مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۲۳ شماره ۱ صفحه های ۱ تا ۱۲ (۱۴۰۱)
مقاله پژوهشی

مقایسه کارایی دو نشانگر کلروپلاستی (*psbA-trnH* و *trnL-F*) در تعیین روابط تبارزایی بین گونه‌های پلاخور (*Lonicera* spp.) در ایران[1]

Comparison of the Efficacy of Two Chloroplast DNA Marker (*psbA-trnH* and *trnL-F*) in Determining the Phylogenetic Relationships among Honeysuckle (*Lonicera* spp.) Species in Iran

نجمه فتاحی دهکردی، مسعود قاسمی قهساره*، بهروز شیران، مجید صیامپور[2]

چکیده

جنس *Lonicera* از تیره Caprifoliaceae، در زبان فارسی به نام‌های پلاخور، شونگ و یا پیچ امین‌الدوله (Honeysuckle) خوانده می‌شود. شناخت روابط بین گونه‌ای بر اساس روش‌های سنتی مانند ویژگی‌های ریخت‌شناسانه و ترکیب‌های شیمیایی گاهی نتایج متناقضی داشته‌اند. در مطالعه حاضر، به‌منظور بررسی کارایی رمزینه‌های DNA در تعیین روابط تبارزایی بین ۱۲ گونه از جنس *Lonicera* زیر کشت در مناطق مختلف ایران از رمزینه‌های DNA کلروپلاستی (*psbA-trnH* و *trnL-F*) استفاده شد. محتوای DNA ژنومی با استفاده از کیت‌های موجود استخراج و به‌منظور تکثیر دو ناحیه مورد نظر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام شد و در نهایت نمونه‌های خالص‌سازی شده توالی‌یابی گردیدند. نتایج نشان دادند که طول منطقه *psbA-trnH* و *trnL-F* به‌ترتیب در حدود ۴۳۵-۴۲۰ و ۹۵۰-۹۴۰ نوکلئوتید است. واکاوی پارسیمونی ناحیه *psbA-trnH* و *trnL-F* به‌ترتیب ۳۸۲ و ۸۸۶ جایگاه حفاظت شده، ۵۵ و ۷۱ جایگاه متغیر و ۱۵ و ۱۶ جایگاه پارسیمون را نشان دادند. در درخت تبارزایی ایجاد شده با ناحیه *psbA-trnH*، بیشترگونه‌ها به جز *L. korolkovii* و در ناحیه *trnL-F*، دو گونه *L. korolkovii* و *L. maackii* به خوبی از یکدیگر متمایز شده و در شاخه‌های متفاوت قرار گرفتند. تنوع و فاصله ژنتیکی (۰/۰۰ تا ۰/۲۰۹) بین گونه‌ها در ناحیه *psbA-trnH* بیشتر از فاصله ژنتیکی (۰/۰۰ تا ۰/۰۲۷) ناحیه *trnL-F* بود. بنابراین، ناحیه *psbA-trnH* با توجه به تنوع و تکثیر آسان، رمزینه مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های پلاخور است.

واژه‌های کلیدی: نواحی رمزینه، فیلوژنی، نشانگر مولکولی، امین‌الدوله.

مقدمه

جنس *Lonicera* شامل گیاهان پیچنده یا درختچه‌ای و بومی نیمکره شمالی هستند. حدود ۱۸۰ گونه دارد که ۱۰۰ گونه آن در چین و ۲۰ گونه آن در اروپا، هندوستان و آمریکای شمالی وجود دارد. چندین گونه از آن نیز به‌طور طبیعی در ایران رشد می‌کنند. گونه‌هایی از آن بالارونده‌های مقاوم هستند که به نام پیچ امین‌الدوله خوانده می‌شوند (۱۰). بیشتر آن‌ها خزان‌دار، اما برخی گونه‌ها، همیشه سبز هستند. گل‌ها لوله‌ای و دارای یک محور تقارن بوده و شهد خوراکی شیرین تولید می‌کنند. میوه آن سته گرد بوده و در رنگ‌های قرمز، آبی و یا سیاه دیده می‌شود و هر سته حاوی چندین بذر است. گونه‌های مختلف با بذر، قلمه و افکندن افزایش می‌یابند، اما روش رایج ریشه‌دار کردن قلمه یا افکندن است (۱۵).گونه‌های مختلف آن به خاطر توان پوشاندن دیوارها، تولید گل‌های فراوان در تابستان و گل‌های بسیار معطر در برخی از آن‌ها، در فضای سبز اهمیت دارند (۱۰، ۱۷). بسیاری

