مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.355498.3040

جلد ۳۷، شماره ۵، صفحه ۸۴۹-۸۳۸ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.5.9.8

بارکدگذاری DNA برخی از گیاهان دارویی در شرق استان گلستان

راضیه سعادتی[1*]، علی ستاریان[2]، ابوالفضل دانشور[3]، الهام امینی[4] و فاطمه نصراللهی[5]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گنبد کاووس، ایران

پست‌الکترونیک: razieh.saadaty@gmail.com

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گنبد کاووس، ایران

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گنبد کاووس، ایران

۴- دانش‌آموخته دکتری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبدکاووس، گنبد کاووس، ایران

۵- دانش‌آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰ | تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

چکیده

روش بارکدگذاری DNA ابزاری مفید برای شناسایی گونه‌های گیاهی و جانوری است. بارکدگذاری DNA روش شناسایی گونه‌ها با استفاده از یک توالی کوتاه و استاندارد، از ژنوم است. در این تحقیق، از این روش به‌منظور شناسایی چهار گونه گیاهی از شرق استان گلستان شامل همیشه‌بهار (*Calendula persica* C.A.Mey.)، خارمریم (*Silybum marianum* L.)، مرزه جنگلی (*Satureja mutica* Fisch.) و پنیرک معمولی (*Malva neglecta* Wallr.) استفاده شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام و PCR با آغازگرهای طراحی شده براساس بارکدهای کلروپلاستی rbcL و *trn*H-*psb*A و بارکد هسته‌ای ITS انجام شد. توالی‌های حاصل، با اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعات NCBI تطبیق داده شد. نتایج نشان داد که هر سه بارکد به‌دلیل قدرت تفکیک بالا، تعداد SNP پایین و جامعیت در اکثر گونه‌ها، بارکدهای بسیار مناسبی برای نمونه‌های مورد بررسی می‌باشند. همچنین، مقایسه‌ی بارکدهای گونه‌های جمع‌آوری شده از مراتع و عطاری‌ها نشان داد که برخی گونه‌های گیاهی که در عطاری‌ها عرضه می‌شوند، با گیاهی که مردم بومی از آن به‌عنوان دارو استفاده می‌کنند، متفاوت هستند. می‌توان گفت امکان اشتباه در ارائه گیاهان دارویی در عطاری‌ها غیر قابل انکار است. بنابراین بررسی سایر گونه‌های گیاهی موجود در عطاری‌ها به روش بارکدگذاری DNA به‌عنوان امری ضروری پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بارکد هسته‌ای ITS، بارکد کلروپلاستی rbcL، بارکد کلروپلاستی *trn*H-*psb*A، گیاهان دارویی.

مقدمه

دارو و درمان عنصری مهم از دانش بومی است که شامل سنت‌های درمانی بومی، عقاید و روش‌های متعددی است. بین ۱۰۰۰۰ تا ۵۳۰۰۰ گونه گیاهی در درمان سنتی استفاده می‌شود و استفاده از گیاهان در درمان، یک صفت همه جاگیر و مهم فرهنگی است (Aghuiy, 2018). گیاه دارویی به گروهی از گیاهان گفته می‌شود که اندام‌های آنها دارای ترکیب‌هایی با خواص دارویی است و به‌دلیل اثرهای درمانی برای انسان یا دام، در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Darvizheh *et al.*, 2016). این گیاهان جزء ذخایر و منابع طبیعی هر کشور محسوب می‌شوند. نوع، تعداد و تنوع گونه‌های گیاهی براساس شرایط و موقعیت جغرافیایی هر منطقه متفاوت است. این بخش از منابع طبیعی قدمتی همپای بشر دارد و یکی از مهمترین منابع تأمین غذایی و دارویی بشر در طول نسل‌ها بوده است (Abedi *et al.*, 2016).

