فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۱ ص. ۳۶-۲۷

مقاله پژوهشی

مروری بر گونه‌های زالزالک غرب ایران با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و مارکر مولکولی

فرحناز نورایی[۱]، فریبا شریف نیا[۱*]، فهیمه سلیم پور[۱]، محمد معصومی[۲]

[۱] گروه زیست شناسی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، ایران

[۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): fa.sharifnia@gmail.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.3.7 DOI:10.30495/JDB.2023.699840

چکیده

جنس *Crataegus* L. از خانواده Rosaceae به دلیل کاربرد زیاد گونه‌های آن در طب سنتی و فضای سبز از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. این جنس از نظر تاکسونومیکی پیچیدگی‌های بسیار زیادی دارد و تاکنون طرح‌های زیادی برای طبقه‌بندی گونه‌های این جنس در بخش‌ها و یا زیرجنس‌ها ارائه شده است. در این بررسی صفات ریخت شناسی همراه با توالی‌های ناحیه ریبوزومی(ITS) DNA برای مطالعه روابط تبارزایی و همچنین تعیین مرز گونه در این جنس مورد استفاده قرار گرفتند. در مطالعات ریخت‌شناسی تعداد ۴۳ صفت (۱۴ صفت کمی و ۲۹ صفت کیفی) از اندام‌های رویشی و زایشی ۱۴ گونه از این جنس بررسی شدند و داده‌های حاصل با نرم‌افزارهای تخصصی نظیر PAST و SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در بررسی‌های فیلوژنی، ژنوم هسته‌ای ۱۴ گونه بوسیله کیت استخراج DNA (MBST) استخراج گردید و توالی DNA آنها همراه با توالی ITS تعداد ۱۹ گونه غیر ایرانی این جنس که از سایت NCBI استخراج شده بود توسط نرم‌افزارهای آماری PAUP و *Figtree* بر اساس روش Maximum Parsimony (MP) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. گرچه طبقه‌بندی گونه‌ها بر اساس روش ماکزیموم پارسیمونی با مونوگراف ارائه شده توسط کریسینسن مطابقت داشت اما این نتایج طرح‌های ارائه شده برای طبقه‌بندی گونه‌ها در فلور ایران را تایید نکرد.

کلیدواژه‌ها: *Crataegus*، تاکسونومی، ریخت شناسی، تبارزایی

مقدمه

جنس *Crataegus* L. متعلق به خانواده Rosaceae است که از درختچه‌ها و درختان مختلفی تشکیل شده است [۱]. این جنس با بیش از ۲۵۰ تاکسون بزرگترین جنس در قبیله Pyreae است [۲] که گونه‌های آن به طور طبیعی در مناطق گرمسیر نیمکره شمالی یافت می‌شوند [۳].

گیاهشناسان بسیار زیادی روی تاکسونومی این جنس کار کرده اند که نتیجه آن، منجر به تعریف بخش‌ها، زیربخش‌ها و سری‌های متفاوت برای طبقه‌بندی گونه‌های این جنس شده است [۵].

گرچه بررسی‌های تاکسونومیک زیادی روی گونه‌های این جنس صورت پذیرفته است ولی هنوز پیچیدگی‌های

تاکسونومیکی زیادی در این جنس وجود دارد که موجب مخدوش شدن مرز گونه‌ها و همچنین شناسایی گونه‌های آن شده است [۶].

گونه‌های زیادی از این جنس به دلیل استفاده در طب سنتی [۷] و فضای سبز [۸] اهمیت اقتصادی چشمگیری دارند. همچنین، میوه‌های تعدادی از گونه‌های این جنس توسط انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲].

بحث‌های زیادی راجع به شمار گونه‌های *Crataegus* در ایران وجود دارد. در این راستا، بواسیه (۱۸۷۲) در فلور اورینتالس و ریدل (۱۹۶۹) در فلور ایرانیکا به ترتیب تعداد ۱۳ و ۱۷ گونه را برای این جنس در ایران نام برده اند. در آخرین بررسی جامع روی این جنس در ایران، خاتمساز (۱۹۹۲) تعداد ۲۷ گونه را برای ایران گزارش نموده اند که ۵ گونه از آنها هیبرید، ۴ گونه بومی و ۴ گونه در معرض خطر انقراض می‌باشند [۱۱].

از نقطه نظر تاکسونومیکی، تمامی گونه‌های ایرانی این جنس به بخش *Crataegus* متعلق هستند که در ۵ سری به اسامی *Crataegus*, *Orientales*, *Pentagyna*, *Microphyllae* و *Erianthae* طبقه‌بندی می‌شوند.

طی سالیان اخیر، مطالعات اندک و پراکنده‌ای راجع به تاکسونومی این جنس در کشور ایران صورت پذیرفته که نتایج حاصل از آنها در تطابق با الگوی طراحی شده توسط کریستینسن (۱۹۹۲) در خصوص طبقه‌بندی گونه‌های این جنس می‌باشد. برای مثال ارجمندی و همکاران (۲۰۰۹) خصوصیات ریخت شناسی و فیتوشیمیایی شماری از گونه‌های این جنس را بررسی کردند. نتایج بررسی‌های فیتوشیمیایی در خصوص ترکیبات فلاونوئیدی این گونه‌ها موید طرح طبقه‌بندی کریستینسن (۱۹۹۲) بود.

مطالعات پیشین [۱۴ و ۱۵] نشان داده‌اند که نواحی ژنومی ITSکه دربرگیرنده DNA ریبوزومی قطعه 5.8S و دوناحیه ITS1,2 است مجموعه‌ای منحصر به فرد از داده‌ها ژنومی را فراهم می‌کند که در طبقه‌بندی گونه‌های مربوط به جنس‌های مختلف خانواده Rosaceae بسیار کارآمد هستند. برای مثال: علیرضالو و همکاران (۲۰۱۸) مطالعه‌ای تبارزایی بر اساس توالی ITS روی گونه‌های این جنس انجام دادند که نتایج مطالعات آنها موید کارآیی فوق العاده توالی‌های ژنوم هسته‌ای در تشخیص و طبقه‌بندی گونه‌ها در این جنس است. در این بررسی ما از خصوصیات ریخت شناسی و داده‌های حاصل از توالی نواحی ITS مرتبط با ژنوم ریبوزومی استفاده کردیم. اهداف این مطالعه به شرح ذیل می‌باشد: (۱) تعیین متغییرترین صفات ریخت شناسی که دارای ارزش تاکسونومیک هستند، (۲) تعیین روابط تبارزایی بین گونه‌های ایرانی و غیر ایرانی این جنس(۳) مقایسه طرح‌های طبقه‌بندی گونه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی و دادهای توالی ژنومی و (۴) تعیین مرز و کمک به شناسایی بهتر شماری از گونه‌ها.

