

شناسایی برخی گونه‌های کاردامینه در ایران با استفاده از نشانگر ملکولی ITS

محمود قربانی مرغشی^۱، هدایت باقری^{۱*} و منصور غلامی^۲

^۱ ایران، همدان، دانشگاه بو علی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

^۲ ایران، همدان، دانشگاه بو علی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۵

چکیده

جنس *Cardamine* L. از خانواده Brassicaceae با بیش از ۲۰۰ گونه در جهان و ۷ گونه در ایران با توجه به تنوع کارپولوژی و مورفولوژی بالا، گیاه مناسبی برای بررسی‌های فیلوژنتیکی و تکامل می‌باشد. گونه *Cardamine* هیروسوتا از این جنس، بتازگی بعنوان گیاهی مدل در مطالعات مقایسه‌ای تکاملی معرفی شده است. این گیاه از شش منطقه مختلف ایران جمع‌آوری و پس از استخراج DNA ی برگی، ناحیه ITS با استفاده از پرایمرهای ITS4 و ITS5 تکثیر و سپس تعیین توالی گردید. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ مورد آنالیز فیلوژنتیک قرار گرفتند و از طریق مقایسه نتایج بلاست و درخت فیلوژنتیکی، گونه‌های *C. uliginosa* و *C. tenera*، *C. flexuosa*، *C. hirsuta* از گونه هیروسوتا بعنوان شاهد (آزوروس و آکسفورد تهیه شده از موسسه ماکس پلانک)، نتایج حاصل تایید گردید. یافته‌های این پژوهش، علاوه بر تایید حداقل چهار گونه کاردامینه در ایران، کارآمدی نشانگر ITS را در تفکیک گونه‌های مختلف جنس کاردامینه بخوبی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کاردامینه، نشانگر ITS، آنالیز فیلوژنتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۹۳۸۰۴۳۷۵، پست الکترونیکی: bagheri.hedayat@gmail.com

مقدمه

معرفی شده است (۲۲) و همچنین ارتباط خویشاوندی و تنوع پلی‌پلوئیدی در گونه‌های دیگر این جنس، مانند *C. flexuosa* سعی شده است با استفاده از روش‌های مختلف مولکولی و مورفولوژیکی، درک بهتری از ارتباطات این گونه‌ها و رابطه تکاملی آنها فراهم گردد (۲۴، ۱۸). امروزه بارکدگذاری 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 موثر در شناسایی گونه‌هاست. در این روش، گونه‌ها با سرعت، دقت و هزینه پائینی، شناسایی و تفکیک می‌گردند. اولین بار Woes و Fox (۲۸) با استفاده از توالی‌یابی قطعه کوچکی از زیر

جنس *Cardamine* از خانواده Brassicaceae شامل بیش از ۲۰۰ گونه در جهان می‌شود که در تمامی کره زمین به جز قطب جنوب پراکنده شده‌اند. این تعداد گونه در یک جنس بمراتب بیشتر از میانگین تعداد گونه‌های شناسایی شده در این خانواده است که بالغ بر ۳۷۰۰ گونه در ۳۳۸ جنس از این خانواده می‌باشد (۲۴، ۱۰). تنوع کارپولوژی و مورفولوژی زیادی در این جنس وجود دارد که کارشناسایی آنها را با روش‌های غیرمولکولی دشوار می‌سازد. بدلیل تنوع و ساختار تکاملی پیچیده این جنس، تاکنون تحقیقات متنوعی روی ارتباط تکاملی گونه‌های آن انجام شده است. از طرفی بدلیل اهمیت برخی از گونه‌های این جنس نظیر *Cardamine* هیروسوتا که بتازگی به عنوان گونه مدل

در تحقیق حاضر نمونه‌هایی از این گیاه با توجه به گزارشات موجود از مکان‌های مختلف، جمع‌آوری گردیده و برای اولین بار با استفاده از نشانگر ITS مورد مقایسه مولکولی قرار گرفتند. با توجه به معرفی گونه *کاردامینه* هیرسوتا در تحقیقات ژنتیکی پایه و همچنین شباهت آن با گونه *C. flexuosa*، از دو نمونه گیاهی اروپایی گونه *کاردامینه* هیرسوتا نیز به عنوان شاهد استفاده گردید.

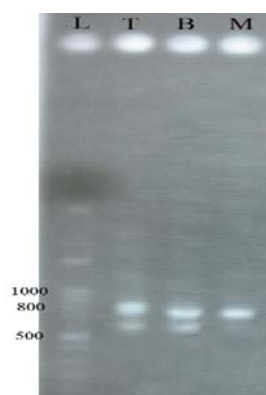
مواد و روشها

بذر و یا نمونه‌های گیاهی *کاردامینه* از مناطق طبیعی اردبیل، نور، بابل، مشهد، محلات و گلخانه‌های دانشگاه بوعلی سینا جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌های گیاهی به گلدان، منتقل و بذرگیری از آنها صورت گرفت. بذور بدست آمده، دوباره کشت گردید و از برگ‌های جوان حاصل، استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (۱۷) انجام گرفت. در مورد نمونه‌های تنکابن و بابل، از برگ گیاهان جمع‌آوری شده، استخراج DNA صورت گرفت. از دو نمونه گیاهی گونه *کاردامینه* هیرسوتای اروپایی (تهیه شده از موسسه ماکس پلانک) نیز بعنوان شاهد و برای اطمینان از نتایج، استفاده گردید. کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد بررسی گردید. همچنین با استفاده از اسپکتروفتومتر و سنجش جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، خلوص و غلظت DNA استخراجی مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمرز برای توالی‌های ITS nrDNA با آغازگرهای ITS4 و ITS5 (شکل ۱) در حجم ۴۰ میکرولیتر و طبق برنامه دمایی زیر صورت گرفت: واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در انتها، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR با الکتروفورز روی ژل