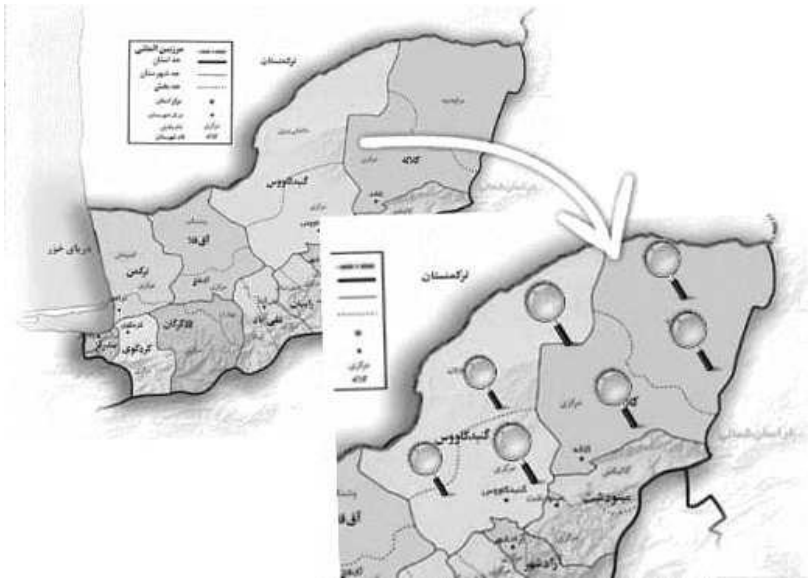
با توجه به اهمیت اقتصادی، دارویی و صنعتی و همچنین افزایش نگرش گیاه‌درمانی در جهان، بوم‌شناسی این گیاهان از اهمیت خاصی برخوردار شده است. به‌طوری که امروزه محققان در تلاش‌اند تا ارزش منابع غیرزراعی را که معمولاً توسط مردم محلی از مراتع و جنگل‌ها جمع‌آوری می‌شوند، ارزیابی کنند. این کار اهمیت مستندسازی دانش بوم‌شناسی و حفاظت جنگل‌ها و مراتع را بیش از پیش نمایان می‌کند (Mirdeilami *et al.*, 2015). ایران از نظر تنوع زیستی گیاهی، یکی از غنی‌ترین مناطق جنوب‌غربی آسیا می‌باشد. تنوع پوشش گیاهان دارویی در کشور باعث شده، بومیان مناطق مختلف کشور برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، از آنها بهره ببرند. استان گلستان، به دلیل موقعیت جغرافیایی و تنوع اقلیمی از نظر فلور بسیار غنی است، به‌طوری که بیش از ۱۷۰۴ گونه گیاهی در این استان شناسایی شده است (Hoseini *et al.*, 2008). ارقام بومی گیاهان دارویی مختلف، بخش اعظم نمونه‌های گیاهی ارزنده هر کشور را تشکیل می‌دهند. امروزه خطرات مختلفی ازجمله خشکسالی، چرای بیش از حد دام، برداشت بیش از حد گیاهان دارویی، ذخایر ژنتیکی این گیاهان را در خطر انقراض قرار داده است (Rahimi-Malik, 2011). علاوه‌براین ترکیب‌های شیمیایی موجود در گیاهان دارویی همواره به‌عنوان مواد غیرقابل جایگزین مورد استفاده هستند (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 موضوع در بیشتر گیاهان در مراحل اولیه رویش و از روی خصوصیات ریخت‌شناسی کاری سخت خواهد بود (Ghahramanzadeh *et al.*, 2012). در برخی موارد وجود نام‌های گیاه‌شناسی متفاوت در مورد یک گیاه، همچنین گاهی شباهت ظاهری بین گونه‌ها، در نواحی مختلف جهان مشکل‌ساز می‌باشد (Techen *et al.*, 2010). امروزه نشانگرشناسی مولکول DNA، با استفاده از اطلاعات مشترک یک یا چند ژن در بین گونه‌های گیاهی و جانوری و توالی‌یابی این مناطق و اشتراک‌گذاری این اطلاعات در پایگاه داده‌های بیوانفورماتیک، راهی مؤثر در شناسایی گونه‌ها می‌باشد (Margheshi *et al.*, 2019). به‌دلیل افزایش تقاضا برای داروهای گیاهی، تهیه یک بانک اطلاعاتی واحد، حاوی اطلاعات مربوط به ترکیب‌های مولکولی گیاهان ضروریست؛ این بانک اطلاعاتی باید با نشانگرهای مولکولی DNA گیاهان تهیه شود. به‌منظور دستیابی به چنین نشانگرهایی، از روش‌های مولکولی متعددی برای افزایش دادن نشانگرهای مولکولی مناسب برای کمک به شناسایی مولکولی گیاهان استفاده می‌شود (Techen *et al.*, 2014) که لازمه این امر، استخراج DNA از گیاهان می‌باشد.

روش بارکدگذاری DNA ابزاری مفید برای شناسایی گونه‌های گیاهی و جانوری است (Guo *et al.*, 2011). برای تشخیص گیاهان دارویی و شناسایی محصولات قابل توجه از گونه‌های جعلی، از منطقه هسته‌ای بارکد DNA از فاصله‌دهنده رونویسی داخلی (ITS) بررسی شده است (Heubl, 2010). این نشانگر دارای تقسیم توالی بالا است و به‌سرعت در طیف وسیعی از گیاهان گل دهنده تکثیر می‌شود (Kress *et al.*, 2005). محققان بسیاری تاکنون بارکدهای rbcL، *trn*H-*psb*A و ITS را در شناسایی و مستندسازی

تنوع گیاهان بکار برده‌اند (Chen *et al*., 2010). کنسرسیوم بارکدگذاری موجودات زنده در سال ۲۰۰۹، استفاده از ژن‌های کلروپلاستی rbcl + matK را به‌عنوان بارکد استاندارد گیاهی پیشنهاد کرد که دارای کیفیت مطلوب توالی و سطوح بالای تفکیک گونه‌ای برای گیاهان است (Mahadani & Ghosh, 2013). از آنجایی که تا به امروز شناسایی گیاهان دارویی در منطقه شرق گلستان، به‌ویژه انواع کمیاب و ارزشمند آنها، برمبنا و اساس صفات ریختی انجام شده است، ازاین‌رو بررسی علمی و شناسایی دقیق و معتبر آنها، براساس مطالعات مولکولی و ژنومیک امری لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه تلاش شد با استفاده از مزایای روش بارکدگذاری DNA گامی مؤثر در جهت شناسایی و ثبت تنوع برخی از گیاهان دارویی منطقه شرق گلستان برداشته شود.

