

Identification of Ecotypes and Different Species of Savory (*Satureja* spp.) Using DNA Barcoding Genes

Tahereh Peiri¹ and Arash Fazeli^{2*}

1- M. Sc. Graduated, Agriculture and Plant Breeding Ilam University, Ilam, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

*Corresponding author: a.fazeli@ilam.ac.ir

(Received: 02 October 2021

Revise: 06 January 2022

Accepted: 29 January 2022)

Extended Abstract

1-Introduction: Medicinal plants are valuable resources that have been considered by developing and developed countries considered as raw materials to become safe drugs for humans. *Satureja* belonging to the Lamiaceae family. This genus has more than 91 species with a wide distribution in the Mediterranean region. There are more than 8 species of this genus in Iran. Genetic identification and registration of different plant cultivars is one of the important stages of protecting genetic resources, which will be a difficult task for most plants in the early stages due to morphological characteristics. DNA barcoding is an emerging technology for fast and accurate species identification, and it is a molecular-based identification system that has recently been widely used, and its purpose is to identify biological samples and assign them to a specific species. Molecular DNA barcoding method is a reliable tool for identifying medicinal plants at the genus and species level. In this technique, a small part of the plant genome is sequenced and used to identify and determine the relationship between different species of a genus.

2-Materials and Methods: In the present study, the seeds of different species of savory plants including (*S. hortensis*, *S. bakhtiari*, *S. bioassier*, *S. mutica*, *S. bakhtiari*) were prepared from different regions of Ilam province and the National Center of Genetic and Biological Resources of Iran were investigated using DNA barcoding. Seed cultivation was done in April 2016 in the greenhouse of Ilam University. The seeds of the used species were grown in small pots. After the seeds germinated, when the seedlings grew to the stage of two to three leaves, the young leaves were sampled for DNA extraction. Genomic DNA was extracted by Doyle et al.'s method in the biotechnology laboratory of Ilam University in 1397. Quality and quantity of genomic DNA was checked using agarose gel 1/2% and nanodrop device respectively. PCR was performed using specific primers for *matK*, *rbcL* and *ITS* genes. Among the studied genes only *matK* gene was amplified in all samples. After purification of PCR products, their product were sequenced. In order analysis of data, first, the sequence Blast in NCBI database using nucleotide Blast. Alignment of sequence was done using Clustalw method by BioEdit Sequence Alignment Editor Software. Indeed, Phylogenetic tree created using MEGA-X software.

3-Results and Discussion: PCR amplification show that the only *matK* gene well amplified in all samples, while the other genes were not amplified. Also, the quality of the graphs shows the high quality of the sequence of the amplified fragment of the PCR product and the purity of the examined samples. Nucleotide BLAST in NCBI show that our results have high similarity with related spices in NCBI (more than 96%). The results of the analysis of content of nucleotides in the studied samples in comparison with the sample in NCBI show that according to the changes observed in the length of the fragment amplified on the agarose gel, but there were no significant changes in the molecular percentage of nucleotides in the studied samples. Cluster analysis based on UPGMA method of *matK* gene showed that the samples of *S. bioassier* and *S. bakhtiari* of Ilam and Gilan along with the sample of *S. hortensis* Birjand and Yazd were in the same group and samples of *s. bakhtiari* Yazd and *s. Khorasan mutica* were in the second group.

4-Conclusion: The results of PCR amplification show that *matK* gene has been amplified in all samples that it can be very well way for investigating and determining of phylogenetic relationship of different savory species. The results of *matK* gene sequence as one of the candidate genes in plant DNA barcodes showed that the studied samples and ecotypes along with samples extracted from NCBI were classified into three groups. The results of this study showed that it is possible to use the *matK* gene as a part of the barcode system to identify savory species. However, due to the lack of information about the barcode library for the *matK* gene in the *Satureja* genus, it is not possible to make a definite conclusion about the species. The *matK* gene has two advantages, including the efficient yield of quality sequences and a high level of species discrimination. In general, re-sequencing of *matK* gene can be separated different samples from each other based on geographical origin.

Keywords: *Satureja* spp., Medicinal plant, DNA barcoding, Sequencing.

Citation: Peiri, T., & fazeli, A. (2022). Identification of ecotypes and different species of savory (*satureja* spp) using DNA barcoding. *Journal of Vegetables Sciences*, 11(1), 82-96. doi: 10.22034/iuvs.2022.540180.1179

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).



شناسایی اکوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف مرزه (*Satureja spp.*) با استفاده از بارکدینگ DNAطاهره پیری^۱ و آرش فاضلی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

*نویسنده مسئول: a.fazeli@ilam.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۰

چکیده

برخی از گیاهان دو منظوره سبزی-دارویی منابع ارزشمندی هستند که در کشورهای در حال توسعه و پیشرفته مورد توجه قرار گرفته و به عنوان سبزی تازه خوری یا مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی خطر برای انسان تلقی می‌شوند. روش بارکدینگ مولکولی ابزار قابل اعتمادی برای شناسایی گیاهان در سطح جنس و گونه است. در این تکنیک بخش کوچکی از ژنوم گیاه توالی‌یابی شده و برای شناسایی و تعیین ارتباط بین گونه‌های مختلف یک جنس استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر ۷ اکوتیپ از گیاه مرزه (*S. hortensis*, *S. bakhtiari*) دانشگاه ایلام استخراج گردید و PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های *matK*، *rbcl* و *ITS* انجام شد. پس از خالص‌سازی محصولات PCR مشخص شد که از ژن‌های مورد بررسی فقط ژن *matK* کیفیت مناسبی جهت تفکیک نمونه را نشان داد. همچنین نتایج جستجوی نوکلئوتیدی نشان داد که شباهت بسیار بالایی (بیش از ۹۶ درصد) بین توالی‌های بدست آمده و توالی‌های پایگاه NCBI وجود دارد. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA ژن *matK* نشان داد که نمونه‌های *S. biossier* و *S. bakhtiari* ایلام و گیلان به همراه نمونه *S. hortensis* بیرجند و یزد در یک گروه قرار گرفتند و نمونه‌های *S. bakhtiari* یزد و *S. mutica* خراسان در گروه دوم قرار گرفتند. نتایج کلی این تحقیق نشان می‌دهد که با استفاده از توالی‌یابی ژن *matK* می‌توان نمونه‌ها را از لحاظ منشاء جغرافیایی از همدیگر تفکیک نماید.

