

مقاله پژوهشی

مطالعه بیوسیستماتیک گونه‌های جنس شیرخشت *Cotoneaster Medikus* در ایران (حوزه هیرکانی)

زینب لطفی، فهیمه سلیم پور*، فریبا شریف نیا، مریم پیوندی

گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): drsalimpour@gmail.com

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۱

DOI: 10.30495/jdb.2022.1961682.1314

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.8.0>

چکیده

جنس *Cotoneaster* L. متعلق به تیره Rosaceae (گل سرخ) می‌باشد شمال ایران یکی از اصلی‌ترین مراکز تنوع این گیاه دارویی ارزشمند محسوب می‌شود. با توجه به تنوع ژنتیکی بسیار بالا در بین گونه‌های جنس *Cotoneaster*، مشکلات متعدد تاکسونومیکی وجود دارد. در تحقیق حاضر ۱۷ نمونه گیاهی براساس مطالعات ریخت‌شناسی (با ۳۶ صفت کمی و کیفی) و توالی هسته‌ای nrDNA ITS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین تمامی صفات ریخت‌شناسی کمی، تفاوت معنی‌داری وجود دارد. واکنش صفات کیفی ارزیابی شده در بین گونه‌ها متفاوت بودند گونه‌های مورد بررسی به پنج گروه طبقه‌بندی شدند. الگوی آنالیز گونه‌ها بر مبنای صفات ریخت‌شناسی و توالی‌یابی مولکولی تا حدود زیادی به هم شباهت دارند. و بین گونه‌های مورد بررسی از حیث صفات مورد مطالعه تشابهات و تفاوت‌هایی دیده می‌شود. کلادوگرام مولکولی نشان داد جنس شیرخشت یک جنس منوفیلتیک با شاخص ثبات (CI: consistency Index) ۰/۶۸ است. بین برخی از گونه‌های این جنس مانند *C. discolor* و *C. pseudodiscolor* تشابه ریختی صفات مانند شکل برگ، تراکم کرک سطح تحتانی، کرک روی میوه مشاهده می‌شود که شناسایی این دو گونه نزدیک بهم را با مشکل مواجه می‌سازد. در صورتی که از لحاظ ژنومی متفاوت بوده و چون از لحاظ مورفولوژیکی با توصیف گونه‌های شناسایی شده شیرخشت در ایران و کشورهای همسایه مطابقت ندارد. بنابراین ما آن را گونه جدید برای ایران در نظر گرفته و به عنوان *C. pseudodiscolor* تعریف می‌کنیم. علاوه بر آن دو گونه *C. morrisonesis* و *C. franchetti* رکورد جدیدی از جنس مذکور است و در فنوگرام خوشه مجزایی را به خود اختصاص داده‌اند. با توجه به اینکه اولین قدم برای برنامه‌های اصلاحی یک گیاه، تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف آن می‌باشد، تحقیق حاضر نخستین پژوهش در زمینه تنوع ژنتیکی در ایران (حوزه هیرکانی) با استفاده از مارکر هسته‌ای (ITS) در شناسایی دقیق گونه‌ها، نخستین گام در جهت اصلاح نژاد این تاکسون با ارزش است که در پژوهش حاضر به آن پرداخته خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: مطالعه ریخت‌شناسی، مطالعات مولکولی، شیرخشت، ایران (حوزه هیرکانی).

مقدمه

جنس شیرخشت (*Cotoneaster L.*) یکی از جنس‌های شناخته شده است که به زیر تیره Maloideae از تیره Rosaceae (گل سرخ) تعلق دارد [۱، ۲]. این جنس دارای ۱۴ [۳] تا ۱۹ گونه در مناطق مختلف کشور و ۱۵۰ تا ۲۶۰ گونه در جهان می‌باشد [۴]. شیرخشت عمدتاً درختی و درختچه ای بوده و به دلیل تنوع در فرم رویشی، گل‌های فراوان، میوه‌های بسیار جذاب و همچنین برگ‌های سبز براق به طور گسترده بصورت زینتی استفاده می‌شوند [۲]. شیرخشت به عنوان یکی از عناصر مهم جنگل‌های هیرکانی و درختچه زارها می‌باشد و همچنین در نواحی اکوتون شمال دیده می‌شود. براساس ویژگی‌های گل، گونه‌های *Cotoneaster* به دو بخش *Cotoneaster* و *Chaenopetalum* طبقه‌بندی می‌شوند [۶]. گونه *Cotoneaster* ایرانی متعلق به بخشی از *Cotoneaster* است که از دو سری *Cotoneaster* و *Chaenopetalum* تشکیل شده است [۷].

تنوع ژنتیکی رکن اصلی بیشتر برنامه‌های اصلاحی است و انجام انتخاب منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب در صفت مورد بررسی می‌باشد با توجه به تنوع ژنتیکی بسیار بالا در بین گونه‌های جنس *Cotoneaster*، مشکلات متعدد تاکسونومیک وجود دارد [۸]. تحقیقات نشان داد، روش‌های تجزیه و تحلیل متفاوت و داده‌های توالی DNA برای روشن شدن روابط فیلوژنتیک مبهم در درون جنس شیرخشت (*Cotoneaster L.*) استفاده می‌شود. داده‌های مولکولی مخصوصاً توالی DNA برای بازسازی روابط خویشاوندی تکاملی نسبت به سایر روش‌های دیگر از صحت بیشتری برخوردار است به همین دلیل امروزه به ویژه از زمان پیدایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز این روش با استقبال محققین مواجه شده است. منطقه ITS از DNA ریپوزومی هسته‌ای به طور گسترده برای استنباط روابط فیلوژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در دهه‌های اخیر از داده‌های توالی ITS به عنوان ابزاری برای تعیین روابط فیلوژنتیکی در سطوح پایین تاکسونومیک استفاده شده است [۹]. فیلوژنی تیره Rosaceae به سه گروه پایه ای مبتنی بر جایگاه هسته‌ای و کلروپلاستی، یعنی Amygdaloideae، Rosoideae و Dryadoideae تقسیم شده‌اند. Amygdaloideae (n=8) شامل (جنس‌های *Apricot peach*، *Cherry*، *Plum*)