مواد و روش‌ها

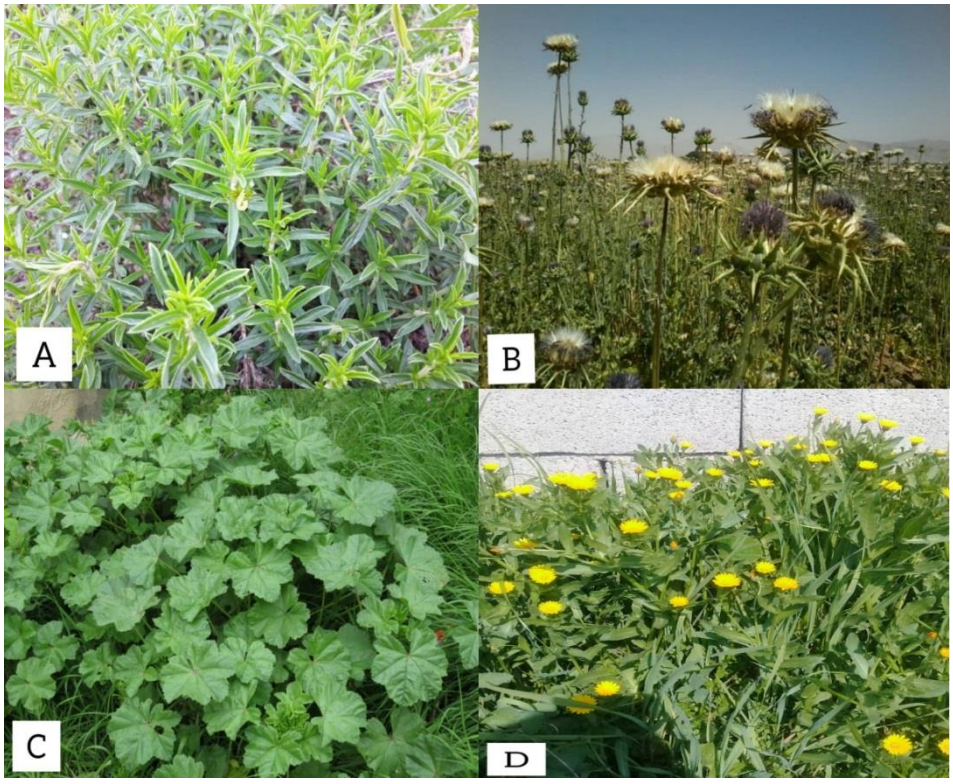
منطقه مورد مطالعه شامل روستاهای شرق استان گلستان، از شهرستان گنبدکاووس تا مراوه‌تپه در شرقی‌ترین قسمت استان گلستان می‌باشد (شکل ۱). این ناحیه در طول جغرافیایی ″۵۵ ′۱۸ °۵۸ تا ″۵۵ ′۹۶ °۳۵ و عرض جغرافیایی ″۳۷ ′۲۶ °۲۵ تا ″۳۷ ′۸۷ °۴۰ قرار دارد.



شکل ۱– موقعیت منطقه مورد مطالعه در استان گلستان

برای شروع مطالعات ابتدا چهار گونه گیاه دارویی پرمصرف در منطقه شناسایی شد (شکل ۲)، این گیاهان شامل همیشه‌بهار (*Calendula persica* C.A.Mey.)، خارمریم (*Silybum marianum* L.)، مرزه جنگلی (*Satureja mutica* Fisch.) و پنیرک معمولی (*Malva neglecta* Wallr.) بودند. نمونه‌های موجود آنها در رویشگاه‌های منطقه جمع‌آوری و به‌روش هرباریومی آماده شدند، سپس شناسایی آنها به کمک فلورهای معتبر انجام شد؛ بعد از آن با مراجعه به شهرستان‌های گنبد و کلاله، عطاری مورد اعتماد مردم که از قدمت زیادی نیز برخوردار بود شناسایی شد، سپس با مراجعه به عطاری‌ها، نمونه موجود از گیاهان مورد نظر تهیه گردید. بنابراین از هر گونه گیاهی، سه نمونه وجود داشت که یک نمونه از مراتع و دو نمونه دیگر از عطاری‌ها جمع‌آوری گردید و استخراج DNA از برگ با روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) انجام شد. در این پژوهش از دو مکان کلروپلاستی rbcl و

*trn*H-*psb*A و مکان ژنی هسته‌ای ITS1 و ITS2 به‌عنوان بارکد استفاده گردید (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر و برنامه دمایی واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه؛ ۳۴ چرخه واکنش PCR (واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه) و در پایان بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، با آغازگرهای مورد نظر و دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany; Astec, Japan) انجام شد.



شکل ۲- گیاهان دارویی مورد مطالعه شامل A: *Satureja mutica*؛ B: *Silybum marianum*؛ C: *Malva neglecta*؛ D: *Calendula persica*

پس از انجام PCR، برای اطمینان از تکثیر قطعات مورد نظر و بررسی کیفیت مطلوب DNA استخراج شده، الکتروفورز محصول نهایی انجام شد. کلیه نمونه‌های تکثیر شده به‌منظور تعیین توالی به شرکت ژنتیک کدون در تهران ارسال و تعیین توالی گردید. توالی‌های حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Finch TV بررسی شده و به‌صورت قالب FASTA درآمدند. توالی‌های کروماتیدی توالی‌های حاصل، با اطلاعات موجود در بانک ژنی سایت NCBI تطبیق داده شدند و میزان تشابه گونه‌ها، با نمونه‌های موجود در سایت بررسی و ثبت گردید. درخت خویشاوندی با استفاده از فاصله p-distance، روش Neighbor joining و ۱۰۰۰ بار Bootstrapping مربوط به نمونه‌های مورد بررسی در بارکدها با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 (Tamura *et al*., 2011) ترسیم شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز

نام آغازگر	جهت حرکت آغازگر	توالی آغازگر
ITS1	رفت	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS2	برگشت	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'
rbcLa	رفت	5'ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC3'
rbcLa	برگشت	5'GTAAAATCAAGTCCACCRCG3'
*trn*H-*psb*A	رفت	5'GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3'
*trn*H-*psb*A	برگشت	5'CGCGCATGGTGGATTCACAATCC3'