واژه‌های کلیدی: مرزه، گیاه سبزی- دارویی، DNA بارکدینگ، توالی‌یابی.

استناد: پیری، ط. و فاضلی، آ. (۱۴۰۱). شناسایی اکوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف مرزه با استفاده از بارکدینگ DNA. علوم سبزی‌ها، ۱۱(۱)، ۸۲-۹۶.

حق چاپ:



حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل دسترس است.

مقدمه

پیشنهاد شد. او پیشنهاد کرد که انتهای ۵ پرم سیتوکروم اکسیداز ۱ (CO1) از ژنوم میتوکندری برای تولید بارکدهای DNA برای شناسایی حیوانات مناسب می‌باشد (Hebert *et al.*, 2003, 2004). DNA بارکدینگ یک تکنولوژی در حال ظهور برای شناسایی سریع و دقیق گونه بوده و یک سیستم شناسایی مبتنی بر مولکولی است که اخیراً به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد و هدف آن شناسایی نمونه‌های بیولوژیکی و اختصاص دادن آن‌ها به یک گونه خاص است. داده‌های DNA بارکدینگ ممکن است به روش‌های گوناگون بسته به نوع تاکسون مورد بررسی تفسیر شود. از طریق تجزیه و تحلیل تنوع در یک (یا چندین) نشانگر مولکولی استاندارد امکان جداسازی موجودات زیستی وجود دارد. این روش بر این فرض استوار است که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها بیش از تنوع در درون گونه‌ها است (Casiraghi *et al.*, 2010). یک بارکد مفید DNA نیاز به تغییرات توالی کافی برای تمایز بین گونه‌ها و سهولت کاربرد در طیف وسیعی از تاکسون‌ها دارد (Kress and Erickson 2007). درون سلول‌های گیاهی اساساً DNA در سه جایگاه هسته، میتوکندری و کلروپلاست وجود دارد که در دهه‌های گذشته ساختار این سه ژنوم سلول‌های یوکاریوتی به‌عنوان هدفی برای DNA بارکدینگ با جزئیات بیشتری مورد بررسی قرار گرفته است، از اینرو نشانگرهای مختلفی بسته به هدف مطالعه‌های سیستماتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که ITS و DNA کلروپلاستی از پرکاربردترین آن‌ها محسوب می‌شود (Caceres *et al.*, 2000). مکان‌های ژنی کلروپلاست شامل matK و trnH-psbA گزینه‌هایی امیدوارکننده برای توسعه DNA بارکدینگ است. مکان‌های ژنی matK برای شناسایی در خانواده‌ها، جنس‌ها و سطوح گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد. مکان‌های ژنی متغیر از ژنوم کلروپلاست نشانگرهای بالقوه برای توسعه DNA بارکدینگ هستند. بنابراین لازم است متغیرترین مکان‌های ژنی در ژنوم کلروپلاست که می‌توانند گونه‌های گیاهی مرتبط نزدیک به هم را تشخیص دهند، تعیین شوند. این ژن‌ها که

گیاهان یک منبع عظیم برای کشف محصولات جدید دارای ارزش غذایی و دارویی می‌باشند (Vanisree *et al.*, 2004). مرزه به عنوان یکی از مطبوع‌ترین سبزی‌ها معرفی شده و مدت‌هاست که از آن به عنوان سبزی، چاشنی و ادویه استفاده می‌شود. در بسیاری از کشورها از جمله انگلیس، از مرزه به عنوان یکی از گیاهان مهم ادویه‌ای استفاده می‌شود (Omidbaigi, 2000). مرزه بومی جنوب اروپاست و امروزه زمین‌های زراعی وسیعی در کشورهای یوگسلاوی، فرانسه، اسپانیا، آمریکا (کالیفرنیا) و مجارستان به کشت مرزه اختصاص می‌یابد (Omidbaigi, 2000).

جنس مرزه (*Satureja*) یکی از جنس‌های خانواده نعناع (Lamiaceae) متعلق به زیر خانواده Nepetoideae و قبیله Mentheae می‌باشد. این جنس دارای بیش از ۹۱ گونه با پراکنش گسترده در منطقه مدیترانه‌ای می‌باشد. از این جنس بیش از ۸ گونه بومی و انحصاری در ایران وجود دارد. گونه‌های مختلف جنس مرزه به‌عنوان، سبزی، ادویه، چاشنی و استفاده می‌شوند. ارزش غذایی و اثرات دارویی متعدد این گونه‌ها به ویژه اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی اسانس عصاره مرزه در مطالعات مختلف بررسی و تأیید شده است (Esmaeili *et al.*, 2016). گونه‌های این جنس بیشتر در دامنه‌های کوهستانی مناطق شمال، شمال غربی، شمال شرقی، مرکزی و جنوب غربی ایران پراکنده داشته و روی صخره‌های آهکی و یا دامنه‌های سنگلاخی می‌رویند و سایر گونه‌ها علاوه بر ایران در ترکمنستان، ترکیه، قفقاز، ماورای قفقاز و عراق نیز می‌رویند (Sefidkon *et al.*, 2005). بسیاری از اعضای جنس مرزه گیاه چند منظوره‌ای هستند که ویژگی‌های معطر و پزشکی داشته و در پزشکی سنتی، برای درمان بیماری‌های مزمن، مثل قولنج، دردهای عضلانی، تهوع، سوء هاضمه اسهال و بیماری‌های عفونی استفاده می‌شده‌اند (Gulluce *et al.*, 2003).