Almond و غیره)، Spiraeoideae (n=9) *Spiraea*، Maloideae (n=17) *Sorbaria*، *Aruncus* و غیره)، Rosoideae (n=7) *Rosa*، *Pear*، *Apple*، *Cotoneaster* و غیره)، *Rosa*، *Rubus*، *Potentilla*، *Fragaria* و *Chamaebatia*، *Cercocarpus*) (n=9) Dryadoideae *Purshia* و *Dryas* می‌باشد است [۱۰]. با توجه به تنوع بالایی گیاهان این تیره در ویژگی‌های رویشی و ریخت شناسی این خانواده از قبل تک نیا شناخته شده است [۱۱]. نتایج داده‌های توالی کلروپلاستی (cpDNA) و هسته‌ای (nrITS) نشان داد *Cotoneaster L.* یک تک نیا است و به عنوان یک جنس منفرد عمل می‌کند و نتایج تنوع ژنتیکی را در سطح گونه نشان می‌دهد [۱۲ و ۱۳]. هدف اصلی این مطالعه بررسی تغییرات مورفولوژیکی بین گونه‌ها و تعیین ویژگی‌های متغیری که دارای اهمیت طبقه‌بندی در سطح خاص هستند، بازسازی درخت فیلوژنی برای این گونه‌ها، مقایسه درخت فیلوژنتیک با درخت مورفولوژیکی بود تحقیق حاضر نخستین پژوهش در زمینه تنوع ژنتیکی در ایران (حوزه هیرکانی) با استفاده از مارکر هسته‌ای (ITS) در شناسایی دقیق گونه‌ها، نخستین گام در جهت اصلاح نژاد این تاکسون با ارزش است که در پژوهش حاضر به آن پرداخته خواهد شد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری: گونه‌های این جنس در زمان گل دهی (اردیبهشت - خرداد) و زمان رسیدن میوه (ماه شهریور - مهر) طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۴ از استان‌های شمالی ایران جمع‌آوری و خشک و پرس شدن شدند. سپس با استفاده از فلورهای معتبرمانند: فلور ایرانیکا [۳]، فلور ترکیه [۱۴]، فلور شرق [۱۵]، فلور روسیه [۱۶]، فلور ایران [۴] و تصاویر هرباریومی نمونه‌های تایپ موجود در هرباریوم‌های جهانی مورد شناسایی قرار گرفتند. گونه‌های مورد مطالعه در هرباریوم دانشگاه آزاد واحد تهران شمال (IAUNT) نگهداری می‌شوند (جدول ۱).

مطالعات ریخت‌شناسی: صفات ریخت‌شناسی در بین ۱۷ گونه شیرخشت مورد بررسی قرار گرفت. پس از شناسایی نمونه‌ها، صفات نشانگر انتخاب، تفاوت‌ها و شباهت‌های بین گونه‌های جمع‌آوری شده، مورد بررسی قرار گرفتند. در این

بررسی، صفت کمی ۱۰ و صفت کیفی ۲۶ مطالعه شد. آنالیز داده‌های ریخت‌شناسی: میانگین و انحراف معیار خصوصیات ریخت‌شناسی در مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۳ و ۲).
 صفت هم چنین آنالیز به فاکتورها (FA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.17 انجام گرفت.

جدول ۱: فهرست نمونه‌های تازه جمع‌آوری شده، اسامی گونه‌ها طبق فلور ایران می‌باشد (Azad University North Tehran = AUNT)

نام گونه	محل جمع‌آوری
<i>C. multiflorus</i> Bge.	AUNT-17405، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۵/۵۲۳ و طول ۵۲/۵۷۲ متر، ارتفاعات عزیز آباد، ورسک، ۳۳۴۶ متر، طول ۵۲/۵۷۲ متر، عرض ۳۵/۵۲۳ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17405
<i>C. insignis</i> Pojark.	AUNT-17406، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۷/۵۲۰ و طول ۵۵/۹۲۳ متر، ارتفاعات عزیز آباد، ۱۱۴۰ متر، طول ۵۵/۹۲۳ متر، عرض ۳۷/۵۲۰ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17406
<i>C. nummularioides</i> Pojark.	AUNT-17407، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۷/۵۱۸ و طول ۵۵/۹۲۳ متر، ارتفاعات عزیز آباد، ۱۱۶۰ متر، طول ۵۵/۹۲۳ متر، عرض ۳۷/۵۱۸ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17407
<i>C. kotschyi</i> Klotz, Wissensch. Zeitschr.	AUNT-17408، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۸۴۵ و طول ۵۵/۳۷۶ متر، خوش بیلاق، ۱۵۷۰ متر، طول ۵۵/۳۷۶ متر، عرض ۳۶/۸۴۵ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17408
<i>C. turcomanicus</i> Pojark.	AUNT-17409، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۷/۲۱۹ و طول ۵۵/۵۹۸ متر، گالیکش، ۸۷۵ متر، طول ۵۵/۵۹۸ متر، عرض ۳۷/۲۱۹ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17409
<i>C. hissaricus</i> Pojark.	AUNT-17410، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۷/۳۳۳ و طول ۵۶/۰۰۳ متر، جنگل گلستان، ۹۳۷ متر، طول ۵۶/۰۰۳ متر، عرض ۳۷/۳۳۳ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17410
<i>C. morulus</i> Pojark.	AUNT-17411، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۶۰۹ و طول ۵۳/۷۹۷ متر، اوارد، گلوگاه، ۱۲۱۷ متر، طول ۵۳/۷۹۷ متر، عرض ۳۶/۶۰۹ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17411
<i>C. tythocarpus</i> Pojark.	AUNT-17412، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۷/۲۴۱ و طول ۵۵/۵۹۸ متر، گالیکش، ۹۸۶ متر، طول ۵۵/۵۹۸ متر، عرض ۳۷/۲۴۱ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17412
<i>C. discolor</i> Pojark.	AUNT-17413، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۵۹۹ و طول ۵۵/۸۹۱ متر، سفیدچاه، گلوگاه، ۱۰۵۴ متر، طول ۵۵/۸۹۱ متر، عرض ۳۶/۵۹۹ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17413
<i>C. nummularius</i> Fisch. & C.A MEY.	AUNT-17414، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۵۹۹ و طول ۵۵/۸۹۱ متر، سفیدچاه، گلوگاه، ۱۰۵۴ متر، طول ۵۵/۸۹۱ متر، عرض ۳۶/۵۹۹ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17414
<i>C. ovatus</i> Pojark.	AUNT-17415، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۷/۴۴۱ و طول ۵۶/۷۶۵ متر، درکش به سمت هاور، آشنخانه، ۱۲۳۶ متر، طول ۵۶/۷۶۵ متر، عرض ۳۷/۴۴۱ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17415
<i>C. horizontalis</i> Decne.	AUNT-17416، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۸۳۲ و طول ۵۴/۴۱۴ متر، گرگان، ۱۲۳ متر، طول ۵۴/۴۱۴ متر، عرض ۳۶/۸۳۲ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17416
<i>C. franchetii</i> Bois.	AUNT-17417، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۸۴۵ و طول ۵۵/۳۷۶ متر، باغ گل، ۱۵۷۶ متر، طول ۵۵/۳۷۶ متر، عرض ۳۶/۸۴۵ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17417
<i>C. morrisonensis</i> Hayata.	AUNT-17418، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۸۴۵ و طول ۵۵/۳۷۶ متر، باغ گل، ۱۵۷۶ متر، طول ۵۵/۳۷۶ متر، عرض ۳۶/۸۴۵ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17418
<i>C. salicifolius</i> Franch.	AUNT-17419، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۸۴۶ و طول ۵۴/۴۲۲ متر، باغ گل، ۱۵۷۶ متر، طول ۵۴/۴۲۲ متر، عرض ۳۶/۸۴۶ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17419
<i>C. henryanus</i> (C.K.Schneid.) Rehder & E.H.Wilson.	AUNT-17420، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۸۴۶ و طول ۵۴/۴۲۲ متر، آتش‌نشانی، گرگان، ۱۰۳ متر، طول ۵۴/۴۲۲ متر، عرض ۳۶/۸۴۶ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17420
<i>C.pseudicolor</i> Lotfi & Salimpor & Sharifnia	AUNT-17421، لطفی، جغرافیایی، عرض ۳۶/۵۸۸ و طول ۵۳/۸۳۸ متر، پل آخوندی، گلوگاه، ۱۰۳۴ متر، طول ۵۳/۸۳۸ متر، عرض ۳۶/۵۸۸ جغرافیایی، لطفی، AUNT-17421