واحد کوچک rRNA مربوط به ارگانسیم‌های مختلف، موفق به بررسی فیلوژنی آنها شدند. امروزه کاربرد این روش در شناسایی گونه‌های سایر جانداران و گیاهان گسترده شده است. از مزایای این روش، استفاده از قطعات کوچکی از اندامهای رویشی و یا زایشی، مستقل از مرحله رشد، برای شناسایی می‌باشد. در گیاهان، ژن‌های مختلفی مانند *rbcL*، *matK*، *trnH-psbA* و ITS معرفی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند که درصد موفقیت هر کدام از این ژن‌های نشانگر در گونه‌های گیاهی، متفاوت گزارش شده است (۱۶). در جنس *کاردامینه* نیز بدلیل تحقیقات گوناگون انجام شده، ITS بیش از ۱۵۰ گونه از این جنس در NCBI ثبت شده است (۲۶، ۲۰، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۱۱).

در این تحقیق، شناسایی گونه‌های *کاردامینه* کشور با استفاده از نشانگر مولکولی Internal transcribed spacer (ITS) مورد بررسی قرار گرفت. از جنس *کاردامینه* در ایران ۷ گونه گزارش شده است (۵) که در سرزمین‌های پست تا ارتفاعات مناطق مرطوب می‌رویند. در سال ۱۳۹۰ توسط عباسی (۵) برخی از گونه‌های این جنس از دیدگاه ریخت‌شناسی، گرده‌شناسی و تشریحی با استفاده از تاکسونومی عددی مورد بررسی قرار گرفت اما تاکنون بررسی مولکولی بر روی گونه‌های این جنس در ایران صورت نگرفته است. از طرفی برخی از گونه‌های این جنس نظیر *C. flexuosa* و *C. hirsuta* اگرچه به لحاظ تکاملی و ژنومی، تفاوت فاحشی با هم دارند اما به لحاظ مورفولوژیکی بسیار شبیه بوده و شناسایی آنها براحتی امکان‌پذیر نیست. در سال ۲۰۰۵ قهرمان و نقی نژاد برای اولین بار وجود گونه *C. flexuosa* را در ایران در نواحی هیرکانی مازندران گزارش دادند. همچنین در بررسی‌های فلور منطقه‌ای که در مناطق مختلف کشور مانند مازندران، گیلان، اردبیل و خوزستان انجام گردید، وجود چندین گونه از این جنس گزارش شده است (۲۷، ۹، ۸، ۷، ۶، ۴، ۳، ۲، ۱).

توالی یابی: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل، باند ITS تکثیر شده را نشان داد (شکل ۲). البته در مورد نمونه های تنکابن و بابل که برگها مستقیما از گیاهان جمع آوری شده، جدا و استخراج DNA صورت گرفته بود، دو باند مشاهده گردید که بررسی های بعدی نشان داد که باند دوم مربوط به آلودگی فارچی می باشد. داده‌های حاصل از توالی یابی نشان داد که طول کل قطعه ITS تکثیر شده در گونه های کاردامین بین ۶۸۰-۷۲۰ متغیر بود.



شکل ۲- الکتروفورز محصول تکثیر قطعه ITS با استفاده از PCR در نمونه های کاردامینه. ستون اول: سایز مارکر (L)، ستون دوم: نمونه کاردامینه تنکابن (T)، ستون سوم: نمونه کاردامینه بابل (B)، ستون چهارم: نمونه کاردامینه مشهد (M).

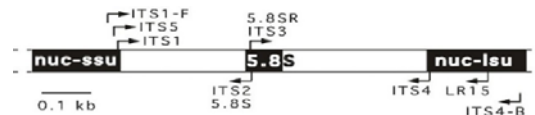
بررسی نسبت بازها و ترکیب نوکلئوتید ها در نمونه های جمع آوری شده، تفاوت بسیار کم داخل گونه های هیرسوتا (محلات، مشهد، آزوروس و آکسفورد از ماکس پلانک) و تفاوت بارز بین این گونه با گونه های دیگر را نشان داد (جدول ۲). نسبت GC در گونه های هیرسوتا به اندازه ۲ درصد کمتر و نسبت AT به همین میزان بیشتر از دیگر گونه ها بود.

بررسی موقعیت Single nucleotide polymorphisms (SNP) در گونه هیرسوتا نشان داد که بیشتر تغییرات SNP مربوط به ناحیه اول ITS بود و در منطقه 5.8S هیچکدام از گونه های مورد بررسی، تفاوتی دیده نشد. بنظر می رسد این ناحیه، کاملا حفاظت شده است.

آگارز ۰/۸ درصد، تفکیک و برای توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید (شکل ۲).

جدول ۱- مناطق مختلف جمع آوری نمونه های کاردامینه که برای شناسایی مولکولی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

ردیف	نام علمی گیاه	محل جمع آوری	شماره
۱	<i>Cardamine hirsuta</i>	طرقه مشهد	CM 16
۲	<i>Cardamine hirsuta</i>	محلات	CM 17
۳	<i>Cardamine flexuoca</i>	همدان (دانشگاه بوعلی سینا)	CH 8
۴	<i>Cardamine flexuoca</i>	بابل (امیر کلابه)	CB 9
۵	<i>Cardamine tenera</i>	نور (جنگل نور)	CN 11
۶	<i>Cardamine uliginosa</i>	اردبیل (دامنه شرقی سیلان)	CA 12



شکل ۱- محل اتصال آغازگرهای مختلف ناحیه ITS و نواحی تکثیر داخلی هر کدام از پرایمرها بر اساس محل اتصال آنها (۲۵). در این تحقیق از آغازگرهای ITS4 و ITS5 استفاده گردید.