اصطلاح "DNA بارکدینگ" به عنوان شناسه‌های تاکسون ابتدا توسط پل هبرت از دانشگاه گلف (۲۰۰۳)

در تشخیص گونه‌ها، نتایج پژوهش نشان داد که ITS2 یک نشانگر قدرتمند برای تشخیص گیاهان است. برای اولین مجموعه داده شامل ۶۱ گیاه، ITS2 به طور کامل ۱۰۰ درصد از آن‌ها را درست شناسایی کرد. برای مجموعه داده‌های دوم حاوی ۵۱ گیاه و ۲۳۸۲ گونه مرتبط نزدیک به آن‌ها، ITS2 توانست به طور صحیح ۴۸ گیاه را از گونه‌های نزدیک خود متمایز کند. برای مجموعه داده‌های سوم شامل ۳۴ گیاه و ۱۱۱ گیاه ناخالص، ITS2 توانست با موفقیت تمام گیاهان را از ناخالص‌های آن‌ها تشخیص دهد (Pang et al., 2013). Zuo و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهشی ۱۱ مکان بارکد DNA را به منظور ایجاد یک سیستم دقیق و مؤثر برای شناسایی ۹۵ نمونه جینسنگ استفاده کردند. نتایج نشان داد تفاوت‌های قابل توجهی در عملکرد مناطق بارکدینگ پتانسیلی وجود دارد. توالی *atpF-atpH* به علت ساختار خاص آن ناموفق بود. محدوده‌های *rbcL*، *rpoB* و *rpoC1* اغلب غیرقابل تغییر و تنها چهار تا هشت مکان متغیر بودند. همچنین ترکیبی از *psbA-trnH* و *ITS* برای شناسایی تمام خوشه‌های گونه در این جنس کافی است. Chen و همکاران (۲۰۱۰) ۶۶۰۰ نمونه گیاه دارویی متعلق به ۴۸۰۰ گونه از ۷۵۳ جنس متمایز را با استفاده از مناطق ژنوم *psbA-trnH*، *matK*، *rbcL*، *rpoC1*، *ycF5*، *ITS* و *ITS2* مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. داده‌های آن‌ها نشان داد که دومین فضای رونویسی شده داخلی (ITS2) از DNA ریبوزوم هسته‌ای، مناسب‌ترین منطقه برای کاربردهای بارکدینگ DNA است. درصد شناسایی موفق با ITS2 در سطح گونه‌ها ۹۲/۷ درصد بود. آن‌ها بیان کردند منطقه ITS2 می‌تواند به طور بالقوه به عنوان یک DNA بارکد استاندارد برای شناسایی گیاهان دارویی و گونه‌های نزدیک آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. همچنین پیشنهاد کردند که ITS2 بتواند به عنوان یک بارکد جدید جهانی برای شناسایی محدوده گسترده‌ای از رده‌بندی گیاهی باشد. Theodoridis و همکاران (۲۰۱۲) گیاهان دارویی خانواده Lamiaceae را که از جزیره چیوس (یونان) و شبه جزیره مجاور (ترکیه)

سرعت و تنوع تکاملی آن‌ها بالا است، برای مطالعه‌های فیلوژنتیک و بارکدینگ DNA ترجیح داده می‌شود. در ژنوم کلروپلاست، برخی از ناحیه‌ها از لحاظ جهشی فعال هستند (Dong et al., 2012) و مشکلاتی را در بازسازی فیلوژنی به علت نوترکیب و همگرایی توالی ایجاد می‌کند (Muller et al., 2006).

ژن *matK* به علت داشتن سرعت تکاملی بالا، در حل روابط تکاملی در سطوح گونه و خانواده و حتی در سطوح بالاتر فیلوژنی کارآمد است (Mohr et al., 1993; Sanders et al., 2003). این ژن حدود ۱۵۰۰ جفت باز طول دارد که در اینترون *trnK* قرار داشته و پروتئین ماچورازی (Maturase protein) را کد می‌کند که این پروتئین در ویرایش گروه اینترون‌ها دخالت دارد. ویژگی منحصر به فرد *matK* یعنی سرعت جایگزینی بالای آن باعث شده که در شناسایی گونه‌های گیاهی به عنوان بارکد DNA در نظر گرفته شود. این ژن به تنهایی یا همراه با سایر توالی‌های DNA برای بارکدینگ استفاده می‌شود (Jing et al., 2011). Asadi و همکاران (۲۰۱۵) به منظور شناسایی هشت گیاه دارویی جمع‌آوری شده از استان اردبیل از بارکدهای کلروپلاستی *rbcL*، *trnH-psbA*، *matK* و بارکد هسته‌ای *ITS* استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد توالی‌ها با نمونه‌های موجود در پایگاه داده NCBI هم‌ردیف شدند. در بارکد *ITS* فقط شیرین بیان با گیاهان هم‌جنس خود قرار گرفت. بارکد *rbcL* به دلیل قدرت تفکیک بالا، تعداد SNP پایین و جامعیت در اکثر گونه‌ها، به عنوان بهترین بارکد معرفی شد. آن‌ها بیان کردند *matK* به دلیل قدرت تکثیر و توالی‌بندی پایین برای نمونه‌های مورد بررسی توصیه نمی‌شود. در پژوهشی دیگر برای تأیید و شناسایی مواد گیاهی و همچنین اطمینان از عدم خطرناک بودن آن‌ها در داروها، از مکان *ITS2* به عنوان یک بارکد DNA بالقوه برای شناسایی هویت ۴۳۸۵ نمونه از ۲۴۳۱ گونه استفاده شد که این نمونه‌ها از ۶۱ گیاه معمول و از گونه‌های نزدیک و مرتبط با آن‌ها استفاده شد. بر اساس ارزیابی میزان انحراف ژنتیکی، توانایی بارکدینگ DNA

بشمار می‌آید که این امر در اکثر گیاهان در مراحل اولیه از روی خصوصیات مورفولوژیکی کاری سخت خواهد بود و 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). منابع ژنتیکی به خصوص گونه‌های دارویی، در سال‌های اخیر به دلیل تغییرات اقلیمی و بهره‌برداری‌های غیرمسئولانه در معرض خطر فرسایش و نابودی هستند و لازم است در خصوص شناسایی و جمع‌آوری و حفاظت آن‌ها برنامه‌ریزی‌های لازم صورت گیرد (Hatari *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر سعی شده تا با استفاده از ناحیه‌های ژنی هسته‌ای و کلروپلاستی گونه‌ها و اکوتیپ‌های مختلف مرزه به روش DNA بارکدینگ شناسایی شوند و گامی مؤثر در جهت ثبت تنوع موجود در این گیاه مهم و اقتصادی برداشته شود.

مواد گیاهی

در این پژوهش بذور گونه‌های مختلف گیاه مرزه از مناطق مختلف استان ایلام و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند که مشخصات آن‌ها در جدول زیر ذکر شده است (جدول ۱).

