تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۷۳-۸۲
دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۹ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۶/۰۹

مقایسه الگوی PCR-RFLP با توالی‌یابی مستقیم ناحیه ITS نمدارهای هیرکانی

حامد یوسف‌زاده [۱]*، حمید بینا [۱] و اباصلت حسین‌زاده کلاگر [۲]
[۱] گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

یکی از نشانگرهایی که امروزه به عنوان DNA بارکد برای گونه‌های گیاهی پیشنهاد می‌شود، تعیین توالی ناحیه هسته‌ای ITS است. از آنجا که توالی‌یابی روشی پَر هزینه و نیازمند زمان طولانی است، این مطالعه با به کارگیری روش PCR-RFLP قصد دارد تا ضمن مطالعه الگوی چند شکلی ناحیه ITS نمدارهای هیرکانی، نتایج این دو روش (توالی‌یابی و PCR-RFLP) را با یکدیگر مقایسه نماید. به این منظور با استفاده از هشت آنزیم برشی، الگوی الکتروفورزی ۹ گونه نمدار جمع آوری شده از جنگل های هیرکانی شمال ایران بررسی شد. نتایج نشان داد که علاوه بر آنزیم *Eco*RI که فاقد جایگاه برش در گیاهان گل‌دار است، آنزیم *Bsr*BI نیز در تمام توالی‌های نمدار مطالعه شده، بدون جایگاه برش است. هر دو روش گونه‌های مورد بررسی را در ۹ گروه مجزا قرار داد و تنها تفاوت در گروه‌بندی گونه *Tilia begonifolia* Steven است که یکی از پایه‌های آن در روش RFLP با گونه *T. hyrcana* Tabari and Colagar و در روش توالی‌یابی مستقیم با گونه *T. rubra* Rupr. در گروهی مجزا قرار گرفته است. همچنین، میزان همسویی نسبتاً بالای این دو روش با استفاده از آزمون منتل نیز تأیید شد (r=۰/۵۷). تحلیل PCoA نیز گویای تمایز گونه‌های *T. dasystyla*، *T. hyrcana* و *T. rubra* و با منشأ هیرکانی از یکدیگر است و تنها گونه *T. begonifoila* را نتوانسته است از این گونه‌ها جدا نماید. بنابراین، با توجه به نیاز به صرف زمان و هزینه کمتر برای روش PCR-RFLP ناحیه ITS و نیز همسویی نسبتاً بالای نتایج آن با روش توالی‌یابی مستقیم، این روش به عنوان روشی مناسب، ساده و کم هزینه برای تبارشناسی گونه‌های گیاهی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فاصله انداز درونی رونویسی، چندشکلی طولی قطعات برشی، آنزیم برشگر، فیلوژنی

مقدمه

روند رو به کاهش تنوع زیستی از یک سو و وقوع دو رگ‌ها و مضاعف‌شدگی کرموزومی که از عوامل اصلی تشخیص نادرست گونه های گیاهی است از سوی دیگر، از دغدغه‌های اصلی متخصصان سیستماتیک گیاهی برای دستیابی به روشی سریع، دقیق و ارزان جهت

* h.yousefzadeh@modares.ac.ir

شناسایی گونه‌های گیاهی است. سیستم‌های شناسایی مبتنی بر DNA علاوه بر سهولت شناسایی گونه‌ها، امکان یافتن گونه‌های جدید را نیز فراهم می‌آورد (Blaxter, 2003؛ Hebert *et al*., 2003a, 2003b). در روش DNA بارکدینگ، بخشی از ژنوم که ضمن کوتاه بودن، دارای ویژگی چند شکلی نیز است، برای تفکیک گونه‌های مختلف یک جنس استفاده می‌شود (Hebert *et al*., 2003a, 2003b؛ Marshall, 2005). علیرغم توافق عمومی روی سیتوکروم اکسیداز I به عنوان قطعه بارکد برای جانوران، هنوز قطعه ژنوم گیاهی که بتواند برای تمام جنس‌های گیاهی به عنوان بارکد کاربرد داشته باشد، معرفی نشده است. البته چندین جایگاه ژنی کلروپلاستی در گیاهان (به عنوان اگزون‌ها: *rbcl*، *atp*B، *ndh*F، *mat*K و مناطق غیر رمز کننده شامل: اینترون *trn*L و ناحیه بین ژنی *trn*L-F) به عنوان بارکد پیشنهاد شده است که بسته به جنس گیاهی مورد مطالعه، کارآیی متفاوتی نیز دارد (Chase *et al*., 2005). به دلیل فراوانی تکامل شبکه‌ای، دو رگه‌ای شدن آسان و مضاعف‌شدگی کرموزومی، احتمالاً گونه‌زایی غیر تک نیایی (non monophyletic) در گیاهان رایج است. با توجه به این که تأثیرپذیری ژنوم هسته‌ای نسبت به مشکل‌های ناشی از دو رگه‌ای شدن کمتر است، چند سالی است که پژوهشگران تبارشناسی به دنبال شناسایی ژنوم هسته ای بارکد برای گیاهان هستند. در این راستا، ناحیه ITS (Internal Transcribed Spacer) به عنوان بارکد برای برخی از گیاهان پیشنهاد شده است (Kress *et al*., 2005). برای نمونه ناحیه ITS2 به عنوان ناحیه مورد توافق عمومی، به عنوان بارکد برای برخی گیاهان پیشنهاد شده است (Chen *et al*., 2010).