جدول ۲: فهرست صفات کیفی و کد حالات به کار رفته در تاکسونومی عددی

شماره صفات	صفات (کیفی)	کد صفات
۱	فرم رویشی	۰- خزنده ۱- افراشته
۲	شیار شاخه‌های جوان	۰- دارد ۱- ندارد
۳	رنگ شاخه‌های جوان	۰- قهوه‌ای ۱- قرمز آلبالویی
۴	شیار شاخه‌های مسن	۰- دارد ۱- ندارد
۵	رنگ شاخه‌های مسن	۰- قهوه‌ای ۱- قرمز آلبالویی
۶	شکل برگ	۰- گرد ۱- بیضی
۷	نوک برگ	۰- چاله‌دار ۱- منقاردار ۲- گرد
۸	قاعده برگ	۰- گوه پهن ۱- گوه باریک
۹	تراکم کرک سطح فوقانی	۰- بدون کرک ۱- کم کرک ۲- پرکرک
۱۰	نوع کرک سطح فوقانی	۰- ندارد ۱- مخملی ۲- زیر
۱۱	تراکم کرک سطح تحتانی	۰- کم کرک ۱- پرکرک
۱۲	نوع کرک سطح تحتانی	۰- مخملی ۱- نمدی
۱۳	رنگ کرک زیر برگ	۰- سفید ۱- زرد

شماره صفات	صفات (کیفی)	کد صفات
۱۴	تراکم کرک حاشیه برگ	۰- بدون کرک ۱- کم کرک ۲- پرکرک
۱۵	جنس برگ	۰- چرمی ۱- غیر چرمی
۱۶	حالت رگبرگ	۰- غیر برجسته ۱- برجسته
۱۷	کرک رگبرگ	۰- بدون کرک ۱- کم کرک ۲- پرکرک
۱۸	تراکم گل در گل آذین	۰- (۱-۴) ۱- (۱۰-۴) ۲- بیشتر از ۱۰
۱۹	زاویه بین گل‌ها در گل آذین	۰- فشرده ۱- باز
۲۰	کرک گل آذین	۰- کم کرک ۱- پرکرک
۲۱	کرک دمگل	۰- کم کرک ۱- پرکرک
۲۲	کرک کاسبرگ	۰- کم کرک ۱- پرکرک
۲۳	رنگ میوه	۰- ارغوانی ۱- قرمز ۲- نارنجی
۲۴	شکل میوه	۰- کروی ۱- واژتخم‌مرغی
۲۵	کرک سطح میوه	۰- گردآلود ۱- کرکدار
۲۶	حالت کاسبرگ روی میوه	۰- افراشته ۱- جمع

جدول ۳: فهرست صفات کمی به کار رفته در تاکسونومی عددی

شماره صفات	صفات (کمی)	واحد
۱	ارتفاع	Mm
۲	قطر ساقه	Mm
۳	طول برگ	Mm
۴	عرض برگ	Mm
۵	نسبت طول به عرض	Mm
۶	اندازه دمبرگ	Mm
۷	اندازه دمگل	Mm
۸	قطر میوه	Mm
۹	تعداد خامه	Mm
۱۰	تعداد دانه	Mm

توسط کیت MBST بر اساس دستورالعمل ساخت استخراج شد. واکنش PCR را برای تکثیر DNA در حجم کل ۲۵ میکرولیتر انجام دادیم که شامل: نمونه DNA ۴ میکرولیتر، مخلوط اصلی ۱۲/۵ میکرولیتر، آب دیونیزه ۷ میکرولیتر، پرایمر Forward و Reverse ۱ میکرولیتر و ۰/۵ DMSO میکرولیتر. تولید PCR با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ مورد بررسی قرار گرفت. شرکت Sectech خالص سازی و تعیین توالی محصولات PCR را انجام داد.

آنالیز داده‌های مولکولی: داده‌های حاصل از توالی‌های nrDNA ITS، با استفاده از نرم‌افزار Sequencher ver.4.1.4 ویرایش و به text تبدیل شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار

مطالعات مولکولی: با بررسی‌های گونه‌های مورد مطالعه انتخاب شدند. پس از انتخاب برون گروه (out group) بر اساس مطالعه [۱۲] انجام شد. براین اساس گونه *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) H.L از خانواده Rosaceae انتخاب شد. لیست گونه‌های مورد مطالعه در جدول ۴ آمده است. تعدادی از گونه‌ها که در ایران حضور ندارند توالی nrDNA ITS شان از سایت NCBI (National Center For Biotechnology Information) گرفته شده است.

استخراج DNA، تکثیر PCR و تعیین توالی: ۱۷ نمونه‌های برگ از گونه *Cotoneaster* به دست آمد و برای مطالعات مولکولی در سیلکاژل نگهداری شد. DNA هسته‌ای

با نرم افزار Mr Bayes ver.3.0B4 آنالیز شدند و درخت توافقی حاصل از آن بدست آمد.

Mesquit ver.2.73 هم ردیف سازی گردید. ماتریس داده‌های هم ردیف سازی شده، با ژن‌های مورد مطالعه با روش Bayesian Maximum Likelihood (ML)، با استفاده از روش

جدول ۴: لیست گونه‌های آنالیز شده برای توالی ITS هسته‌ای. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر بارپوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال نگهداری می‌شود. گونه‌هایی که با ستاره (*) مشخص شده است توالیشان از بانک ژن (NCBI) گرفته شده است.