جمع‌آوری شده بود با استفاده از هر سه بارکد matK, psbA-trnH, rbcL که آن‌ها را به صورت تک منطقه یا به عنوان بارکد چند منطقه‌ای مورد آزمایش قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که matK و psbA-trnH به عنوان ترکیبی از چندین منطقه مفید هستند. برای گونه‌های Labiatae, matK و psbA-trnH می‌تواند به عنوان بارکدینگ‌های تک منطقه مورد استفاده قرار گیرد. ناحیه‌های تک منطقه‌ای مثل psbA-trnH و matK برای آنالیز گونه‌های Labiatae مفید بودند. Schori و Showalter (۲۰۱۱) مکان‌های rbcL, matK, psbA-trnH را از ۱۴ گونه از گیاهان دارویی پاکستان مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند و دریافتند که بسته به شناسایی گیاه، یک مکان ژنی برای کمک به شناسایی گونه‌ها ترجیح داده می‌شود. Gao و همکاران (۲۰۱۰) ۱۱۴ نمونه گیاه از خانواده Fabaceae را با استفاده از منطقه بارکد ITS2 را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد ITS2 به خوبی توانست بیش از ۸۰ درصد از گونه‌ها و ۱۰۰ درصد از جنس‌ها را به درستی متمایز کند برای ۱۵۰۷ توالی از ۱۱۲۶ گونه متعلق به ۱۹۶ جنس به درستی تمایز داد. آن‌ها بیان کردند که ITS2 می‌تواند به عنوان نشانگر کارآمد و قدرتمند و بارکد بالقوه برای تشخیص گونه‌های مختلف در Fabaceae استفاده شود.

شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف گیاهی یکی از ارکان مهم حفاظت و بهره‌برداری صحیح از منابع ژنتیکی

جدول ۱- نمونه های مرزه مورد استفاده در تحقیق

Table 1- Samples of savory used in the research

نام علمی Scientific name	نام فارسی Persian name	محل جمع‌آوری Place of collection
<i>Satureja bakhtiari</i>	مرزه بختیاری	یزد- Yazd
<i>Satureja horentiss</i>	مرزه تابستانه	Birjand- بیرجند
<i>Satureja horentiss</i>	مرزه تابستانه	یزد- Yazd
<i>Satureja bakhtiari</i>	مرزه بختیاری	ایلام- (ایوان)
<i>Satureja biossier</i>	مرزه	گیلان- Guilan
<i>Satureja mutica</i>	مرزه جنگلی	خراسان- Khorasan
<i>Satureja bakhtiari</i>	مرزه بختیاری	ایلام- (کبیرکوه)
<i>Satureja bakhtiari</i>	مرزه بختیاری	ایلام- (ملکشاهی)

شرایط کشت

کشت بذور در فروردین ماه سال ۱۳۹۶ در گلخانه دانشگاه ایلام انجام شد. بذور گونه‌های مورد استفاده در گلدان‌های کوچک پلاستیکی که با نسبت مساوی از خاک مخصوص حاوی (شن، خاک، کود برگ) پر شده بودند، کشت گردید. بعد از جوانه‌زنی بذور، مراقبت‌های لازم در دوره داشت گیاهچه‌ها به عمل آمد. وقتی گیاهچه‌ها به مرحله دو تا سه برگی رسیدند، از برگ‌های

جوان نمونه‌برداری صورت گرفت و برای انجام آزمایشات بعدی به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

مراحل استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های فریز شده صورت گرفت (Doyle & Doyle., 1990). برای تعیین کیفیت DNA از ژل آگاروز ۰/۸ درصد استفاده شد. جهت تکثیر DNA ژنومی از پرایمرهای اختصاصی بر اساس پژوهش Asadi و همکاران (۲۰۱۵) (جدول ۲) استفاده گردید.

جدول ۲- آغازگرهای اختصاصی در پژوهش

Table 2 – Specific primers in the research

آغازگر primer	توالی (۳-۵) Sequence 5-3	اندازه (bp) Size (bp)	دمای اتصال Temperature annealing
matK	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG TAATTTACGATCAATTCATTC	250	۴۰
Rbcl	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC GTAAAATCAAGTCCACCRGC	-	۵۰-۶۰
ITS1	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCCG GTTGCCGAGAGTCG	-	۶۰-۶۵

آنالیزهای بیوانفورماتیکی

ابتدا صحت توالی‌های به دست آمده با نمونه‌های موجود در NCBI با استفاده از گزینه BLAST انجام گرفت، سپس میزان تشابه و همولوژی توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی مرکز زیست‌فناوری آمریکا (NCBI) بررسی گردید. جهت هم‌ردیف‌سازی نمونه‌ها از نرم‌افزار BioEdit استفاده شد. همچنین جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و شناسایی هاپلوتایپ‌ها، شناسایی نواحی حفاظت شده از نرم‌افزارهای CLC Sequencer، Viewer6، Geneious، MEGA5.2 استفاده گردید. در نرم‌افزار MEGA5.2 ترسیم درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor Joining و ۱۰۰۰ بار Bootstarring انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف مدل Mastercycler nexus آمریکا در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و برنامه دمایی واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۵-۴۰ درجه سانتیگراد (برای هر آغازگر) ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

از ژل آگارز ۱/۲ درصد برای تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR استفاده شد. محصول PCR به دست آمده برای خالص‌سازی و توالی‌یابی تک رشته پیشرو توسط ژن matK به شرکت سینا کلون ارسال گردید.

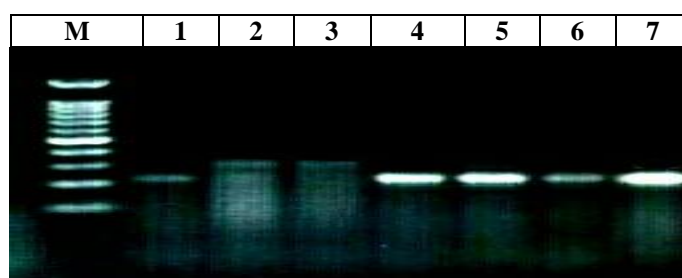
نتایج و بحث

نتایج استخراج DNA ژنومی براساس روش دوپیل و همکاران (۱۹۹۰) نشان می‌دهد که DNA استخراج شده بدون خردشدگی و با کیفیت بسیار بالایی می‌باشد که می‌توان از این DNA در آنالیزهای بعدی جهت انجام PCR و توالی‌یابی استفاده نمود.