کیفیت توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SeqMan مربوط به DNASTAR بررسی گردید. برای بررسی توانایی بارکد مورد بررسی در تفکیک گونه ها، برای هر گیاه مورد مطالعه، چندین توالی دیگر از همان جنس و چندین بارکد از پایگاه اطلاعات داده NCBI نیز جمع آوری شد. این توالی ها در نرم افزار MEGA7 (۲۳) با استفاده از الگوریتم ClustalW هم‌ردیف شده و درخت خویشاوندی با استفاده از فاصله p-distance، روش Neighbor joining و Bootstrap ۱۰۰۰ ترسیم گردید.

نتایج

استخراج DNA : نتایج الکتروفورز و اسپکتروفوتومتری نشان داد که تمامی DNA های استخراجی از کیفیت بالایی برخوردار می باشند. بنابراین تمامی نمونه ها برای آنالیز PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

میزان دیده شد. همچنین در ناحیه 5.8S یک SNP مشاهده گردید (جدول ۴).

در گونه پراتنسیس همانند گونه هیرسوتا اکثر تفاوت‌های SNP در ITS1 مشاهده شد و فقط سه SNP در مقابل هشت SNP در ITS2 مشاهده گردید. ناحیه 5.8S کاملاً حفاظت شده و بدون SNP بود (جدول ۵).

همردیفی توالی ها: نتایج همردیفی (BLASTn) توالی‌های ITS گیاهان جمع‌آوری شده، تایید نمود که تمامی گیاهان جمع‌آوری شده از جنس کاردامینه بودند. همچنین از نظر شناسایی گونه نیز نتایج همردیفی، درصد بالای شباهت را با گونه‌های دیگر این جنس نشان داد.

همچنین در ناحیه دوم ITS، اگرچه تفاوت در SNP مشاهده شد اما این تفاوت بمراتب کمتر از ناحیه اول بود (جدول ۳). بجز موقعیت ۱۷۲ که تفاوت SNP مربوط به بازهای پورین و پیریمیدین است در موقعیت‌های دیگر، تفاوت منحصر یا مربوط به بازهای پورین و یا پیریمیدین است. همچنین در موقعیت ۵۸۵، نمونه‌های مختلف به جز نمونه آکسفورد، فاقد یک نوکلئوتید بودند که احتمالاً نشان‌دهنده یک حذف شدگی باشد.

بر خلاف گونه هیرسوتا در گروه *flexuosa* جایگاه‌های SNP به مراتب بیشتر از هیرسوتا بود ضمن آنکه در هر دو ناحیه اول و دوم ITS، تفاوت‌های SNP تقریباً به یک

جدول ۲- ترکیب و درصد نوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده ITS nrDNA در کاردامینه‌های ایرانی و خارجی (دو اکوتیپ آزروروس و آکسفورد از موسسه ماکس پلانک تحت عنوان *C. hirsuta* بعنوان شاهد، اضافه شدند).

آزروروس	آکسفورد	اردبیل	نور	همدان	محلات	مشهد	نوکلئوتید
۲۳/۳۹	۲۳/۳۵	۲۴/۱۵	۲۳/۸۳	۲۳/۲۶	۲۳/۲۳	۲۳/۵۵	A
۲۲/۱۰	۲۲/۲۲	۲۳/۵۱	۲۳/۸۳	۲۳/۹۱	۲۱/۹۴	۲۱/۹۴	T
۲۶/۴۵	۲۶/۲۵	۲۵/۲۸	۲۵/۴۴	۲۵/۸۵	۲۶/۶۱	۲۶/۲۹	G
۲۸/۰۶	۲۸/۱۸	۲۷/۰۵	۲۶/۸۹	۲۶/۹۸	۲۸/۲۳	۲۸/۲۳	C
۵۴/۵۲	۵۴/۴۳	۵۲/۳۳	۵۲/۳۳	۵۲/۸۳	۵۴/۸۴	۵۴/۵۲	G+C
۴۵/۴۸	۴۵/۵۷	۴۷/۶۷	۴۷/۶۷	۴۷/۱۷	۴۵/۱۶	۴۵/۴۸	A+T
۶۲۰	۶۲۰	۶۲۱	۶۲۱	۶۱۹	۶۲۰	۶۲۰	طول توالی

جدول ۳- موقعیت SNP ها در گروه *C. hirsuta* در نتایج حاصل از توالی‌یابی nrDNA ITS

موقعیت SNP	۶۳۴	۵۸۵	۲۵۶	۱۸۵	۱۷۲	۱۱۹	۷۴	۵۴
آکسفورد	A	T	C	G	C	T	A	T
آزروروس	G	-	T	G	A	C	A	T
محلات	G	-	T	G	A	C	G	C
مشهد	G	-	T	A	A	C	A	C

جدول ۴- موقعیت SNP ها در گروه *C. flexuosa* در نتایج حاصل از توالی‌یابی nrDNA ITS

موقعیت SNP	۶۱۰	۶۰۱	۵۶۷	۵۳۷	۴۶۴	۲۴۷	۲۳۲	۹۳	۳۹	۳۵	۱۴
Hamedan (<i>Asian flexuosa</i>)	T	T	A	T	T	C	T	T	T	A	T
KM875628.1 (<i>Cardamine flexuosa</i>)	C	T	T	C	T	C	C	C	G	C	-
KM875629.1 (<i>Asian flexuosa</i>)	T	C	A	T	T	C	T	T	T	A	A
KP998042.1 (<i>Cardamine flexuosa</i>)	C	T	T	T	C	T	T	T	T	C	A