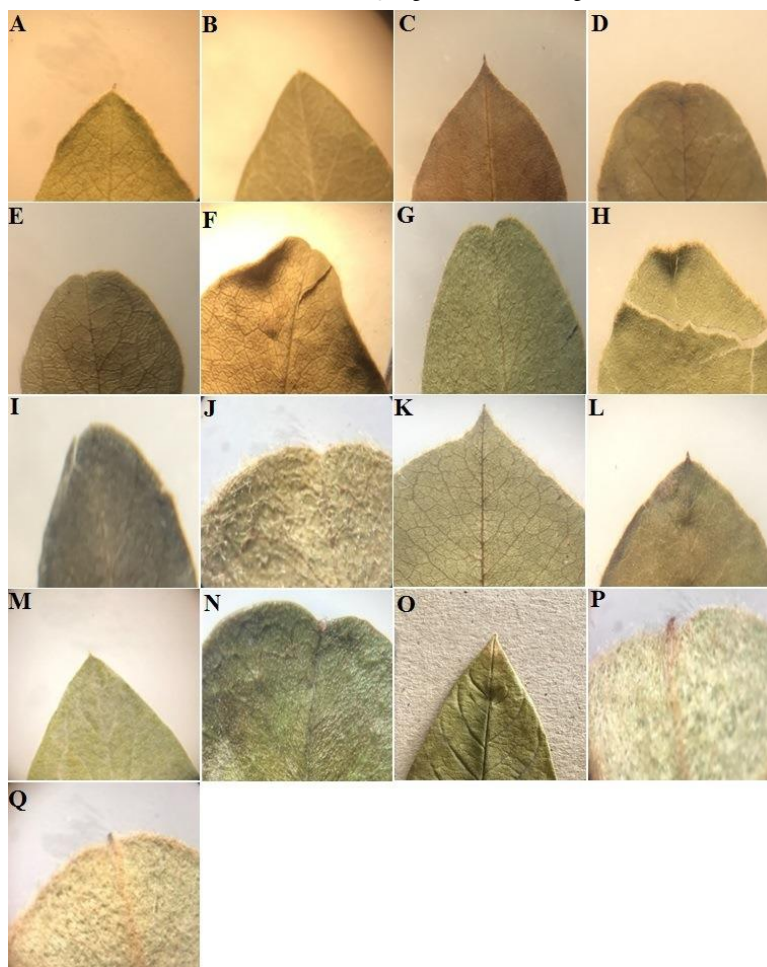
گونه	محل جمع آوری	بانک ژن
<i>C. multiflorus</i> Bge.	مازندران: ۲۷ کیلومتری به فیروزکوه از ورسک، ۳۳۴۶ متر، لطفی، AUNT-17405	-
<i>C. insignis</i> Pojark.	گلستان: لهنذر، کلاله، ارتفاعات عزیز آباد، ۱۱۴۰ متر، لطفی، AUNT-17406	-
<i>C. nummularioides</i> Pojark.	گلستان: لهنذر، کلاله، ارتفاعات عزیز آباد، ۱۱۶۰ متر، لطفی، AUNT-17407	-
<i>C. kotschyi</i> Klotz, Wissenschaft. Zeitschr.	گلستان: تیل آباد، خوش بیلاق، ۱۵۷۰ متر، لطفی، AUNT-17408	-
<i>C. turcomanicus</i> Pojark.	گلستان: فارسین، گالیکش، ۸۷۵ متر، لطفی، AUNT-17409	-
<i>C. hissaricus</i> Pojark.	گلستان: جنگل گلستان، ۹۳۷ متر، لطفی، AUNT-17410	-
<i>C. morulus</i> Pojark.	مازندران: اوارد، گلوگاه، ۱۲۱۷ متر، لطفی، AUNT-17411	-
<i>C. tythocarpus</i> Pojark.	گلستان: فارسین، گالیکش، ۹۸۶ متر، لطفی، AUNT-17412	-
<i>C. discolor</i> Pojark.	مازندران: ۲۷ کیلومتری به فیروزکوه از ورسک، ۳۳۴۶ متر، لطفی، AUNT-17413	-
<i>C. nummularius</i> Fisch. & C.A MEY.	مازندران: سفیدچاه، گلوگاه، ۱۰۵۴ متر، لطفی، AUNT-17414	-
<i>C. ovatus</i> Pojark.	خراسان شمالی: درکش به سمت هاور، آشخانه، ۱۲۳۶ متر، لطفی، AUNT-17415	-
<i>C. horizontalis</i> Decne.	گلستان: الغدیر، گرگان، ۱۲۳ متر، لطفی، AUNT-17416	-
<i>C. franchetii</i> Bois.	اصفهان، باغ گل، ۱۵۷۶ متر، لطفی، AUNT-17417	-
<i>C. morrisonensis</i> Hayata.	گلستان: تیل آباد، خوش بیلاق، ۱۵۷۰ متر، لطفی، AUNT-17418	-
<i>C. salicifolius</i> Franch.	اصفهان، باغ گل، ۱۵۷۶ متر، لطفی، AUNT-17419	-
<i>C. henryanus</i> (C.K.Schneid.) Rehder & E.H.Wilson.	گلستان: آتش نشانی، گرگان، ۱۰۳ متر، لطفی، AUNT-17420	-
<i>C. pseudicolor</i> Lotfi.	مازندران: پل آخوندی، گلوگاه، ۱۰۳۴ متر، لطفی، AUNT-17421	-
<i>C. cambrius</i> J.Fryer & B.Hylmo*	de Vere, N.L. and Ford, C.R. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of the UK. Science, National Botanic Garden of Wales, Llanarthne, Carmarthenshire SA32 8HG, United Kingdom (2016)	KX165656.1
<i>C. coriaceus</i> Franch.*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405592
<i>C. acutifolius</i> var. <i>lucidus</i> (Schltdl.) L.T.Lu*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405597
<i>C. melanocarpus</i> Lodd., G.Lodd. & W.Lodd.*	Li, X.J. and Fan, C.Z. DNA barcoding. Unpublished	KF530293.1
<i>C. dammeri</i> C.K.Schneid.*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405590.1
<i>C. mongolicus</i> Pojark.*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405595.1
<i>C. silvestrii</i> Pamp.*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405586.1
<i>C. wardii</i> W.W.Sm.*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405593.1
<i>C. microphyllus</i> Wall. ex Lindl.*	Li, F., Fan, Q., Li, Q., Chen, S., Guo, W., Cui, D. and Liao, W. Molecular phylogeny of <i>Cotoneaster</i> (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences Plant Syst. Evol. 300 (6), 1533-1546 (2014).	JQ405587.1
<i>Pyraecanthia fortuneana</i> (Maxim.) H.L.*	Lo, E.Y. and Donoghue, M.J. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae) JOURNAL Mol. Phylogenet. Evol. 63 (2), 230-243 (2012).	JQ392485.1

نتایج

بررسی‌های ریخت‌شناسی: خصوصیات ریخت‌شناسی صفات کمی بررسی شده در جدول ۲ ارائه شده است. در میان این صفات، شکل و تعداد دانه به ندرت در بین گونه‌ها متفاوت است و در اکثر گونه‌ها، دو دانه در هر گونه وجود دارد. با این حال، در برخی از گونه‌ها (*C. salicifolia* و *C. horizontalis*)، تعداد آنها به سه می‌رسد. هیچ گونه تغییر معنی داری از نظر شکل و تعداد دانه در بین گونه‌ها مشاهده نشد. بقیه صفات در بین گونه‌ها متفاوت بود و آزمون ANOVA ($P \leq 0.01$) تغییرات معنی داری را برای آنها نشان داد. در این راستا بیشترین و کوتاه‌ترین قطر میوه به ترتیب از *C. morrisonensis* و *C. multiflora* گزارش شد. کوچک‌ترین برگ گونه *C. kotschyi* ($۸/۴ \times ۱۰/۲$ میلی‌متر) ثبت شد، در حالی که *C. salicifolia* دارای بزرگ‌ترین برگ ($۴۳/۱۹ \times ۴۷/۱۰$ میلی‌متر) بود. بزرگ‌ترین دمبرگ‌ها را در