مواد و روش‌ها

– نمونه‌های گیاهی

نمونه‌های گیاهی مرتبط با ۱۴ گونه از جنس *Crataegus* از نقاط مختلف کشور ایران جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس شرح‌های گیاهی و کلیدهای شناسایی موجود در فلور ایران [۱۰] و فلور ایرانیکا [۴] شناسایی شدند. همه نمونه‌های جمع‌آوری شده از کشور ایران متعلق به سری‌های مختلف بخش *Crataegus* است. نمونه‌های هرباریومی گونه‌های جمع‌آوری شده در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال (IAUNT) نگهداری می‌شوند (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات زیستگاهی و هرباریومی تاکسون‌های مورد استفاده

شماره هرباریومی	آدرس محل جمع آوری	نام تاکسون
IAUNT- 17402	ایران، استان کردستان، جاده سنندج به بانه، ۱۶۰۰ متر	*C. sakeranensis* Hadac & Chrtek.
IAUNT-17391	ایران، استان کردستان، جاده سنندج به بانه، ۱۷۰۰ متر	*C. rhipidophylla* Gand. var. *rhipidophylla*
IAUNT-17394	ایران، استان کردستان، جاده پیرانشهر به سردشت، ۱۷۰۰ متر	*C. monogyna* Jacquin var. *monogyna*
IAUNT- 17417	ایران، استان کردستان، جاده پیرانشهر به سردشت، ۱۴۰۰ متر	*C. songarica* C. Koch.
IAUNT- 17399	ایران، استان آذربایجان غربی، قاسملو، ۱۳۷۶ متر	*C. psedoheterophylla* Pojark.

شماره هرباریومی	آدرس محل جمع آوری	نام تاکسون
IAUNT-17396	ایران، استان کردستان، جاده پیرانشهر به سردشت، ۱۵۴۰ متر	C. *ambigua* Meyer ex Becker subsp. *ambigua*
IAUNT- 17392	ایران، استان کردستان، جاده سنندج به بانه، ۱۵۵۰ متر	*C. atrosanguinea* Pojark.
IAUNT- 17403	ایران، استان کردستان، جاده پیرانشهر به سردشت، ۱۴۰۰ متر	*C. meyeri* Pojark.
IAUNT- 17416	ایران، استان کردستان، جاده پیرانشهر به سردشت، ۱۷۰۰ متر	*C. persica* Pojark.
IAUNT-17395	ایران، استان کرمانشاه، ۲ کیلومتری پاوه، ۱۹۰۰ متر	*C. zarrei* Dönmez
IAUNT- 17393	ایران، استان ایلام، ایوان غرب، کوهپایه، ۱۳۰۰ متر	*C. azarolus* var. *aronia* L.
IAUNT- 17398	ایران، استان کرمانشاه، دالاهو، ۱۹۰۰ روستای بیوانج، ۱۵۰۰ متر	*C. azarolus var. pontica* (Koch) K.I. Christensen
IAUNT-17404	ایران، استان کردستان، جاده پیرانشهر به سردشت، ۱۵۰۰ متر	*C. assadi* Khatamsaz
IAUNT-17390	ایران، استان آذربایجان غربی، اشنویه، میرآباد ۱۵۵۰ متر	C. *kurdistanica* Hadac & Chrtek.
IAUNT-17397	ایران، استان آذربایجان غربی، قاسملو، ۱۶۵۰ متر	*C. orientalis* Pall. ex Bieb. Subsp. *szovitsii* (Pojark.) Christensen
2003-35-03	USA, Arkansas, Prairie	*Mespilus canescens* Phipps *
Zika18472	USA, Washington, San Juan	*C. laevigata* (Poir.) DC.
2000-11	USA, Texas, Jasper	*C. brachyacantha* Sarg. & Engelm *
2003-6	USA, Georgia, Floyd	*C. spathulata* Michx.*
99ME1 (Cult.)	USA, Maine, Penobscot	*C. phaenopyrum* (L. f.) Medikus*
2003-05	USA, Alabama, Dekalb	*C. marshallii* Eggles.*
JBM1232-49(Cult.)	Canada, Jardin Botanique De Montréal, Montréal, Québec	*C. sanguinea* Pall. ex Bieb. *
AA281-71A (Cult.)	USA, Arnold Arboretum, Boston, Massachusetts	*C. chloroscara* Maxim. *
Christensen 294(Cult.)	Denmark, Taastrup	*C. nigra* Waldst. & Kit. *
AA271-84A (Cult.)	Arnold Arboretum, Boston, Massachusetts	*C. wilsonii* Sarg. *
D1619A	USA, Montana, Powell	*C. suksdorfii* (Sarg.) Kruschke *
2001-4A	USA, Colorado, Gunnison	*C. saligna* Greene *
2003-44	USA, Arkansas, Prairie	*C. viridis* L. *
Talent 213A	USA, Alabama, Montgomery	*C. crus-galli* L*
NC1992-250(Cult.)	USA, North Carolina, Arboretum, Asheville, North Carolina	*C. aestivalis* (Walter) T. & G. *
Talent 290a	USA, Georgia, Floyd	*C. triflora* Chapm. *
2003-18	USA, Alabama, Dallas	*C. lassa* Beadle. *
2003-26	USA, Alabama-Autauga	*C. uniflora* Münchh*
AA356-81B (Cult.)	USA, Arnold Arboretum, Boston, Massachusetts	*C. hupehensis* Sarg.*

– بررسی‌های ریخت‌شناسی

صفات ریخت شناسی درختان و درختچه‌های جمع آوری شده این جنس مورد مطالعه قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۴۳ صفت ریخت شناسی دربرگیرنده ۱۴ صفت کمی و کیفی اندام‌های رویشی و زایشی مورد ارزیابی قرار گرفتند. اغلب صفات ریخت شناسی کیفی دارای دو شکل (حالت) بودند که به صورت دوحالتی (۰ و۱) کد گزاری شدند. با این وجود شمار اندکی از خصوصیات ریخت شناسی کیفی به سه شکل مشاهده شدند که به صورت سه حالتی (۰ و ۱و۲) کد گذاری گردیدند.