۱- تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۳

۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، استاد گروه بیوتکنولوژی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (mghasemi1352@gmail.com).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

از گونه‌های این جنس دارای ارزش قابل توجهی از نظر پزشکی هستند. در چین از آن به عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شود و گفته شده که دارای ویژگی‌های زیستی و دارویی مانند ویژگی‌های ضد باکتریایی، ضد التهاب، ضد سرطان، آنتی اکسیدانی و محافظت کنندگی کبد است (۶). شناخت روابط بین گونه‌ای بر اساس روش‌های سنتی مانند ویژگی‌های ریخت‌شناسانه و ترکیب‌های شیمیایی گاهی نتایج متناقضی داشته‌اند، زیرا شرایط محیطی، مراحل مختلف رشدی، شرایط آزمایش، زمان نمونه‌گیری و فاکتورهای مختلف دیگر اثر گذار می‌باشند. این تفاوت‌های ریخت‌شناسانه بین نمونه‌های گیاهی می‌تواند سبب نتیجه‌گیری اشتباه در مطالعه‌های طبقه‌بندی گیاهان شود. از این رو استفاده از روش‌های مولکولی و یا زیست‌شیمیایی اگرچه با افزایش هزینه همراه است، اما با توجه به دقت بالا در تمایز گونه‌ها از یکدیگر، امروزه کاربرد فراوانی در رده‌بندی گیاهی دارد (۲۵). استفاده از رمزینه کردن DNA[1]یک مفهوم تازه با هدف دستیابی سریع و دقیق برای شناسایی گونه‌ها با به کارگیری منطقه استانداردی از DNA به عنوان یک نشانگر می‌باشد. جهت بررسی روابط فیلوژنی استفاده از روش رمزینه‌کردن DNA، روز به روز در حال افزایش است و چند سالی است که مورد توجه قرار گرفته است (۱۲، ۲۰). در واقع، با دسته‌بندی توالی‌ها و مقایسه آن‌ها با استفاده از روش‌های آماری و بیوانفورماتیک، درخت‌های تبارزایی[2] ترسیم و روابط خویشاوندی موجودات زنده تعیین می‌شود. برای این منظور از DNA ژنومی، میتوکندری و چندین ناحیه از ژنوم کلروپلاستی و غیره استفاده می‌گردد (۱). DNA کلروپلاستی به دلیل حفاظت شدگی بالا، نوترکیبی اندک و جانشینی اندک نوکلئوتیدی، از جمله نشانگرهایی است که برای جنس‌های مختلف گیاهی به عنوان رمزینه DNA مورد استفاده قرار گرفته است (۹، ۱۴). از جمله توالی‌های کلروپلاستی مورد استفاده گسترده در مطالعه‌های فیلوژنتیک، توالی فاصله‌انداز درون ژنی *trnL-F* و ناحیه بین ژنی *psb*A-*trn*H است که در سطوح درون گونه‌ای و در سطح جنس برای گیاهان مطرح می‌گردند (۹، ۲۶، ۴). مناطق غیر رمزشونده نسبت به مناطق رمزکننده پروتئین‌ها کمتر مورد توجه و اهمیت در انتخاب طبیعی هستند. از این رو، بیشتر برای مطالعه تاریخ تکاملی و بررسی روابط تبارزایی مورد استفاده هستند. بنابراین در علم رده‌بندی استفاده ترکیبی از توالی‌یابی DNA و ویژگی‌های ریخت‌شناسانه، سرعت طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌ها را در سطح جهانی افزایش داده است (۸، ۱۱). در پژوهشی Theis و همکاران (۳۰) به منظور بررسی واکاوی تبارزایی *Lonicera* و Caprifolieae از توالی‌یابی ناحیه ITS ریبوزومی و پنج ناحیه کلروپلاستی (*rpo*B-*trn*C, *atp*B-*rbc*L, *trn*S-*trn*G, *pet*N-*psb*M, *psb*M-*trn*D) استفاده نمودند. نتایج حاصل، موفق به ساخت تاریخ تکاملی و ارزیابی طبقه‌بندی *Lonicera* و Caprifolieae شدند. همچنین Peng و همکاران (۱۹) با استفاده از ناحیه ITS و RFLP توانستند *Lonicera japonica* را از گونه‌های نزدیک به آن متمایز کنند. در مطالعه‌ای که توسط Sun و همکاران (۲۵) با استفاده از نواحی *rbcL*، *matK*، *psbA-trnH*، ITS2، ITS1، *trnL intron* و *trnL-F* در ۴۴ نمونه از *Lonicera japonica* انجام شد، نشان دادند که اندازه ناحیه بین ژنی *psbA-trnH* برابر ۳۵۷-۳۳۲ جفت باز بود. بنابراین، این ناحیه به آسانی توسط جفت آغازگرهای عمومی تکثیر می‌یابد و یک رمزینه مناسب جهت تمایز *Lonicera japonica* ازگونه‌های نزدیک می‌باشد.