نمدار (*Tilia* spp.) از جمله گیاهانی است که سهولت وقوع پدیده دو رگ شدن بین گونه‌های مختلف آن و همچنین هم ناحیه‌ای بودن برخی از گونه‌های آن، شناسایی دقیق گونه‌های آن را بر اساس صفات ریخت‌شناسی مشکل نموده است. بنابراین، می‌توان با به کارگیری روش DNA بارکدینگ، از تعداد دقیق گونه‌ها در یک منطقه جغرافیایی اطمینان بیشتری حاصل نمود. در این ارتباط بررسی های اندکی روی جنس نمدار انجام شده است. اگرچه تکثیر ناحیه بارکد و توالی یابی مستقیم آن روشی استاندارد در مطالعه بارکدینگ است، اما در برخی موارد محققان ترجیح می‌دهند با استفاده از روش های ارزان‌تر، ساده‌تر و با صرف زمان کمتر به نتایج مشابه دست یابند. یکی از این روش‌ها، PCR-RFLP است که گرچه در مقایسه با توالی یابی مستقیم دقت کمتری دارد اما برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها، در عین ساده و ارزان بودن، کارا و مؤثر است (Nakamura *et al*., 1998a). با توجه به استفاده از روش توالی‌یابی مستقیم برای شناسایی گونه های مختلف جنس نمدار در جنگل‌های شمال ایران توسط Yousefzadeh و همکاران (۲۰۱۲)، تحقیق حاضر در نظر دارد تا با استفاده از روش PCR-RFLP ناحیه ITS به بررسی وجود چند شکلی در ناحیه ITS گونه‌های جنس نمدار و نوع ارتباط آنها با یکدیگر با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و سپس مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج حاصل از گروه‌بندی بر اساس توالی‌یابی مستقیم، بپردازد.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه: برای این بررسی چهار گونه نمدار موجود در جنگل هیرکانی شامل: *T. begonifoloa*

Steven (دو پایه)، *T. dasystyla* Steven (دو پایه)، *T. hyrcana* Tabari and Colagar (دو پایه) و *T. rubra* Rupr. (دو پایه) که قبلاً شناسایی تیپ‌های مختلف روزنه (Yousefzadeh *et al*., 2010a)، مطالعات ریخت شناسی برگ (Yousefzadeh *et al*., 2010b) و همچنین ساختار دوم توالی ITS (Yousefzadeh *et al*., 2012) آنها انجام شده بود، انتخاب و استفاده گردید. همچنین، گونه های موجود در بانک ژن شامل: *T. hetrophylla* Vent.، *T. hupehensis* Heng، *T. miqueliana* Maximowicz، *T. paucicostata* Maximowicz و *T. tomentosa* Moench به ترتیب با کد دسترسی AF174639، AF460197، DQ120724، AF460198 و AF25002 نیز برای ارزیابی استفاده شدند.