تکثیر ژن matK در نمونه‌های مورد بررسی با

استفاده از آغازگر اختصاصی

برای تکثیر ژن matK در نمونه‌های مورد بررسی، واکنش زنجیره‌ای PCR با آغازگر اختصاصی انجام گرفت و محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد انتقال یافتند. نتایج حاصل از تکثیر ژن matK در نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که این ژن در همه‌ی نمونه‌ها تکثیر شده است (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج تکثیر ژن matK در نمونه‌های مورد بررسی (M: سایز مارکر، ۱: نمونه یزد (مرزه بختیاری)، ۲: نمونه بیرجند (مرزه تابستانه)، ۳: نمونه یزد (مرزه تابستانه)، ۴: نمونه ایلام (مرزه بختیاری)، ۵: نمونه گیلان، ۶: نمونه خراسان (مرزه جنگلی) و ۷: نمونه ایلام (مرزه بختیاری - کبیرکوه)).

Figure 2- Results of matK gene amplification in the studied samples (M: marker size, 1: Yazd sample (*S. bakhtiari*), 2: Birjand sample (*S. horentiss*), 3: Yazd sample (*S. horentiss*), 4: Ilam sample (*S. bakhtiari*), 5: Guilan sample (*S. bioissier*), 6: Khorasan sample (*S. mutica*) and 7: Ilam sample (Kabirkoh- *S. bakhtiari*)).

نتایج حاصل از توالی‌یابی

بعد از انجام PCR و تکثیر ژن matK، محصول PCR خالص‌سازی و توالی‌یابی شد. بررسی مقدماتی توالی‌های به دست آمده نشان داد که توالی‌های به دست آمده از قطعات تکثیر شده PCR تشابه بسیار بالایی با ژن matK سایر گیاهان در NCBI دارد، لذا این می‌تواند صحت توالی‌های به دست آمده را تأیید نماید تا سایر آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر اساس همین توالی‌ها صورت گیرد. کیفیت گراف‌ها نشان دهنده کیفیت بالای توالی قطعه تکثیر شده محصول PCR و خالص بودن نمونه‌های مورد بررسی می‌باشد.

نتایج مقایسات بیوانفورماتیکی

نتایج جستجوی توالی ژن matK نمونه بیرجند

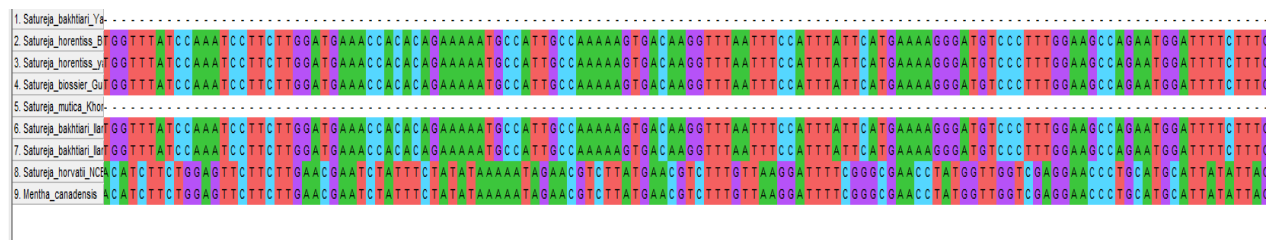
جهت آنالیز داده‌ها، توالی‌های به دست آمده ابتدا با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Sequence Alignment Editor به روش ClustalW هم‌مردیف‌سازی شدند و سپس توالی‌های مرتب شده به فرمت FASTA جهت آنالیزهای بعدی ذخیره شدند. این مقایسه صرفاً برای نشان دادن تنوع بین‌گونه‌ای در سطح ژن matK و مقایسه آن با نمونه موجود در NCBI است. برای این کار توالی ژن matK برای هر نمونه به روش بلاست نوکلئوتیدی در پایگاه اطلاعاتی NCBI انجام گرفت. طول قطعه تکثیر شده ژن matK در نمونه بیرجند ۹۲۵ جفت باز بود که مقایسات بیوانفورماتیکی در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که این توالی همولوژی بسیار بالایی با نمونه‌های زیر دارد که بر اساس نمره کل محاسبه شده از لحاظ درصد تشابه، همپوشانی به ترتیب در جدول (۳) ذکر شده است.

جدول ۳- درصد تشابه نمونه بیرجند با نمونه‌های موجود در پایگاه NCBI
Table 3- Similarity of Birjand sample with the samples in NCBI database

نام علمی Scientific name	E-value E-value	درصد تشابه Similarity	کد دسترسی Accession number
<i>Satureja horvatiisat</i>	0	99	KX954592.1
<i>Mentha pulegium</i>	0	98	JN896125.1
<i>Satureja motana</i>	0	98	MF350242.1
<i>Salvia officinalis</i>	0	96	MG772529.1
<i>Killickia pilosa</i>	0	99	GU381662.1
<i>Lycopus virginicus</i>	0	97	MF350270.1
<i>Clinopodium atlantiicum</i>	0	98	GU381697.1

بسیار حفاظت شده می‌باشد. در حالیکه نسبت به دو نمونه *Mentha Canadensis* و *Satureja horvati* که توالی ژن matK آن‌ها از NCBI گرفته شده تنوع بسیار زیادی را نشان می‌دهند. علاوه بر این همانطور که در شکل (۲) نشان داده شده است هفت توالی حاصل از نمونه‌های مورد مطالعه تشابه بسیار بالایی با یکدیگر دارند در حالیکه همین نمونه‌ها با نمونه‌های موجود در NCBI تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهند.

نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌های حاصل از جستجوی ژن matK برای این منظور توالی‌های بدست آمده به روش ClustalW هم‌ردیف‌سازی شدند. نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی نمونه‌ها نشان می‌دهد که بین نمونه‌های موجود در NCBI و نمونه بیرجند تشابه نوکلئوتیدی بسیار بالایی وجود دارد بطوریکه فقط در بخش‌هایی تنوع تک نوکلئوتیدی وجود دارد که نشان می‌دهد این ژن در نمونه‌های مورد بررسی در بین گونه‌های مختلف



شکل ۲- هم‌ردیف‌سازی با روش ClustalW
Figure 2- Alignment using ClustalW method

Mentha Canadensis موجود در NCBI مشاهده شد در حالی که کمترین مقدار (۲۹/۵۱) در نمونه *Satureja hortensis* Birjand مشاهده شد. بیشترین و کمترین مقدار گوانین (G) به ترتیب (۲۱/۲۳) و (۱۶/۱۸) در نمونه *Satureja mutica* Khorasan و *Menthe Canadensis* مشاهده شد. مقدار سیتوزین (C) نسبت به بقیه نوکلئوتیدها در همه نمونه‌ها کمتر بود، علاوه بر این، کمترین مقدار سیتوزین (C) در نمونه *Satureja biossier* Guilan (۱۵/۵۹) مشاهده شد در حالیکه بیشترین مقدار سیتوزین (۱۸/۸۸) در نمونه *Satureja bakhtiari* Yazd مشاهده شد.

