Crop Biotech.
Summer (2015) 10: 31-40.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دهم، تابستان ۱۳۹۴ (۴۰-۳۱)

بارکدگذاری DNA برخی از گیاهان دارویی

فاطمه اسدی[۱]، سارا دژستان[۲*]، رباب قهرمانزاده[۳]، جبرایل رزمجو[٤]، محمدتقی آل‌ابراهیم[۲]

۱. کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۳. پژوهشگر بیوتکنولوژی گیاهی، گروه اصلاح نباتات دانشگاه واخینگن هلند
٤. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۲/۲۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/٦/۳۰)

DNA barcoding of some medicinal plants

Fatemeh Asadi[1], Sara Dezhsetan[2*], Robab Ghahramanzadeh[3], Jabraeil Razmjou[4], Mohammad Taghi Alebrahim[2]

1. M.Sc. Agricultural Biotechnology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3. Plant Biotechnology Researcher, Plant Breeding Department, Wageningen UR. Netherlands
4. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
(Received: May 17, 2015 - Accepted: Sep. 21, 2015)

چکیده

بارکدگذاری DNA روشی ساده برای شناسایی گونه‌ها با استفاده از یک توالی کوتاه ژنتیکی از یک بخش استاندارد ژنوم است. این روش به منظور شناسایی هشت گیاه دارویی جمع‌آوری‌شده از استان اردبیل مورد استفاده واقع شد. استخراج DNA به روش تغییریافته CTAB انجام گرفت و PCR با آغازگرهای طراحی‌شده براساس بارکدهای کلروپلاستی *rbcL*، *trnH-psbA*، *matK* و بارکد هسته‌ای *ITS* انجام شد. سپس محصولات PCR خالص‌سازی و تعیین توالی گردید. درصد موفقیت تکثیر و توالی‌یابی در نمونه‌ها به‌ترتیب ۸۷ و ٦۲، ۷۵ و ۳۷، ٦۲ و ۱۲، ۷۵ و ۳۷ به‌دست‌آمد. توالی‌ها با نمونه‌های موجود در پایگاه داده NCBI همردیف-شده و تحت تجزیه بیوانفورماتیکی قرار گرفتند. در درخت خویشاوندی گونه‌های هم‌جنس براساس توالی‌های بارکدهای *rbcL* و *trnH-psbA* از دیگر جنس‌ها تفکیک شدند. همچنین، در بارکد *ITS* فقط شیرین‌بیان با گیاهان هم‌جنس خود قرار گرفت. در این مطالعه، گیاه سوسن‌چلچراغ برای اولین بار با بارکد *rbcL* بارکدگذاری شد. SNP بارکدهای *rbcL* (کم‌تر از ۳۰)، *trnH-psbA* (کم‌تر از ۱۰۰)، *ITS* (بیشتر از ۲۰۰) و *matK* (کمتر از ۲۰) شمارش شد. بنابراین، بارکد *rbcL* به‌دلیل قدرت تفکیک بالا، تعداد SNP پایین و جامعیت در اکثر گونه‌ها، به‌عنوان بهترین بارکد معرفی شد. باوجوداین، بارکدهای *ITS* و *trnH-psbA* به‌دلیل مشکل مرتبط با توالی-یابی مستقیم محصولات PCR و عدم دسترسی به توالی‌های با کیفیت، به عنوان بارکدهای مکمل شناسایی شدند. بارکد *matK* به‌دلیل قدرت تکثیر و توالی‌یابی پایین برای نمونه‌های مورد بررسی توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: بارکدهای *rbcL*، *trnH-psbA*، *matK*، *ITS*

Abstract

DNA barcoding is a simple way to identify species using a very short genetic sequence from a standard part of the genome. This technique used to identify eight medicinal plants collected from the Ardabil province. DNA extraction was performed by modified CTAB method and PCR was performed with primers designed based on *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* Chloroplast barcodes and *ITS* nuclear barcode. Then, PCR products purified and sequenced. The percentage of amplification and sequencing success were assumed in samples respectively, 87 and 62, 75 and 37, 62 and 12, 75 and 37. The sequences were blasted with samples existed in NCBI database and Bioinformatics analyses were performed. In phylogenetic tree, the species belonging to the same genus were separated from other genus based on *rbcL* and *trnH-psbA* barcode sequences. Also, in *ITS* barcode only *G. glabra* organized with plants from same genus. In this study, barcoding of *L. ledebourii* with *rbcL* was done for the first time. SNPs were counted for barcodes of *rbcL* (less than 30), *trnH-psbA* (less than100), *ITS* (more than 200) and *matK* (less than 20). Thus, *rbcL* barcode due to high separation ability, low number of SNPs and universality in most species, was introduced as the best barcode. However, *trnH-psbA* and *ITS* barcodes due to related problem with direct sequencing of PCR products and lack of access to high quality sequences were identified as complementary barcodes. *MatK* barcode is not recommended for these samples because of the low ability of amplification and sequencing.

Keywords: Bracodes *rbcL*, *trnH-psbA, matK* and *ITS*.