استخراج DNA، تکثیر قطعه ITS و توالی‌یابی مستقیم آن: استخراج DNAی ژنومی از برگ نمدار، با استفاده از CTAB و سدیم دودسیل سولفات-پتاسیم استات (Hosseinzadeh Colagar *et al*., 2010) انجام شد. تکثیر منطقه ITS که شامل ITS1-5.8s-ITS2 است با توالی های پرایمری گزارش شده توسط White و همکاران (۱۹۹۰) که شامل پرایمر مستقیم با نام ITS1 (و توالی '5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) و پرایمر معکوس با نام ITS4 (و توالی '5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) است، در شرایط دمایی و غلظت نهایی ذکر شده در جدول ۱، صورت گرفت. در بررسی حاضر، برای شناسایی مقدماتی قطعات تکثیری از آنزیم *Taq* و برای تعیین توالی محصولات PCR از آنزیم *Pfu* به دلیل داشتن کیفیت تصحیح بالا (proof-reading) در فرآیند پلی‌مرازی استفاده شد. برای توالی یابی مستقیم، محصول *Pfu*-PCR قطعه ITS که شامل ITS1-5.8s-ITS2 است، به شرکت MWG آلمان فرستاده شد. استخراج توالی از الکتروفروگرام‌های دریافت شده از شرکت MWG با نرم‌افزار Chromas نسخه ۲ صورت گرفت. مقایسه توالی‌ها نیز با به کارگیری نرم‌افزار برخط Blast که از نرم‌افزارهای برخط بانک NCBI است (www.ncbi.nlm.nih.gov) انجام شد.

جدول ۱- شرایط و غلظت نهایی مواد تشکیل‌دهنده PCR

		Taq-DNA polymerase-PCR	*Pfu*-DNA polymerase-PCR
واسرشت اولیه		۹۴-۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳۶۰ ثانیه	۹۴-۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳۶۰ ثانیه
۳۲ چرخه	اتصال	۵۶ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه	۵۶ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه
	توسعه	۷۲ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه	۷۲ درجه سانتیگراد برای ۹۰ ثانیه
	واسرشت	۹۴ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه	۹۴ درجه سانتیگراد برای ۶۰ ثانیه
توسعه نهایی		۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتیگراد برای ۷ دقیقه
غلظت نهایی واکنشگرهای PCR		10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 0.08% Nonidet P40, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 mM of each primer, 20 ng of template DNA and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Germany)	10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 0.1% Triton X100, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1mg/ml BSA, 2mM $MgSO_4$, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0.5 mM of each primer, 20 ng of template DNA and 1.25U *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, Germany)

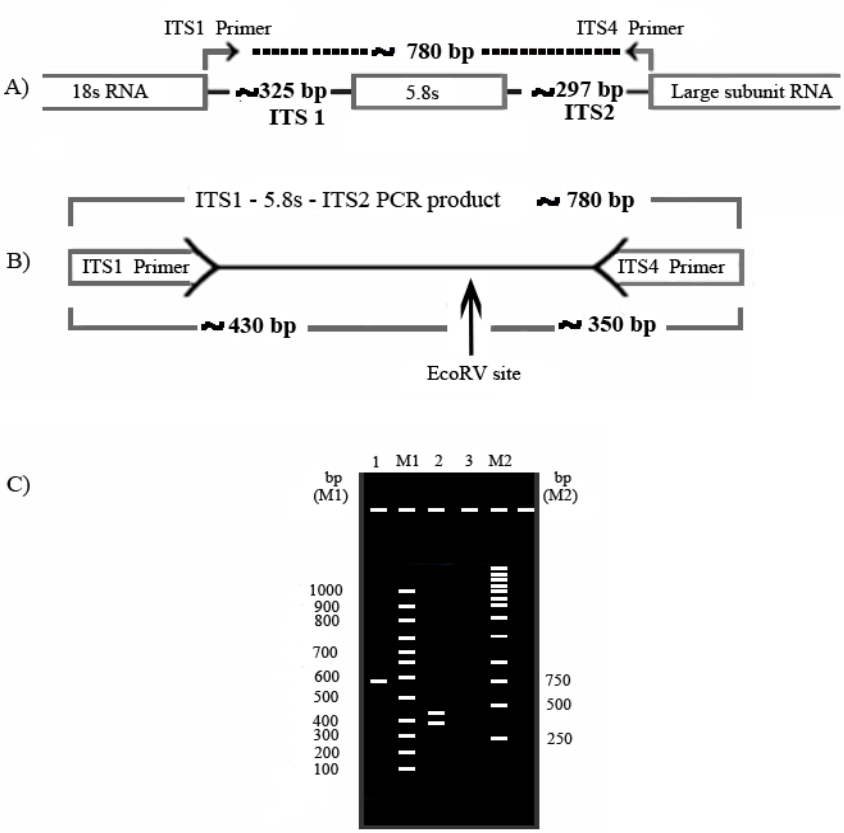
تحلیل RFLP: بر اساس توالی ثبت شده گونه‌هایی از جنس نمدار در بانک بین‌المللی ژن (NCBI) و با نرم‌افزار برخط Nebcutter نسخه ۲/۰ (http://tools.neb.com/NEBcutter/index.php)، تعداد ۸ آنزیم برشگر (restriction enzymes) شامل EcoRI، Bsr BI، EcoRV، AluI، HpaI، RsaI، MscI و Hpy 166II انتخاب شدند. برای اطمینان از تطابق نتایج تجربی هضم آنزیمی در آزمایشگاه با نتایج محاسباتی هضم آنزیمی با نرم‌افزار، الگوی هضم آنزیمی با دو آنزیم *Eco*RI و *Eco*RV نیز در آزمایشگاه بررسی شد. برای هضم آنزیمی محصولات PCR ابتدا مخلوط واکنشگرهای آنزیمی در حجم کل واکنشگرهای ۱۰ میکرولیتری شامل: ۵ میکرولیتر بافر ۲X، ۰/۲۵ واحد آنزیم و ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر بود، در داخل تیوب های ۰/۵ میلی‌لیتری تهیه شد. پس از ورتکس کوتاه، تیوب ها را به مدت ۳ تا ۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند. سپس، مخلوط واکنش در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرماگذاری شد. سپس برای تأیید، پس از افزودن مقدار ۵ میکرولیتر بافر نمونه DNA، در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز گردید. نمره‌دهی بر اساس اندازه باندها به صورت صفر و یک انجام شد. برای گروه‌بندی گونه‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش سلسله مراتبی و الگوریتم Ward و همکاران (۲۰۰۵) و با استفاده از نرم‌افزار JMP نسخه ۳/۱/۲ انجام شد و مربع فاصله اقلیدسی به عنوان معیار تشابه مورد استفاده قرار گرفت. از تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis; PCoA) به عنوان آزمون مکمل تجزیه خوشه‌ای جهت نمایش میزان تمایز گونه ها از یکدیگر (بر اساس شباهت یا عدم شباهت گونه‌ها)، با نرم‌افزار PopTools انجام شد.