ساختار نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد بررسی نتایج آنالیز تعداد و درصد نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد بررسی در مقایسه با نمونه موجود در NCBI (جدول ۴) نشان می‌دهد که با توجه به تغییراتی که در طول قطعه تکثیر شده روی ژل آگارز مشاهده شد، اما تغییرات چندانی در درصد مولکولی نوکلئوتیدها در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد بطوریکه بیشترین درصد مولکولی نوکلئوتید A در نمونه بیرجند (۳۶/۳۲) درصد) مشاهده شد در صورتیکه کمترین مقدار در نمونه NCBI (۲۸/۸۴) درصد) مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد (۳۶/۷۲) مولکولی تیمین (T) در نمونه

جدول ۴- تعداد و درصد مولکولی نوکلئوتیدهای نمونه‌های مورد بررسی
Table 4- Number and molecular percentage of nucleotide in the samples

اسم علمی Latin name	A		T		G		C	
	تعداد	درصد مولکولی	تعداد	درصد مولکولی	تعداد	درصد مولکولی	تعداد	درصد مولکولی
	Number	Molecular %	Number	Molecular %	Number	Molecular %	Number	Molecular %
<i>Satureja bakhtiari</i> Yazd	61	31.12	58	29.59	40	20.41	37	18.88
<i>Satureja horentiss</i> Birjand	336	36.32	273	29.51	166	17.95	150	16.22
<i>Satureja horentiss</i> Yazd	326	35.36	282	30.59	165	17.90	149	16.16
<i>Satureja bioissier</i> Guilan	329	35.38	288	30.97	168	18.06	145	15.59
<i>Satureja mutica</i> Khorasan	53	29.70	54	30.28	38	21.23	34	18.79
<i>Satureja bakhtiari</i> Ilam	325	35.83	269	29.66	168	18.52	145	15.99
<i>Satureja bakhtiari</i> Ilam	331	36.06	274	29.80	170	18.52	143	15.83
<i>Satureja horvatii</i> NCBI	246	28.84	310	36.34	144	16.88	153	17.94
<i>Mentha canadensis</i>	260	29.02	329	36.72	145	16.18	162	18.08

زیادی به همدیگر دارند تحت ریشه‌های مشترک قرار می‌گیرند و طول شاخه‌ها نیز نمایانگر فاصله بین توالی‌ها است (Mount., 2004; Felsenstein., 2004). در ماتریس فاصله توالی‌های اکوتیپ‌ها مشاهده می‌شود که یکی از خروجی‌های نرم‌افزار MegAlign است. در این ماتریس برای هر جفت توالی اکوتیپ، اعداد بالای قطر نشان‌دهنده میزان شباهت یا همسانی و اعداد زیر قطر نشان‌دهنده میزان تفاوت یا تنوع است (جدول ۵).

محاسبه ماتریس فاصله بین توالی‌ها

روش یافتن ماتریس فاصله در تحلیل‌های ژنتیکی متکی بر اندازه‌گیری فاصله ژنتیکی بین توالی‌ها می‌باشد. ماتریس فاصله بین توالی نمونه‌های مورد بررسی و دو نمونه حاصل از پایگاه NCBI در جدول (۵) آمده است که این جدول فاصله‌ی هر جفت از توالی‌ها را مشخص می‌کند. با استفاده از این اطلاعات درخت فیلوژنتیکی ساخته می‌شود که در آن توالی‌هایی که شباهت بسیار

جدول ۵- ماتریس فاصله بین توالی‌ها
Table 5-- Distance Matrix between Sequences

گونه‌ها species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Satureja horentiss</i> Birjand (1)		0.009	0.019	0.2434	0.0166	0.018	0.260	0.7483	0.8095
<i>Satureja horentiss</i> yazd (2)	0.062		0.013	0.226	0.012	0.013	0.2458	0.7514	0.7384
<i>Satureja bioissier</i> Guilan (3)	0.1603	0.104		0.241	0.005	0.0040	0.258	0.957	0.9486
<i>Satureja mutica</i> Khorasan (4)	1.1519	1.084	1.1267		0.233	0.226	0.023	1.0203	1.0631
<i>Satureja bakhtiari</i> Ilam (5)	0.1335	0.099	0.0245	1.1092		0.0055	0.251	0.9081	0.905
<i>Satureja bakhtiari</i> Ilam (6)	0.157	0.107	0.015	1.0848	0.025		0.2458	0.963	1.010
<i>Satureja bakhtiari</i> Yazd (7)	1.3301	1.260	1.304	0.081	1.2856	1.260		1.363	1.363
<i>Satureja horvatii</i> NCBI (8)	3.2893	3.3560	4.182	2.9851	4.0404	4.185	3.868		0.003
<i>Mentha Canadensis</i> (9)	3.5213	3.3526	4.205	3.066	4.0543	4.3839	3.868	0.0107	

مورد مطالعه از لحاظ توالی ژن matK (شکل ۳) نشان می‌دهد که نمونه‌های مورد مطالعه به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل نمونه‌های *S. bioissier* Guilan، *S. bakhtiari* Ilam و *S. horentiss* Birjand، *S. bakhtiari* Ilam و *S.*

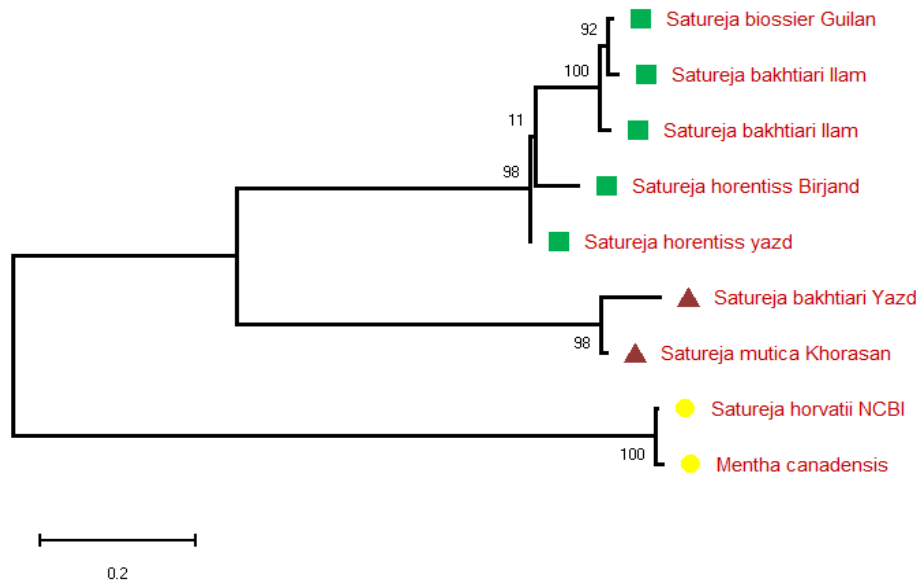
تعیین میزان شباهت نمونه‌های مورد بررسی از

