

Intraspecific Inversion in *psbA-trnH* Region and its Implication for DNA Barcoding: Case Study of *Capparis spinosa* L. Group

Maryam Ahmadi ¹, Hojjatollah Saeidi ^{2*}, Seyed Mansour Mirtadzadini ³

¹ Ph. D. Student of Systematic Plant, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² Associate Professor, Department of Plant and Animal Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

DNA barcoding is one of the developing methods in molecular systematics for the identification of species. *psbA-trnH* is one of the most variable noncoding regions of chloroplast genome and a standard DNA barcode for plant species. However, intraspecific inversions limited the ability of this barcode in the identification of species. The efficiency of these structural changes in the identification of *Capparis spinosa* genre, including *C. spinosa*, *C. parviflora*, *C. mucronifolia* and *C. cartilaginea*, was investigated in the present study. Twenty five sequences from 4 species of this complex and 3 other species of the genus *Capparis* was aligned. The results revealed intraspecific polymorphism in 2 regions of *psbA-trnH* (8% of whole region) in this group. Analysis of data showed that ignoring these inversions has led to overestimating intraspecific divergence, underestimating interspecific divergence, and disability of *psbA-trnH* in the identification of closely related taxa. Using reverse complementary sequence may partly overcome this problem. Based on the results of this study, it can be recommended that sampling from a wide geographic range of a species would reveal more intra-specific molecular variation and increase the efficiency of a DNA barcode.

Key words: *Capparis Spinosa*, Intraspecific Inversion, *psbA-trnH* Region.

* ho.saeidi@sci.ui.ac.ir

واژگونی درون گونه‌ای در ناحیه *psbA-trnH* و تأثیر آن در بارکدگذاری: مطالعه موردی گروه *Capparis spinosa* L.

مریم احمدی^۱، حجت اله سعیدی^{۲*}، سید منصور میر تاج الدینی^۳

^۱ دانشجوی دکتری، سیستماتیک گیاهی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ دانشیار گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۳ استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

بارکدگذاری DNA یکی از روش‌های رو به گسترش در سیستماتیک مولکولی برای شناسایی گونه‌ها است. ناحیه *psbA-trnH* یکی از متغیرترین نواحی غیر کدشونده ژنوم کلروپلاستی و بارکد DNA استاندارد برای گونه‌های گیاهی است؛ با این حال، وجود واژگونی‌های درون گونه‌ای، استفاده از این قطعه را به عنوان بارکد DNA مناسب محدود کرده است. در پژوهش حاضر، تأثیر این تغییرات ساختاری بر شناسایی گونه‌های گروه *Capparis spinosa* شامل *C. spinosa*، *C. parviflora*، *C. mucronifolia* و *C. cartilaginea*، بررسی شد. هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های این قطعه در ۲۵ نمونه، شامل ۴ گونه از این گروه و ۳ گونه دیگر از جنس *Capparis* انجام شد. نتایج حاصل نشان داد چندشکلی درون گونه‌ای در دو ناحیه از قطعه *psbA-trnH* در گروه *C. spinosa* وجود دارد و حدود ۸ درصد از طول این ناحیه را در بر گرفته است. تحلیل داده‌ها نشان داد شناسایی نکردن این واژگونی‌ها منجر به تخمین بیش از حد واگرایی درون گونه‌ای، کاهش واگرایی بین گونه‌ای و ناتوانی توالی *psbA-trnH* در شناسایی تاکسون‌های خویشاوند می‌شود و استفاده از توالی مکمل معکوس تا حدودی این مشکل را کاهش می‌دهد. براساس نتایج این پژوهش، پیشنهاد می‌شود نمونه‌برداری از دامنه جغرافیایی وسیعی ممکن است تنوعات مولکولی درون یک گونه را بهتر نمایان کند و کارآیی یک بارکد DNA را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: *Capparis spinosa*، واژگونی‌های درون گونه‌ای، *psbA-trnH*

این وارونگی‌ها و استفاده از روش‌های معمول هم‌ردیف‌سازی ممکن است منجر به تخمین بیش از حد تعداد رخداد‌های جایگزینی و ارزیابی اشتباه روابط بین تاکسون‌ها شود (Whitlock *et al.*, 2010).

C. spinosa L. متعلق به تیره Cappearaceae و بخشه *Capparis* گروه تاکسونومیک پیچیده‌ای با تنوع شایان توجه و هم‌پوشانی در صفات ریخت‌شناسی کلیدی است. چنین وضعیتی منجر به تلقی‌های تاکسونومیک متفاوت از این گروه شده است و تاکسون‌هایی که قبلاً گونه‌های مجزا شناخته می‌شدند، اکنون وارسته‌ها یا زیرگونه‌های *C. spinosa* معرفی می‌شوند (Zohary, 1960; Jacobs, 1965; Hedge and Lamond, 1970; Inocencio *et al.*, 2006; Fici, 2014; Fici, 2015).

تاکسونومیک گروه *C. spinosa* بحث‌برانگیز بوده و در مطالعات قبلی به ۱ تا ۵ گونه تقسیم شده است. دیدگاه‌های متفاوت ارائه شده درباره این گروه در ایران براساس منابع مختلف در جدول ۱ خلاصه شده است.

از آن جایی که یکی از مهم‌ترین اهداف بارکد گذاری DNA شناسایی گونه‌ها است، مطالعه حاضر پیامدهای واژگونی‌های درون گونه‌ای ناحیه بین ژنی *psbA-trnH* را در شناسایی گونه‌های گروه *C. spinosa* بررسی می‌کند.