جدول ۵- موقعیت SNP ها در گروه *C.pratensis* در نتایج حاصل از توالی‌یابی nrDNA ITS

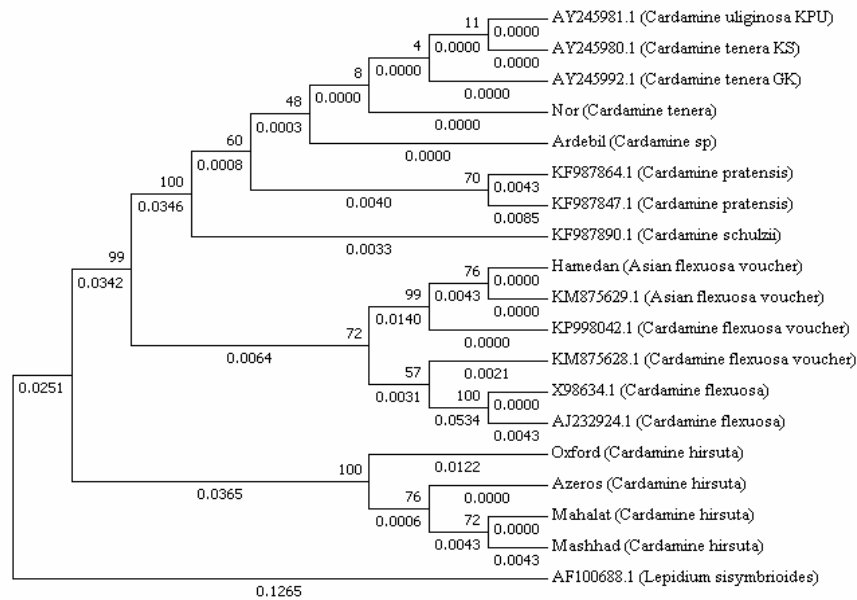
موقعیت SNP	۵۰	۵۶	۸۰	۱۱۶	۱۳۰	۱۴۳	۲۱۰	۲۵۱	۴۶۱	۵۲۴	۵۴۸
Ardebil (<i>Cardamine sp</i>)	A	G	G	C	C	G	C	C	A	C	T
Nor (<i>Cardamine tenera</i>)	T	G	G	C	T	G	C	C	G	T	C
KF987890.1 (<i>Cardamine schulzii</i>)	A	G	G	C	C	G	C	T	G	C	C
KF987864.1 (<i>Cardamine pratensis</i>)	A	G	C	T	C	G	C	C	G	C	T
KF987847.1 (<i>Cardamine pratensis</i>)	A	G	G	T	C	T	T	C	G	C	T
AY245992.1 (<i>Cardamine tenera</i> GK)	T	-	G	C	C	G	C	C	T	-	C
AY245981.1 (<i>Cardamine uliginosa</i> KPU)	-	-	G	C	-	G	C	C	G	C	T
AY245980.1 (<i>Cardamine tenera</i> KS)	T	-	G	C	-	G	C	C	-	-	C

های *C.hirsuta* بودند. جنس *Lipidium sisymbrioides* خارج از گروه قرار گرفت. بیشترین طول شاخه مربوط به گروه *C.hirsuta* با طول ۰/۰۳۶ و کمترین آن مربوط به *C.flexuosa* با طول ۰/۰۰۶۴ بدست آمد. طول شاخه بین سه اکوتیپ *C.tenera*، صفر بدست آمد. همچنین برای دو اکوتیپ همدان و *Asian flexuosa* طول شاخه صفر نشان داده شد که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی اندک بین این دو اکوتیپ می‌باشد. ناحیه ITS1 دارای ۲۶۰ نوکلوتید بود که بیشترین SNP ها در این ناحیه دیده شد و در واقع بیشترین تنوع مربوط به این ناحیه مشاهده شد (شکل ۳).

آنالیز مکان بین ژنی ITS2: درخت فیلوژنی حاصل از توالی‌یابی مکان بین ژنی ITS2 سه گروه مختلف را نشان داد. در این درخت، فاصله شاخه‌ها در گروه *C.hirsuta* و گروه *C.pratensis* صفر بدست آمد در حالیکه در گروه *C.flexuosa*، مقادیر طول شاخه‌ها بین صفر و ۰/۰۰۵۷ متغیر بود که احتمالاً نشان‌دهنده تفاوت‌های بیشتر ناحیه ITS2 نسبت به دو گروه دیگر باشد. دلیل صفر بودن طول شاخه‌ها در داخل تاکس‌های گروه *کارد/مین هیرسوتا* را می‌توان به تعداد کم SNP (جدول ۳) در این ناحیه نسبت داد بطوریکه در ناحیه ITS2 در این نمونه‌ها، فقط دو SNP مشاهده گردید. بیشترین فاصله مربوط به گروه *C.hirsuta* به میزان ۰/۰۴۵ بدست آمد و جنس *L. sisymbrioides* خارج از گروه قرار گرفت (شکل ۴).