نظر ژن matK

بعد از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها نمودار فیلوژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از روش NJ انجام گرفت. نتایج تجزیه فیلوژنتیکی در سطح DNA برای نمونه‌های

NCBI و *Mentha Canadensis* بدست آمده از NCBI در یک گروه قرار دارند. علاوه بر آن دو نمونه *S. mutica Khorasan* و *S. bakhtiari Yazd* بیشترین نزدیکی را با نمونه‌های حاصل از NCBI دارند.

S. horentiss yazd می‌باشد که در بین آن‌ها *S. bakhtiari Ilam* و *biossier Guilan* بیشترین شباهت و نمونه *S. biossier Guilan* و *S. horentiss yazd* کمترین شباهت را دارند. گروه دوم شامل *S. mutica Khorasan* و *S. bakhtiari Yazd* می‌باشند و گروه سوم شامل دو نمونه *S. horvatii*



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم UPGMA در سطح DNA
Figure ۳- Phylogenetic tree using UPGMA algorithm at DNA level

G با A به مقدار ۹/۴۰ بوده و کمترین مقدار جایگزینی C با A ۳/۹۲ بوده است. علاوه بر این برای جایگزینی T/U با سایر نوکلئوتیدها در توالی‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که جایگزینی C با T/U بیشترین (۸/۸۴) و جایگزینی G با T/U کمترین مقدار (۴/۲۲) می‌باشد. همچنین برای باز C بیشترین جایگزینی T/U با C به مقدار ۱۶/۸۹ و کمترین مقدار G با C ۴/۲۲ مشاهده شد. در نهایت برای باز G بیشترین جایگزینی A با G به مقدار ۱۷/۶۹ و کمترین مقدار C با G ۳/۹۲ نوکلئوتید محاسبه گردید.

ماتریس حداکثر درست‌نمایی از جایگزینی نوکلئوتیدها

داده‌های جدول (۶) احتمال جایگزینی یک باز را از یک ردیف به باز دیگر در ستون بعدی نشان می‌دهد. الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی تخمین زده شد (Tamura & Nei., 1993). فراوانی نوکلئوتید (آدنین ۳۳,۷۱ درصد، تیمین/یوراسیل ۳۱,۷۷ درصد، سیتوزین ۱۶,۶۲ درصد و گوانین ۱۷,۹۰ درصد است. نتایج جدول نشان می‌دهد که بیشترین جایگزینی نوکلئوتیدی برای نوکلئوتید A،

جدول ۶- ماتریس حداکثر درست نمایی از جایگزینی نوکلئوتیدها

Table 6- Maximum likelihood matrix of nucleotide substitution

	A	T/U	C	G
A	-	7.50	3.92	9.40
T/U	7.95	-	8.84	4.22
C	7.95	16.89	-	4.22
G	17.69	7.50	3.92	-

زیادی از گونه‌های گیاهی است ولی ممکن است در موارد خاص به دلیل نامتناسب بودن پرایمر در مکان اولیه نتوانند موفق عمل کنند.

نتایج حاصل از بررسی توالی ژن *matK* به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندید شده در بارکدهای DNA گیاهی نشان داد که نمونه‌ها و اکوتیپ‌های مورد بررسی به همراه نمونه‌های استخراج شده از NCBI در سه گروه دسته‌بندی شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که احتمالاً می‌توان ژن *matK* را به عنوان بخشی از سیستم بارکدگذاری برای شناسایی گونه‌های مرزه بکار برد. اگرچه با توجه به کمبود اطلاعات در مورد کتابخانه بارکد برای ژن *matK* در جنس *Satureja* نمی‌توان با اطمینان کامل در مورد گونه‌ها نتیجه‌گیری قطعی کرد. ژن *matK* دارای دو مزیت شامل بازده کارایی توالی‌های با کیفیت و سطح بالایی از تبعیض گونه می‌باشد (Burgess *et al.*, 2011). در مطالعاتی از توالی *matK* برای شناسایی گونه‌ها (بارکدینگ) استفاده کرده‌اند (Asahina *et al.*, 2010) و همچنین برای تحلیل فیلوژنتیک (Kuo *et al.*, 2011; Manen *et al.*, 2004; Tamura, 1993) استفاده شده است. همچنین نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که مرزه ایلام بیشترین تشابه توالی نوکلئوتیدی با مرزه گیلان دارد، همچنین نمودار درختی توانست نمونه‌ها را بر اساس موقعیت جغرافیایی از هم تفکیک نماید بطوریکه نمونه‌های مرکز و شرق کشور شامل یزد و خراسان نسبت به نمونه‌های ایلام در گروه دیگری قرار گرفتند. لذا نتایج کلی این آزمایش نشان می‌دهد که ژن *matK* می‌تواند گونه‌های مختلف مرزه را بر اساس موقعیت

روش‌های سنتی شناسایی گیاهان خوراکی و دارویی شامل روش‌های ارگانولپتیکی یا حسی (طعم، دید، بوی، لمس)، روش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی (شناسایی شکل، رنگ، بافت) و مشخصات شیمیایی (مانند TLC، HPLC-UV، HPLC-MS) بودند. با این وجود، هیچ یک از روش‌ها نمی‌توانند گونه‌های مرتبط را به راحتی در محصولات فرآوری شده به آسانی شناسایی کنند، زیرا روش قبلی نیاز به آزمایش شخصی برای آزمایش‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی دارد. در روش دوم پروفیل‌های شیمیایی یا نشانگرها ممکن است تحت شرایط فیزیولوژیکی و ذخیره‌سازی قرار بگیرند. شناسایی در سطح DNA، قابلیت اطمینان بیشتری را فراهم می‌کند، زیرا در مقایسه با DNA، RNA یک ماکرومولکول پایدار است که توسط عوامل خارجی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و در همه بافت‌ها یافت می‌شود. بنابراین، توسعه مارکرهای مبتنی بر DNA برای تأیید اعتبار گیاهان خوراکی مهم است (Techen *et al.*, 2014).