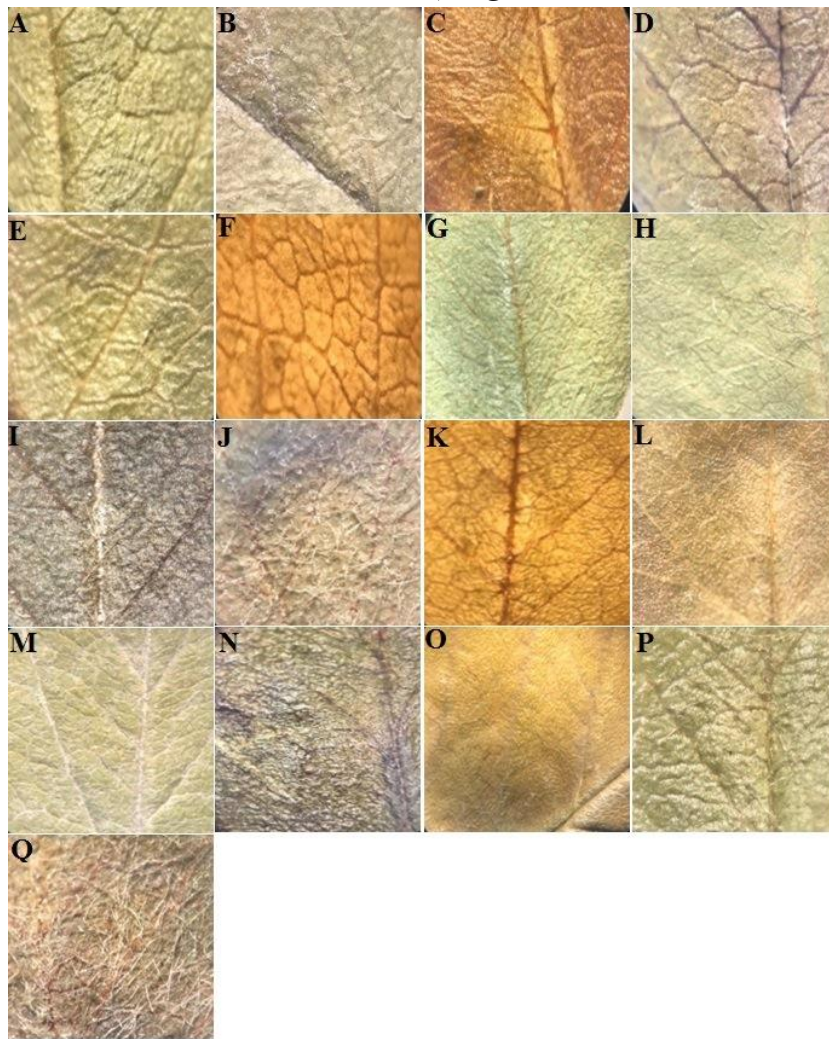
C. multiflora ($۵/۹۷$ میلی‌متر) و کوتاه‌ترین ($۱/۴$ میلی‌متر) را در *C. kotschyi* ثبت کردیم. طولانی‌ترین ($۵/۵۳$ میلی‌متر) و کوتاه‌ترین ($۱/۰۰$ میلی‌متر) دمگل‌ها به ترتیب در *C. multiflora* و *C. horizontalis* مشاهده شد. صفات ریخت‌شناسی کیفی ارزیابی شده در بین گونه‌ها متفاوت بود (جدول ۳). بیشتر این صفات به دو صورت مشاهده شد. به عنوان مثال گلبرگ‌ها حالت ایستاده یا افراشته مشاهده شد، رنگ ساقه جوان و پیر به صورت قرمزآلبالویی یا قهوه‌ای، قاعده برگ که به صورت گوه پهن یا گوه باریک، تراکم کرک سطح فوقانی برگ‌ها که به صورت پرکرک یا بدون کرک تشخیص داده شد، مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). شکل میوه به صورت کروی و واژه تخم مرغی تشخیص داده شد. با این حال، برخی دیگر مانند نوک برگ به صورت چاله‌دار، منقاردار، گرد و رنگ میوه به صورت ارغوانی، قرمز و نارنجی می‌باشد.

شکل ۱: حاشیه برگ و شکل راس برگ گونه‌های شیرخشت.

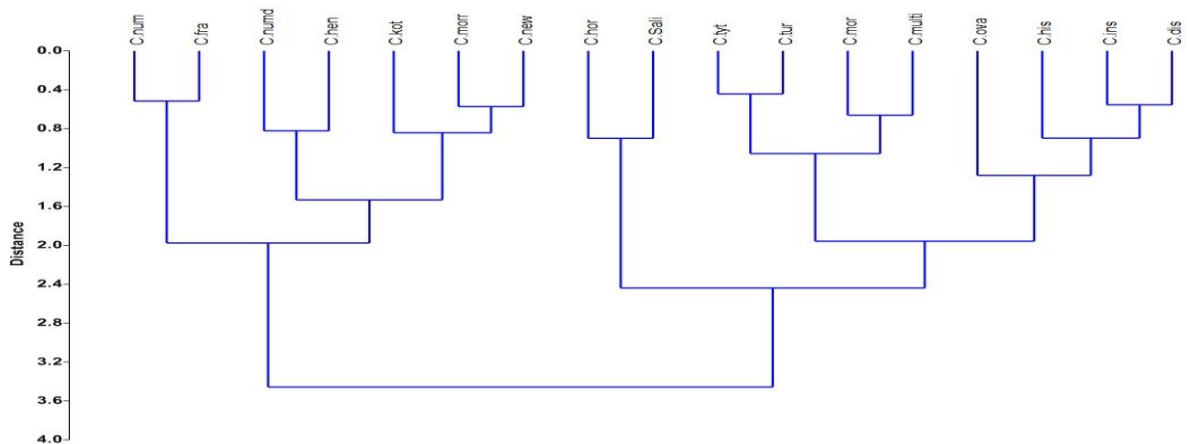


A) *C. new* (*C. pseudodicolor*), B) *C. discolor*, C) *C. morulus*, D) *C. turcomanica*, E) *C. tythocarpa*, F) *C. multiflora*, G) *C. morrisonensis*, H) *C. ovata*, I) *C. henryana*, J) *C. kotschyi*, K) *C. hissarica*, L) *C. insignis*, M) *C. franchetti*, N) *C. horizontalis*, O) *C. salicifolia*, P) *C. nummularioides*, Q) *C. nummularia*.