استفاده از توالی‌های DNA اورتولوگ کوتاه است. این روش در سال‌های اولیه قرن حاضر برای گونه‌های جانوری طراحی و به کار گرفته شد (Hebert *et al.*, 2004). در جانوران توالی ژنی سیتوکروم c اکسیداز ۱ (*COI*) به‌عنوان بارکد جهانی پذیرفته شده است. در مقابل، یافتن بارکد استاندارد برای گیاهان در ابتدا موفقیت‌آمیز نبود و چنین روشی تا چند سال بعد از سوی جامعه گیاه‌شناسی پذیرفته نشد. پس از پژوهش گسترده‌ای در ژنوم‌های میتوکندریایی، کلروپلاستی و هسته‌ای، چهار ناحیه ژنی اولیه (*psbA-trnK-rbcL* و *trnH-ITS*) به‌عنوان بارکدهای استاندارد DNA در بیشتر برنامه‌های کاربردی برای گیاهان پذیرفته شدند (Kress, 2017).

ناحیه بین ژنی *psbA-trnH* یکی از متغیرترین مناطق ژنوم کلروپلاستی نهان‌دانگان است. این ناحیه شامل دو بخش متفاوت از نظر حفاظت تکاملی است: ۱. *psbA* 3'UTR (ناحیه غیر ترجمه‌شونده) و ۲. فاصله‌انداز غیر رونویسی شونده بین ژنی *psbA-trnH* این ناحیه ابزاری متداول برای مطالعات ژنتیک جمعیت و تبارشناختی در سطح گونه (Štorchová and Olson, 2007) و منبعی برای تنوع درون گونه‌ای واژگونی‌های مرتبط با تکرارهای وارونه است که امکان دارد در بارکد گذاری DNA مشکل ایجاد کند. شناسایی نکردن

جدول ۱- وضعیت تاکسونومیک گروه *C. spinosa* در ایران

تاکسون	منبع
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>aegyptia</i> (Lam.) Boiss.	
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>pubescens</i> Zoh.	Zohary (1960)
<i>C. ovata</i> Desf. var. <i>Kurdica</i> Zoh.	
<i>C. ovata</i> Desf. var. <i>palaestina</i> Zoh.	

<i>C. leucophylla</i> DC. var. <i>leucophylla</i>	
<i>C. leucophylla</i> DC. var. <i>parviflora</i> (Boiss.) Zoh.	
<i>C. mucronifolia</i> Boiss.	
<i>C. cartilaginea</i> Decne.	
<i>C. cartilaginea</i> Decne.	
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>spinosa</i>	Hedge and Lamond (1970)
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>parviflora</i> (Boiss.) Boiss.	
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>mucronifolia</i> (Boiss.) Hedge & Lamond	
<i>C. cartilaginea</i> Decne.	
<i>C. spinosa</i> L.	Saghafi khadem (2000)
<i>C. mucronifolia</i> Boiss.	
<i>C. parviflora</i> Boiss.	
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>canescens</i> Cosson	
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>leucophylla</i>	Boissier (1867)
<i>C. spinosa</i> L. var. <i>parviflora</i> (Boiss.) Boiss.	
<i>C. cartilaginea</i> Decne. (= <i>C. galeata</i>)	
<i>C. cartilaginea</i> Decne.	
<i>C. sicula</i> Veill. subsp. <i>herbacea</i> (Willd.) Inocencio, D. Rivera, Obo'n & Alcaraz	
<i>C. sicula</i> Veill. subsp. <i>leucophylla</i> (DC.) Inocencio, D. Rivera, Obo'n & Alcaraz	Inocencio et al., (2006)
<i>C. sicula</i> Veill. subsp. <i>mesopotamica</i> Inocencio, D. Rivera, Obo'n & Alcaraz	
<i>C. mucronifolia</i> Boiss. subsp. <i>mucronifolia</i>	
<i>C. parviflora</i> Boiss. subsp. <i>parviflora</i>	
<i>C. parviflora</i> subsp. <i>kurdica</i> (Zohary) Inocencio, D. Rivera, Obo'n & Alcaraz	
<i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>spinosa</i> var. <i>parviflora</i> (Boiss.) Boiss.	
<i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>spinosa</i> var. <i>canescens</i> Cosson	
<i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>spinosa</i> var. <i>aegyptia</i> (Lam.) Boiss.	Fici (2014, 2015)
<i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>spinosa</i> var. <i>mucronifolia</i> (Boiss.) Hedge & Lamond	
<i>C. spinosa</i> L. subsp. <i>cartilaginea</i> (Decne.) Maire & Weiller	

متعلق به گروه *C. spinosa* بود که در مطالعه حاضر تکثیر شدند و بقیه نمونه‌ها از گونه‌هایی که بیش از یک فرد در پایگاه داده NCBI داشتند، تهیه شدند. شناسایی

مواد و روش‌ها

۲ تا ۶ توالی از ۷ گونه *Capparis* که برای ناحیه واژگونی چندریخت بودند انتخاب شدند. ۱۹ نمونه

نمونه‌های گروه *C. spinosa* با استفاده از فلور ایران (Saghafi Khadem, 2000) صورت گرفت و نمونه‌های تکثیر شده از این گروه به ۴ گونه تعلق داشتند. اطلاعات این نمونه‌ها در جدول ۲ آورده شده است. توالی‌های پایگاه داده‌ای NCBI شامل گونه‌های *C. acutifolia* و *C. urophylla bodinieri* بود.