* نویسنده مسئول: سارا دژستان

E-mail: sdezhsetan@uma.ac.ir

مقدمه

ارقام بومی گیاهان دارویی مختلف و خویشاوندان وحشی آن‌ها بخش اعظم نمونه‌های گیاهی ارزنده هر کشور را تشکیل می‌دهند. امروزه خطرات مختلف از جمله خشکسالی، چرای بیش از حد دام، برداشت بیش از حد گیاهان دارویی ذخایر ژنتیکی این گیاهان را در خطر انقراض قرار داده است (Rahim-Malik, 2011). علاوه‌بر این ترکیبات موجود در گیاهان دارویی همواره به‌عنوان مواد غیرقابل جایگزین مورد استفاده خواهند بود (Vanisree *et al*., 2004). شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف گیاهی یکی از ارکان مهم حفاظت و بهره‌برداری صحیح از منابع ژنتیکی به‌شمار می‌آید که این امر در اکثر گیاهان در مراحل اولیه از روی خصوصیات مورفولوژیکی کاری سخت خواهد بود (Ghahramanzadeh *et al*., 2012). در برخی موارد وجود نام‌های گیاه‌شناسی متفاوت در مورد یک گیاه در نواحی مختلف جهان و گاهی شباهت ظاهری بین گونه‌ها امری مشکل‌ساز می‌باشد (Chen *et al*., 2010). بیش از یک دهه تقاضا برای تشخیص مولکولی تنوع زیستی افزایش یافته است. بارکدگذاری DNA[1] با استفاده از اطلاعات موجود در یک منطقه مشترک از یک ژن یا ناحیه بین‌ژنی در تمام گونه‌ها و تعیین توالی آن‌ها برای فراهم‌آوردن یک شبکه جهانی برای تبادل داده‌ها بین پژوهشگران روشی موفق در شناسایی و مستندسازی تنوع زیستی موجودات محسوب می‌گردد. این روش که اولین بار توسط هبرت و همکاران (۲۰۰۳) مطرح گردید، یک ارتباط ساده بین تمام مراحل زندگی در سطوح بالاتر از گونه ایجاد می‌کند. کنسرسیوم بارکدگذاری موجودات زنده (CBOL[2]) تلاش‌های فراوانی برای توسعه این روش انجام می‌دهد (Casiraghi *et al*., 2010). در جانوران منطقه ژنی که به‌عنوان بارکد استاندارد پیشنهادشده، ژن سیتوکروم اکسیداز (*CO1*) میتوکندری می‌باشد (Hebert *et al*., 2003) ولی در گیاهان استفاده از این مکان ژنی به‌عنوان بارکد به‌دلیل ماهیت میتوکندریایی گیاهان میسر نیست، زیرا میزان تغییرات در ژن‌های میتوکندریایی گیاهان پایین بوده و همچنین ساختار ژنوم میتوکندریایی در گونه‌های گیاهی متغیر است. بنابراین بسیاری از بارکدهای پیشنهادشده در گیاهان براساس یک منطقه منفرد از کلروپلاست و یا ترکیبی از مناطق مختلف کلروپلاستی یا هسته‌ای می‌باشند (Chen *et al*., 2010). در شناسایی و مستندسازی تنوع گیاهان بارکدهای *rbcL*[3]، *matK*[4]، *trnH-psbA* و *ITS*[5] توسط محققان بسیاری آزمون شده‌اند (Chen *et al*., 2010). در سال ۲۰۰۹، کنسرسیوم بارکدگذاری موجودات زنده استفاده از ژن‌های کلروپلاستی *rbcL* + *matK* را به‌عنوان بارکد استاندارد گیاهی پیشنهاد نمود که دارای کیفیت مطلوب توالی و سطوح بالای تفکیک گونه‌ای برای گیاهان است (Mahadani and Ghosh, 2013; Federici *et al.,* 2013).

در مطالعه‌ای، ۱۰ گونه از گیاهان تیره خرما به کمک این دو بارکد مورد مطالعه قرار گرفتند که درصد موفقیت بارکد *rbcL* در تفکیک گونه‌ها بیشتر از بارکد *matK* برآورد شد (Naeem *et al.,* 2014). با استفاده از سه مکان ژنی *rbcL*، *matK*، *ITS* و یک مکان بین‌ژنی *trnH-psbA* تعداد ۱۰۵ نمونه گیاهی *Fallopia multiflora* از مناطق مختلف کشور چین مورد مطالعه قرار گرفت که از بین بارکدهای استفاده‌شده تنها بارکد *trnH-psbA* نتایج رضایت‌بخشی را نشان داد (Sun *et al.,* 2013). در شناسایی گونه‌های جنس *Moraea* و *Protea* دو مکان ژنی *rbcL* و

1. DNA barcoding
2. Consortium for the Barcode Of Life
3. *Ribulose Bisphosphate Carboxylase* L.
4. *Maturase K*
5. *Internal Transcribed Spacer*