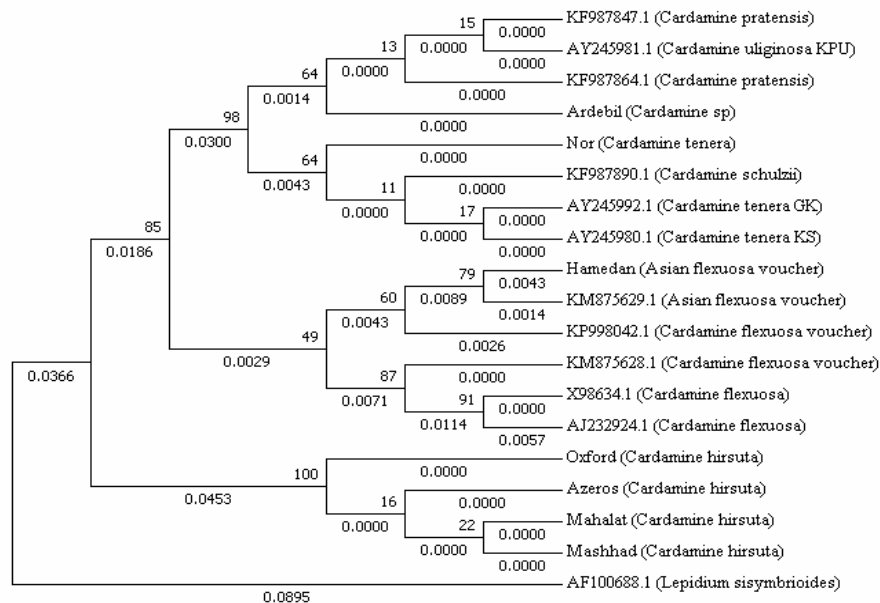
در گونه جمع‌آوری شده از منطقه جنگل نور، اگرچه نتایج یکسانی از بلاست ناحیه کامل ITS با بلاست نواحی جداگانه ITS1 و ITS2 بدست نیامد اما با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی و بررسی‌های انجام شده در مورد شناسایی این گونه در منطقه جنگل نور و نتایج بدست آمده از بلاست جداگانه نواحی ITS، این گونه با دقت ۹۹ درصد *C.tenera* تعیین گردید. نتایج حاصل از بلاست گونه جمع‌آوری شده از منطقه اردبیل، شباهت ۹۸ درصدی با دو گونه *C.pratensis* و *C.flexuosa* را نشان داد اما در بلاست جداگانه نواحی ITS1 و ITS2 این گونه جمع‌آوری شده با ۹۹ درصد شباهت *C.uliginosa* تعیین گردید. همچنین نتیجه بلاست گیاهان جمع‌آوری شده از منطقه امیرکلا در بابل، شباهت ۹۸ درصدی را با گونه *C.flexuosa* نشان داد در حالیکه نتایج حاصل از بلاست گیاهان جمع‌آوری شده از محلات، مشهد و دو اکوتیپ ارسالی از موسسه ماکس پلانک آلمان (آزوروس و آکسفورد) نشان داد که گونه جمع‌آوری شده با احتمال ۹۹ درصد *C.hirsuta* است.

آنالیز مکان بین ژنی ITS1: درخت فیلوژنی حاصل از توالی‌یابی مکان بین ژنی ITS1، سه گروه مختلف را نشان داد. گروه اول شامل گونه‌های *C.pratensis*، *C.tenera*، *C.sultizi* و گیاه جمع‌آوری شده از منطقه اردبیل، گروه دوم شامل گونه‌های *C.flexuosa* و گروه سوم شامل گونه

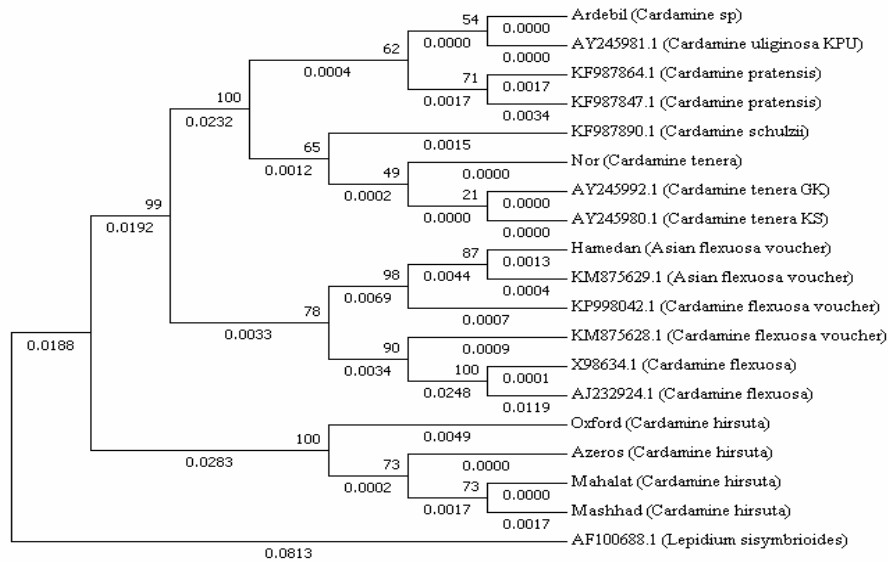


شکل ۳- درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی ITS1 و به کمک نرم افزار MEGA7 از مقایسه توالی نمونه‌های کاردامینه جمع‌آوری شده در ایران و توالی‌های موجود در NCBI، ترسیم شد. اعداد روی هر گروه نشان‌دهنده ضریب Bootstrapping بر پایه ۱۰۰۰ تکرار می‌باشد.