جدول ۲- اطلاعات مکان‌های جمع‌آوری نمونه‌های تکثیر شده گروه *C. spinosa* در مطالعه حاضر

مکان جمع‌آوری	شماره هر بار یومی	تاریخ جمع‌آوری	جمع‌آوری کننده	نمونه‌ها
فارس، شهرستان ممسنی، روستای زيردو	HUI (22139) HUI (22137)	۱۳۹۴/۱/۲۵	احمدی	<i>C. spinosa</i> 159 و <i>C. parviflora</i> 251, 255
کرمانشاه، هرسین، روستای چغاکیود	HUI (22186)	۱۳۹۴/۳/۲۱	سعیدی و احمدی	<i>C. spinosa</i> 16
آذربایجان غربی، ماکو	HUI (22176)	۱۳۹۵/۳/۱۲	سعیدی و احمدی	<i>C. spinosa</i> 211, 22
گلستان، آزادشهر، ۲ کیلومتری روستای فارسین	HUI (22181)	۱۳۹۵/۳/۳۱	فراهانی	<i>C. spinosa</i> 1
کرمان، شهر بابک	HUI (22143)	۱۳۹۴/۲/۱۱	سعیدی و احمدی	<i>C. spinosa</i> 198
بوشهر، دوراهی کازرون به برازجان	HUI (22166)	۱۳۹۴/۱/۲۷	سعیدی و احمدی	<i>C. parviflora</i> 148
کرمانشاه، پاوه به مریوان، نزدیک نودشه	HUI (22168)	۱۳۹۵/۳/۹	سعیدی و احمدی	<i>C. parviflora</i> 150, 156
سیستان و بلوچستان، راسک به ایرانشهر	HUI (22162)	۱۳۹۵/۲/۲۲	سعیدی و احمدی	<i>C. mucronifolia</i> 235
بوشهر، بندرسیراف	HUI (22155) HUI (22146)	۱۳۹۴/۲/۸	سعیدی و احمدی	<i>C. mucronifolia</i> 84, 284 و <i>C. cartilaginea</i> 329
هرمزگان، عسلویه به پارسیان، شهر پارسیان	HUI (22156) HUI (22147)	۱۳۹۴/۲/۹	سعیدی و احمدی	<i>C. cartilaginea</i> 302 و <i>C. mucronifolia</i> 98
کرمان، ۵ کیلومتری سیرجان	HUI (22158) HUI (55148)	۱۳۹۴/۲/۱۱	سعیدی و احمدی	<i>C. cartilaginea</i> 3414 و <i>C. mucronifolia</i> 341

استخراج DNA

DNA ژنومی، از جوان‌ترین برگ‌های خشک (۱ گرم) با روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987; Cullings, 1992) و با تغییرات جزئی استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰.۸ درصد (w / v) اندازه‌گیری شد. DNA استخراج شده تا ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقیق و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ناحیه *psbA-trnH* در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

استخراج DNA ژنومی، از جوان‌ترین برگ‌های خشک (۱ گرم) با روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987; Cullings, 1992) و با تغییرات جزئی استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰.۸ درصد

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای استفاده‌شده برای گروه *C. spinosa* در مطالعه حاضر

منبع	آغازگر برگشت	آغازگر رفت	ناحیه
Sang <i>et al.</i> , 1997	trnHR (CGCGCATGGTGATTACAAAATC)	psbAF (GTTATGCATGAACGTAATGCTC)	<i>psbA-trnH</i>

هم‌ردیف‌سازی

ابتدا با نرم‌افزارهای MAFFT v7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) و ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007) هم‌ردیف‌سازی انجام شد. امکان حضور واژگونی‌های درون‌گونه‌ای در ناحیه *psbA-trnH* با مقایسه توالی‌های هم‌ردیف‌سازی‌شده، به صورت چشمی بررسی شد. مقایسه این توالی‌ها وجود واژگونی‌های درون‌گونه‌ای را در این ناحیه نشان داد. برای شناخت آثار این واژگونی‌ها بر بارکدگذاری DNA، توالی‌های هم‌ردیف‌سازی‌شده روی دو ماتریس بررسی شدند: ۱. ماتریس توالی خام (حاوی دو شکل متفاوت ناحیه واژگون‌شده) و ۲. ماتریس همسان (دارای یک شکل از ناحیه واژگون‌شده). در ماتریس همسان برای به حداکثر رساندن همسانی توالی‌ها، یک شکل از ناحیه واژگون‌شده با توالی مکمل معکوس آن جایگزین شد و تفاوت موجود به صورت صفت دو حالت منفردی کدگذاری شد؛ یعنی یک حالت واژگونی به عنوان مبنا یا حالت نرمال و حالت دیگر به عنوان حالت واژگون‌شده در نظر گرفته شد و برای توالی‌های نرمال یک نوکلئوتید (برای مثال یک "A") و برای توالی‌های واژگون‌شده یک فاصله (-) در انتهای توالی افزوده شد (Whitlock *et al.*, 2010; personal Simeone, 2018). (communication;)

تحلیل داده‌ها

تعداد جایگاه‌های متغیر، حداکثر فاصله

درون‌گونه‌ای و حداقل فاصله بین گونه‌ای (uncorrected p-distance) برای گونه‌هایی که در ناحیه واژگونی چندشکل بودند، با نرم افزار MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) محاسبه شد. در هر دو ماتریس خام و ماتریس یکسان حداقل فاصله بین گونه‌ای با مقایسه توالی‌های گونه مد نظر نسبت به سایر گونه‌ها محاسبه شد؛ همچنین درخت Neighbor-Joining (NJ) ماتریس خام و ماتریس یکسان برای نشان دادن روابط میان افراد و گونه‌ها با نرم افزار MEGA 6.0 ترسیم شد.