برای هر صفت ۴ تکرار در نظر گرفته شد. برای توصیف صفات کیفی از واژه‌شناسی اشترن (۱۹۹۲) استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS ver.15 برای تجزیه و تحلیل صفات ریخت شناسی کمی استفاده شد که در این راستا میانگین و انحراف استاندارد صفات محاسبه شدند. سپس همه صفات ریخت‌شناسی مورد مطالعه استاندارد شده و برای ترسیم نمودارهای PCA و PCA-biplot توسط نرم‌افزار PAST مورد استفاده قرار گرفتند.

– استخراج ژنوم هسته‌ای و تعیین توالی

نمونه‌های برگ تازه جدا شده از ۱۴ گونه *Crataegus* تا زمان استخراج ژنوم هسته‌ای در سیلیکاژل نگهداری شدند. برای استخراج DNA از کیت استخراج MBST استفاده شد. برای

انجام فرایند PCR ژنوم استخراج شده، از ویال هایی به حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده شد که محتوی: نمونه ۴ میکرولیتر DNA الگو، ماستر میکس ۱۲ میکرولیتر ، ۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۲ میکرولیتر پرایمر و ۰/۵ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) بودند . محصولات حاصل از PCR روی یک ژل آگار به غلظت ۰/۱ گرم کروماتوگرافی شدند. خاص سازی و توالی یابی محصولات PCR توسط شرکت Sectech انجام شد (جدول ۲).

– آنالیزهای تبارشناسی

توالی ITS ۳۳ تاکسون از جنس *Crataegus* همراه با Mespilus canescens Phipps (به عنوان گروه خواهری) برای بررسی‌های تبارشناسی مورد استفاده قرار گرفتند. توالی‌یابی تاکسون‌های ایرانی (۱۴ تاکسون) بوسیله نرم‌افزار Sequencer 4.1.4 انجام شد و توالی تاکسون‌های غیر ایرانی از بانک ژن استخراج شد (جدول ۱). ما از روش ماکزیموم پارسیمونی توسط نرم‌افزارهای PAUP و *Figtree* برای آنالیز دادها و رسم درختچه استفاده کردیم.

نتایج

– بررسی‌های ریخت‌شناسی

شماری از مهمترین صفات ریخت شناسی مورد بررسی در جدول ۳ به طور خلاصه ارائه شده اند . صفات کمی و کیفی ریخت شناسی در بین گونه‌های مورد مطالعه متغیر بودند. آنالیز PCA صفات مورد مطالعه را به پنج گروه اصلی تقسیم نمود که حدود ۸۰% تغییرات در صفات ریخت شناسی را در بر می‌گرفتند. در این میان، نخستین گروه بیش از ۳۰% تغییرات را شامل می‌شد(جدول ۴). بر اساس آنالیز PCA (شکل ۱)، شکل فرم رویشی، نوع پوشش کرکی شاخه‌ها، شکل کلی و قاعده میوه‌ها متغیرترین صفات ریخت شناسی بودند. فرم رویشی گونه‌های مورد مطالعه به شکل درختچه‌هایی با ساقه‌های متعدد تا درختی بود. در اغلب گونه‌های مورد مطالعه هر دو شکل رویشی مشاهده شد اما در شماری از گونه فرم رویشی فقط به شکل درخت (*C. azarolus* var. *aronia, C. azarolus* var. *pontica*, **C. atrosanguinea,** *C. zarrei C. assadi*) بود.

سطح شاخه‌ها دارای پوشش کرکی به اشکال بسیار کم کرک (*C. atrosanguinea*, *C. psedoheterophylla*, *C. monogyna* و *C. rhipidophylla*)، دارای کرک‌های پراکنده (*C. songarica*, *C. ambigua*, *C. sakeranensis*) و (*C. kurdistanica*) و یا متراکم (بقیه تاکسون ها) بود.

میوه در تاکسون‌های مورد مطالعه به صورت پومه(سیبی) به اشکال کم و بیش دایره‌ای تا بیضی شکل بود. شکل قاعده میوه در بین تاکسون‌ها متفاوت بوده و به اشکال: گوشه‌دار (C. sakeanensis, *C. psedoheterophylla*, C. ambigua)، گرد (**C.** atrosanguinea, *C. kurdistanica*, *C. meyeri*, *C. orientalis*, *C. assadi*, *C. rhipidophylla*, *C. monogyna C. songarica*) و یا هردو شکل باهم (بقیه تاکسون‌ها) مشاهده شد.

آنالیز PCA-biplot نشان داد گونه‌های مورد مطالعه دارای صفات شاخص ریخت‌شناسی هستند که توسط آنها متمایز شده و شناسایی می‌شوند. برای مثال: شکل کاسبرگ‌ها و نوع پوشش کرکی شاخه‌ها صفات متمایز برای گونه‌های *C. songarica* و *C. sakeanensis* بودند. همچنین گونه *C. atrosanguinea* بر اساس صفاتی مانند شکل پوشش کرکی هیپانتیوم و تعداد دانه‌ها در هر میوه از بقیه گونه‌ها متمایز می‌شود. تعدادی از گونه‌ها (*C. azarolus* var. *pontica*, *C. azarolus* var. *aronia*, *C. zarrei*، *C. assadi*) به صورت یک گروه قرار داشتند که بر پایه خصوصیاتی مانند شکل قاعده میوه، تعداد خامه، نوع پوشش کرکی گل آذین و حضور یا عدم حضور گوشوارک در شاخه‌ها از سایرین متمایز می‌شوند (شکل ۲).