بلاست توالی کامل ناحیه ITS، با توالی گونه‌های دیگر همچنین نزدیکی دو گونه *C. pratensis* و *C. tenera* نشان کاردامینه نظیر *C. flexuosa* و *C. pratensis* هم‌ردیف شد و داده شد (شکل ۵).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی ناحیه ITS2 و به کمک نرم افزار MEGA7 از مقایسه توالی نمونه‌های کاردامینه جمع‌آوری شده در ایران و توالی‌های موجود در NCBI ترسیم شد. اعداد روی هر گروه نشان‌دهنده ضریب Bootstrapping بر پایه ۱۰۰۰ تکرار می‌باشد.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor-joining مبتنی بر هم‌ردیفی توالی ITS1، ITS2 و ناحیه 5.8S و به کمک نرم افزار MEGA7 از مقایسه توالی نمونه های کاردامینه جمع آوری شده در ایران و توالی های موجود در NCBI ترسیم شد. اعداد روی هر گروه نشان دهنده ضریب Bootstrapping بر پایه ۱۰۰۰ تکرار می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نور برای شناسایی تنوع گیاهی منطقه انجام دادند، ۴ گونه کاردامینه گزارش شد که یکی از گونه های شناسایی شده *C.tenera* بود که در این بررسی با استفاده از بلاست نواحی ITS1 و ITS2 با ۹۹ درصد شباهت، این گونه مورد تایید قرار گرفت. البته بلاست توالی کامل ناحیه ITS، با توالی گونه های دیگر کاردامینه نظیر *C.pratensis* و *C.flexuosa* هم‌ردیف شد که می تواند بیانگر پیچیدگیهای شناسایی مولکولی در جنس های پلی پلوئید بعلت نسخه های تکراری و متعدد ITS باشد (۱۱،۲۰). نتایج درخت فیلوژنی همچنین تایید کننده نزدیکی دو گونه *C.tenera*، *C.pratensis* بود (شکل ۵).

در تحقیقاتی که توسط قهرمانی نژاد و همکاران (۲۱) در پنج تالاب بابل انجام شد، گونه گیاهی جمع آوری شده این جنس، گونه *C.hirsuta* معرفی شد در حالیکه نتیجه بدست آمده از توالی یابی گیاه جمع آوری شده از تالاب امیرکلاه در منطقه بابل در این تحقیق، *C.flexuosa* تعیین گردید. بالا بودن درصد شباهت در بلاست (۹۵ درصد) و مشخصات ظاهری آن شامل داشتن ساقه موج دار، تعداد

تاکنون تحقیقات متعددی به لحاظ مولکولی بر روی گونه های مختلف جنس کاردامینه انجام شده است (۲۶، ۲۰، ۱۵، ۱۴، ۱۳، ۱۲، ۱۱). این جنس با بیش از ۲۰۰ گونه، جزء یکی از بزرگترین خانواده های گیاهی محسوب می شود (۲۴). علاوه بر تنوع پلوئیدی گزارش شده در این جنس، برخی از گروه های مختلف در آن براحتی با یکدیگر تلاقی می یابند. بدلیل همین تلاقی های درون گروهی و تنوع بالای پلوئیدی، شناسایی برخی از گونه های آن بدشواری صورت می گیرد (۲۴). از طرفی بدلیل همین تنوع و پیچیدگی، بررسی های مولکولی و یافتن روابط تکاملی گونه ها، بسیار مفید و جالب می باشد. در ایران فقط ۷ گونه از این جنس گزارش شده است (۵) و تاکنون هیچ بررسی مولکولی بر روی آنها انجام نشده است. نتایج این تحقیق بر روی گونه های جمع آوری شده، نشان داد که ITS می تواند به عنوان یک نشانگر قدرتمند در شناسایی گونه های مختلف کاردامینه بخوبی عمل کند. به عنوان مثال در تحقیقاتی که یوسف وند و همکاران (۹) در جنگل

یکسانی را نشان داد و هر چهار نمونه با طول شاخه صفر در یک گروه قرار گرفتند. از طرفی با در نظر گرفتن تعداد SNP، دو نمونه مشهد و محلات قرابت بیشتری را در درخت فیلوژنی نشان دادند. این نمونه‌ها هرچند از نظر مورفولوژیکی شباهت بالایی با *C. flexuosa* نشان دادند ولی در هر سه درخت فیلوژنی، بصورت دو گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند که تایید کننده تفاوت بارز مولکولی بین این دو گونه می باشد. مقایسه تفاوت موقعیت SNP در این دو گونه نشان می دهد که بر خلاف *C. hirsuta* که اکثر تفاوتها در ناحیه اول ITS است، در گونه *C. flexuosa* تقریباً در هر دو ناحیه ITS1 و ITS2 به یک میزان مشاهده می شود که نشان از الگوی متفاوت ژنی این دو گونه است و البته با توجه به تتراپلوئیدی بودن *C. flexuosa* این تفاوتها دور از انتظار نمی باشد.

در بررسی فلور دامنه های شمالی و شرقی سیلان که بوسیله شریفی و همکاران (۴) صورت گرفت دو گونه *C. hirsuta* و *C. uliginosa* شناسایی شد. در این بررسی نیز گیاه کاردامینه از همین منطقه جمع آوری و ناحیه ITS آن توالی یابی شد. نتایج حاصل از توالی یابی و بلاست ITS1 و ITS2 نشان داد که با احتمال ۹۹ درصد این گیاه با گونه های *C. uliginosa* و *C. pratensis* و *C. schultzi* و با احتمال ۹۷ درصد با گونه *C. flexuosa vucher* شباهت دارد ولی در درخت فیلوژنتیکی حاصل از ITS کامل، در کنار *C. uliginosa* قرار گرفت. به لحاظ ویژگی های مورفولوژیکی، این گیاه شباهتی با گونه *C. flexuosa* نشان نمی دهد از طرفی گونه *C. pratensis* دارای الگوی پیچیده ای از تنوع مورفولوژیکی و کروموزومی شامل دیپلوئیدی و سطوح مختلف پلی پلوئیدی دیگر (۱۶ تا ۹۶ کروموزومی) است. همچنین این گونه تاکنون در ایران گزارش نشده است ولی بطور وسیعی در اروپا، شمال آفریقا، امریکای شمالی و آسیا گسترده شده است (۲۶). در نتیجه با توجه به نتیجه توالی یابی و درخت فیلوژنی، به احتمال زیاد این گونه *C. uliginosa* می باشد که با گزارش فلور منطقه

پرچم (شش)، نداشتن کرک بر روی برگ ها، تعداد زیاد شاخه فرعی و داشتن کرک بر روی ساقه از صفات بارز این گونه است که در شناسایی آن در نظر گرفته شد (۲۷). از لحاظ سطح پلوئیدی گونه *C. hirsuta* دیپلوئید است در حالیکه *C. flexuosa* گونه ای تتراپلوئید می باشد. از لحاظ تکاملی این گونه در نتیجه تلاقی *C. hirsuta x C. caldeirar*، *C. hirsuta x C. parviflora* و *C. hirsuta x C. impatiens* وجود آمده است (۱۹).