ITS به‌عنوان بارکد مناسب انتخاب شدند (Chase *et al*., 2005). در مطالعه ۱۱۴ نمونه از تیره بقولات بومی کشور چین (شامل ۸۵ گونه از ۴۹ جنس مختلف) (Gao *et al*., 2010) و همچنین در شناسایی ۲۴۳۱ گونه از ۶۱ گیاه دارویی بومی چین (Pang *et al*., 2013) و ۵۱ نمونه متعلق به ۱۹ جنس مختلف از گیاهان دارویی (Sun and Chen, 2013)، بارکد *ITS2* به‌عنوان یک بارکد مناسب معرفی شد. همچنین، از پنج بارکد گیاهی *rpoB*، *rpoC1*، *rbcL*، *matK* و *ITS* برای شناسایی گونه‌هایی از جنس *Paphiopedilum* استفاده شد که دو بارکد *matK* و *ITS* به‌عنوان بارکد مناسب معرفی شدند (Parveen *et al*., 2012). تنوع زیستی تیره *Polygonaceae* (Jingyuan *et al*., 2009) و شناسایی گیاهان گلدار و مخروطی‌ها (Steinke *et al*., 2012) به‌کمک ترکیبی از دو بارکد *rbcL* و *trnH-psbA* انجام گرفت. در بررسی گیاه *Nepeta deflersiana* از جنس پونه، ترکیبی از دو بارکد *rps16* و *trnH-psbA* به‌عنوان بارکد مناسب معرفی شد (Al-Qurainy *et al*., 2014).

در مطالعه حاضر سعی بر این بود با استفاده از مزایای روش بارکدگذاری DNA گامی موثر در جهت شناسایی و ثبت تنوع برخی از گیاهان دارویی منطقه اردبیل برداشته شود.

مواد و روش‌ها

برگ نمونه‌های گیاهی مورد بررسی، از مناطق مختلف استان اردبیل به‌صورت دستی جمع‌آوری شد. گیاهان مورد بررسی شامل بارهنگ (*Plantago major*)، بابونه (*Matricaria chamomilla*)، ثعلب (*Orchis* spp.)، خاکشیر (*Sisymbrium* spp.)، سوسن‌چلچراغ (*Lilium ledebourii*)، شیرین‌بیان (*Glyserhiza glabra*)، درمنه (*Artemisia* spp.) و بومادران (*Achillea millefolium*) بودند که هر کدام به‌نوعی در طب سنتی جایگاه ویژه‌ای دارند. به‌منظور استخراج DNA، ترجیحاً از برگ‌های جوان انتهایی استفاده گردید. استخراج DNA با روش تغییریافته CTAB (Saghai Maroof *et al*., 1994) انجام گرفت. کیفیت DNA استخراج‌شده با ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی گردید و کمیت و خلوص نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. در این پژوهش از دو مکان ژنی کلروپلاستی رمزکننده *rbcL* و *matK*، یک مکان بین‌ژنی کلروپلاستی غیررمزکننده *trnH-psbA* و مکان ژنی هسته‌ای *ITS* به‌عنوان بارکد استفاده گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۳۵ میکرولیتر و برنامه دمایی واسرشت اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در ۵۶°C–۶۰ (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه) و در نهایت بسط نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. کلیه نمونه‌های تکثیرشده به‌منظور توالی‌یابی برای شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. کیفیت توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan متعلق به DNASTAR (Schwei, 2015) بررسی گردید. به‌منظور بررسی میزان توانایی بارکدهای مورد بررسی در تفکیک گونه‌ها، برای هر گیاه مورد مطالعه چند توالی دیگر متعلق به همان جنس و بارکد از پایگاه اطلاعات داده NCBI جمع‌آوری شد. توالی‌های حاصل از توالی‌یابی و توالی‌های به‌دست‌آمده از پایگاه داده NCBI در نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al*., 2011) با استفاده از الگوریتم ClustalW همردیف شدند و همردیفی برای هر بارکد مورد بررسی به‌طور جداگانه انجام گرفت. در نرم‌افزار MEGA5 کلیه پارامترهای لازم (میزان SNP و فاصله ژنتیکی گونه‌ها) برای مقایسه توالی‌ها اندازه‌گیری شد. درخت خویشاوندی با استفاده از فاصله p-distance، روش Neighbor joining و ۱۰۰۰ بار Bootstrapping مربوط به نمونه‌های مورد بررسی در بارکدها ترسم گردید.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده‌شده برای تکثیر مناطق ژنی و بین‌ژنی گیاهان مورد استفاده

توالی نوکلئوتیدی	توالی آغازگر
rbcLa	5'ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC3'
rbcLa	5'GTAAAATCAAGTCCACCRCG3'
trnH-psbA	5'GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3'
trnH-psbA	5'CGCGCATGGTGGATTCACAATCC3'
matK	5'GTTCTAGCACAAGAAAGTCG3'
matK	5'TAATTTACGATCAATTCATTC3'
ITS1	5'ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG3'
ITS1	5'GTTGCCGAGAGTCGT 3'
ITS2	5'TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC3'
ITS2	5'GCCTGGGCGTCACGC3'

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از کاربرد بارکدهای مورد استفاده

rbcL

میزان موفقیت تکثیر در مکان ژنی *rbcL* در نمونه‌های گیاهی مورد بررسی شامل بابونه، بومادران، ثعلب، شیرین‌بیان، سوسن چلچراغ، خاکشیر و بارهنگ، ۸۷ درصد محاسبه شد. ۶۲ درصد از توالی‌های تکثیرشده با موفقیت توالی‌یابی شدند که نسبت به سایر بارکدها درصد بالاتری بود. طول قطعه تکثیرشده در گیاهان شیرین‌بیان، سوسن چلچراغ، بابونه، ثعلب و خاکشیر ۵۵۳، ۵۵۰، ۵۵۸، ۵۷۷ و ۵۵۴ نوکلئوتید توالی‌یابی شد. نتایج همردیفی (BLASTn)، توالی *rbcL* گیاهان شیرین‌بیان، سوسن چلچراغ، بابونه و خاکشیر را به گیاهان همان جنس منتسب کرد و ثعلب را به توالی‌های *rbcL* تیره ثعلبیان نسبت داد (جدول ۲).