نتایج

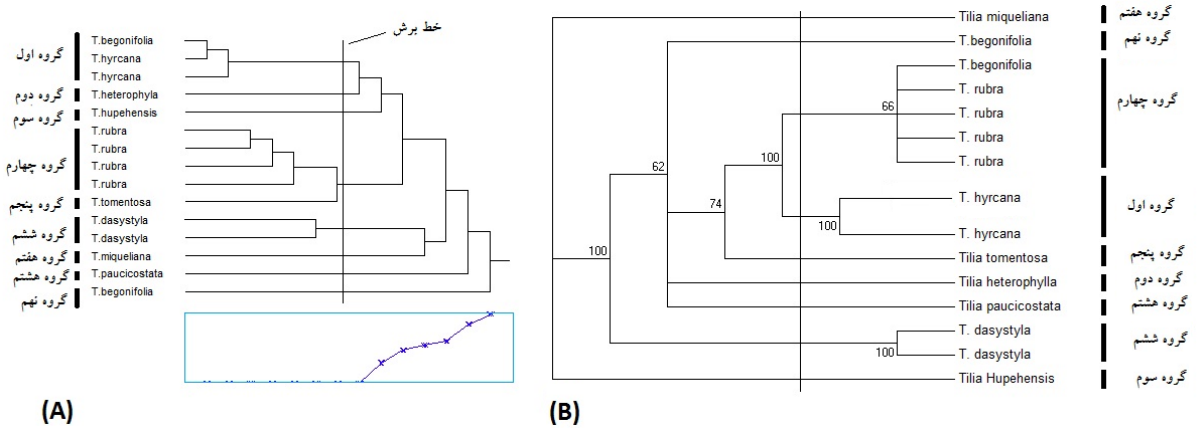
الگوی هضم آنزیمی محصولات PCR با آنزیم های *Eco*RI و *Eco*RV: برای تأیید قطعه ITS با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و الگوی پیش‌بینی شده با نرم‌افزار از دو آنزیم *Eco*RV (دارای یک جایگاه برش در نمدار) و آنزیم *Eco*RI (بدون جایگاه برش در گیاهان گل دار) استفاده گردید. بر اساس الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم *Eco*RV در ژل آگاروز به ترتیب قطعاتی حدود ۴۳۰ و ۳۵۰ جفت بازی مورد انتظار بود که نتایج به دست آمده DNA تکثیر شده را مورد تأیید قرار داد (شکل ۱، ستون ۵). همچنین، نتایج نشان داد که آنزیم *Eco*RV روی محصول PCR دارای برش نبوده است. بنابراین، می‌تواند محصول ITS گیاهان گل‌دار باشد (Jobes and Thien, 1997). بر این اساس الگوی هضم آنزیمی مشاهده شده با الگوی هضم قابل انتظار، یا همان پیش بینی شده با نرم افزار، کاملاً با یکدیگر مطابقت نشان داد. در تمام تاکسون‌ها در موقعیت ۳۷، آنزیم *Hpa*I دارای جایگاه برش است. از بین همه گونه‌های تحت مطالعه، تنها گونه *T. dasystyla* در موقعیت ۲۸۳ توسط آنزیم *Hpy*166II دارای برش است. همچنین این گونه تنها گونه در بین گونه های جنس نمدار از جنگل های شمال ایران است که در موقعیت ۳۸۳ توسط آنزیم *Hpy*166II بدون جایگاه برش است.