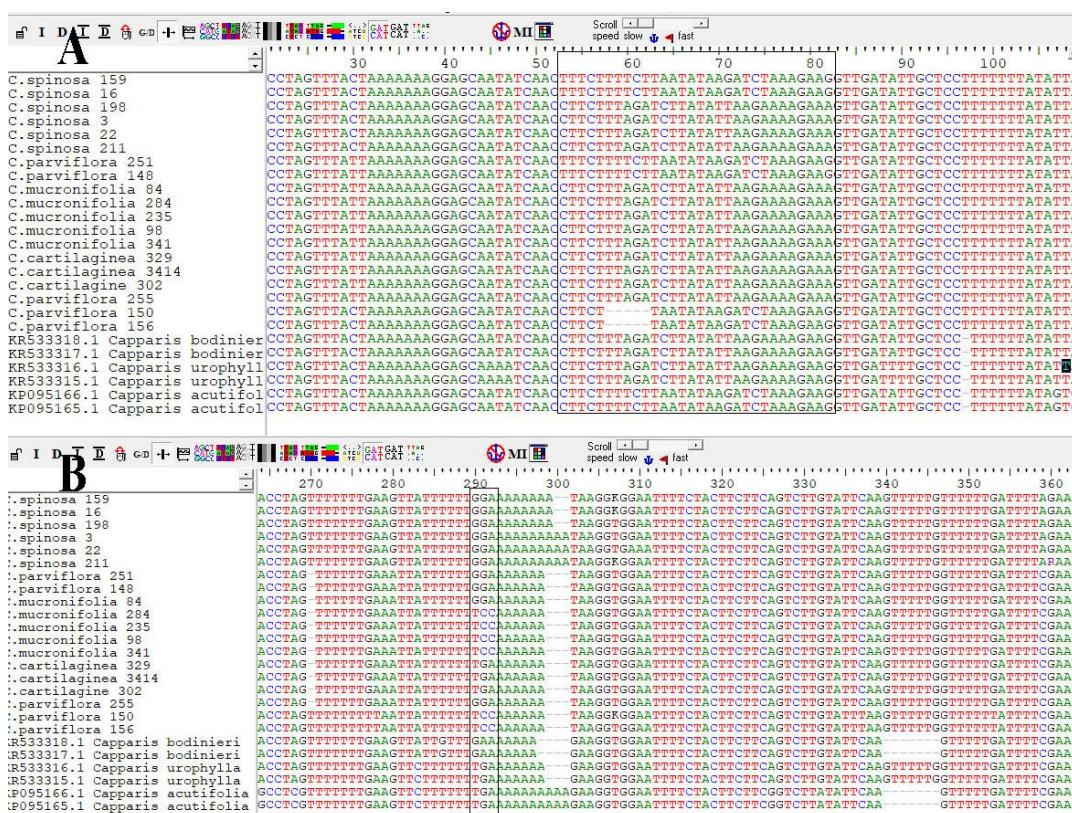
نتایج

ناحیه *psbA-trnH* برای همه تاکسون‌های موجود در مطالعه حاضر با موفقیت توالی‌یابی شد. طول توالی‌ها برای نمونه‌های گروه *C. spinosa* از ۴۷۱ تا ۴۸۳ جفت باز و برای نمونه‌های جنس *Capparis* موجود در پایگاه داده NCBI از ۳۷۹ تا ۴۲۳ جفت باز متغیر بود. دو ناحیه واژگون‌شده به طول ۳۰ و ۳ جفت باز در قطعه *psbA-trnH* وجود داشت؛ همچنین در دو فرد از گونه *C. parviflora* حذف کوچکی در ناحیه واژگونی ۳۰ جفت بازی دیده شد (شکل ۱ و جدول ۴).

از ۲۵ نمونه موجود در ماتریس خام، ۸ نمونه، واژگونی ۳۰ جفت بازی و ۱۷ نمونه، توالی مکمل معکوس آن را داشتند؛ همچنین ۶ نمونه، واژگونی ۳ جفت بازی و بقیه نمونه‌ها توالی مکمل معکوس آن را داشتند. برای همسان‌سازی توالی‌ها، در هر مورد یک شکل واژگونی به طور دلخواه انتخاب و با توالی مکمل

معکوس آن جایگزین شد. ماتریس توالی خام برای هر سه گونه بزرگ‌تر از ماتریس یکسان بود. تعداد جایگاه‌های متغیر در ماتریس داده‌های خام ۶۰ (۱۴,۵ درصد کل طول ناحیه *psbA-trnH*) و تعداد جایگاه‌های متغیر درون گونه ۳ تا ۲۵ بود. زمانی که یک شکل واژگونی با توالی مکمل معکوس جایگزین شد این اعداد به ترتیب به ۴۸ (۱۱,۶ درصد) و ۰ تا ۱۱ کاهش یافت (جدول ۴).

از ۷ گونه مطالعه‌شده، سه گونه واگرایی‌های درون‌گونه‌ای نشان دادند. در حالی که افراد گونه *C. spinosa* و *C. mucronifolia* تنها یک نوع واژگونی درون‌گونه‌ای، به ترتیب ۳۰ و ۳ جفت باز، را نشان دادند. در توالی‌های گونه *C. parviflora* هر دو نوع واژگونی دیده شد. واگرایی میان توالی‌های هم‌گونه در



شکل ۱- نواحی واژگونی‌ها در ناحیه *psbA-trnH*. A. واژگونی ۳۰ جفت بازی؛ B. واژگونی ۳ جفت بازی

جدول ۴- مشخصات توالی‌های هم‌گونه *psbA-trnH* برای گونه‌هایی که چندشکلی ناحیه واژگونی را نشان دادند.