جدول ۲. نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه تبارشناختی

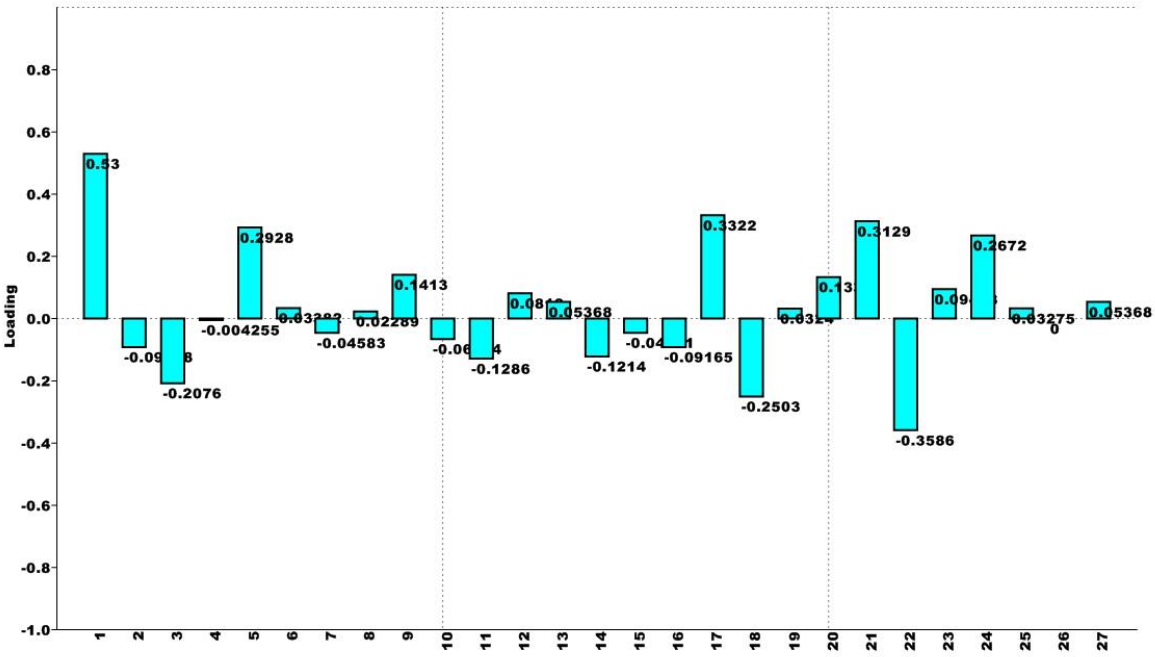
نام پرایمر	توالی پرایمر	منبع
18S	5'-CCTTMTCATYTAGAGGAAGGAG-3'	Muir & Schlotterer 1999
28S	5'-CCGCTTATTKATATGCTTAAA-3'	Muir & Schlotterer 1999

جدول ۳. شماری از مهمترین صفات ریخت شناسی مورد مطالعه

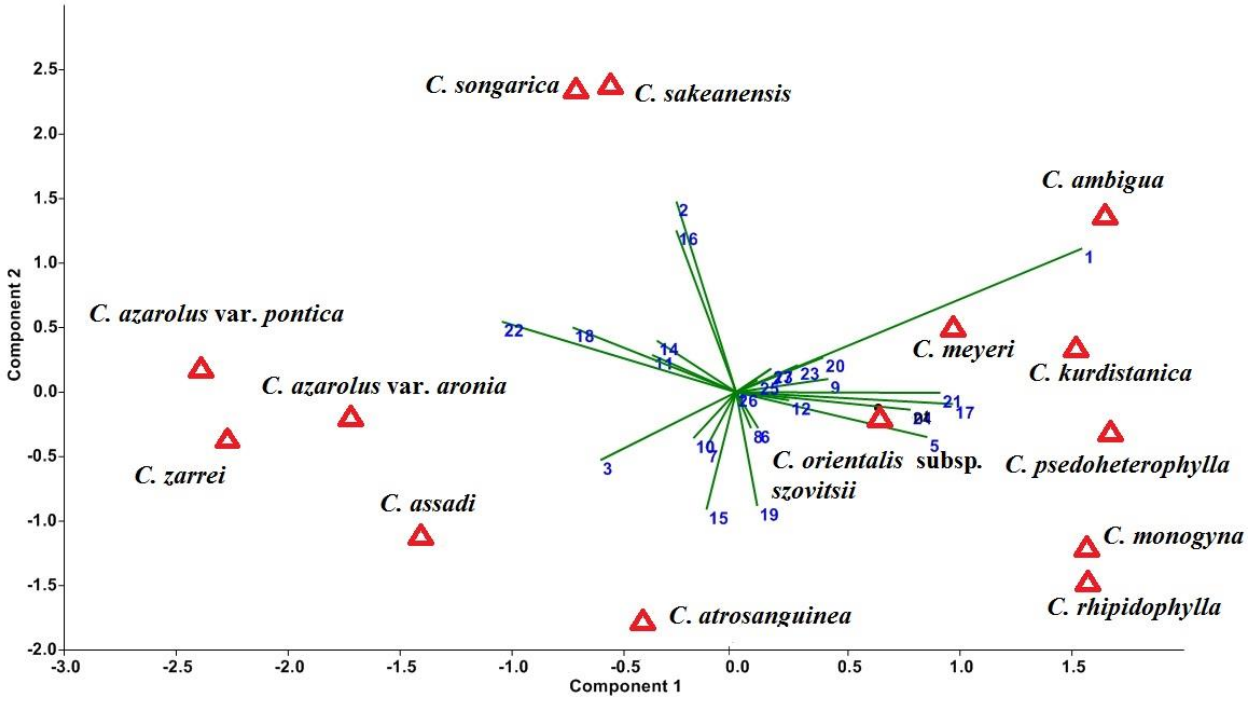
نام تاکسون	فرم رویشی	شکل قاعده برگ	شکل گل آذین	شکل حاشیه کاسبرگ	تعداد خامه	تعداد دانه	رنگ میوه	شکل میوه	شکل قاعده میوه
C. songarica	درخت-درختچه	گوه ای	سست	دندانه دار	3-5	1-3	قرمز	گرد	زاویه دار
C. ambigua	درخت-درختچه	گوه ای	فشرده	دندانه دار	1-3	1-3	بنفش تیره	گرد-مستطیل	زاویه دار
C. atrosanguinea	درختی	گوه ای- بریده	سست	دندانه دار	1-3	1	قرمز	گرد	صاف
C. psedoheterophylla	درخت-درختچه	گوه ای- بریده	سست	کامل- دندانه دار	1-3	1	بنفش تیره	گرد-مستطیل	زاویه دار
C. monogyna	درخت-درختچه	گوه ای	سست	کامل- دندانه دار	1-3	1	قرمز	بیضی	صاف
C. rhipidophylla	درخت-درختچه	گوه ای	سست	کامل- دندانه دار	1-3	1	قرمز	بیضی	صاف
C. assadi	درختی	گوه ای	سست	کامل	1-3	1	قرمز	گرد	صاف
C. zarrei	درختی	گوه ای	سست	کامل	3-5	1	قرمز	گرد	صاف یا زاویه دار
C. *sakeanensis*	درخت-درختچه	گوه ای	سست	دندانه دار	3-5	1-3	قرمز	گرد	زاویه دار
C. azarolus var. *pontica*	درختی	گوه ای	سست	کامل	3-5	1-3	قرمز	گرد	صاف یا زاویه دار
C. azarolus var. *aronia*	درختی	گوه ای	سست	دندانه دار	3-5	1	قرمز	گرد	صاف یا زاویه‌دار
C. orientalis	درخت-درختچه	گوه ای	سست	کامل	1-3	1	قرمز	گرد	صاف
C. meyeri	درخت-درختچه	گوه ای	سست	دندانه‌دار	1-3	1-3	بنفش تیره	گرد	صاف
C. kurdistanica	درخت-درختچه	گوه ای	سست	دندانه‌دار	1-3	1	قرمز	گرد	صاف