نتایج

بارکد **rbcL**

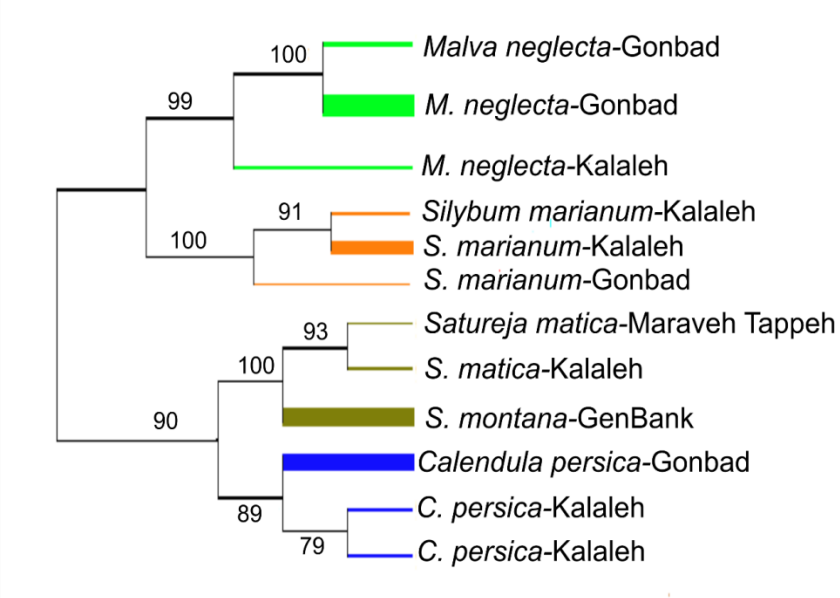
میزان موفقیت تکثیر در مکان ژنی rbcL در نمونه‌های گیاهی مورد بررسی ۸۵٪ محاسبه شد. طول قطعه تکثیر شده در گیاهان همیشه‌بهار ۵۵۳، خارمریم ۵۵۰، مرزه جنگلی ۵۵۸ و پنیرک معمولی ۵۷۷ نوکلئوتید توالی‌یابی شدند. نتایج همردیفی (BLASTn) توالی rbcL نمونه‌های مورد بررسی را به گیاهان همان جنس نسبت داد. در درخت خویشاوندی براساس بارکد rbcL، گونه‌های مربوط به یک جنس به درستی از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۳). تنوع درون گروهی (میزان شباهت توالی rbcL گونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های هم جنس خود در سایت NCBI) برای گیاه همیشه‌بهار ۹۸٪، خارمریم ۹۶٪، مرزه جنگلی ۸۷٪ و پنیرک معمولی ۹۷٪ محاسبه شد. تعداد جایگاه‌های متغیر (SNP) با استفاده از توالی rbcL در گیاهان همیشه‌بهار، خارمریم، مرزه جنگلی و پنیرک معمولی به‌ترتیب ۱۲، ۲، ۲۹ و ۸ عدد شمارش شد. بنابراین می‌توان از بارکد rbcL برای شناسایی نمونه‌های گیاهی استفاده نمود. در واقع بارکد rbcL با مزیت سرعت تکامل پایین و همردیف نمودن با وضوح بالا برای تمایز گونه‌های نزدیک کارایی بالایی دارد (جدول ۲).

بارکد ***trn*H-*psb*A**

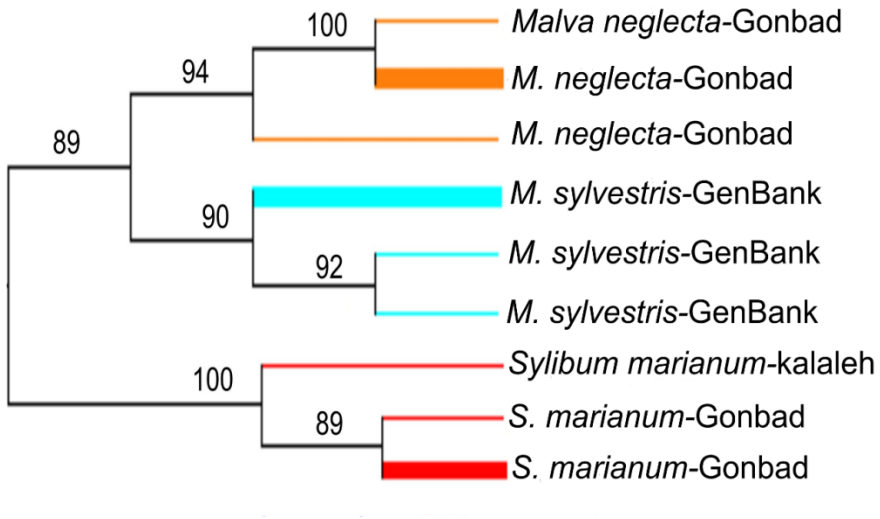
میزان موفقیت تکثیر در مکان ژنی *trn*H-*psb*A در نمونه‌های گیاهی مورد بررسی ۷۹٪ محاسبه شد. طول قطعه تکثیر شده در گیاهان همیشه‌بهار ۴۴۳، خارمریم ۳۳۰، مرزه جنگلی ۲۴۸ و پنیرک معمولی ۲۷۷ نوکلئوتید توالی‌یابی شد. در همردیفی، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نمونه‌های هم جنس خود همردیف شدند. در درخت خویشاوندی نمونه‌های مورد بررسی در سطح جنس از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۴). تنوع درون گروهی (میزان شباهت توالی *trn*H-*psb*A گونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های هم جنس خود) در سایت NCBI برای گیاه همیشه‌بهار ۸۸٪، خارمریم ۸۶٪، مرزه جنگلی ۹۷٪ و پنیرک معمولی ۷۷٪ محاسبه گردید. تعداد جایگاه‌های متغیر (SNP) در گیاهان همیشه‌بهار، خارمریم، مرزه جنگلی و پنیرک معمولی به‌ترتیب ۱۰، ۳۲، ۵ و ۳۹ عدد شمارش شد. هر چند با وجود حضور جایگاه‌های تکراری و تنوع طولی بالا در بارکد *trn*H-*psb*A، دسترسی به توالی با کیفیت را سخت کرده اما نتایج ما نشان داد که این بارکد برای بررسی گونه‌های مورد مطالعه مناسب است.