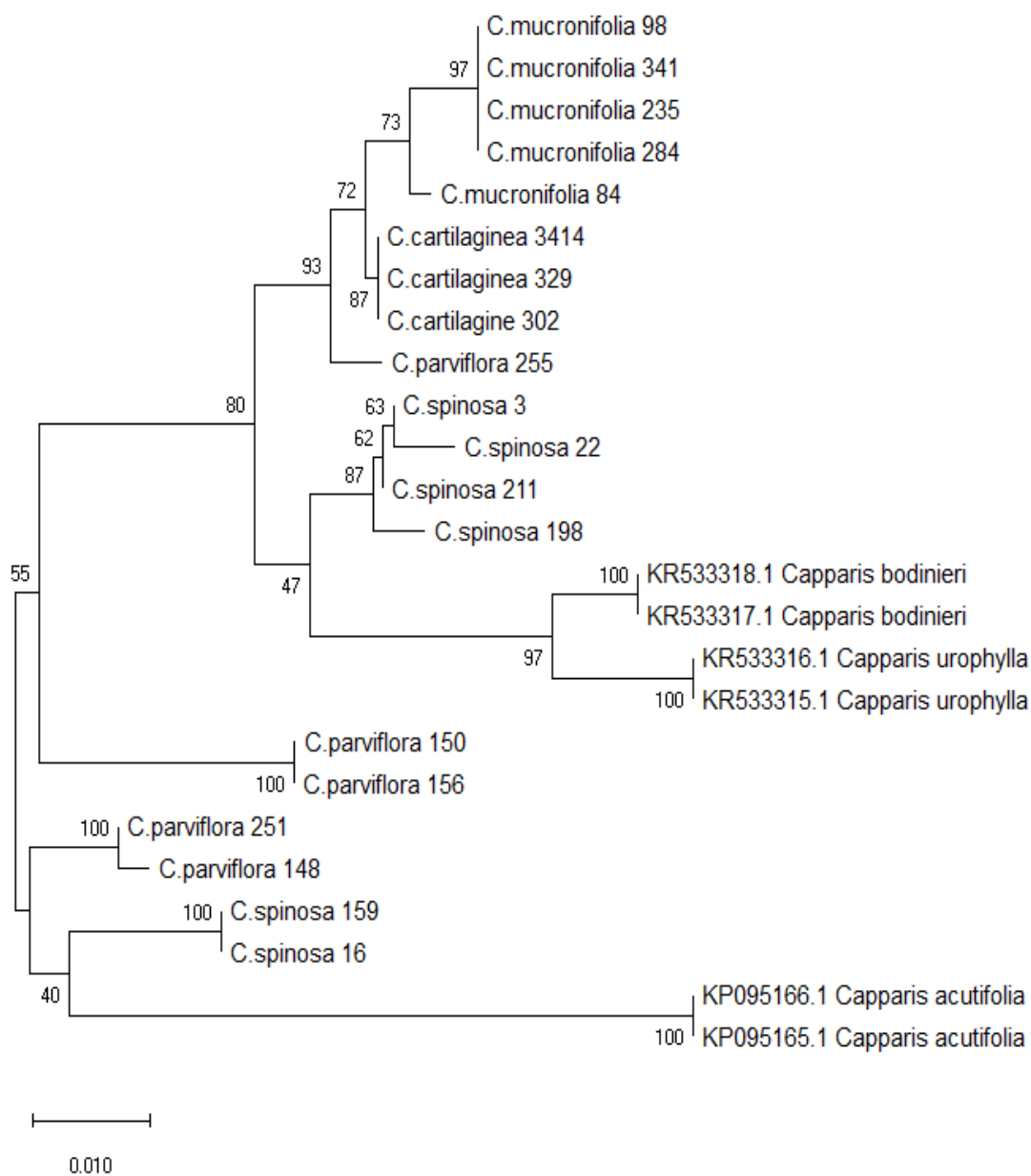
تاکسون	ماتریس اصلاح‌شده		ماتریس خام	
	حداقل فاصله	حداکثر فاصله	حداقل فاصله	حداکثر فاصله
	بین گونه‌ای	درون گونه‌ای	بین گونه‌ای	درون گونه‌ای
	متغیر	متغیر	جایگاه‌های متغیر	جایگاه‌های متغیر
<i>C. spinosa</i>	۰,۰۱۰۶۳۸۲۹۷۹	۴(۰,۹۶)	۰,۰۴۲۵۳۳۱۹۱۵	۱۶(۳,۸۶)
	۰,۰۱۳۶۹۹	۰,۰۱۶۴۳۸	۴۸۱-۴۷۱	

<i>C. parviflora</i>	۴۷۸-۴۶۴	۲۵(۰.۶,۰.۳)	۰,۰۵۵۲۴۸۶۱۸۸	۰,۰۰۷۸۷۴	۱۱(۰.۲,۰.۶۵)	۰,۰۲۷۵۴۸۲۰۹۴	۰,۰۰۵۲۴۹
<i>C. mucronifolia</i>	۴۷۷-۴۷۱	۳(۰.۰,۰.۷۲)	۰,۰۰۷۸۵۳۴۰۳۱	۰,۰۰۷۸۵۳۴۰۳	.	.	۰,۰۰۷۸۵۳۴۰۳