جدول ۴. آنالیز PCA صفات ریخت شناسی کمی گونه های مورد مطالعه

Principal components		
Component	Eigenvalue	% variance
1	2.39635	30.266
2	1.58812	20.058
3	0.898903	11.353
4	0.892295	10.891
5	0.552723	6.981
6	0.474311	5.9906
7	0.422828	5.3404
8	0.285597	3.6071
9	0.180111	2.2748
10	0.107002	1.3514
11	0.0935587	1.1817
12	0.0557898	0.70463



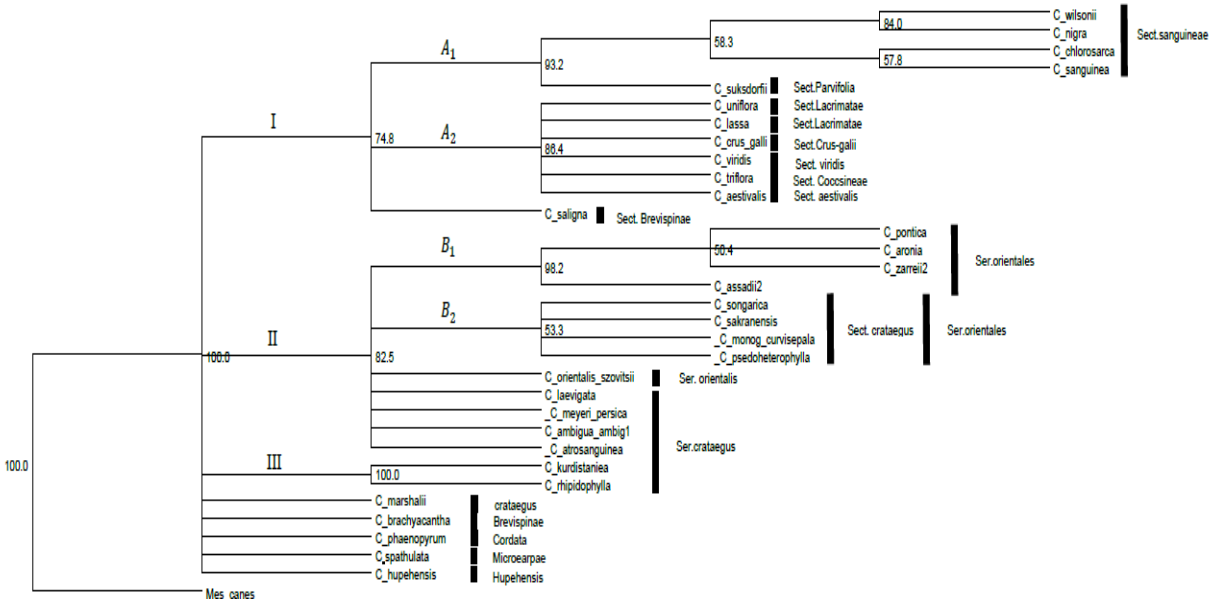
شکل ۱. آنالیز PCA-Loading صفات ریخت شناسی مورد مطالعه



شکل ۲. نمودار PCA-BIPLOT تاکسون‌های مورد مطالعه و صفات ریخت شناسی(اعداد نشانگر صفات ریخت شناسی مورد مطالعه می‌باشند).

– بررسی‌های تبارشناختی

در درخت تبارشناختی که به روش ماکزیموم پارسیمونی رسم گردیده است گونه *M. canescens* به عنوان گروه خواهری گونه‌های جنس *Crataegus*قرار گرفته و سایر گونه‌ها با تاییدیه بوتستراپ ۱۰۰% در یک خوشه بزرگ جای گرفت‌اند. این خوشه بزرگ به سه گروه اصلی (I,II,III) همراه با شماری گونه مستقل *C. hupehensis* (China) *C. spathulata* (section *Microcarpa*), *C. phaenopyrum* (section *Cordata*), *C.* marshallii (section *Crataegus*) and *C.* brachyacantha (section *Brevispinae*) تقسیم می‌شود. تاکسون‌های گروه I در دو زیر گروه قرار می‌گیرند. در گروه II گونه‌های مربوط به دنیای قدیم بخش *Crataegus* قرار گرفته اند که به دو زیر گروه و شماری گونه مستقل تقسیم می‌شود(با تاییدیه بوتستراپ ۸۲/۵%). در گروه III دو تاکسون *C. rhipidophylla* var. *rhipidophylla* و *C. kurdistanica* قرار گرفتند(برای مشاهده جزئیات به شکل ۳ مراجعه شود).