در درخت خویشاوندی براساس بارکد *rbcL*، گونه‌های مربوط به یک جنس به‌درستی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۱). تنوع درون گروهی (میزان شباهت توالی *rbcL* گونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های همجنس خود در سایت NCBI) برای گیاه شیرین‌بیان ۹۸ تا ۹۸/۹، سوسن چلچراغ ۹۶/۴ تا ۹۹/۳، بابونه ۹۵/۳ تا ۹۹/۸، ثعلب ۷۶/۳ تا ۹۸/۲ و خاکشیر ۸۷/۹ تا ۹۸/۷ درصد محاسبه گردید. نتایج به‌دست‌آمده بیشترین درصد شباهت را در شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*) با *G. glabra* بومی هند، ژاپن و *G. inflata* بومی آلمان، سوسن چلچراغ (*Lilium ledebourii*) با *L. candidum* بومی ژاپن و *L. mackliniae* بومی هند، بابونه (*Matricaria chamomilla*) با *M. chamomilla* بومی برزیل، ثعلب (*Orchis* spp.) با *O. Mascula* بومی انگلستان و خاکشیر (*Sisymbrium* spp) با *S. loeselii* بومی لهستان نشان داد. پس از جستجو در پایگاه داده‌ها مشخص شد که هیچ توالی *rbcL* برای گیاه سوسن چلچراغ تابحال در بانک اطلاعاتی ثبت نشده است، به‌نظر می‌رسد نتایج حاصل از این مطالعه برای اولین بار توالی *rbcL* را برای این گیاه دارویی به ثبت خواهد رساند. توالی این گونه با توالی گونه‌های *L. mackliniae*، *L. candidum*، *L. wenshanense* و *L. longiflorum* موجود در سایت NCBI همردیف شد که می‌توان نتیجه گرفت، بارکد *rbcL* در سطح جنس نیز قابل اطمینان است. همچنین در ترسیم درخت خویشاوندی مربوط به بارکد *rbcL*، این نمونه گیاهی به‌درستی از جنس‌های دیگر مجزا شد. تعداد جایگاه‌های متغیر (SNP) با استفاده از توالی *rbcL* در گونه‌های جنس شیرین‌بیان، سوسن چلچراغ، بابونه، ثعلب و خاکشیر به‌ترتیب ۹، ۲، ۸، ۲۹ و ۶ عدد شمارش شد. بنابراین می‌توان از بارکد *rbcL* برای شناسایی نمونه‌های گیاهی استفاده نمود. در واقع بارکد *rbcL*، با مزیت سرعت تکامل پایین و همردیف‌نمودن با وضوح بالا برای تمایز گونه‌های نزدیک، کارایی بالایی دارد (Kress *et al*., 2009).

trnH-psbA

درصد موفقیت تکثیر بارکد *trnH-psbA* در نمونه‌های گیاهی مورد بررسی شامل بابونه، بارهنگ، خاکشیر، بومادران، ثعلب، سوسن چلچراغ در حدود ۷۵ درصد برآورد شد. طول قطعه تکثیرشده در گیاهان بابونه، بارهنگ و خاکشیر ۴۴۸، ۳۳۲ و ۲۴۴ نوکلئوتید توالی‌یابی شد. در همردیفی، نمونه‌های توالی‌یابی‌شده با نمونه‌های هم‌جنس خود همردیف شدند (جدول ۲). در ترسیم درخت خویشاوندی نمونه‌های مورد بررسی در سطح جنس از یکدیگر تفکیک نشان دادند (شکل ۱). تنوع درون گروهی، میزان شباهت توالی *trnH-psbA* گونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های همجنس خود در سایت NCBI، برای گیاه بابونه ۱۲/۱ تا ۹۶، بارهنگ ۱۹ تا ۹۸/۸ و خاکشیر ۲۹/۹ تا ۹۰/۶ درصد محاسبه گردید. بنابراین توالی نوکلوتیدی *trnH-psbA* گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla*) با *M. recutita* بومی آلمان، بارهنگ (*Plantago major*) با *P. major* بومی ایتالیا و خاکشیر (*Sisymbrium* spp.) با *S. orientale* بومی ایتالیا بیشترین درصد شباهت را نشان داد. تعداد جایگاه‌های متغیر (SNP) با استفاده از توالی *trnH-psbA* در گونه‌های جنس خاکشیر، بابونه و بارهنگ در مقایسه با گیاهان هم‌جنس خود به‌ترتیب ۹۹، ۴۰ و ۳ شمارش شد. معرفی بارکد مناسب تنها زمانی امکان‌پذیر است که تعداد SNP پایین باشد. تعداد SNP در بارکد *rbcl* برای گیاه بابونه و خاکشیر نسبت به بارکد *trnH-psbA* مناسب‌تر بود. در بارکد *trnH-psbA* حضور جایگاه‌های تکراری (Hollingsworth *et al*., 2011) و عدم توانایی دسترسی به توالی با کیفیت و همردیف‌کردن توالی‌ها در یک گروه خاص به‌دلیل تنوع طولی بالا (CBOL, 2009) نشان‌دهنده این است که این بارکد به‌تنهایی قادر به تفکیک مناسب نخواهد بود. بنابراین، هرچند این بارکد برای بررسی گونه‌های جنس بابونه، بارهنگ و خاکشیر بارکد مناسبی است ولی برای استفاده در دیگر گونه‌ها نیاز به بررسی و مطالعه دارد.