از آنجا که بر اساس اطلاعات ما گزارشی مبنی بر بررسی گونه‌های جنس *Lonicera* زیر کشت در ایران با استفاده از نشانگرهای کلرپلاستی شامل *psbA-trnH* و *trnL-F* در دست نبود، این پژوهش به منظور ارزیابی گونه‌های پلاخور موجود در ایران و بررسی کارایی این دو ناحیه ژنومی DNA یا رمزینه در تعیین روابط تبارزایی آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری مواد گیاهی، تشخیص و گروه‌بندی

در این پژوهش ۱۲ گونه از جنس *Lonicera* (جدول ۱) از رویشگاه‌های طبیعی و یا کشت شده کشور واقع در استان‌های اصفهان، اردبیل، چهارمحال و بختیاری و گیلان و از کلکسیون مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در زمان جمع‌آوری کدگذاری و بر اساس منابع گیاه‌شناسی و ویژگی‌های ریخت‌شناسانه آن‌ها نام‌گذاری شدند. سپس از هر نمونه چندین برگ جوان جدا و پس از شستشو و حذف رطوبت سطحی در ورق آلومینیومی پیچیده و کدگذاری شده و درون نیتروژن مایع، منجمد و سپس برای استفاده در مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۱- DNA barcoding ۲- Phylogenetic

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

جدول ۱- گونه‌ها، مناطق جمع‌آوری و کد شناسایی گونه‌های *Lonicera* استفاده شده در پژوهش حاضر.

Table 1. Species, collecting areas and identification code of *Lonicera* species used in the present research.

کد نمونه Sample code	گونه Species	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude	استان Province	محل جمع‌آوری Collection areas
1	*L. floribunda*	37°,61′,04″	48°,82′,00″	گیلان Gilan	حوزه لومیر Hoze Lomir
2	*L. korolkovii*	نمونه هرباریوم	نمونه هرباریوم	مازندران Mazandaran	سنگده Sangdeh
3	*L. nummulariifolia*	33°,00′,94″	49°,85′,07″	اصفهان Isfahan	سکان Sokkan
4	*L. iberica*	37°,61′,81″	48°,60′,00″	اردبیل Ardabil	اندبیل Andabil
5	*L. bracteolaris*	37°,61′,83″	48°,52′,38″	اردبیل Ardabil	خلخال Khalkhal
6	*L. caucasica*	37°,62′,06″	48°,60′,80″	آذربایجان شرقی East Azerbaijan	ارس‌باران Arasbaran
7	*L.maackii*	32°,64′,24″	51°,64′,69″	اصفهان Isfahan	پارک بیشه حبیب Park Bisheh Habib
8	*L. caprifolium*	32°,63′,98″	51°,69′,65″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
9	*L. heckrottii*	32°,63′,48″	51°,69′,25″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
10	*L. fragrantissima*	32°,63′,00″	51°,69′,36″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
11	*L. sempervirens*	32°,63′,30″	51°,69′,78″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden
12	*L. nitida*	32°,63′,25″	51°,69′,61″	اصفهان Isfahan	باغ گل‌ها Flower Garden

بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA و تکثیر نواحی کلروپلاستی

برای استخراج DNA ژنومی نمونه‌های برگی با استفاده از نیتروژن مایع پودر شدند و با استفاده کیت Vivantis GF-1 محصول کشور مالزی، استخراج DNA انجام شد. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA با استفاده از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ٪ ۰/۸ در بافر ۰/۵ X TBE و اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (Eppendorf AG) تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به منظور تکثیر توالی‌های کلروپلاستی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf AG) انجام گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است. واکنش PCR برای هر نمونه در دو حجم ۲۵ میکرولیتری انجام شد و سپس محصول واکنش‌ها با یکدیگر مخلوط گردیدند. نوع و مقدار مواد مورد استفاده در هر واکنش PCR شامل ۱۹/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر (10µM)، ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X، ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ (50mM) ، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) (شرکت سیناژن - محصول کشور ایران) و ۱ میکرولیتر از DNA ژنومی (50 ng/µl) بود.