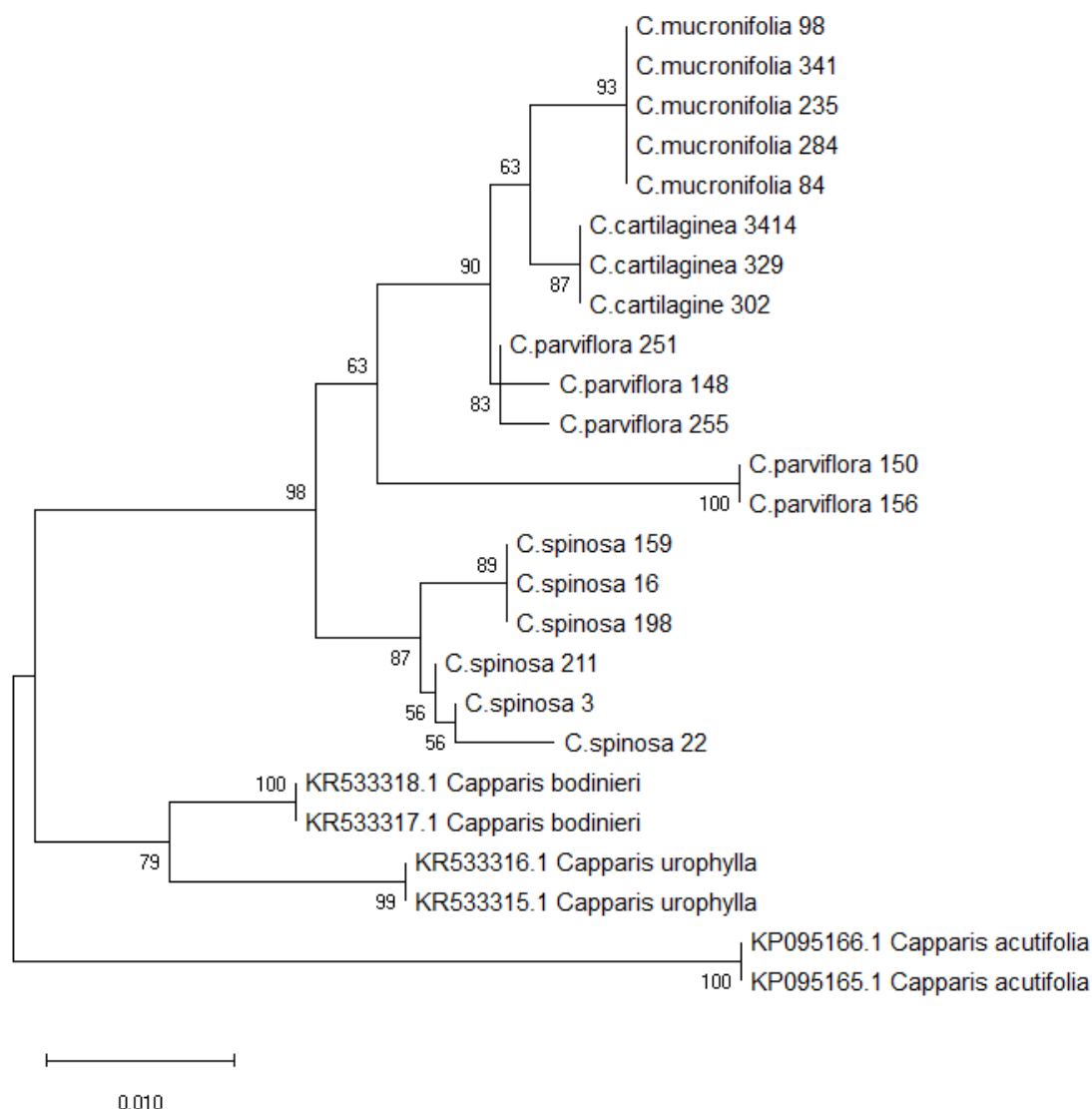
متفاوتی بین افراد و گونه‌ها در ماتریس توالی خام و ماتریس همسان شد. در درخت NJ حاصل از ماتریس خام (شکل ۲)، توالی‌های هم گونه *C. parviflora* و *C. spinosa* که برای ناحیه واژگونی چندشکل بودند، با یکدیگر گروه‌بندی نشدند. سه توالی گونه *C. spinosa* از ماکو و آزادشهر به گونه‌های *C. bodinieri* و *C. urophylla* نزدیک‌تر بودند و سایر توالی‌ها خویشاوندی نزدیکی با *C. acutifolia* نشان دادند. یکی از چهار توالی *C. parviflora* از جنوب ایران با افراد گونه‌های *C. mucronifolia* و *C. cartilaginea* گروه‌بندی شد و دو توالی دیگر جمع‌آوری شده از جنوب به توالی‌هایی از گونه *C. spinosa* و *C. acutifolia* نزدیک بودند؛ همچنین دو فرد *C. parviflora* از غرب یک کلاذ مجزا با حمایت بوت‌استراپ بالا را تشکیل دادند.

در درخت NJ ماتریس توالی همسان همه افراد گروه *Capparis*، در یک کلاذ مجزا با حمایت بالا قرار گرفتند. افراد هم گونه با یکدیگر گروه‌بندی شدند یا روابط خویشاوندی نزدیکی نشان دادند که با تنوعات ریخت‌شناسی و پراکنش جغرافیایی این گونه‌ها هم‌خوانی داشت (شکل ۳).

در ماتریس توالی خام حداکثر فاصله درون گونه‌ای (uncorrected p-distance) در ۲ گونه از ۳ گونه دارای واژگونی درون گونه‌ای (*C. spinosa* و *C. parviflora*)، حداکثر فاصله درون گونه‌ای بزرگ‌تر از حداقل فاصله میان گونه‌ای بود. در گونه *C. mucronifolia* به دلیل آنکه تنها واجد واژگونی ۳ جفت بازی بود، چنین وضعیتی مشاهده نشد. در برخی موارد حداکثر فاصله درون گونه‌ای، بین توالی‌های با ناحیه واژگون متفاوت و حداقل فاصله میان گونه‌ای، بین توالی‌های با واژگونی مشابه رخ داد. فاصله بین یک فرد از گونه *C. parviflora* (255) *C. parviflora* جمع‌آوری شده از منطقه زيردو از سایر افراد این گونه از مناطق زيردو و کازرون بزرگ‌تر از فاصله همین فرد از افراد گونه *C. spinosa* جمع‌آوری شده از ماکو و آزادشهر بود. نزدیکی بیشتر افراد گونه *C. spinosa* از آزادشهر و ماکو به گونه *Capparis bodinieri* نسبت به سایر افراد گونه اول نیز مشاهده شد. در حالی که جایگزینی ناحیه واژگون شده با توالی مکمل معکوس در ماتریس توالی یکسان منجر به فاصله درون گونه‌ای کمتر از فاصله بین گونه‌ای شد (جدول ۳). تحلیل داده‌ها در روش درخت مبنا منجر به روابط



شکل ۲- درخت NJ حاصل از ماتریس خام (حاوی دو شکل متفاوت ناحیه واژگون شده) ناحیه *psbA-trnH* با نرم افزار MEGA 6.0 و به روش Uncorrected p-distance. اعداد روی شاخه ها مقادیر بوت استراپ را نشان می دهد.