ITS

درصد موفقیت تکثیر برای نمونه‌های مورد بررسی شامل بارهنگ، بابونه، بومادران، سوسن چلچراغ، شیرین‌بیان و خاکشیر در بارکد *ITS* ۷۵ درصد برآورد شد. نتایج توالی‌یابی تنها برای سه گونه بابونه، شیرین‌بیان و خاکشیر حاصل شد. طول توالی تکثیرشده برای این گیاهان به‌ترتیب ۸۲۷، ۸۰۶ و ۸۰۱ نوکلئوتید به‌دست آمد. نتایج همردیفی (BLASTn)، توالی *ITS* گیاهان بابونه، شیرین‌بیان و خاکشیر را به گیاهان همان جنس منتسب کرد (جدول ۲) و همچنین نتایج همردیفی برای گیاهان خاکشیر، شیرین‌بیان و بابونه، درصد شباهت بالای این گیاهان را با گونه‌های هم‌جنس خود تصدیق می‌کند. درخت خویشاوندی مربوط به این بارکد تنها توانست جنس شیرین‌بیان را به‌درستی تفکیک کند (شکل۱). در ترسیم درخت خویشاوندی گیاه شیرین‌بیان (*Glyserhiza glabra*) در بارکد *rbcl* همجوار با *G. inflata* و *G. glabra* و در بارکد *ITS* همجوار با *G. glabra* قرار گرفت. در اینجا نقش کلیدی بارکد مکمل که منجر به شناسایی دقیق‌تر می‌گردد، مشخص است. تنوع درون گروهی، میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی *ITS* گونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های همجنس در پایگاه داده NCBI، برای گیاه شیرین‌بیان ۴/۳ تا ۹۹/۷، بابونه ۳/۸ تا ۷/۲ و خاکشیر ۲/۷ تا ۷/۱ درصد محاسبه گردید. براساس نتایج به‌دست‌آمده از توالی نوکلوتیدی *ITS*، شیرین‌بیان (*Glyserhiza glabra*) با *G.* sp بومی مراکش و *G. glabra* بومی اسپانیا بیشترین درصد شباهت را نشان داد. برای سایر گونه‌های مورد بررسی شباهت قابل قبولی مشاهده نشد. تعداد SNP برای گیاهان شیرین‌بیان، بابونه و خاکشیر در مقایسه با گیاهان موجود در درخت خویشاوندی به‌ترتیب ۲، ۳۸۵ و ۳۷۰ شمارش شد. البته برای گیاه شیرین‌بیان در مقایسه با بارکد *rbcl* که ۹ عدد SNP شمارش شده بود در این بارکد ۲ عدد شمارش شد. بنابراین

بارکد *ITS* با تشخیص SNP کم‌تر نقش مثبتی دارد. ژنوم هسته‌ای *ITS* (*ITS1* و *ITS2*)، دارای قدرت تکثیر بالا بوده ولی به‌دلیل تکثیر از ژنوم قارچ‌های موجود روی نمونه‌های گیاهی، طول بالای ژنوم هسته‌ای و به‌خاطر داشتن تکامل غیریکنواخت به‌عنوان بارکدی مستقل توصیه نمی‌شود (Ghahramanzadeh *et al*., 2012; Hollingsworth *et al*., 2011). با این که امروزه تمرکز روی منطقه *ITS2* به‌منظور کاهش مشکلات تکثیر و توالی‌یابی افزایش پیدا کرده است (Chen *et al*., 2010) اما ثابت‌شده که حتی با استفاده از این بخش ژنومی نیز نمی‌توان کاربرد این منطقه ژنی را در گیاهان افزایش داد (Liu *et al*., 2010). در این پژوهش بارکد *ITS* تنها برای بررسی جنس شیرین‌بیان مناسب بود و به دلایل ذکرشده در کل به‌عنوان بارکد مکمل کارایی بیشتری خواهد داشت (CBOL, 2009).