مقایسه گروه‌بندی بر اساس نمره‌دهی با روش RFLP و روش توالی‌یابی مستقیم: در ابتدا، توالی‌یابی مستقیم منطقه ITS1-5.8s-ITS2 از الکتروفروگرام‌های دریافتی و مقایسه توالی‌ها با نرم‌افزار برخط Blast نشان داد که قطعه مورد نظر به جنس نمدار تعلق دارد. سپس، رسم دندروگرام نمره‌دهی قطعات RFLP با روش

Ward و همکاران (۲۰۰۵) و رسم دندروگرام با استفاده از نمره‌دهی توالی‌یابی مستقیم با روش حداکثر پارسیمونی صورت گرفت. نتایج گروه‌بندی گونه‌های مورد بررسی بر اساس الگوی نمره‌دهی RFLP، آنها را در ۹ گروه مجزا تفکیک نمود (شکل ۲) که این تعداد گروه با نتایج گروه‌بندی بر اساس روش توالی‌یابی مستقیم و روش حداکثر پارسیمونی مطابقت دارد. در هر دو روش گونه‌های با منشأ غیر هیرکانی در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. در ارتباط با گونه‌های با منشأ هیرکانی، در هر دو روش گونه‌های *T. dasystyla*، *T. hyrcana* و *T. rubra* در گروهی کاملاً مجزا قرار گرفتند. تنها گونه مورد اختلاف گونه *T. begonifolia* است که یکی از پایه‌های آن در روش RFLP با گونه *T. hyrcana* در یک گروه قرار گرفته است. در حالی که در روش توالی‌یابی مستقیم با گونه *T. rubra* در گروهی مجزا قرار گرفته است (شکل ۲). با استفاده از آزمون منتل نیز میزان تطابق این دو روش با یکدیگر سنجش شد و نتایج نشان‌دهنده همسویی نسبتاً بالای نتایج حاصل از دو روش مورد بررسی است (r=0.57).