شکل ۳. کلادوگرام فیلوژنی گونه های مورد مطالعه بر اساس روش ماکزیموم پارسیمونی

بحث

در این مطالعه، ما از صفات ریخت‌شناسی و داده‌های تبار زایی حاصل از تکنیک ITS برای بررسی روابط تکاملی بین گونه‌های ایرانی و غیرایرانی جنس *Crataegus* استفاده کردیم. بررسی تاکسونومیک گونه‌های اروپایی جنس *Crataegus* نشان داد خصوصیات ریخت شناسی اندام‌های رویشی (برگ) و زایشی (گل و میوه)دارای ارزش تاکسونومیک فوق العاده زیاد هستند. اهمیت صفات ریخت شناسی برگ‌ها مانند: ابعاد و شکل برگ‌ها، پراکنش و تراکم کرک‌ها، شکل و تعداد لوب‌های برگ‌ها، عمق نسبی لوب‌های برگ، شکل رگبندی، شکل حاشیه برگ‌ها و طول دمبرگ‌ها در کلیدهای شناسایی جنس *Crataegus* توسط فرانکو (۱۹۶۸) به روشنی تبین شده‌اند.

همچنین این صفات برای نشان دادن میزان نفوذ ژنتیکی هر یک از والدین در گونه‌های هیبرید مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۸].

مطالعه پیشین خاطر نشان کرد که اطلاعات حاصل از بررسی‌های تنوع ژنتیکی یا تبارزایی‌دارای پتانسیل کافی جهت بهبود طبقه‌بندی درون جنس *Crataegus* می‌باشد [۱].

در کلادوگرام تبارزایی بر اساس روش ماکزیموم پارسیمونی، گونه *M.* canescens ***به عنوان*** گروه خواهری برای گونه‌های جنس *Crataegus* تعیین گردید. همچنین تک نیایی جنس *Crataegus* با درصد بالایی از شاخص بوتستراپ به تایید رسید. با این وجود شماری از گروه‌های ایجاد شده در این جنس‌دارای تاییدیه بوتستراپ پایینی بودند. علت این مسئله تغییرپذیری پایین

نواحی ITS در این جنس می‌باشد که ناشی از تکامل جزئی در جنس *Crataegus* می‌باشد. همچنین، رحمانی و همکاران (۲۰۱۵) تنوع ژنتیکی موجود بین تعدادی از گونه‌های این جنس را بررسی کرده و نرخ بالایی از جریان ژنی را گزارش نمودند که موجب تنوع ژنتیکی اندک بین گونه‌ها شده است.

لو و همکاران (۲۰۰۷) مطالعه تبار زایی بین گونه‌های دو جنس *Mespilus*و Crataegus را بر اساس داده‌های حاصل از توالی ITS و ژن‌های کلروپلاستی trnS-trnG, psbA-trnH, trnH-rpl2, and rpl20-rps12 انجام دادند. نتایج حاصل از همه کلادوگرام‌ها نشان از روابط خواهری این دو جنس داشت.

در کلادوگرام حاصل از داده‌های مولکولی، تاکسون‌های مورد مطالعه از این جنس در سه گروه همراه با تعدادی گونه مستقل طبقه‌بندی شدند که این موضوع نشان از سطح بالای تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها می‌باشد. این یافته‌ها موافق با نتایج بررسی امامی و همکاران (۲۰۱۸) بود که تنوع و ساختار ژنتیکی گونه‌های ایرانی جنس *Cratagus* را با مارکرهای مولکولی تنوع ژنتیکی نظیر ISSR و SCoT مطالعه کردند. ایشان سه خوشه اصلی همراه با شماری خوشه فرعی در این جنس مشاهده کردند که حاکی از وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های مورد مطالعه بود.

گونه‌های *C. azarolus* var. ،*C. assadi*, *C. zarrei*, *pontica* و *C. azarolus* var. *aronia* در یک خوشه با تاییدیه بوتستراپ بالا قرار گرفتند. همچنین شواهد ریخت شناسی نشان می‌دهد که همه این گونه‌ها باید به عنوان واریته‌های مختلفی از گونه *C. azarolus* معرفی شوند.

این یافته‌ها در تطابق با نتایج حاصل از تحقیقات کریستینسن و زیلینسکی (2008) بود که بیان نمودند گونه‌های *C. aronia*, *C. pontica* و *C. assadi* باید همگی به عنوان سه واریته از *C. azarolus* در نظر گرفته شوند. بعلاوه در آخرین کار فیلوژنتیکی روی این گونه [۱۵] دو واریته *C. azarolus* var. *pontica* و *C. azarolus* var. *aronia* نزدیک به هم در یک خوشه قرار گرفتند.

گونه *C. zarrei* که توسط دومنز)۲۰۰۴) به عنوان گونه‌ای جدید برای کشور ایران گزارش شده است از لحاظ ساختار ژنتیکی بسیار نزدیک به گونه *C. azarolus* بوده و حتی به نظر می‌رسد که واریته‌ای از این گونه باشد. همه این گونه‌ها متعلق به سری *Orientalis* هستند. شباهت این گونه‌ها بوسیله شماری از صفات ریخت شناسی مانند تعداد دانه در هر میوه، اندازه و شکل کلی و قاعده میوه، فرم رویشی، تعداد لوب‌های برگ، نوع پوشش کرکی شاخه‌های گل دهنده و موقعیت تیغ‌های پوستی به اثبات رسیده است. در این راستا، دو و همکاران (۲۰۱۹) بیان نمودند که خصوصیات ریخت شناسی میوه و برگ در طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Crataegus*حائز اهمیت فوق العاده‌ای هستند.