شکل ۲: سطح اپیدرم برگ گونه‌های شیرخشت



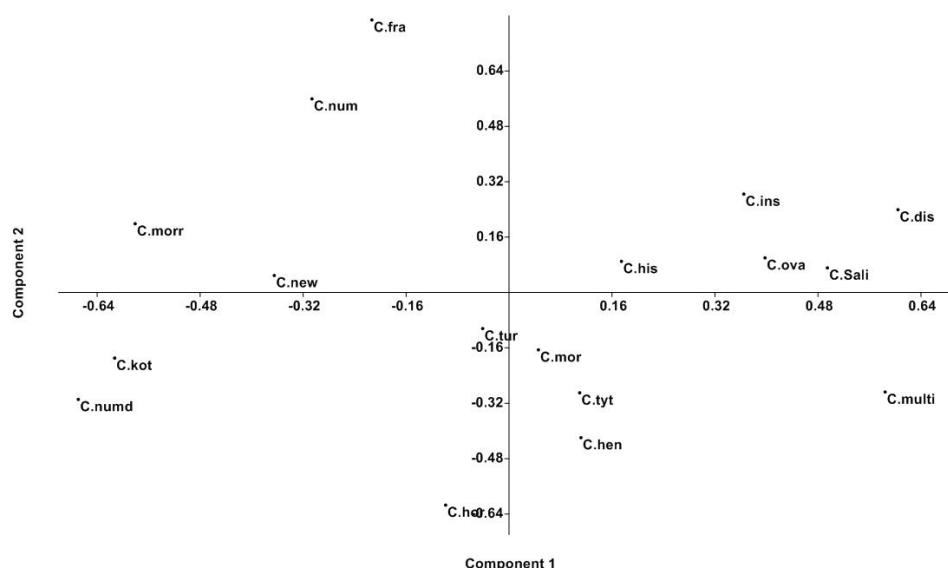
A) *C. new* (*C. pseudodicolor*), B) *C. discolor*, C) *C. morulus*, D) *C. turcomanica*, E) *C. tythocarpa*, F) *C. multiflora*, G) *C. morrisonensis*, H) *C. ovata*, I) *C. henryana*, J) *C. kotschyi*, K) *C. hissarica*, L) *C. insignis*, M) *C. franchetti*, N) *C. horizontalis*, O) *C. salicifolia*, P) *C. nummularioides*, Q) *C. nummularia*.



شکل ۳: دندروگرام خوشه ای (متد Ward) براساس صفات کمی ریخت شناسی (اختصارات و نام کامل گونه ها در زیر ذکر شده است).

C. new (*C. pseudodicolor*), *C. dis*: *C. discolor*, *C. mor*: *C. morulus*, *C. tur*: *C. turcomanica*, *C. tytt*: *C. tythocarpa*, *C. multi*: *C. multiflora*, *C. morr*: *C. morrisonensis*, *C. ova*: *C. ovata*, *C. hen*: *C. henryana*, *C. kot*: *C. kotschyi*, *C. his*: *C. hissarica*, *C. ins*: *C. insignis*, *C. fra*: *C. franchetti*, *C. hor*: *C. horizontalis*, *C. sali*: *C. salicifolia*, *C. numd*: *C. nummularioides*, *C. num*: *C. nummularia*.

شکل ۴: تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) براساس صفات کیفی ریخت‌شناسی (گونه‌ها مربوط با اختصارات نمودار می باشد)



C. new: *C. pseudodicolor*, C. dis: *C. discolor*, C. mor: *C. morolus*, C. tur: *C. turcomanica*, C. tytt: *C. tythocarpa*, C. multi: *C. multiflora*, C. morr: *C. morrisonesis*, C. ova: *C. ovata*, C. hen: *C. henryana*, C. kot: *C. kotschyi*, C. his: *C. hissarica*, C. ins: *C. insignis*, C. fra: *C. franchetti*, C. hor: *C. horizontalis*, C. sali: *C. salicifolia*, C. numd: *C. nummularioides*, C. num: *C. nummularia*.

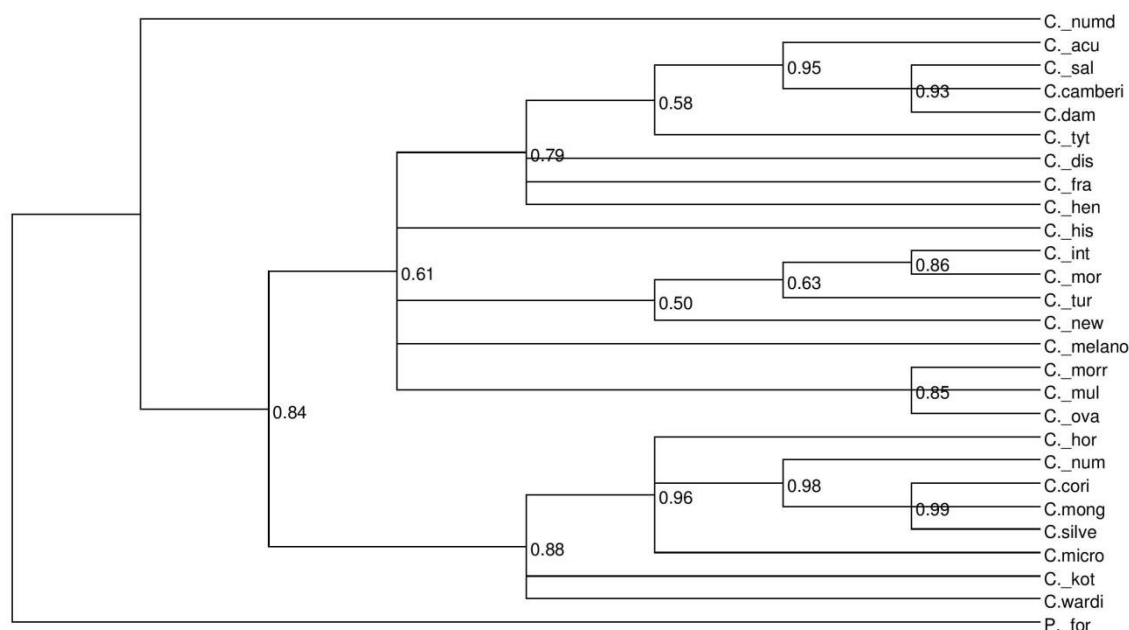
بررسی‌های مولکولی: در مجموع از ترکیب نتایج حاصل از کوتاه‌ترین درخت‌ها، درخت اجماع قاطع با مشخصات زیر حاصل شد: طول (Length) = ۷۸۸، شاخص ثابت (CI) = ۰/۶۴۰۲، شاخص پایداری (RI) = ۰/۷۲. براساس کلادوگرام حاصل ۲ کلاد اصلی قابل تشخیص است. گونه *Pyracantha fortuneana* (Maxim.) H.L. به عنوان outgroup در یک کلاد مجزا قرار گرفته و کلیه گونه‌های دیگر جنس *Cotoneaster* در یک کلاد جای گرفته است. این نشان می‌دهد جنس شیرخشت یک جنس منوفیلیتیک است. طبق نتایج این تحقیق، گونه *C. nummularioides* قدیمی‌ترین گونه جنس که بعد از outgroup محسوب می‌شود که در یک خوشه نزدیک به جنس *Pyracantha* قرار گرفته است. سایر گونه‌های شیرخشت با حمایت آماری ۸۴٪ به دو کلاد تقسیم می‌شود. زیر کلاد اول شامل گونه‌های خودرو و کاشته شده کشور است که با تعدادی از گونه‌های خارجی ادغام شده است که نشانگر ژنوم مخلوط در جنس شیرخشت است. زیر کلاد دوم با حمایت آماری ۶۱٪ به ۵ زیر کلاد تقسیم شده است. علاوه بر این ۳ گونه *C. morrisonesis*، *C. multiflora*، *C. ovata* شامل یک زیر گروه است که با حمایت آماری ۸۵٪ در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. این نتایج با نتایج ریخت‌شناسی تطابق نشان می‌دهد. این ۳ گونه در ۲۱۳ نوکلئوتید نیز با یکدیگر تفاوت دارند. گونه

C. pseudodicolor که در صفات ریخت‌شناسی به گونه *C. discolor* نزدیک بوده در زیر کلاد جدایی قرار گرفته است. این نشان می‌دهد که *C. pseudodicolor* از لحاظ ژنومی با *C. discolor* متفاوت است و بر این اساس گونه‌ای جدید از جنس *Cotoneaster* برای اولین بار در کشور گزارش می‌شود. در صفات ریخت‌شناسی تشابه بالایی با *C. turcomanica* و *C. morolus* داشته است طبق نتایج آنالیز فیلوژنی در یک زیر کلاد کاملاً مجزا از گونه‌های مذکور قرار گرفته است. با توجه به نتایج مولکولی گونه *C. morrisonesis* رکورد جدیدی از جنس مذکور در منطقه تیل‌آباد (گلستان) است. همچنین گونه *C. franchetti* که برای نخستین بار جمع‌آوری شده است، در فنوگرام خوشه مجزایی را به خود اختصاص داده است.