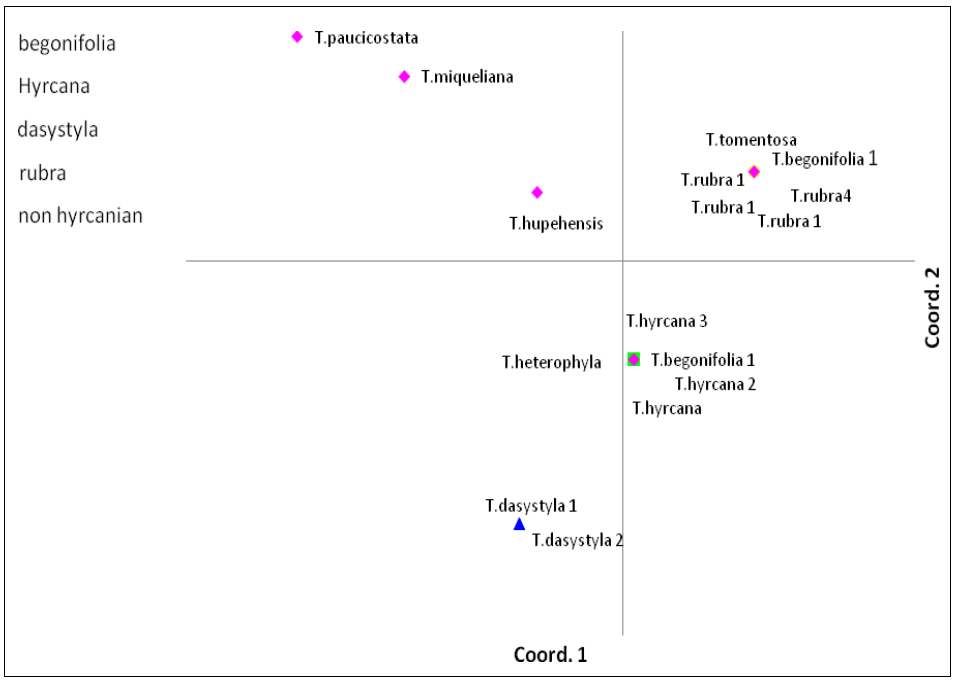


شکل ۱- محصول‌های PCR و هضم آنزیمی قطعه *ITS* در ژل آگاروز. A) شماتیک پرایمرها و طول فرضی قطعات حاصل از عملکرد آنها در قطعه *ITS*؛ B) شماتیک الگوی هضم آنزیمی و محصول عملکردی آن روی قطعه *ITS1*-5.8s-*ITS2*؛ C) محصول‌های PCR و هضم آنزیمی روی ژل آگاروز ۱ درصد در این ژل. ستون ۱: محصول پرایمرهای *ITS1/ITS4*، ستون ۲: هضم آنزیمی توسط آنزیم برشگر *Eco*RV، M1 و M2 نشانگر است.



شکل ۲- مقایسه نتایج گروه‌بندی گونه‌های بررسی شده با روش‌های RFLP و توالی‌یابی مستقیم. A) دندروگرام رسم شده با نمره‌دهی قطعات RFLP با روش Ward و همکاران (۲۰۰۵)؛ B) دندروگرام رسم شده با نمره‌دهی توالی‌یابی مستقیم با روش حداکثر پارسیمونی.

همچنین، میزان تمایز گونه‌های مطالعه شده به صورت گرافیکی در قالب تحلیل PCoA انجام شد. همان طور که در شکل ۳ مشخص است گونه های با منشأ غیر هیرکانی به ویژه گونه‌های *T. hupehensis*، *T. miqueliana* و *T. paucicostata* با فاصله زیادی از گونه‌های موجود در شمال ایران متمایز هستند. در بین گونه‌های هیرکانی نیز مرکز گونه‌های *T. dasystyla*، *T. hyrcana* و *T. rubra* از یکدیگر دارای فاصله است. اما یکی از پایه‌های گونه *T. begonifolia* با گونه *T. hyrcana* و یکی دیگر از پایه‌های آن با گونه *T. rubra* آمیخته شده است. از نکات جالب توجه این تحلیل، هم مرکزی گونه *T. heterophyla* از منشأ آمریکای شمالی با گونه *T. hyrcana* (گونه جدید تازه معرفی شده از جنگل هیرکانی توسط Yousefzadeh و همکاران، ۲۰۱۲) است.



شکل ۳- پراکنش گونه‌های مطالعه شده بر اساس محور اول و دوم تحلیل مختصات اصلی (PCoA)

بحث و نتیجه‌گیری

روش PCR-RFLP روشی کم هزینه برای آشکارسازی چند شکلی ناحیه ITS است (Manhart and Mccourt, 1992). اگرچه نتیجه‌گیری بر اساس روش PCR-RFLP ناحیه ITS نسبت با روش توالی‌یابی مستقیم آن دقت پایین‌تری دارد (Gonzalez *et al.*, 1999)، اما به دلیل ساده، سریع، ارزان بودن و داشتن کارایی بالا (Cocolin *et al.*, 2000)، به طور وسیعی در مطالعه‌های تاکسونومی و زیست‌شناسی جمعیت استفاده می‌شود (Avise, 1994، Kuninaga *et al.*, 1997؛ Nakamura *et al.*, 1998b؛ Ristaino *et al.*, 1998). در پژوهش حاضر نیز همسویی نسبتاً بالای نتایج روش مورد مطالعه با نتایج حاصل از توالی یابی مستقیم، گویای کارایی بالای روش PCR-RFLP ناحیه ITS برای تفکیک گونه های مختلف نمدار از یکدیگر است. تنها گونه مطالعه شده که هم بر اساس توالی یابی مستقیم و هم بر اساس روش PCR-RFLP از سایر گونه ها تفکیک نشده است، پایه اول از گونه *T. begonifolia* است. از آنجا که پدیده دو رگه‌ای شدن در جنس نمدار به ویژه گونه های با ناحیه زیستی هم جا، شایع است احتمال این که گونه اشاره شده پایه‌ای دو رگ باشد، بسیار محتمل است. چرا که گونه *T. begonifolia* هم در نواحی پراکنش گونه *T. hyrcana* و هم در نواحی پراکنش *T. rubra* حضور دارد. البته انجام مطالعه‌های کرموزومی و به کارگیری سایر روش‌های مولکولی در راستای شناسایی پایه‌های دو رگ می‌تواند راهگشا باشد.