شکل ۳- درخت NJ حاصل از ماتریس همسان (حاوی یک شکل متفاوت ناحیه واژگون‌شده) ناحیه *psbA-trnH* با نرم‌افزار MEGA 6.0 و به روش uncorrected p-distance. اعداد روی شاخه‌ها مقادیر بوت‌استرپ را نشان می‌دهد.

بحث

مختلف گزارش شده‌اند که نشان می‌دهد فرآیند واژگونی، حالتی معمول در تکامل این نواحی است (Kelchner and Wendel, 1996).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد چندشکلی درون‌گونه‌ای بین جایگاه‌های نوکلئوتیدی ۵۳ و ۸۲ از یک سو و بین جایگاه‌های نوکلئوتیدی ۲۹۰ و ۲۹۲ از سوی دیگر در قطعه *psbA-trnH* گروه *C. spinosa* وجود دارد. هر کدام از این نواحی شامل یک

نواحی غیر کدشونده DNA نسبتاً سریع تکامل می‌یابند، بنابراین برای مطالعات تبارشناختی در سطوح تاکسونومیک پایین مرسوم هستند. نواحی بین ژنی (IGS) در ژنوم کلروپلاستی اغلب برای چنین مطالعاتی استفاده می‌شوند (Spooner, 2009). واژگونی‌های کوچک (۴ تا ۵۰ جفت باز) نواحی غیر کدشونده کلروپلاستی در مطالعات تبارشناختی گونه‌های گیاهی

(Case, 2000; Colchicaceae و Oleaceae, Poaceae Graham *et al.*, 2000; Kim and Lee, 2005; Whitlock *et al.*, 2010; Degtjareva *et al.*, 2012; Bieniek *et al.*, 2015) نیز گزارش شده است. Whitlock و همکاران (۲۰۱۰) برای نخستین بار تأثیر این واژگونی‌ها را بر بارکدگذاری و شناسایی نمونه‌های گیاهی بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد واژگونی‌های درون‌گونه‌ای ممکن است به تخمین بیش از حد واگرایی میان توالی‌های هم‌گونه، شناسایی اشتباه و تخمین اشتباه روابط میان گونه‌های خویشاوند منجر شود. برخی از پژوهشگران توالی‌هایی واجد واژگونی را به این دلیل که چندبار در طول تکامل رخ داده‌اند از تحلیل‌های تبارشناختی حذف می‌کنند (Sang *et al.*, 1997; Degtjareva *et al.*, 2012; Bieniek *et al.*, 2015)؛ با این حال، این واژگونی‌ها ممکن است اطلاعات ارزشمندی از روابط میان جمعیت‌ها و شواهدی برای گونه‌های پنهان فراهم کنند (Whitlock *et al.*, 2010)؛ برای مثال، دوفرد از گونه *C. parviflora* از غرب ایران با داشتن یک حذف در ناحیه واژگونی ۳۰ جفت بازی و شکل واژگونی متفاوت ۳ جفت بازی نسبت به نمونه‌های جنوب ایران، همچنین با ۴ جایگزینی و یک ایندل ۷ جفت بازی منحصر به فرد نشان می‌دهد حذف این واژگونی‌ها ممکن است به از بین رفتن اطلاعات ارزشمندی درباره روابط جغرافیایی میان جمعیت‌های مطالعه‌شده این گونه منجر شود؛ به همین دلیل پیشنهاد شده است توالی‌های واژگون‌شده، با توالی مکمل معکوس آن جایگزین شود و ناحیه واژگون به صورت صفتی دوحالتی کدگذاری شود (Whitlock *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2012).

جفت تکرارهای وارونه ۳۰ و ۳ جفت بازی هستند. محاسبه تعداد نوکلئوتیدها در نواحی واژگونی نسبت به طول کل توالی هم‌ردیف‌سازی شده نشان داد که این واژگونی‌ها بخش نسبتاً بزرگی (۸ درصد) از این ناحیه را تشکیل می‌دهند. بنابراین، شناسایی نکردن و هم‌ردیف‌سازی ساده آنها منجر به ناتوانی بارکدگذاری DNA در شناسایی گونه‌های نزدیک، تخمین بیش از حد میزان واگرایی‌های درون‌گونه‌ای در گونه‌هایی با اشکال واژگونی متفاوت و کاهش واگرایی بین گونه‌ای در گونه‌هایی با شکل واژگونی مشابه شد (شکل ۱ و ۲، جدول ۴). در تحلیل‌های ما، توالی‌های *C. spinosa* با داشتن شکل‌های واژگونی متفاوت در ناحیه ۳۰ جفت بازی، ۱۳ جایگاه نوکلئوتیدی متفاوت، غیر از نواحی حذف و اضافه، داشتند که ۱۲ جایگاه در ناحیه واژگونی قرار می‌گرفت. این در حالی است که گونه *C. cartilaginea* و توالی‌های *C. spinosa* از ماکو، آزادشهر و شهر بابک با شکل واژگونی مشابه، تنها در ۵ جایگاه نوکلئوتیدی متفاوت بودند که تقریباً تمام جایگاه‌ها خارج از نواحی واژگون‌شده قرار داشتند. بنابراین، گونه‌های خویشاوند با شکل واژگونی مشابه نزدیکی بیشتری نسبت به توالی‌های هم‌گونه با اشکال واژگونی متفاوت نشان دادند.