جدول ۲- همردیفی (BLAST) توالی نشانگرگذاری شده با نشانگرهای موجود

گیاه مورد بررسی	محل جمع‌آوری	نشانگر استفاده شده	گیاه موجود در پایگاه داده (NCBI)
Calendula persica C.A.Mey.	گلستان – مراتع کلاله	ITS	*Calendula persica (GU 818507.1)*
Calendula persica C.A.Mey.	عطاری گنبدکاووس	ITS	*Achillea millefolium (MH 711475.1)*
Calendula persica C.A.Mey.	عطاری کلاله	ITS	*Calendula arvensis (GU 818507.1)*
Calendula persica C.A.Mey.	گلستان – مراتع کلاله	rbcl	*Calendula persica (KM356105.1)*
Calendula persica C.A.Mey.	عطاری گنبدکاووس	rbcl	*Calendula persica (KM356105.1)*
Calendula persica C.A.Mey.	عطاری کلاله	rbcl	*Calendula persica (KM356105.1)*
Silybum marianum L.	گلستان – گنبدکاووس	ITS	*Silybum marianum (KY 418159.1)*
Silybum marianum L.	عطاری گنبدکاووس	ITS	*Onopordum horridum (KY 418162.1)*
Silybum marianum L.	عطاری کلاله	ITS	*Onopordum horridum (KY 418159.1)*
Silybum marianum L.	گلستان – گنبدکاووس	rbcl	*Silybum marianum (KU556646.1)*
Silybum marianum L.	عطاری گنبدکاووس	rbcl	*Silybum marianum (KU556646.1)*
Silybum marianum L.	عطاری کلاله	rbcl	*Silybum marianum (KU556646.1)*
Silybum marianum L.	گلستان – گنبدکاووس	*trn*H-*psb*A	*Silybum marianum (MK090089.1)*
Silybum marianum L.	عطاری گنبدکاووس	*trn*H-*psb*A	*Silybum marianum (MK090089.1)*
Silybum marianum L.	عطاری کلاله	*trn*H-*psb*A	*Silybum marianum (MK090089.1)*
Satureja matica Fisch.	گلستان – مراوه‌تپه	ITS	*Satureja matica (MH 645775.1)*
Satureja matica Fisch.	عطاری گنبدکاووس	ITS	*Satureja hortensis (KR 150181.1)*
Satureja matica Fisch.	عطاری کلاله	ITS	*Satureja hortensis (MH 645775.1)*
Satureja matica Fisch.	گلستان – مراوه‌تپه	rbcl	*Satureja montana (MF349309.1)*
Satureja matica Fisch.	عطاری گنبدکاووس	rbcl	*Satureja montana (MF349309.1)*
Satureja matica Fisch.	عطاری کلاله	rbcl	*Satureja montana (MF349309.1)*
Malva neglecta wallr.	گلستان – گنبدکاووس	ITS	*Malva nicaeensis (AH 010174.2)*
Malva neglecta wallr.	عطاری گنبدکاووس	ITS	*Malva sylvestris (MK 496176.1*)
Malva neglecta wallr.	عطاری کلاله	ITS	*Malva sylvestris (MK 496176.1*)
Malva neglecta wallr.	گلستان – گنبدکاووس	rbcl	*Malva neglecta (HQ590176.1)*
Malva neglecta wallr.	عطاری گنبدکاووس	rbcl	*Malva neglecta (HQ590176.1)*
Malva neglecta wallr.	عطاری کلاله	rbcl	*Malva neglecta (HQ590176.1)*
Malva neglecta wallr.	گلستان – گنبدکاووس	*trn*H-*psb*A	*Malva sylvestris (EF590714.1)*
Malva neglecta wallr.	گلستان – گنبدکاووس	*trn*H-*psb*A	*Malva sylvestris (EF590714.1)*
Malva neglecta wallr.	عطاری گنبدکاووس	*trn*H-*psb*A	*Malva sylvestris (EF590714.1)*



شکل ۳- درخت خویشاوندی **Neighbor-joining** مبتنی بر همردیفی توالی بارکد **rbcL**



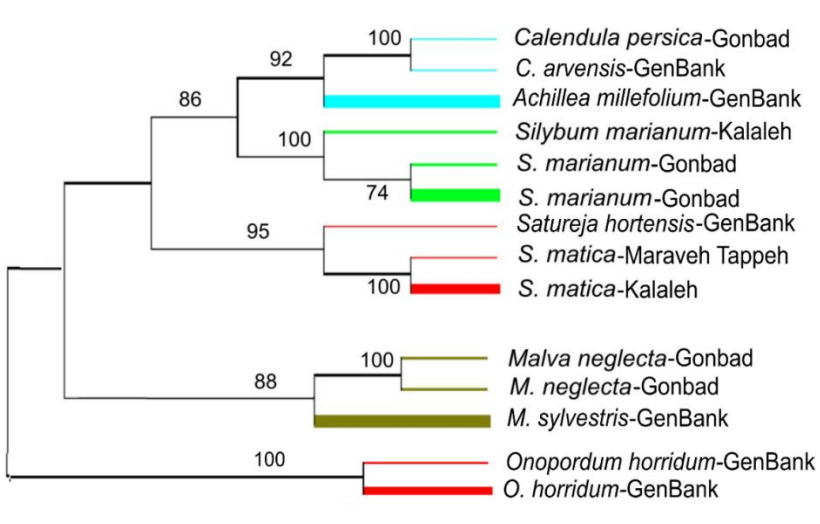
شکل ۴- درخت خویشاوندی **Neighbor-joining** مبتنی بر همردیفی توالی بارکد ***trn*H-*psb*A**

بارکد ITS

تمام توالی‌های تکثیر شده با استفاده از نشانگر ITS با موفقیت توالی‌یابی شدند. طول قطعه تکثیر شده در گیاهان همیشه‌بهار ۷۳۶، خارمریم ۷۳۳، مرزه جنگلی ۷۱۲ و پنیرک معمولی ۷۲۱ نوکلئوتید توالی‌یابی گردید و کروماتوگرام‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI) تطبیق داده شد.