خاتمساز (۱۹۹۲) در فلور ایران *C. sanguinea* (جمع‌آوری شده از ارتفاع ۲۲۰۰ متری منطقه سیاه بیشه) را به عنوان گونه‌ای جدید برای کشور ایران معرفی می‌کند. ما با مراجعه به این منطقه نتوانستیم گونه مورد نظر را مشاهده کنیم. بنابراین به نظر می‌رسد این گزارش بر مبنای شناسایی نادرست پایه هایی از گونه *C. meyeri* اتفاق افتاده که به فراوانی در این منطقه می‌رویند.

ما تغییرات ریخت شناسی زیادی (نظیر تعداد دانه‌ها در میوه، شکل و اندازه میوه، شکل پوشش کرکی برگ و شاخه) در بین جمعیت‌ها و افراد گونه *C. meyeri* مشاهده کردیم که در طول شیب‌های محیطی رخ می‌دهند. نتایج مشابهی توسط علیرضالو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شد که تنوع ژنتیکی زیادی بین جمعیت‌های این گونه مشاهده کردند. به این دلیل، *C. meyeri* را گونه‌ای با درجه تغییرپذیری بالا معرفی کرده و گیاه شناسان مختلف جمعیت‌های این گونه را به عنوان گونه‌های جدیدی معرفی کرده اند.

بررسی صفات ریخت‌شناسی و نتایج حاصل از مطالعه تبارشناسی نشان داد که دو گونه *C. meyeri* و C. ambigua **د*ارای* تفاوت‌های چشمگیری بوده و باید به عنوان دو گونه مستقل در نظر گرفته شوند. این یافته در تطابق با نظر کریستینسن (۱۹۹۲) بود ولی خاتمساز (۱۹۹۲) و ریدل (۱۹۶۹) معتقد هستند که این دو گونه در حقیقت یک گونه واحد بوده و باید به صورت سینونیم (مترادف) تعریف شوند.

شباهت موجود بین دو گونه *C. meyeri* و *C. persica* در شماری از صفات ریخت شناسی مانند رنگ میوه، اندازه و تعداد دانه‌ها در میوه نشان می‌دهد این گونه‌ها بسیار به هم نزدیک هستند و باید به عنوان یک گونه واحد در نظر گرفته شوند. این

یافته‌ها توسط داده‌های حاصل از توالی‌های ناحیه ITS مورد تایید واقع شده اند و نتایج این مطالعه در تطابق با نظریات کریستینسن (1992) است. اما خاتمساز (۱۹۹۲) معتقد است این گونه‌ها بر اساس رنگ میوه‌ها متمایز می‌گردند. به این منظور ما رنگ میوه را در گونه *C. meyeri* مورد مطالعه قرار دادیم و مشخص شد رنگ میوه رسیده و تازه قرمز بوده ولی بعد از جمع آوری تیره رنگ می‌شود. بنابراین ما نتیجه گیری کردیم که نمونه‌هایی که به عنوان گونه *C. persica* از نواحی غرب کشور ایران جمع آوری شده اند باید به عنوان جمعیتی از گونه *C. meyeri* تلقی شوند. همچنین، در بررسی‌های پیشین، گونه *C. persica* همراه با شماری از جمعیت‌های گونه *C. meyeri* قرار گرفتند.

نتایج مشابهی توسط دومنز (۲۰۰۴) ارائه شده که معتقد است به دلیل وقوع فرایند هایی مانند آپومیکسی و هیبریداسیون، جنس *Crataegus* دارای سطح بالایی از تنوعات ریخت‌شناسی در بین جمعیت‌ها است. بنابراین، بسیاری از تاکسون‌هایی که سابقا در این جنس معرفی شده‌اند باید به صورت سینونیم (مترادف) در نظر گرفته شوند.

دومنز (۲۰۰۴) بر این باور است که چندین گونه از این جنس به صورت پلی‌پلوئید هستند. در واقع ارتباط‌های معنی‌داری بین سطح پلی‌پلوئیدی و فاکتورهای مختلف اکولوژیکی زیستگاه (مانند ارتفاع محل رویش، اقلیم و عرض جغرافیایی)، صفات مختلف ریخت‌شناسی (نظیر شکل رویشی)،سیستم تولید مثلی، هیبرید شدن و خصوصیات سیتولوژیکی مانند ساختار ژنتیکی، اندازه سلول‌ها و مکانیسم کروموزوم‌های جنسی وجود دارند [۲۳].

یافته‌های حاصل از بررسی‌های ریخت شناسی و تبارزایی نشان داد که گونه‌های *C. sakeranensis* و *C. songarica* دارای شباهت‌های بسیاری هستند.در واقع گونه *C. songarica* متعلق به سری *Crataegus* است. در درخت تبار زایی گونه *C. sakeranensis* همراه با شماری از گونه‌های بخش *Crataegus* نظیر *C. songarica*، *C. monogyna* و *C. psedoheterophylla* قرار گرفت. بنابراین به نظر می‌رسد قرار گرفتن گونه *C. sakeranensis* در بخش *Sanguineae* مطابق با فلور ایران [۱۰] صحیح نیست. ما معتقد هستیم که این گونه باید به عنوان بخشی از سری *Crataegus* در نظر گرفته شود. البته برای اخذ تصمیم نهایی باید نمونه‌های هرباریومی گونه *C. sakeranensis* که توسط Khatamsaz در سال ۱۹۹۲ مطالعه شده اند مورد مطالعه قرار گیرند.

References

[1] Du X., Zhang X., Bu H., Zhang T., Lao Y., Dong W. Molecular analysis of evolution and origins of cultivated hawthorn (*Crataegus* spp.) and related species in China. *Front. Plant Sci.* 2019: 10:443. DOI:10.3389/fpls.2019.00443.

[2] Campbell CS., Evans RC., Morgan DR., Dickinson TA., Arsenault MP. Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): limited resolution of a complex evolutionary history. Plant Syst. Evol. 2007: 266:119–145 DOI: 10.1007/s00606-007-0545-y.