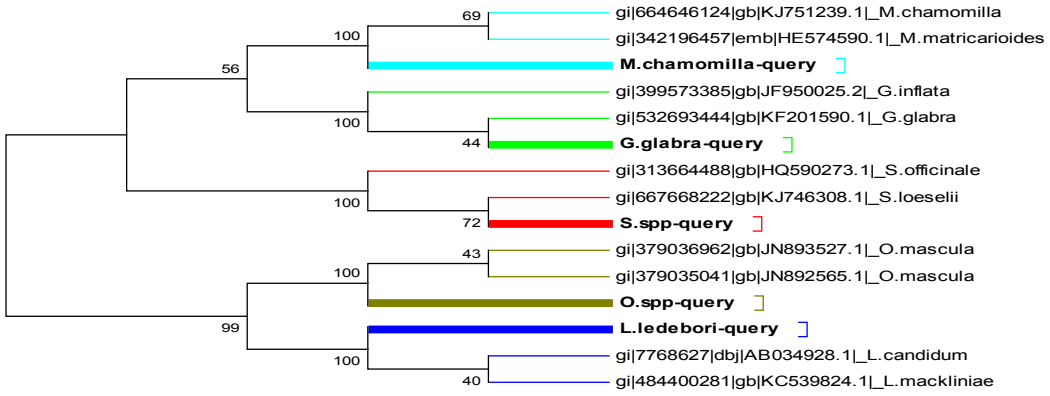
بارکد *matK* با ۶۲ درصد قدرت تکثیر در نمونه‌های مورد مطالعه درمنه، بومادران، بارهنگ، سوسن چلچراغ و شیرین‌بیان، تنها در گیاه درمنه با طول ۸۵۰ نوکلئوتید توالی‌یابی گردید. توالی گیاه درمنه با گیاهی از جنس خود همردیف شد (جدول ۲) و در درخت خویشاوندی، همجوار با گونه‌های همجنس خود قرار گرفت (شکل۱). میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی *matK* گونه مورد مطالعه با گونه همجنس (*A. frigida* بومی چین) موجود در سایت NCBI برای گیاه درمنه ۹۷/۵ درصد مشاهده شد. تعداد SNP نمونه گیاهی درمنه مورد بررسی با گونه *A. frigida*، که دارای بیشترین شباهت بودند، ۱۶ عدد شمارش شد. بارکد *matK* دارای سرعت تکامل و جایگاه‌های حذف و اضافه بالایی می‌باشد (Hilu and Liang, 1997). اگرچه تعداد SNP برآوردشده در بارکد *matK* مطلوب بود ولی به‌دلیل قدرت تکثیر و توالی‌یابی پایین برای نمونه‌های مورد بررسی توصیه نمی‌شود.

matK

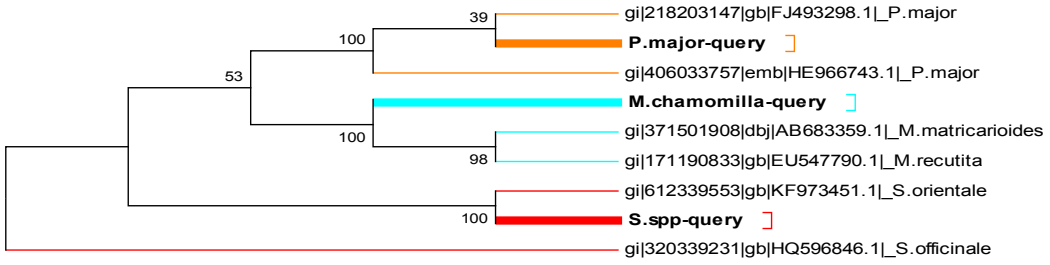
جدول ۲. همردیفی (BLASTn) توالی بارکدگذاری‌شده با بارکدهای موجود

گیاه مورد بررسی	بارکد استفاده شده	گیاه موجود در پایگاه داده
Sisymbrium spp.	*rbcL*	*Sisymbrium officinale* (gb|HQ590273.1|)
Matricaria chamomilla	*rbcL*	*Matricaria discoidea* (emb|HQ590177.1|)
Orchis spp.	*rbcL*	*Holothrix scopolaria* (gb|AY368343.1|)
Glyserhiza glabra	*rbcL*	*Glycyrrhiza glabra* (gb|KF201590.1|)
Lilium ledebourii	*rbcL*	*Lilium longiflorum* (gb|KC968977.1|)
Sisymbrium spp.	*trnH-psbA*	*Sisymbrium orientale* (gb|KF973451.1|)
Matricaria chamomilla	*trnH-psbA*	*Matricaria recutita* (gb|EU547790.1|)
plantago major	*trnH-psbA*	*Plantago major* (gb|FJ493298.1|)
Artemisia spp.	*matK*	*Artemisia frigida* (gb|JX293720.1|)
Sisymbrium spp.	*ITS*	*Sisymbrium orientale* (dbj|AB856329.1|)
Matricaria chamomilla	*ITS*	*Matricaria chamomilla* (gb|KC816562.1|)
Glyserhiza glabra	*ITS*	*Glycyrrhiza* sp (emb|HE687351.1|)

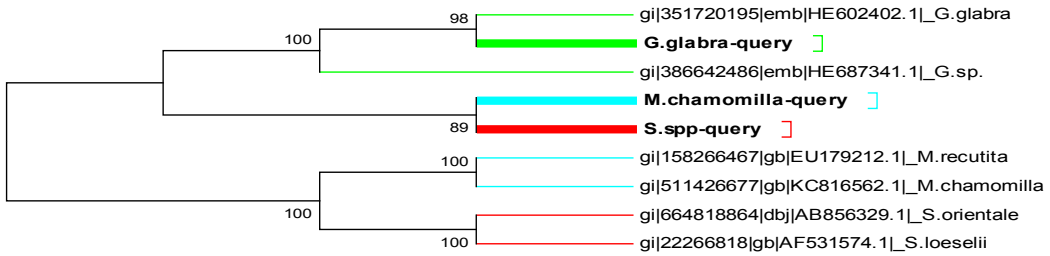
الف)