از دیگر نتایج برجسته پژوهش حاضر، وجود جایگاه برش انحصاری در موقعیت ۲۸۳ توسط آنزیم *Hpy166II* برای گونه *T. dasystyla* است. حضور این گونه قبلاً در جنگل های شمال ایران گزارش شده است (Pigott and Francis, 1999) و به تازگی نیز Yousefzadeh و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی‌های دقیق میکروسکوپی و تهیه عکس از خامه کُرک‌دار که مشخصه اصلی این گونه است، حضور این گونه را در جنگل های شمال ایران تأیید نمودند. این پژوهش نیز نشان داد که چنانچه در مطالعه روی ناحیه ITS پایه‌های مختلف از جنس نمدار از جنگل هیرکانی، آنزیم *Hpy166II* در موقعیت ۲۸۳ دارای جایگاه برش باشد، گونه مورد نظر گونه *T. dasystyla* است. همچنین، اگرچه سایر پژوهشگران فقدان جایگاه برش توسط آنزیم *EcorI* در ناحیه ITS گیاهان گل‌دار را گزارش کرده‌اند (Jobes and Thien, 1997)، اما پژوهش حاضر حداقل در سطح گونه‌های بررسی شده از جنس نمدار اثبات نمود که آنزیم *BsrBI* نیز روی ناحیه ITS نمدارها بدون جایگاه برش است و در صورت انجام این آزمون روی تمامی گونه‌های جنس نمدار، می‌توان با اطمینان گفت که آنزیم *BsrBI* می‌تواند به عنوان یکی از گزینه‌ها جهت تأیید ناحیه ITS جنس نمدار حاصل از PCR معرفی گردد. این رهیافت به ویژه برای پژوهشگرانی که در زمینه سنگواره‌شناسی گیاهی و شناسایی ترکیب جوامع گیاهی گذشته از طریق بررسی فسیل گیاهان مطالعه می‌کنند، می‌تواند بسیار مفید باشد. از سوی دیگر، وجود الگوی باندی اختصاصی مختص به گونه در روش PCR-RFLP، می‌تواند استفاده از آن را در مطالعات تاکسونومی جنس نمدار، مورد توجه قرار دهد. بر این اساس، چنانچه محققانی قصد مطالعه روی الگوی نواری ناحیه ITS یک جنس از گیاهان جنگلی-درختی خاص را داشته باشند، در گام نخست می‌توانند با اخذ توالی گونه های نزدیک به گونه های مورد مطالعه از بانک‌های ژنی و اطمینان از تعداد

جایگاه برش، آنزیم‌های مناسب را انتخاب نمایند. سپس، با استفاده از روش PCR-RFLP به آشکارسازی چندشکلی ناحیه ITS و مطالعه روابط بین گونه‌ها بپردازند.

منابع

Avise, J. C. (1994) Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.

Blaxter, M. (2003) Molecular systematics counting angels with DNA. Nature and Resources 421: 122-124.

Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haider, N. and Savolainen, V. (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360: 1889-1895.

Chen, S. L., Yao, H., Han, J. P., Liu C., Song, J. Y., Shi, L. C., Zhu, Y. J., Ma, X. Y., Gao, T., Pang, X. H., Luo, K., Li, Y., Li, X. W., Jia, X. C., Lin, Y. L. and Leon, C. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PLoS One 5(1): e8613.

Cocolin, L., Bisson, L. F. and Mills, D. A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in ine fermentations. Fems Microbiology Letters 189(1): 81-87.