درخت فیلوژنی گونه جمع آوری شده از همدان نشان داد این گونه در یک گروه مجزا از *C. hirsuta* قرار گرفته و با گونه آسیایی خود، شباهت و قرابت بیشتری دارد. نتیجه همردیفی توالی آن، شباهت ۹۹ درصدی با گونه *C. flexuosa* را نشان داد که از لحاظ مورفولوژیکی نیز این شباهت تایید گردید. همچنین این گونه کاردامینه در کنار گونه های مشابه در درخت فیلوژنتیکی قرار گرفت. چون این گیاه از گلخانه دانشگاه بوعلی سینا جمع آوری شده بود، بررسی ها نشان داد که احتمالاً از طریق خاک گلدان از ناحیه شمال به همدان انتقال یافته است. در واقع رویشگاه طبیعی آن، نواحی مرطوب و خاکهای توری در حاشیه مزارع برنج یا تالاب ها می باشد (۲۷). گیاهانی که در این تحقیق از مناطق تنکابن، بابل و حاشیه جنگل نور جمع آوری شدند، کاملاً مشابه این گیاه بودند. با اینکه در گزارش نقی نژاد و قهرمان (۲۷) به حضور این گیاه در مناطق مختلف هیرکانی اشاره شده است اما در تحقیقات انجام شده در مورد فلور مناطق ناحیه شمال و شمال غرب، نامی از این گیاه ذکر نشده است (۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۲۷).

در بررسی نمونه های *C. hirsuta* از بذرهای دو اکوتیپ مشخص از موسسه ماکس پلانک نیز بعنوان شاهد استفاده شد. توالی گیاهان جمع آوری شده از گلخانه های مشهد و محلات با توالی این گیاهان مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج هر سه درخت فیلوژنی از نواحی مختلف ITS، نتایج

جنس و گونه در گیاهان کاردامینه، کارایی بالایی داشته باشد. از آنجا که ناحیه ITS گونه‌های زیادی از کاردامینه، تعیین توالی شده و در NCBI ثبت گردیده است، همین امر باعث افزایش کارایی این نشانگر شده است.

سبلان شرقی همخوانی دارد. با اینحال صحت این موضوع نیاز به بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی دقیق‌تری دارد.

در مجموع، این تحقیق به خوبی نشان داد که ITS می‌تواند بعنوان یک نشانگر مولکولی مناسب در شناسایی

منابع

۱. خدادادی، ص.، سعیدی، م.س. و نقی نژاد، ع.ر. (۱۳۸۸) بررسی فلور و زیستگاه‌های تالاب حفاظت شده استیل (آستارا) و محیط اطراف آن، شمال غرب ایران. رستنیها، جلد ۱۰ شماره ۱ صفحات ۱-۱۹
۲. دیناروند، م.، اجتهادی، ح.، جنگجو، م. و اندرزیان، ب. (۱۳۹۴) معرفی فلور، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان منطقه حفاظت شده شیمبار (استان خوزستان). زیست‌شناسی گیاهی ایران، شماره ۲۳ صفحه ۱-۱۴
۳. روانبخش، م. و امینی، ط. (۱۳۹۱) بررسی فلور، پراکنش جغرافیایی و ساختار اکولوژیکی ذخیره گاه جنگلی گیسوم تالش. مجله زیست‌شناسی ایران جلد ۲۵ شماره ۱ صفحات ۲۱-۳۱
۴. شریفی، ج.، جلیلی، ع.، قاسماف، ش.، نقی نژاد، ع.ر. و عظیمی، ف. (۱۳۹۱) مطعم بررسی فلورزیستی، شکل زیستی و پراکنش جغرافیایی گیاهان اراضی ماندابی (wetlands) دامنه‌های شمالی و شرقی سبلان. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. سال چهارم، شماره ۱۰ صفحات ۴۱-۵۲
۵. عباسی، ف. (۱۳۹۱) بررسی بیوسیستماتیکی جنس *Cardamine* L. در ایران از خانواده شب بو (Brassicaceae). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه الزهرا.
۶. محمودی، ج. (۱۳۸۶) بررسی تنوع گونه‌ای گیاهان جنگل حفاظت شده کلار آباد در سطح گروه‌های اکولوژیکی. مجله زیست‌شناسی ایران جلد ۲۰ شماره ۴ صفحات ۳۵۳-۳۶۲
۷. نقی نژاد، ع.ر. و حسین زاده، ف. (۱۳۹۳) بررسی تنوع گونه‌های گیاهی تالاب بین‌المللی فریدونکنار مازندران. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۷ شماره ۲ صفحات ۳۲۰-۳۳۵
۸. نقی نژاد، ع.ر.، حسینی، س.، رجماند، م.ع. و سعیدی، م.ش. (۱۳۸۹) بررسی فلورزیستی جنگلهای حفاظت شده مازین و سی بن رامسر در طول شیب ارتفاعی (۳۰۰ تا ۲۳۰۰ متر). فصلنامه تاکسونومی و بیوسیستماتیک، شماره ۵ صفحات ۹-۱۱۴
۹. یوسفوند، ث.، اسماعیل زاده، ا.، جلالی، غ.ع. و اسدی، ح. (۱۳۹۶) معرفی فلور، شکل زیستی و کورولوژی پوشش گیاهی روزمینی و بانک بذر خاک پارک جنگلی نور. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۳۰، شماره ۱.
10. Al-Shehbaz, I.A., Beilstein M.A. and Kellogg, E.A. (2006) Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259:89-120.
11. Angela, R., Post R.A., Krings, A., Xiang, J., Brian, R., Sosinski. and Joseph, C. (2011) Neal on the Identity of the Weedy Bittercresses (*Cardamine*: Brassicaceae) in United States. Nurseries: Evidence from Molecules and Morphology *Weed Science*, 59(1):123-135.
12. Anthony, D.M. and Heenan, P.B. (2000) Systematic Relationships of New Zealand Endemic Brassicaceae inferred from nrDNA ITS Sequence data. *Systematic Botany*, 25(1): pp. 98-105.
13. Beilstein, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Mathews, S. and Kellogg, E.A. (2008) Brassicaceae phylogeny inferred from phytochrome A and ndhF sequence data: tribes and trichomes revisited. *American Journal of Botany*, 95(10): 1307-1327.
14. Bleekera, W., Klausmeyera, S., Peintinger M. and Dienstc, M. (2008) DNA sequences identify invasive alien *Cardamine* at Lake Constance. *Biological Conservation*, 141:692-698.
15. Carlsen, T., Bleeker, W., Hurka, H., Elven, R. and Brochmann, C. (2009) Biogeography and Phylogeny of *Cardamine* (Brassicaceae). *Annals*