بحث

در مطالعه انجام شده، ۱۷ گونه از جنس *Cotoneaster* L. مربوط به نواحی شمالی کشور با استفاده از مطالعات مولکولی، ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. صفات ریخت‌شناسی معمولاً بیشترین صفات مورد استفاده در تشخیص عملی گیاهان و برخی از صفات مورد استفاده برای تعیین روابط فیلوژنتیکی را فراهم می‌سازد. این خصوصیات منبع اصلی شواهد تاکسونومیک

شکل ۵: درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز nrDNA ITS با استفاده از روش Bayesian. اعداد نشان داده شده، حمایت آماری کلادها را نشان می‌دهند.



C.new: *C. pseudodicolor* • C.dis: *C. discolor* • C.mor: *C. morulus* • C. tur: *C. turcomanica* • C.tytt: *C. tythocarpa* • C.multi: *C. multiflora* • C.morr: *C. morrisonensis* • C.ova: *C. ovata* • C.hen: *C. henryana* • C.kot: *C. kotschyi* • C. his: *C. hissarica* • C.ins: *C. insignis* • C. fra: *C. franchetti* • C.hor: *C. horizontalis* • C. sali: *C. salicifolia* • C.numd: *C. nummularioides* • C.num: *C. nummularia*.

استفاده می‌شود [۱۷]. این تفاوت در تنوع کرک می‌تواند به عنوان مبنای شناسایی گونه‌های جنس شیرخشت قرار گیرد. آنالیز فاکتور نشان داد که متغیرترین صفات در مولفه اول با درصد واریانس ۲۲/۹ درصد شامل تراکم کرک سطح فوقانی و نوع کرک سطح فوقانی، رنگ میوه سهمی را در تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌ها در بین گونه‌ها داشته است. همچنین متغیرترین صفات در مولفه دوم با درصد واریانس ۱۷/۲ درصد شامل صفات شکل کرک برگ، جنس برگ، طول برگ، نوک برگ، تراکم کرک سطح تحتانی و شکل یرگ قادر به تفکیک گونه‌های اخیر می‌باشد (جدول ۴-۱ و ۴-۲؛ جدول ۵-۵ و ۴-۵). مطابق با نظر [۱۲]، اعضای این جنس به طور قابل توجهی تنوع مورفولوژیکی را نشان می‌دهند. یافته‌های ما با یافته‌های قبلی مطابقت داشته است. به عنوان مثال: [۱۸] برای گونه‌های این جنس براساس طول برگ‌های بالغ و بدون در نظر گرفتن هیچ بخش کلیدی طبقه بندی نوشت. در آنالیز مولکولی *Pyracantha fortuneana* گروه خواهری سایر گونه‌های *Cotoneaster* می‌باشد. از طرفی تک نیا بودن گونه‌های *Cotoneaster* با حمایت آماری بالا مشهود است (شکل ۵)، یافته‌های ما نتایج مطالعات قبلی، [۱۲] را تایید کردند.

از ابتدای شروع سیستماتیک گیاهی تاکنون بوده‌اند [۱۲]. اعضای این جنس به طور قابل توجهی تنوع ریخت شناسی را نشان می‌دهند. نتایج نشان داد که در اکثر موارد الگوی آنالیز گونه‌ها بر مبنای صفات ریخت شناسی و توالی‌یابی مولکولی تا حدود زیادی به هم شباهت دارند. بر این اساس گونه *C. pseudodicolor* بیشترین شباهت را به گونه *C. discolor* بر مبنای صفاتی همچون شکل برگ، تراکم کرک سطح تحتانی، کرک روی میوه نشان می‌دهد (شکل ۱ و ۲). شیرخشت با دارا بودن ۱۴ [۳] تا ۱۹ گونه [۴] در ایران دارای دو بخش بوده: *Sect. Chaenopetalum* و *Sect. orthopetlum* با دارا بودن گلبرگ‌های سفید و گسترده از بخش اول جدا می‌شود. که بر مبنای تحقیقات ریخت‌شناسی حاضر گونه‌های شیرخشت به بخش *Sect. Chaenopetalum* با گلبرگ‌های سفید و گسترده تعلق دارند.

از آنجایی که صفات کرکپوش از جمله صفات مهم در ریخت‌شناسی است که به وسیله گیاهشناسان استفاده می‌شود و حتی گاهی اوقات عامل تعیین کننده‌ای در شناسایی گیاهان به شمار می‌رود استفاده از صفت تنوع کرک در رده بندی از اهمیت زیادی برخوردار است و در مواردی از کرک‌ها در رده بندی گونه‌ها

گونه *C. pseudodiscolor* در فنوگرام صفات ریخت‌شناسی در کنار گونه *C. discolor* قرار گرفته است، اما در زیر کلاد جدایی قرار گرفته است. این نشان می‌دهد که گونه *C. pseudodiscolor* از لحاظ ژنومی با *C. discolor* متفاوت است. بر این اساس در این پژوهش به عنوان گونه جدیدی برای فلور ایران اعلام شده است.

منابع

- [1] Dickoré, W.B. and G. Kasperek, *Species of Cotoneaster* (Rosaceae, Maloideae) indigenous to, naturalising or commonly cultivated in Central Europe. Willdenowia, 2010. **40**(1): p. 13-45.
- [2] Kicel, A., An overview of the genus *Cotoneaster* (Rosaceae): phytochemistry, biological activity, and toxicology. Antioxidants, 2020. **9**(10): p. 1002.
- [3] H, R., *Cotoneaster*: in Rechinger KH (ed.) Flora Iranica 66. 1969, Graz, Austria: Akademische Druck- und Verlagsanstalt.
- [4] Khatamsaz M, Flora of Iran no. 6. 1992, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran.
- [5] Talent, N. and T.A. Dickinson, The potential for ploidy level increases and decreases in *Crataegus* (Rosaceae, Spiraeoideae, tribe Pyreae). Botany, 2007. **85**(6): p. 570-584.
- [6] Yang, J., et al., Infrageneric Plastid Genomes of *Cotoneaster* (Rosaceae): Implications for the Plastome Evolution and Origin of *C. wilsonii* on Ulleung Island. Genes, 2022. **13**(5): p. 728.
- [7] Fryer, J. and B. Hylm, *Cotoneasters: a comprehensive guide to shrubs for flowers, fruit, and foliage*. 2009: Timber Press.
- [8] Grevtsova, G.T. and T.B. Vakulenko, New species of the genus *Cotoneaster Medik.* introduced from the flora of the CIS countries to the Botanical garden ACAD.ov fomin KYIV national taras shevchenko university. Publishing House "Baltija Publishing", 2021.
- [9] Giudicelli, G.C., et al., Secondary structure of nrDNA Internal Transcribed Spacers as a useful tool to align highly divergent species in phylogenetic studies. Genetics and molecular biology, 2017. **40**: p. 191-199.
- [10] Potter, D., et al., Phylogeny and classification of Rosaceae. Plant systematics and evolution, 2007. **266**(1): p. 5-43.