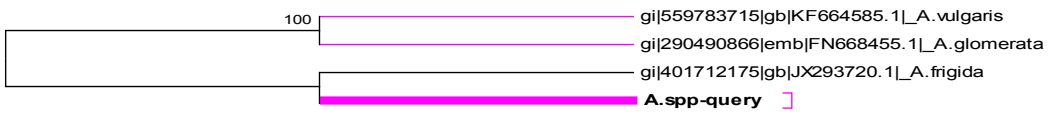
ب)



ج)



د)



شکل ۱. درخت خویشاوندی Neighbor-joining مبتنی بر همردیفی توالی بارکدهای *rbcL*(آ)، *trnH-psbA* (ب)، *ITS* (ج)، *matK* (د) و توالی مورد بررسی با واژه query و ۱۰۰۰ بار Boot strapping انجام گرفت.

بحث

یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی جهان گیاهان دارویی هستند که شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف گیاهی یکی از ارکان مهم حفاظت منابع ژنتیکی به‌شمار می‌آید. استان اردبیل با موقعیت جغرافیایی مناسب و تنوع آب و هوایی بالا یکی از مناطق با ارزش و با پتانسیل بالا از نقطه نظر وجود گیاهان دارویی می‌باشد. پیشرفت در فن‌آوری‌های تعیین توالی و محاسبات بیوانفورماتیکی، بارکدگذاری DNA را به یکی از منابع اصلی و جدید اطلاعات برای مطالعات روابط تکامل ژنتیکی، کشف گونه‌های ناشناس، شناسایی تنوع زیستی و رسم درخت خویشاوندی تبدیل نموده است.

بنابر تحقیقات انجام‌شده یک بارکد باید دارای قدرت تفکیک مناسبی باشد (Hebert *et al*., 2003)، حاوی اطلاعات خویشاوندی کافی برای اختصاص دادن ناشناخته‌ها و یا گونه‌های بارکدنشده به داخل گروه‌های رده‌بندی‌شده بوده و جامعیت داشته باشد (Mahadani and Ghosh, 2013). توالی بارکد مورد استفاده باید نسبتاً کوتاه باشد تا اجازه تکثیر DNA تخریب‌شده را فراهم نموده و براساس توالی‌های حفاظت‌شده طراحی شود (Kress *et al*., 2007). بنابراین بارکد *rbcL* که دارای قدرت تفکیک بالا در سطح جنس، وجود اطلاعات خویشاوندی بسیار در پایگاه داده، جامعیت در اکثر گونه‌های گیاهی و همچنین همردیفی با وضوح بالا می‌باشد، قابلیت استفاده به‌عنوان بارکد مناسب را دارد.

با توجه به درصد موفقیت در تکثیر و توالی‌یابی برای بارکدهای موجود، کنسرسیوم بارکدگذاری موجودات زنده CBOL (۲۰۰۹) ژن‌های کلروپلاستی *matK+rbcL* را به‌عنوان بهترین گزینه بارکد عمومی در گیاهان معرفی کرده است. همچنین یافته‌های پژوهشگران بارکد کلروپلاستی مکان بین‌ژنی *trnH-psbA* و بارکد مکان ژنی هسته‌ای *ITS* را به‌عنوان بارکدهای مکمل بارکدهای عمومی در گیاهان پیشنهاد می‌کند (Hollingsworth *et al*., 2011). با این حال، آغازگر مورد استفاده ممکن است در همه موارد کارآمد نباشد، زیرا بارکد جهانی باید در طیف گسترده‌ای از گیاهان با توجه به تنوع مورفولوژیکی و جغرافیایی ارزیابی شود (Bafeel *et al*., 2011). برای مثال از معایب بارکد *trnH-psbA* حضور جایگاه‌های تکراری و عدم توانایی در دسترسی به توالی با کیفیت و همردیفی نامناسب توالی‌ها به‌دلیل تنوع طولی بالا می‌باشد. در تحقیقات (Steinke *et al*., 2012; Piredda *et al*., 2010; Roy *et al*., 2010; Ren *et al*., 2010) این بارکد در کنار بارکد *rbcL* به‌عنوان بارکد مکمل توصیه شده است. همچنین بارکد *ITS* به‌دلیل تکثیر از ژنوم قارچ‌های موجود روی نمونه‌های گیاهی، طول بالای ژنوم هسته‌ای و به‌خاطر داشتن تکامل غیریکنواخت معمولاً به‌عنوان بارکد مکمل استفاده می‌شود (Hollingsworth *et al*., 2011; Chase *et al*., 2005). در واقع استفاده از ترکیبی از بارکدها در کنار هم نتایج مناسب‌تری را نمایان خواهد کرد. در این پژوهش نیز دو بارکد *ITS* و *trnH-psbA* همانند نتایج به‌دست‌آمده از سایر تحقیقات (Chase *et al*., 2005; Roy *et al*., 2010; Ren *et al*., 2010; Piredda *et al*., 2010; Hollingsworth *et al*., 2011; Steinke *et al*., 2012) به‌دلیل عدم توانایی دسترسی به توالی با کیفیت و همردیفی نامناسب توالی‌ها، طول بالای توالی و تنوع طولی بالا گزینه‌ای مناسب برای بارکد عمومی نیستند و به‌عنوان بارکد مکمل قابل کاربرد می‌باشند. علاوه‌بر این در پژوهش حاضر برای بارکد *matK* نتیجه مطلوبی حاصل نشد.