در پژوهش حاضر از سه مکان ژنی ITS1، *rbcL* و *matK* برای شناسایی و جداسازی گونه‌های مرزه استفاده شد. از این سه مکان ژنی فقط ژن *matK* از نمونه‌ها با موفقیت استخراج شد و در این پژوهش نتیجه داد. میزان موفقیت PCR در مکان‌های ژنی ITS1 و *rbcL* ضعیف بود در نتیجه از آنالیز آن‌ها در مرحله‌های بعدی پژوهش صرف نظر شد. در میان نمونه‌های بررسی شده نیز نمونه مرزه ایوان قادر به تکثیر DNA نبود. Bafeel و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که اگرچه پرایمرهای عمومی *matK* قادر به تکثیر تعداد

باشد به طوریکه در پژوهش حاضر ژن matK توانست نمونه‌های مختلف مرزه را از مناطق مختلف ایران بر اساس محل جغرافیایی از هم تفکیک نماید.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ایلام جهت حمایت از پژوهش حاضر نهایت تقدیر و تشکر بعمل می‌آید.

جغرافیایی از هم تفکیک نماید که نشان‌دهنده کارایی بالای DNA بارکدینگ است که می‌تواند در مطالعات تکمیلی جهت تعیین دقیق روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف مرزه در ایران از آن استفاده کرد.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از ژن‌های بارکدینگ DNA می‌تواند روش مفید و موثری جهت شناسایی گونه‌های مختلف مرزه

References

- Asadi, F., Dezhsetan, S., Ghahremanzadeh, R., Razmjoo, J. & Alebrahim, M. T. (2015). DNA barcoding of some local medicinal plants of Ardabil province. *Crop Biotechnology*, 5(10), 31-40. (In Persian).
- Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y. & Satake, M. (2010). Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using matK and rbcL sequences. *Journal of Natural Medicines*, 64, 133-138.
- Bafeel, S. O., Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Al Farhan, A. H., Al Homaidan, A. 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.
- Burgess, K.S., Fazekas, A.J. & Kesanakurti, P.R. (2011). Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+ matK DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, 333-340.
- Caceres, M.E., Pupilli, F., Piano, E. & Arcioni, S. (2000). RFLP markers are an effective tool for the identification of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 455-459.
- 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. *Briefings in Bioinformatics*, 11, 440-453.
- 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 (1), e8613.
- Dong W., Liu J., Yu J. & Wang L. (2012). Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. *PLoS One*, 7, e35071.
- Doyle, J.J. & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Esmaili, H., Hadian, J., Mirjalili, M H. & Rezaei, H. (2016). Evaluation of Some Morphological, Phytochemical and Ecological Characteristics of Different Populations of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Journal of Range and Watershed Management*, 69(1), 1-12. (In Persian).
- Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies*, Publishers Sunderland Massachusetts, 1-645.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., & Chen, S. (2010). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of ethnopharmacology*, 130(1), 116-121.
- Gulluce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N.,

- Polissiou, M., Sokmen, A. & Sahin, F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (14), 3958-3965.
- Hatari, Z., Zamani, Z., Nazeri, V. & Tabrizi, L. (2013). Evaluation of genetic diversity in the medicinal plant Kakooti (*Ziziphora tenuior* L.) using morphological characteristics and RAPD markers. *Modern Genetic Journal*, 8(1). 19-28. (In Persian).
 - Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
 - Hebert, P. D., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, 2(10), e312.
 - Jing, Y.U., Jian-Hua, X. U. E., & Shi-Liang, Z. H. O. U. (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49 (3), 176-181.
 - Kress, W.J. & Erickson, D.L., (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region. *PloS one*, 2, e508.
 - Kuo LY, Li FW, Chiou WL. & Wang CN (2011) First insights into fern *matK* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 556-566.
 - Manen, J.F., Habashi, C., Jeanmonod, D., Park, JM. & Schneeweiss, GM. (2004) Phylogeny and intraspecific variability of holoparasitic Orobanche (Orobanchaceae) inferred from plastid *rbcL* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33, 482-500.
 - Mohr, G., Perlman, P. S. & Lambowitz, A. M. (1993). Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function. *Nucleic Acid Research*, 21, 4991-4997.
 - Mount, D.M. (2004). *Bioinformatics: sequence and Genome Analysis 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY.*
 - Müller K.F., Borsch T. & Hilu KW (2006). Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: contrasting *matK*, *trnT-F*, and *rbcL* in basal angiosperms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 99-117.
 - Omidbaigi, R. (2000). Production and Processing of Medicinal Plant. *Austan Quds publication.* (In Persian).
 - Pang, X., Shi, L., Song, J., Chen, X. & Chen, S. (2013). Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials. *Journal of natural medicines*, 67(3), 571-575.
 - Sanders, E. R., Karol, K. G. & McCourt, R. M. (2003). Occurrence of *matK* in a *trnK* group II intron in charophyte green algae and phylogeny of the Characeae. *American Journal of Botany*, 90(4), 628-633.
 - Schori, M. & Showalter, A. M. (2011). DNA barcoding as a means for identifying medicinal plants of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 1-4.
 - Sefidkon, F., Jamzad, Z. & Barazandeh, M.M. (2005). Essential oil of *Satureja bachtiarica* Bunge. A potential source of carvacrol. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 20 (4), 425-439.
 - Tamura K. & Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10,512-526.
 - Techen, N., Parveen, I., Pan, Z. & Khan, I. A. (2014). DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 103-110.
 - Theodoridis S., Stefanaki A., Tezcan M., Aki C., Kokkini S. & Vlachonasios KE. (2012). DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from

Chios Island (Greece) and the adjacent Çesme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Molecular Ecology Resources*, 12, 620–633.

- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y. & Tsay, H. S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei*, 45(1), 1- 22.
- Zuo, Y., Chen, Z., Kondo, K., Funamoto, T., Wen, J. & Zhou, S. (2011) DNA Barcoding of Panax Species. *Planta Medica*, 77, 182-187.