نتایج همردیف‌سازی، توالی نمونه جمع‌آوری شده گیاه خارمریم را به همان جنس و همان گونه و نمونه تهیه شده از عطاری‌های گنبد و کلاله را به جـنس *Onopordum* و

هر سه نمونه مربوط به مرزه جنگلی را به گیاهان همان جنس (*Satureja*) نسبت داد و نمونه جمع‌آوری شده و تهیه شده از عطاری کلاله، گیاه همیشه‌بهار را به گیاهان همان جنس، ولی نمونه تهیه شده از عطاری گنبدکاووس را به جنس *Achillea* و همچنین هر سه نمونه مربوط به گیاه پنیرک معمولی را به گیاهان همان جنس (*Malva*) منتسب کرد. تنوع درون گونه‌ای برای گیاه همیشه‌بهار ۹۱٪ تا ۹۹/۷٪، خارمریم ۹۷٪ تا ۹۹/۴٪، مرزه جنگلی ۹۵٪ تا ۹۸/۵٪ و برای پنیرک معمولی ۹۲/۵۱٪ تا ۱۰۰٪ محاسبه شد. نتایج بدست‌آمده بیشترین درصد شباهت را در همیشه‌بهار (*C. persica*) با *C. arvensis* بومی استرالیا و *C. arvensis* بومی اتریش، خارمریم (*S. marianum*) را با *S. marianum* بومی ایتالیا و *O. horridum* بومی ایتالیا و مرزه جنگلی (*S. matica*) را با *S. hortensis* بومی ایران و *S. hortensis* بومی هلند و پنیرک معمولی (*M. neglecta*) را با *M. nicaeensis* گزارش شده از آمریکا و *M. sylvestris* بومی ایران (سیستان و بلوچستان) نشان داد. درخت خویشاوندی مربوط به این بارکد نتوانست جنس *Silybum* را به درستی تفکیک کند (شکل ۵). در اینجا نقش کلیدی بارکد مکمل که منجر به شناسایی دقیق‌تر می‌گردد، مشخص است.



شکل ۵- درخت خویشاوندی Neighbor-joining مبتنی بر همردیفی توالی بارکد ITS

بحث

مصرف دارویی گیاه پنیرک (*M. neglecta*) برای بومیان منطقه مورد بررسی، رفع درد مفاصل، سرفه و عفونت ثبت شده که عموماً به‌صورت ضماد مورد استفاده قرار می‌گیرد. گیاه خارمریم (*S. marianum*) در منطقه عموماً به‌عنوان سبزی و خوراکی محبوب شناخته شده است و مردم از ساقه و برگ آن به‌صورت تازه و پخته، به‌عنوان کاهنده فشار خون و همچنین از دانه آن برای درمان نارسایی‌های کبدی و قلبی عروقی استفاده می‌کنند. گیاه مرزه (*S. mutica*) در میان مردم بومی به‌عنوان دارویی برای درمان نفخ معده و ضدعفونی‌کننده معده مورد استفاده قرار می‌گیرد و عموماً برگ این گیاه به‌صورت خشک به صورت چاشنی غذا یا دم‌کرده استفاده می‌شود. مردمان شرق گلستان، بخش هوایی گیاه همیشه‌بهار (*C. persica*) را برای درمان سنگ کلیه و التهابات پوستی به‌صورت جوشانده دم‌کرده و یا شیره گیاهی آن را مورد استفاده قرار می‌دهند.

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. امروزه بارکدگذاری DNA یک منبع مهم اطلاعات برای مطالعات روابط تکامل ژنتیکی، کشف گونه‌های ناشناس، شناسایی تنوع زیستی و رسم درخت خویشاوندی محسوب می‌شود. در این تحقیق، شناسایی مولکولی چهار گونه گیاهی به روش نشانگرگذاری مولکول DNA انجام شد. نشانگرگذاری مولکولی، روشی قابل اعتماد برای شناسایی گیاهان دارویی در حد گونه و جنس می‌باشد. کنسرسیوم نشانگرگذاری موجودات زنده (CBOL)، ژن‌های کلروپلاستی matK و rbcl را با توجه به درصد موفقیت در تکثیر و توالی‌یابی، به‌عنوان بهترین نشانگر عمومی برای گیاهان معرفی کرده است. همچنین یافته‌های پژوهشگران بارکد کلروپلاستی، مکان ژنی هسته‌ای ITS را به‌عنوان بارکد مکمل بارکدهای عمومی در گیاهان پیشنهاد می‌کند (Hollingsworth *et al*., 2011). Mohebi anabat و همکاران (۲۰۲۰) مطالعه ژنتیکی بر روی ۸ جمعیت مختلف زعفران را در خراسان جنوبی انجام دادند. در این مورد که از نشانگر کلروپلاستی *trn*H-*psb*A استفاده شده، جمعیت‌های مورد مطالعه تمایز قابل قبولی را از نظر ژنتیکی نشان دادند. در مطالعه‌ای که بر روی هشت گیاه دارویی در اردبیل انجام شد، بارکد rbcL به‌دلیل قدرت تفکیک بالا، تعداد SNP پایین و جامعیت در بیشتر گونه‌ها، به‌عنوان بهترین بارکد معرفی شد و بارکدهای ITS و *trn*H-*psb*A به‌دلیل مشکل مرتبط با توالی‌یابی مستقیم محصولات PCR و عدم دسترسی با توالی‌های با کیفیت، به‌عنوان بارکدهای مکمل شناسایی شدند (Asadi *et al*., 2015). در تحقیقی دیگر که در کشور آلمان بر روی یک تیره گیاهی انجام شده، مشخص شد که بارکد rbcl تا ۹۰٪ قدرت تمایز دارد؛ در صورتی که این مورد برای بارکد matK ۶۰٪ بیان شده است (Naeem *et al*., 2014). در تحقیقی مشابه این بررسی، ۱۱ گونه گیاه دارویی از جنس *Hymenocrater* به روش ریخت‌شناسی و مولکولی با بارکدهای ITS و *trn*H-*psb*A مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مقایسه‌ای با این گونه‌ها و گیاهانی که به فروش می‌رسد انجام شده است؛ در این بررسی نیز این دو بارکد برای گونه‌های جنس *Hymenocrater* مورد قبول بوده‌اند (Tabaripour *et al*., 2021). در این مطالعه نیز که از ناحیه nrDNA ITS استفاده گردید، مشخص شد که توالی‌های هسته‌ای نیز می‌توانند به‌عنوان نواحی مناسبی برای مطالعات مولکولی استفاده شوند. در بررسی‌های مختلف، مناطق ژنومی متفاوتی برای نشانگرگذاری توصیه شده است و اینطور به نظر می‌رسد که اغلب مناطق ژنومی می‌توانند برای شناسایی گیاهان دارویی مورد استفاده قرار بگیرند (Techen *et al*., 2014). توالی نشانگرهای مورد استفاده در شناسایی مولکولی، باید براساس توالی‌های حفاظت شده طراحی شود و نسبتاً کوتاه باشد تا امکان تکثیر توالی‌های DNA آسیب دیده را فراهم کند (Kress & Erickson, 2007).