واژگونی‌های درون‌گونه‌ای ناحیه *trnH-psbA* در خانواده Capparaceae برای نخستین بار گزارش می‌شود؛ اما در سایر نواحی غیر کدشونده کلروپلاستی از جمله *atpB-rbcL* و *rpl16* (Kelchner and Ohsako and Wendel, 1996) *trnK* intron، *trnL-trnF* (Ohnishi, 2000) *ndhB* intron و (Graham *et al.*, 2000) و خانواده‌های مختلف گیاهی از جمله Gentianaceae, Apiaceae, Alismataceae،

باوجود آنکه از بارکدگذاری DNA به‌عنوان روشی ساده برای شناسایی گونه‌ها نام برده می‌شود، تجربه پژوهشگر و شناخت تغییرات ساختاری مانع از شناسایی اشتباه نمونه‌های گیاهی می‌شود و سوم، واژگونی درون‌گونه‌ای موجب محدودیت کاربرد فاصله‌انداز *psbA-trnH* به‌عنوان بارکد DNA مناسب در جنس *Capparis* محدود می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان صمیمانه از معاونت پژوهشی، مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان برای حمایت مالی از پژوهش حاضر قدردانی می‌کنند.

نتایج تحلیل‌های ما نشان داد جایگزینی این واژگونی‌ها با توالی‌های مکمل معکوس سبب ایجاد درخت رضایت‌بخش‌تری از روابط بین گونه‌ها، روابط افراد درون‌گونه‌ها و پراکندگی جغرافیایی تاکسون‌ها شد (شکل ۳ و جدول ۴).

جمع‌بندی

مطالعه حاضر اهمیت چند موضوع را نشان می‌دهد؛ نخست، لزوم نمونه‌برداری وسیع از محدوده پراکندگی جغرافیایی تاکسون‌ها؛ زیرا افزایش نمونه‌برداری درون‌گونه‌ای ممکن است تنوعات پنهان درون‌گونه‌ها و مثال‌های بیشتری از تغییرات ساختاری در نواحی غیرکدشونده کلروپلاستی را آشکار سازد؛ دوم،

منابع

- Saghafi Khadem, F. (2000) Flora of Iran. Capparaceae. Number 30. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran (in Persian).
- Boissier, E. (1867) Flora Orientalis sive enumeratio plantarum in Oriente a Graecia et Aegypto ad Indiae fines hucusque observatarum. Vol. 1, H. Georg, Basel, Genève.
- Bieniek, W., Mizianty, M. and Szklarczyk, M. (2015) Sequence variation at the three chloroplast loci (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*) in the Triticeae tribe (Poaceae): comments on the relationships and utility in DNA barcoding of selected species. *Plant Systematics and Evolution* 301(4): 1275-1286.
- Case, A. (2000) Evolution of combined versus separate sexes in *Wurmbea* (Colchicaceae). PhD thesis, University of Toronto, Toronto, Canada.
- Costion, C., Ford, A., Cross, H., Crayn, D., Harrington, M. and Lowe, A. (2011) Plant DNA barcodes can accurately estimate species richness in poorly known floras. *PLoS One* 6(11): e26841.
- Cullings, K. W. (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1(4): 233-240.
- Degtjareva, G. V., Logacheva, M. D., Samigullin, T. H., Terentjeva, E. I. and Valiejo-Roman, C. M. (2012) Organization of chloroplast *psbA-trnH* intergenic spacer in dicotyledonous angiosperms of the family Umbelliferae. *Biochemistry (Moscow)* 77(9): 1056-1064.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1987) A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Fici, S. (2015) A taxonomic revision of the *Capparis spinosa* group (Capparaceae) from eastern Africa to Oceania. *Phytotaxa* 203(1): 024-036.
- Fici, S. (2014) A taxonomic revision of the *Capparis spinosa* group (Capparaceae) from the Mediterranean to Central Asia. *Phytotaxa* 174 (1): 001-024.

- Graham, S. W., Reeves, P. A., Burns, A. C. and Olmstead, R. G. (2000) Microstructural changes in noncoding chloroplast DNA: interpretation, evolution, and utility of indels and inversions in basal angiosperm phylogenetic inference. *International Journal of Plant Sciences* 161(S6): S83-S96.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. and Francis, C. M. (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: e312.
- Hedge, I. C. and Lamond J. (1970) Capparidaceae. In: *Flora Iranica* (Ed. Rechinger, K. H.) 68: 1-9.
- Inocencio, C., Rivera, D., Obón, M. C., Alcaraz, F. and Barreña, J. A. (2006) A systematic revision of *Capparis* section *Capparis* (Capparaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1: 122-149.
- Jacobs, M. (1965) The genus *Capparis* (Capparaceae) from the Indus to the Pacific. *Blumea* 12(3): 385-541.
- Kelchner, S. A., and Wendel, J. F. (1996). Hairpins create minute inversions in non-coding regions of chloroplast DNA. *Current genetics* 30(3): 259-262.
- Kim K. J., Lee H. L. (2005) Widespread occurrence of small inversions in the chloroplast genomes of land plants. *Molecules and Cells* 19: 104–113.
- Kress, W. J. (2017) Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution* 55(4): 291-307.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Ohsako, T., and Ohnishi, O. (2000) Intra- and interspecific phylogeny of wild *Fagopyrum* (Polygonaceae) species based on nucleotide sequences of noncoding regions in chloroplast DNA. *American Journal of Botany* 87(4): 573-582.
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., Cherny, S. S. and Chen, S. (2012) Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 7(11): e48833.
- Štorchová, H., and Olson, M. S. (2007) The architecture of the chloroplast psbA-trnH non-coding region in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 268(1-4): 235-256.
- Sang, T., Crawford D. J. and Stuessy, T. F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84(8): 1120-1136.
- Spooner, D. M. (2009) DNA barcoding will frequently fail in complicated groups: an example in wild potatoes. *American journal of botany* 96(6): 1177-1189.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30(12): 2725-2729.
- Whitlock, B. A., Hale, A. M. and Groff, P. A. (2010) Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PloS one* 5(7): e11533.
- Zohary, M. (1960) The species of *Capparis* in the Mediterranean and the Near Eastern countries. *Bulletin of the Research Council of Israel* 8D: 49–64.