REFERENCES

Al-Qurainy F, Khan S, Nadeem M, Tarroum M, Gaafar ARZ (2014) Selection of DNA barcoding loci for *Nepeta deflersiana* Schweinf. ex Hedge from chloroplast and nuclear DNA genomes. Genet. Mol. Res. 13 (1): 1144-1151.

Bafeel S, Arif I, Bakir M, Khan H, Al Farhan A, Al Homaidan A, Ahamed A, Thomas J (2011) Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. Plant Omics Journal. 4(4): 195-198.

Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F (2010) DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. Brief. Bioinform. 11(4): 440-453.

CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. PNAS. 106 (31): 12794-12797.

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term

goals. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. 360: 1889-1895.

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J (2010) Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS one. 5: e8613.

Federici S, Galimberti A, Bartolucci F, Bruni I, De mattia F, Cortis P, Labra M (2013) DNA barcoding to analyse taxonomically complex groups in plants: the case of *Thymus* (*Lamiaceae*). Bot. J. Linn. Soc. 687-699.

Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S (2010) Identification of medicinal plants in the family *Fabaceae* using a potential DNA barcode *ITS*2. J. Ethnopharmacol. 116–121.

Ghahramanzadeh R, Marashi H, van de Weil K, Malekzadeh S, Shahriari F, Asmaldrz R (2012) The use of DNA barcoding to separation invasive species of aquatic weeds *Myriophyllum* spp. Non-invasive from relatives. Journal of Crop Protection. 101. (In Farsi)

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: *cytochrome c oxidase subunit 1* divergences among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. [Biol]. 270: 96-99.

Hilu KW, Liang H (1997) The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. Am. J. Bot. 84: 830–839.

Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP (2011) Choosing and using plant DNA barcode. PloS one. 6 (5): 19254.

Jingyuan S, Hui Y, Ying L, Xiwen L, Yulin L, Chang L, Jianping H, Caixiang X, Shilin C (2009) Authentication of the family *Polygonaceae* in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique. J Ethnopharmacol. 124 (3): 434-439.

Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PloS one. 2: e508.

Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, Swenson NG, Perez R, Sanjur O, Bermingham E (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogenyof a tropical forest dynamics plot in Panama. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Nov 3; 106 (44): 18621–18626.

Liu JIE, Möller M, Gao LM, Zhang DQ, Li DZ (2010) DNA barcoding for the discrimination of Eurasian yews (*Taxus L*., *Taxaceae*) and the discovery of cryptic species. Mol. Ecol. Resour. 11: 89–100.

Mahadani P, Ghosh SK (2013) DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices. DNA Barcodes. 35-38.

Naeem A, Ali Khan A, Cheema HMN, Khan I, Buerkert A (2013) DNA barcoding for species identification in Palmae family, In: International conference on date palm: Present status and future prospects. 2nd-4th September.

Pang X, Shi L, Song J, Chen X, Chen, S (2013) Use of the potential DNA barcode *ITS* to identify herbal materials. Nat. Med. 571-575.

Parveen I, Singh H, Raghuvanshi S, Pradhan U, Babbar S (2012) DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. Mol. Ecol. Resour. 12 (1): 82–90.

Piredda R, Simeone MC, Attimonelli M, Bellarosa R, Schirone B (2010) Prospects of barcoding the Italian wild dendroflora: oaks reveal severe limitations to tracking species identity. Mol. Ecol. Resour. 11: 72–83.

Rahim-Malik M (2011) Study and comparison of different methods of DNA extraction medicinal plants and aromatic. J. Med. Plants. 1-5.

Ren BQ, Xiang XG, Chen ZD (2010) Species identification of *Alnus* (*Betulaceae*) using mtDNA and cpDNA genetic markers. Mol. Ecol. Resour. 10: 594–605.

Roy S, Tyagi A, Shukla V, Kumar A, Singh UM (2010) Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian Berberis species. PloS one. 5: e13674.

Saghai Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW, (1994) Extraordinarily polymorphic micro satellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 91 (12): 5466–5470.

Schwei T (2015) "DNASTAR Lasergene 12.2 Software Achieves High Accuracy" (Press release). DNASTAR.

Steinke D, de Vere N, Rich T, Ford C, Trinder S, Long C, Moore C, Satterthwaite D,

Davies H, Allainguillaume J, Ronca S, Tatarinova T, Garbett H, Walker K, Wilkinson M, (2012) DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. PloS one. 7 (6): 37945.

Sun XQ, Bai MM, Yao H, Guo JL, Li MM, Hang YY (2013) DNA barcoding of populations of *Fallopia multiflora*, an indigenous herb in China. Genet. Mol. Res. 12 (3): 4078-4089.

Sun Z, Chen S (2013) Identification of cortex herbs using the DNA barcode. Nat. Med. 296-302.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1-25.