[3] Phipps J.B., O'Kennon R.J., Lance R.W. Hawthorns and medlars. Royal horticultural society plant collector guide. Timber Press, 2003.Portland.

[4] Riedl H. *Cotoneaster* Medik. In*:* Rechinger KH. (Ed.) Flora Iranica, 1969; no. 66. Graz, pp. 13–26.

[5] Roemer M.J. Familiarum naturalium regni vegetabilis synopses monographicae, III, Rosiflorae. 1847;Weimar.

[6] Donmez A.A. The Genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with Special Reference to Hybridisation and Biodiversity in Turkey. *Turk. J. Bot.* 2004; 28:29–37 DOI:10.1111/j.10 95-8339.2007.00682.x

[7] Chen CY., Li H., Yuan YN., Dai HQ., Yang B. Antioxidant activity and components of a traditional Chinese medicine formula consisting of *Crataegus pinnatifida* and *Salvia miltiorrhiza*. BMC Complement Altern Med. 2013; 13:99. DOI: 10.1186/1472-6882-13-99.

[8] Brown JA., Beatty GE., Finlay CMV., Montgomery WI., Tosh DG., Provan J. Genetic analyses reveal high levels of seed and pollen flow in hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), a key component of hedgerows. *Tree Genet. Genomes.* 2016; 12, 3: (58). DOI: 10.1007/s11295-016-1020-0.

[9] Boissier E. Flora Orientalis, H. Georg in Basileae, 1872.

[10] Khatamsaz M. 1992. *Cotoneaster* Medik. In: Assadi M. (ed.) Flora of Iran, no. 6. Research institute of forests and rangelands [in Persian].

[11] Jalili A., Jamzad Z. Red Data Book of Iran. Research Institute of Forest & Rangelands,1999, Tehran

[12] Christensen KI. 1992. Revision of *Crataegus* section *Crataegus* and Nothosect.

Crataeguineae (Rosaceae-Maloideae) in the Old World. *Syst. Bot. Monogr*. 35: 1–199.

[13] Arjmandi A., Nazeri V., Ejtehadi H., Joharchi M. Revision of the genus *Crataegus* in the East and Northeast of Iran. *Rostaniha* 2009; 10(1):1–36.

[14] Xiang Y., Huang C.H., Hu Y., Wen J., Li S., Yi T., Chen H., Xiang J., Ma H. Evolution of Rosaceae fruit types based on nuclear phylogeny in the context of geological times and genome duplication. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 34(2) DOI:10.1093/molbev/msw242

[16] Stearn W.T. Botanical Latin: history, grammar, syntax, terminology and vocabulary (4th ed.). Timber Press. 1992; Portland, Oregon

[15] Alirezalu A., Ahmadi N., Salehi P., Sonboli A. Genetic variation in *Crataegus* accessions based on internal transcribed spacer sequences of nuclear DNA. *Pomology Research* 2018; 3(1):67–75.

[17] Franco J. *Crataegus* L. In: *Flora Europeae*, 2nd ed. Vol. 2. Eds. Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.M., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., Cambridge: Cambridge University Press;1968; p.73-77

[18] Gosler AG., Kelly CK., Blakey J. K. Phenotypic plasticity in leaf morphology of *Crataegus monogyna* (Rosaceae): an experimental study with taxonomic implications. *Bot. J. Linn. Soc.* 1994;115: 21 1-219.

[19] Rahmani M.S., Shabanian N., Khadivi-Khob A., Woeste K., Badakhshan H., Alikani L. Population structure and genotypic variation of Crataegus pontica inferred by molecular markers. *Gene* 2015; 572(1):123-129. DOI:10.1016/j.gene.2015.07.001.

[20] Lo E.Y.Y, Stefanović S., Dickinson T. A. Molecular reappraisal of relationships between *Crataegus* and *Mespilu*s (Rosaceae, Pyreae) – Two Genera or One? *Syst. Bot.* 2007; 32(3): 596–616. DOI:10.1600/036364407782250562

[21] Emami A., Shabanian N., Rahmani MS., Khadivi A., Mohammad-Panah N. Genetic characterization of the *Crataegus* genus: implications for *in situ* conservation. *Sci. Hortic.* 2018; 231: 56–65 DOI:10.1016/j.scienta.2017.12.014.

[22] Christensen K., Zielinski J. Notes on the genus *Crataegus* (Rosaceae-Pyreae) in southern Europe, the Crimea and western Asia. *Nord. J. Bot.* 2008; 26:344–360.

[23] Grant V. Plant Speciation. Columbia University Press. 1971; New York and London.

A review of hawthorn species in western Iran using morphological traits and molecular markers

Nooraei, F.[1], Sharifnia, F.[*1], Salimpour, F.[1], Masoumi, SM.[2]

[1] Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran

* (Corresponding author): fa.sharifnia@gmail.com

DOI:10.30495/JDB.2023.699840 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.3.7

Received: November 2022 Accepted: December 2022

Abstract

The genus L. Crataegus belongs Rosaceae family. It has economic importance due to its widespread use in traditional medicine and landscaping. This genus has a lot of complexities from a taxonomic point of view and so far many plans have been presented to classify the species of this genus into sections or subgenera. In this study, morphological traits along with ribosomal DNA (ITS) region sequences were used to study the progeny relationships as well as to determine the species boundary in this genus. In morphological studies, 43 traits (14 quantitative traits and 29 qualitative traits) of vegetative and reproductive organs of 14 species of this genus were studied and the obtained data were statistically analyzed by specialized software such as PAST and SPSS. . In phylogenetic studies, the nuclear genomes of 14 species were extracted by DNA Extraction Kit (MBST) and their DNA sequences along with ITS sequences of 19 non-Iranian species of this genus were extracted from NCBI site and then analyzed by PAUP and Figtree softwares were analyzed based on Maximum Parsimony (MP) method. Although the classification of species based on The maximum Parsimony method was consistent with the monograph presented by Christensen, but these results did not confirm the proposed schemes for classifying species in the flora of Iran.

Keywords: Crataegus, taxonomy, morphology, phylogeny.