بر اساس نتایج مولکولی *C. nummularioides* بیشترین خویشاوندی را با گروه خواهری یعنی جنس *Pyracantha fortuneana* نشان می‌دهد. صفات ریخت‌شناسی نیز مجزا بودن گونه فوق را تایید می‌نماید. منطقه ITS از DNA ریپوزومی هسته‌ای به طور گسترده برای استنباط روابط فیلوژنتیکی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در دهه‌های اخیر از داده‌های توالی ITS به عنوان ابزاری برای تعیین روابط فیلوژنتیکی در سطوح پایین تاکسونومیکی استفاده شده است روش‌های تجزیه و تحلیل متفاوت و داده‌های توالی DNA برای روشن شدن روابط فیلوژنتیک مبهم در درون جنس شیرخشت (*Cotoneaster* L.) استفاده می‌شود [۱۹].

مارکر مولکولی هسته‌ای (ITS) توانایی شناسایی و تنوع ژنتیکی را در بین گونه‌های مورد مطالعه نشان داد، با حمایت آماری ۶۳٪ گونه *C. turcomanica* در کنار دو گونه *C. insignis* و *C. morolus* جای گرفته. گونه *C. hissarica* نیز به دلیل تنوع در ژنوم در یک زیر کلاد مجزا جای گرفته است. همچنین گونه‌های خودرو و کاشته شده کشور با تعدادی از گونه‌ها خارجی (که توالی ITS این گونه‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI گرفته شد) ادغام شده است که نشانگر ژنوم مخلوط در جنس شیرخشت است (نمودار ۴-۳). این یافته‌ها با مطالعات قبلی [۱۲] که تنوع ژنتیکی در میان ۵۶ گونه شیرخشت با استفاده از توالی هسته‌ای و کلروپلاستی بررسی کردند و این نشانگرها تنوع شناسایی و تشخیص خوشه‌ها و تنوع ژنتیکی را در بین گونه‌ها دارند (نمودار ۴-۲ و ۴-۵)، مطابقت دارد. همچنین ارزیابی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف جنس *Cotoneaster* مورد استفاده قرار گرفت [۲۰].

فیلوژنی مولکولی [۲۱]، با فرضیه روابط خویشاوندی زیر جنسی در درون *Cotoneaster* L. همخوان است.

کلادوگرام سه گونه *C. multiflora*، *C. ovata*، *C. morrisonesis* با حمایت آماری ۸۵٪ در کنار یکدیگر نشان داده است. گونه *C. morrisonesis* که در تحقیق حاضر با بررسی توالی ITS و همچنین صفات ریخت‌شناسی متمایز این گونه، به‌عنوان رکوردی جدید برای نخستین بار در ایران جمع‌آوری شده است.

- [11] Potter, D., et al., Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast matK and trnL-trnF nucleotide sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 2002. **231**(1): p. 77-89.
- [12] Li, F., et al., Molecular phylogeny of *Cotoneaster* (Rosaceae) inferred from nuclear ITS and multiple chloroplast sequences. *Plant systematics and evolution*, 2014. **300**(6): p. 1533-1546.
- [13] Meng, K.-K., et al., Phylogenomic analyses based on genome-skimming data reveal cytonuclear discordance in the evolutionary history of *Cotoneaster* (Rosaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2021. **158**: p. 107083.
- [14] H, D.P., *Flore of Turk and Agean Island*. Vol. 4. 1972. 3040.
- [15] Boissier E, *Cotoneaster L.* in *Flora orientalis*. 1872.
- [16] L, K.V., *Flora of the U.S.S.R.* Academy of science of the U.S.S.R. Jerusalem. Vol. 10. 1971. 1-512.
- [17] Sharifnia, F. and S.B. Shakib, Epidermal petal patterns of 13 Iranian *Rubus L.*(Rosaceae) species. *Annals of biological Research*, 2012. **3**(6): p. 2734-2740.
- [18] Bentham, G. and J. Hooker, Rosaceae tribus Chrysobalaneae. *Genera plantarum*, 1865. **1**(2): p. 600-609.
- [19] Zeilinga, A., Polyploidy in *cotoneaster*. 1964.
- [20] Lo, E.Y. and M.J. Donoghue, Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2012. **63**(2): p. 230-243.
- [21] Flinck, K. and B. Hylmö, A list of series and species in the genus *Cotoneaster* *Bot. Not*, 1966. **119**(3): p. 445-463.

Biosystematic study of Shirkhest *Cotoneaster* Medikus species in Iran (Hyrcani Basin)

Lotfi Z., Salimpour F. *, Sharifnia F., Peyvani M.

Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

* (Corresponding author): drsalimpour@gmail.com

DOI: 10.30495/jdb.2022.1961682.1314

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.3.8.0>

Received: May 2022

Accepted: August 2022

Abstract

The genus *Cotoneaster* L. belongs to the genus Rosaceae. Northern Iran is one of the main centers of diversity of this valuable medicinal plant. Due to the high genetic diversity among *Cotoneaster* species, there are several taxonomic problems. In the present study, 14 plant samples were examined based on morphological studies (with 36 quantitative and qualitative traits) and the nucleus sequence of ITS nrDNA. The results showed that there was a significant difference between all quantitative morphological traits. Most of the evaluated qualitative traits were different between species. The studied species were classified into five groups. The pattern of species analysis based on morphological traits and molecular sequencing are very similar. There are similarities and differences between the studied species in terms of the studied traits. Molecular cladogram showed that the genus of *Cotoneaster* material with consistency index (CI) is 0.68. Among some species of this genus such as *C. pseudodiscolor* and *C. discolor*, morphological similarity of traits such as leaf shape, density of lower surface hairs, and hairs on the fruit is observed, which makes it difficult to identify these two closely related species. If it is genomically different and because it is not morphologically consistent with the description of the identified species of milk thistle in Iran and neighboring countries. Therefore, we consider it as a new species for Iran and define it as *C. pseudodiscolor*. In addition, the species *C. morrisonesis* and *C. franchetti* are a new record of this genus and have a separate cluster in their phenogram. Given that the first step for breeding programs of a plant is the genetic diversity of its different species, the present study is the first study in the field of genetic diversity in Iran (Hyrcanian province) using nuclear markers (ITS) in accurate species identification. Is the first step in breeding this valuable taxon, which will be addressed in the present study.

Keywords: Phenetics, phylogeny, *Cotoneaster* L., Iran(hyrcania province.