داروهای محلی بر پایه گیاهان عمدتاً مورد توجه قرار گرفته و در بسیاری از کشورها نقش بسزایی دارند (Sheidai *et al*., 2019)، بنابراین باید توجه بیشتری به‌منظور حفظ اطمینان و بازاریابی واقعی و مصرف گیاهان دارویی انجام شود. برای این منظور باید از رویکردهای مولکولی و بارکدینگ استفاده شود. در بسیاری از کشورها، داروهایی که از گیاهان بدست می‌آیند، بسیار مورد توجه قرار گرفته و نقش بسزایی در درمان بیماری‌ها دارند (Sheidai *et al*., 2019). با توجه به اهمیت گیاهان دارویی در سلامت جوامع و به‌منظور حفظ اطمینان و بازاریابی واقعی این گیاهان، لازم است از روش‌های مولکولی و بارکدینگ برای شناسایی گیاهان استفاده شود. بارکدگذاری DNA گونه‌های دارویی که به‌درستی شناسایی شده‌اند، استانداردی را برای مقایسه نمونه‌های گیاهی موجود در بازار با گیاهان دارویی واقعی بوجود می‌آورد. بنابراین توالی‌های بکاررفته در این تحقیق برای بارکدگذاری گیاهان دارویی ذکرشده مهم هستند. این گونه‌های دارویی به درستی شناسایی شده‌اند و به‌عنوان استاندارد برای ارزیابی گیاهان فروخته شده در بازار می‌توانند استفاده شوند.

با توجه به نتایج حاصل از توالی‌یابی و شناسایی مولکولی نمونه‌ها، مشخص شد که دو گونه خارمریم و همیشه‌بهار که در عطاری‌ها به مردم عرضه می‌شود، با

نمونه‌ای که مردم بومی از آن به‌عنوان گیاه دارویی استفاده می‌کنند کاملاً متفاوت است و این تفاوت حتی در حد جنس است. یعنی چیزی که در عطاری‌ها با همان نام به فروش می‌رسد، در واقع گیاه مورد نظر مردم نیست، بنابراین می‌توان گفت امکان خطا در ارائه گیاهان دارویی در عطاری‌ها غیر قابل انکار است، البته امکان دارد که ارائه‌دهنده گیاهان نیز از این تفاوت و اشتباه اطلاعی نداشته باشد. این خطاها ممکن است به‌طور سهوی و به‌دلیل شباهت‌های ظاهری که برخی گیاهان با هم دارند باشد که این موضوع تشخیص گونه‌های مختلف را از هم مشکل می‌کند و یا عمداً به‌دلیل سودجویی‌هایی که گاهی در عرضه کالا انجام می‌شود، باشد. البته که بروز چنین خطاهایی در حوزه دارویی و سلامت مردم ممکن است خسارتهای جبران‌ناپذیری برای افراد جامعه داشته باشد. بنابراین این طور به‌نظر می‌رسد که برای جلوگیری از بروز چنین مسائلی، علاوه‌بر دقت و وسواسی که فروشندگان گیاهان دارویی باید در خرید و نحوه ارائه گیاهان داشته باشند، لازم است که مردم نیز از حداقل اطلاعات در مورد گیاهان دارویی برخوردار باشند، همچنین برای خرید و استفاده از این گیاهان، به مراکز فروش قابل اعتماد مراجعه کنند. حضور و نظارت ارگان‌های دولتی، مانند مراکز بهداشت و نظارت بازار نیز در این بین لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به اینکه گونه‌های گیاهی ذکرشده در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته و در بازارهای محلی برای درمان برخی بیماری‌ها فروخته می‌شود، یافته‌های تحقیقات فعلی توسط توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی برای بارکدگذاری این گیاهان مهم دارویی مناسب است.