- of the Missouri Botanical Garden, 96(2):215-236.
16. Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C. and Song, J. (2010) Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*, 5(1):e8613.
 17. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
 18. Doyle, J.J. (1992) Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Botany*, 17: 144-163.
 19. Ellis, R.P. and Jones, B.M.G. (1969) The origin of *Cardamine flexuosa* with evidence from morphology and geographical distribution. National J institute of Agricultural Botany, Cambridge. *Watsonia* 7:92-103.
 20. Franzke, A., Pollmann, K., Bleeker, W., Kohrt, R. and Hurka, H. (1998) Molecular systematics of *Cardamine* and allied genera (*Brassicaceae*): Its and non-coding chloroplast DNA. *Folia Geobotanica*, 33: 225-240.
 21. Ghahremaninejad, F., Naqinezhad, A. and Amirgholipour K.V. (2012) Plant diversity of five important wetlands of Babol Mazandaran province, Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 13-24.
 22. Hay, A.S., Pieper, B., Cooke, E., Mandáková, T., Cartolano, M., Tattersall, A.D., Ioio, R.D., McGowan, S.J., Barkoulas, M., Galinha, C., Rast, M.I., Hofhuis, H., Then, C., Plieske, J., Gana, M., Mott, R., Martinez-Garcia, J.F., Carine, M.A., Scotland, R.W., Gan, X., Filatov, D.A., Lysak, M.A. and Tsiantis, M. (2014) *Cardamine hirsuta*: a versatile genetic system for comparative studies. *The Plant Journal*, 78:1-15.
 23. Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7):1870-4.
 24. Lihová, J., Marhold, K., Kudoh, H. and Koch, M.A. (2006) Worldwide phylogeny and biogeography of *Cardamine flexuosa* (*Brassicaceae*) and its relatives. *American Journal of Botany*, 93(8): 1206-1221.
 25. Sahin, F.P., Yamashita, H., Guo, Y., Terasaka, K., Kondo, T., Yamamoto, Y., Shimada, H., Fujita, M., Kawasaki, T., Sakai, E., Tanaka, T., Goda, Y. and Mizukami, H. (2007) DNA Authentication of Plantago Herb Based on Nucleotide Sequences of 18S-28S rRNA Internal Transcribed Spacer Region. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30:1265-1270.
 26. Marhold, K., J. Lihova, M., Perny. and Bleeker, w. (2004) Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (*Brassicaceae*) taxa from closely related polyploid complexes. *Annals of Botany* . (*Oxford*), 93:507-520.
 27. Naqinezhad, A.R., Ghahreman, A. and Assadi, M. (2004) Some New Record Species for the Flora of Iran as Well as Ecological and Phytogeographical Notes. *Journal Botany*, 11(1)89-96.
 28. Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 74:5088-5090.

Identification of some Iranian cardamine species using the ITS molecular marker

Ghorbani Marghashi M.¹, Bagheri H.¹ and Gholami M.²

¹ Dept. of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

² Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

The genus *Cardamine* L. in Brassicaceae comprises about 200 species in the world and 7 species in Iran. It has great morphological and karyological diversity and complex evolutionary history. This plant was collected from six different parts of Iran. The identity of these species was further explored by DNA extraction from young leaves and amplification of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) internal transcribed spacer (ITS) region by ITS4 and ITS5 primers. The amplified DNA was sequenced via Takapozist Company. Phylogeny reconstructions were performed using MEGA7 software. Blast and phylogeny analysis identified the collected plants as *C.hirsuta*, *C.flexuosa*, *C.tenera* and *C.uliginosa*. Two known european ecotypes of *C. hirsuta* (azureus and oxford from Max Planck Institute) were used as control which confirmed the outcome. These results not only confirmed the presence of at least four Cardamine species in Iran but also showed the effectiveness of ITS marker in identification of different species in the genus Cardamine.

Key words: Cardamine, ITS marker, Phylogenetic analysis