگه‌سازی طبیعی بین گونه‌ای وجود خواهد داشت که نیاز به مطالعات بیشتر ریختی و مولکولی برای تأیید و یا رد این پدیده خواهد بود.

#### تشکر و قدردانی

از بنیاد علم ایران (صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور) به خاطر حمایت از انجام بخشی از پژوهش (با شماره طرح ۹۲۰۳۸۸۳۸) تشکر می‌گردد.

۲- سعیدی، ف.، اژدری‌زرمهری، حسن، ارمی، اف و محمدی، ع. (۱۳۹۲). بررسی اثر عصاره هیدرولیکی برگ گیاه گلپر روی تشنج ناشی از تزریق پنتیلن تترازول بر روی موش سوری. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، ۲۱، ۴۵-۵۵.

(۲۰۱۱) نیز همین نتیجه را از ترکیب توالی ITS و پنج منطقه غیررمز کننده DNA کلروپلاست برای گونه‌های *Heracleum* از چین گزارش کردند (۲۶). این درخت تبارزایی توانست گونه‌های مربوط به بخش‌های مختلف را از هم جدا کند ولی نتوانست با توجه به متفاوت بودن در طول شاخه افراد که نشان‌دهنده متفاوت بودن آنهاست، به صورت کامل گونه‌های داخل بخشه (بر اساس طبقه‌بندی فلور ایرانیکا و ماندنوا) را از یکدیگر جدا کند. تفاوت توپولوژی بین ژنوم هسته‌ای و ژنوم پلاستییدی مختلف توسط یوسف‌زاده و همکاران (۲۰۱۹) هم گزارش شده است (۲۵). که Yu و همکاران (۲۰۱۱) چنین تضادی بین تبارزایی به دست آمده از توالیهای هسته‌ای و پلاستییدی را در تیره کرفسیان را غیرمعمول شمرده‌اند و عواملی مانند هیبریداسیون و یا جورشدن ناقص تبارها را از علل احتمالی آن برشمردند (۲۶) و با توجه به وجود هیبریداسیون طبیعی بین گونه‌های خواهری نقش هیبرید بین‌گونه‌ای را در این زمینه پررنگ‌تر دانستند (۲۶). علاوه بر این وجود دورگه سازی طبیعی در بین گونه‌های گلپر اروپایی نیز در مطالعات مولکولی پیشنهاد شده است (۲۱). نتایج حاصل از آنالیز شبکه بر اساس هاپلوتیپ‌ها نیز توپولوژی درخت تبارزایی حاصل از قطعه ITS را تأیید نمود.

#### نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر با استفاده از داده‌های توالیهای نوکلئوتیدی جمعیت‌های مختلف گونه‌های هم‌تافت *H. persicum* و *H. pastinacifolium* نشان داده شد که بخش‌ها به‌صورت کاملاً مشخص از یکدیگر جدا شدند،

#### منابع

۱- حیدری، پ.، مهرابی، ع و نصرالله نژاد قمی، ع. (۱۳۹۳). بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌های گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) با استفاده از نشانگرهای ITS. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی، ۶، ۲۰.