Gonzalez, M. A., Gomez, P. J. and Montoya, R. (1999) Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of *Dunaliella*. Journal of Applied Phycology 10: 573-580.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. and Dewaard, J. R. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. In: Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 270: 313-321.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. and Dewaard, J. R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 270: 596-599.

Hosseinzadeh Colagar, A., Saadati, M., Zarea, M. and Talei, S. A. (2010) Genetic variation of the Iranian Sclerotinia sclerotiorum isolates by standardizing DNA polymorphic fragments. Biotechnology (Pakistan) 9(1): 67-72.

Jobes, D. V. and Thien, L. B. (1997) A conserved motif in the 58S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. Plant Molecular Biology Reporter 15(4): 326-334.

Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. and Janzen, D. H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. In: Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102(23): 8369-8374.

Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T. and Yokosawa, R. (1997) Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in Rhizoctonia solani. Current Genetics 32: 237-243.

Marshall, E. (2005) Will DNA bar codes breathe new life into classification? Science 307:1037.

Nakamura, H., Kaneko, S., Yamaoka, Y. and Kakishima, M. (1998a) Differentiation of Melampsora rust species on willows in Japan using PCR-RFLP analysis of ITS regions of ribosomal DNA. Mycoscience 39: 105-113.

Nakamura, T., Arai, T., Takagi, M., Sawada, T., Matsuda, T., Yokota, T. and Heike, T. (1998b) A selective switch-on system for self-renewal of embryonic stem cells using chimeric cytokine receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications 248: 22-27.

Pigott, C. D. and Francis, B. (1999) The taxonomic status of *Tilia dasystyla* in Crimea, Ukraine. Edinburgh Journal of Botany 56:161-173.

Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L. and Parra, G. (1998) PCR amplification of ribosomal DNA species identification in the plant pathogen genus Phytophthora. Applied And Environmental Microbiology 64: 948-954.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. and Hebert, P. D. N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences 360: 1847-1857.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.) 315-322. Academic Press, Inc., New York.

Yousefzadeh, H. (2012) Biosystematic genus *Tilia* in northern Iran. PhD thesis, Tarbiat Modares University, Noor, Iran (in Persian).

Yousefzadeh, H., Hosseinzadeh Colagar, A., Tabari, M., Sattarian, A. and Assadi, M. (2010a) Recognition of different stomata types of *Tilia* spp. in hyrcanian forests. Taxonomy and Biosystematic 2(5): 17-28

Yousefzadeh, H., Hosseinzadeh Colagar, A., Tabari, M., Sattarian, A. and Assadi, M. (2012) Utility of the ITS region sequence and structure for molecular identification of the *Tilia* species from Hyrcanian forest, Iran. Plant Systematic and Evolution 298: 947-961

Yousefzadeh, H., Tabari, M., Hosseinzadeh Colagar, A., Assadi, M., Sattarian, A. and Zare, H. (2010b) Variation in Leaf Morphology of *Tilia* spp. of in Hyrcanian forests. Taxonomy and Biosystematic 2(3): 11-24.

Comparison of PCR-RFLP pattern with sequencing analysis of the ITS region of Hyrcanain's *Tilia*

Hamed Yousefzadeh [1]*, Hamid Bina [1] and Abasalt Hosseinzadeh Colagar [2]

[1] Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Sequencing of ITS region is one of the candidate markers as a DNA barcoding in Plants. Since sequencing technique is expensive and time consuming, we used PCR-RFLP technique and compared the result of these methods (PCR-RFLP and sequencing) to evaluate the efficiency of PCR RFLP technique in recognition of different species of *Tilia* from Hyrcanain forest. Electrophoresis pattern of ITS regions of nine species of *Tilia* were studied by eight restriction enzymes. Results indicated that the *EcoRI* and *BsrBI* did not have restriction site in the genus *Tilia*. Mantel test showed that the dendrogram derived from RFLP and cladogram indicated relatively high congruency (r=0.57). PCoA analysis recognized *T. dasystyla*, *T. hyrcana* and *T. rubra* from Hyrcanian's origin, but it could not separate *T. begonifloia* from the other hyrcanian species. In this respect, derived results were similar to sequencing one. In conclusion, with regard to less expensive and less time consuming PCR-RFLP technique and high similarity between its result with sequencing, we recommend this method as a simple and economical method with relatively high efficiency studding plant phylogeny.

Key words: Internal Transcribed Spacer (ITS), Restriction fragment length polymorphism, Restriction enzyme, Phylogeny

* h.yousefzadeh@modares.ac.ir