منابع مورد استفاده

- Abedi, M., Panahi, J., Sattarian, A. and Habibi, M., 2016. Ethnobotanical study of medicinal plants of gheregh ghoinik in jargalan of north Khorasan province. The First National Conference of Aromatic and Medicinal Herbs, Gonbad Kavous University, 20 April.
- Aghuiy, S., 2018. Anthropology and anthropology of medicinal plants in the deserts of Turkmen Sahara (Case study: Kurdish pastures, Dashliberun, Incheh Barun). Master Thesis, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, 72p.
- Asadi, F., Dezhsetan, S., Ghahramanzadeh, R., Razmjou, J. and Alebrahim, M.T., 2015. DNA barcoding of some local medicinal plants of Ardabil province. Crop Biotechnology, 5(10): 31-40.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, K., Jia, X., Lin, Y. and Leon, Ch., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PloS One, 5: e8613.
- Darvizheh, H., Zahedi, M., Abaszadeh, B. and Dudmani, A., 2016. Importance of cultivation and production of Medicinal Plants in the Iran Economy and Industry with a case Study of the *E.purpurea*.L. The First National Conference of Aromatic and Medicinal Herbs, Gonbad Kavous University, 20 April.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
- Ghahramanzadeh, R., Marashi, H., Van de Weil, K., Malekzadeh, S., Shahriari, F. and Asmaldrz, R., 2012. The use of DNA barcoding to separation invasive species of aquatic weeds *Myriophyllum* spp. Noninvasive from relatives. 12th Congress of Iranian Genetics Society, Tehran, 21 May: 101.
- Ghorbani Marghashi, M., Bagheri, H. and Gholami, M., 2019. Identification of some Iranian cardamine species using the ITS molecular marker. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 32(1): 183-193.
- Guo, X., Wang, X., Su., W., Zhang, G. and Zhou, R., 2011. DNA barcodes for discriminating the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 34(8): 1198-1203.
- Heubl, G., 2010. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. Planta Medica, 76(7): 1963-1974.
- Hoseini, S.A.R., Abrasji, G.H. and Hoseini, S.A.H., 2008. Medicinal Plants of Golestan province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(4): 472-498.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little, D.P., 2011. Choosing and using plant DNA barcode. PloS One, 6(5): 19254.

- Kress, W.J., Liu, Z., Newman, M. and Li, Q.J., 2005. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers. American Journal of Botany, 92: 167-178.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding rbcLgene complements the noncoding trnH-psbA spacer region. PloS One, 2: e508.
- Mahadani, P. and Ghosh, S., 2013. DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices. DNA Barcode and Genomics Laboratory, 2013: 35-38.
- Mirdeilami, S.Z., Heshmati, G.H. and Barani, H., 2015. Ethnobotanical and ethnoecological survey on medicinal species (case study Kechik rangelands in the Northeast Golestan province). Journal of Indigenous Knowledge, 1(2): 129-154.
- Mohebi anabat, M., Riahi, H., Sheidai and M. and Koohdar, F., 2020. Population genetic study and barcoding in Iran saffron (*Crocus sativus* L.). Industrial Crops and Products, 143 :111915.
- Naeem, A., Khan, A.A., Cheema, H.M.N., Khan, I.A. and Buerkert, A., 2014. DNA barcoding for species identification in the Palmae family. Genetics and Molecular Research, 13(4): 10341-10348.
- Rahim-Malik, M., 2011. Study and comparison of different methods of DNA extraction medicinal plants and aromatic. Journal of Medical Herbs, 2(1): 1-5.
- Sheidai, M., Tabaripour, R., Talebi, S.M., Noormohammadi, Z. and Koohdar, F., 2019. Adulteration in medicinally important plant species of *Ziziphora* in Iran market: DNA barcoding approach. Industrial Crops and Products, 130: 627-633.
- Tabaripour, R., Sheidai, M., Talebi, S.M. and Noormohammadi, Z., 2021. Molecular and morphological investigation in Hymenocrater: species delimitation, relationship, divergence time and DNA barcoding. Genetic Resources and Crop Evolution, 68: 2003-2017.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.
- Techen, N., Parveen, I., Pan, Z. and Khan, I.A., 2014. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. Current Opinion in Biotechnology, 25: 103-110.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. and 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: 1-22.

DNA barcoding of some medicinal plants in eastern Golestan province

R. Saadati[1*], A. Sattarian[2], A. Daneshvar[2], E. Amini[3] and F. Nasrollahi[4]

1*- Corresponding author, M.Sc. Graduated, Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
E-mail: razieh.saadaty@gmail.com
2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
3- Ph.D. graduated, Department of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran
4- Ph.D. graduated, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, Iran

Received: August 2021 Revised: October 2021 Accepted: October 2021

Abstract

DNA barcoding technique is a useful tool for the identification of plant and animal species using a short and standard sequence of the genome. In the present study, this method was used to identify four plant species including *Calendula persica* C.A. Mey., *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Satureja mutica* Fisch. & C.A. Mey., and *Malva neglecta* Wallr. from the eastern Golestan province. The DNA was extracted by CTAB method and the PCR was performed with the primers designed based on the rbcL and *trn*H-*psb*A chloroplast barcodes and ITS nuclear barcode. The results of sequences were matched with the information in the NCBI database. The results showed that the all three barcodes were suitable for the samples studied due to their high resolution, low SNP number, and comprehensiveness in most species. Also, the barcodes comparison of the species collected from the rangelands and perfumeries showd that some plant species that are offered in the perfumeries are different from the plants that the natives use as medicine. It could be mentioned that the mistakes possibility in the medicinal plants offered in the perfumeries is undeniable. Therefore, the study on the other plant species in the perfumeries by the DNA barcoding method could be recommended as a necessity.

Keywords: ITS nuclear barcode, rbcl chloroplast barcode, *trn*H-*psb*A chloroplast barcode, medicinal plants.