- ۳- مظفریان، و. (۱۳۸۶). فلور ایران، تیره چتریان (Umbelliferae) جلد ۵۴. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران. ۶۰۰ ص.
- ۴- مظفریان، و. (۱۳۹۱). شناخت گیاهان دارویی و معطر ایران، انتشارات فرهنگ معاصر، ۱۱۹۵-۱۱۹۲ ص.
- 5- Asgarpanah, J., Mehrabani, G. D., Ahmadi, M., Ranjbar, R., & Ardebily, M. S. A. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Heracleum persicum* Desf. Ex Fischer: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(10), 1813-1820.
- 6- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48.
- 7- Boissier, E. (1872). Umbelliferae. In: *Flora orientalis*. 2. Basel, Geneve, pp 819-109.
- 8- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., & Zhou, S. (2016). Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 138-149.
- 9- Dadjo, Y., Panahi, Y., Pishgoo, B., Sahebkar, A., Taghipour, H., Akbari, A. and Parvin, S. (2015). Effects of supplementation with *Heracleum persicum* fruit extract on serum lipids in patients undergoing coronary angiography: a pilot trial. *Phytotherapy Research*, 29, 141-143.
- 10- Daemi-Saeedabad, M., Falahati-Anbaran, M., Vivian-Smith, A., Shojaeiyan, A., & Stenøien, H.K. (2019). Novel microsatellite markers in *Heracleum* (Apiaceae) developed with ddRADseq reveal taxonomic significance in closely related species complex. submitted.
- 11- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- 12- Falahati-Anbaran, M., Mohammadi Bazargani, M., & Rohloff, J. (2018). Large scale geographical mapping of essential oil volatiles in *Heracleum* (Apiaceae): identification of novel compounds and unraveling cryptic variation. *Chemistry & Biodiversity*, 15, e1800230.
- 13- He, X., Pu, F. (1992). Pollen morphology of the genus *Heracleum* from South-Western China and its systematic significance. *Acta Botanica Yunnanica*, 12, 405-412.
- 14- He, X., Pu, F., Wang, Y., & Wang, L. (1995). Anatomical studies on petiole of *Heracleum* from China. *Bulletin of Botanical Research*, 15, 72-83.
- 15- He, X., Wang, Y., Pu, F., Wang, P. & Xu, J. (1998). Anatomical studies on fruit of the genus *Heracleum* from China and its revision of systematics. *Acta Botanica Yunnanica*, 20, 295-302.
- 16- Huelsenbech, J. P., Ronquist F. R. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- 17- Logacheva, M. D., Valiejo-Roman, C. M. & Pimenov, M.G. (2008). ITS phylogeny of West Asian *Heracleum* species and related taxa of Umbelliferae-Tordylieae WDJ Koch, with notes on evolution of their *psbA-trnH* sequences. *Plant Systematics and Evolution*, 270, 139-157.
- 18- Radjabian, T., Salimi, A. & Rahmani, N. (2014). Essential oil composition of the fruits of six *Heracleum* L. species from Iran: chemotaxonomic significance. *Chemistry and Biodiversity*, 11, 1945-1953.
- 19- Rambaut, A., Drummond, A.J. & Suchard, M. (2003-2013). MCMC Trace Analysis Package.
- 20- Rechinger, K. H. 1987. *Flora Iranica*, No. 162: Umbelliferae. Graz: Akademische Druck und Verlagsanstalt. 555 pages.
- 21- Rijal, D. P., Falahati-Anbaran, M., Alm, T., & Alsos, I. G. (2015). Microsatellite markers for *Heracleum persicum* (Apiaceae) and allied taxa: Application of next-generation sequencing to develop genetic resources for invasive species management. *Plant molecular biology reporter*, 33(5), 1381-1390.
- 22- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- 23- Shu. P., Chen. H., Yuan. C.Q., Zou. Q. G., & Sheh. M. L. (2001). Application of high-resonance pyrolysis-gas chromatography in the taxonomy of Peucedaneae Drude. *Journal of Plant Resources and Environment*, 10, 51-55.
- 24- Timme, R. E., Kuehl, J. V., Boore, J. L. & Jansen, R. K (2007). A comparative analysis of the *Lactuca* and *Helianthus* (Asteraceae) plastid genomes: identification of divergent regions and categorization of shared repeats. *American Journal of Botany*, 94, 302-313.

- 25- Yousefzadeh, H., Colagar, A. H., Yousefi, E., Badbar, M., & Kozłowski, G. (2019). Phylogenetic relationship and genetic differentiation of *Populus caspica* and *Populus alba* using cpDNA and ITS noncoding sequences. *Journal of Forestry Research*, 30(2), 451-461.
- 26- Yu, Y., Downie, S. R., He, X., Deng, X., & Yan, L. (2011). Phylogeny and biogeography of Chinese *Heracleum* (Apiaceae tribe Tordylieae) with comments on their fruit morphology. *Plant Systematics and Evolution*, 296, 179-203.

## Phylogenetic Relationships in the *Heracleum* sp. Species Complex from Iran by Using Nuclear Ribosomal DNA (ITS) and *rpl32-trnL*

Eidi M.,<sup>1</sup> Ebadi M.T.,<sup>1</sup> Falahati-Anbaran M.,<sup>2</sup> and Shojaeiyan A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Plant Sciences, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran.

### Abstract

Apiaceae is one of the largest plant families with worldwide distribution including 114 genera and 363 species in Iran. *Heracleum* (Golpar) consists more than 100 species that mainly occur in northern hemisphere, eight of them being reported in Iran including three endemic species. Based on taxonomic descriptions in Flora Iranica, the species reported within *Pubescentia* and *Wendia* sections have several morphological similarities, and display extensive geographical variation in taxonomic characters. The nuclear ITS and the chloroplast *rpl32-trnL* nucleotide sequences were used to evaluate the genetic relationships among different populations of *Heracleum* species. The Bayesian phylogenetic analysis showed that the genetic relationships inferred from nuclear and chloroplast regions were relatively similar, but a higher number of variable and parsimony informative sites were observed in ITS compared to that in *rpl32-trnL* region. The phylogenetic tree constructed with the combined sequences could separate the species associated with the different sections, but could not separate the species within each section. The results of this study indicate that the molecular data is in agreement with the morphological data reported in Flora Iranica to delimit species at section level. However various populations of the different species in each section, except *H. gorganicum* and a population of *H. anisactis*, could not be distinguished from the others. The result suggests that more work is required to clarify the taxonomic classification for the endemic Iranian species, including *H. anisactis* and *H. rechingeri*, as a separate species.

**Key words:** Species complex, Phylogenetic relationship, *Heracleum*, ITS, *rpl32-trnL*