برنامه دمایی واکنش زنجیره پلیمراز شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه از دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۳ درجه سلسیوس و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

جدول ۲- موقعیت و توالی آغازگرهای استفاده شده در تکثیر نواحی کلروپلاستی.

Table 2. Position and sequence of primers used in amplification of chloroplast regions.

نام آغازگر Primer name	جهت Direction	توالی آغازگر (′۵-′۳) Primer's sequence (5′-3′)	منبع Reference
*trn*L-F	F	CGAAATCGGTAGACGCTACG	(27)
	R	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
*psb*A-*trn*H	F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	(22)
	R	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	(29)

خالص‌سازی محصول‌های PCR

به منظور خالص نمودن محصول‌های PCR، از کیت خالص‌سازی PCR (محصول شرکت Favorgen کشور تایوان) استفاده شد (شکل ۱). پس از خالص‌سازی کمیت و کیفیت نمونه‌ها به روش اسپکتوفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر Eppendorf (AG) اندازه‌گیری شد. محصول DNA خالص‌سازی شده در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد و در نهایت نمونه‌های خالص‌سازی شده جهت توالی یابی به شرکت Seqlab آلمان ارسال شدند.

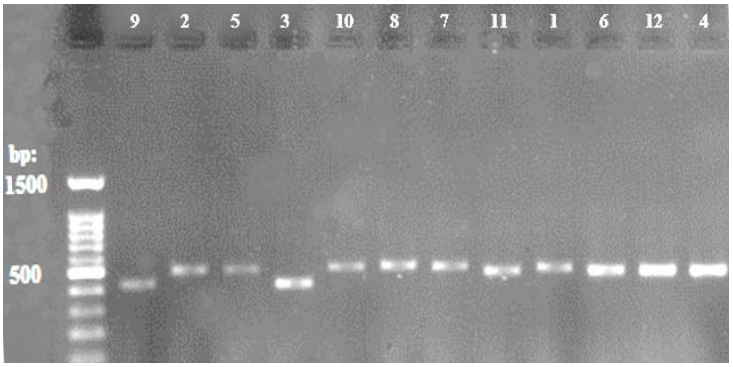


Fig. 1. Purified PCR products related to the *psbA-trnH* region of chloroplast genome were visualized on 1% agarose gel. The bands size is around 400-600 bp. The numbers in Table 1 are listed.

شکل ۱- فراورده‌های خالص شده PCR مربوط به ناحیه *psbA-trnH* ژنوم کلروپلاستی روی ژل آگارز ۱٪ آشکار شدند. اندازه باندها در حدود ۴۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز است. شماره‌های موجود در جدول ۱ مشخص شده‌اند.

واکاوی داده‌ها

پس از استخراج DNA کلروپلاستی و تکثیر قطعه‌های مورد نظر، محصولات PCR از قطعه *psbA-trnH* و *trnL-F* هر یک از نمونه‌ها با آغازگر رفت و برگشت توسط شرکت Seqlab آلمان تعیین توالی گردیدند. کروماتوگرام‌های دریافتی با استفاده از نرم افزار Chromas ver 4 مشاهده شدند و توالی‌های *psbA-trnH* و *trnL-F* استخراج گردید. کیفیت توالی‌ها با نرم افزار Chromas ver 4 سنجیده و با همین نرم افزار ابتدا و انتهای توالی‌ها حذف گردیدند. واکاوی آماری Maximum Parsimony، برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی هر ناحیه و در نهایت رسم درخت‌های تبارزایی توالی‌های DNA کلروپلاستی نمونه‌های *Lonicera* به همراه تعدادی توالی‌های دیگر انتخاب شده از پایگاه بانک ژن که بیشترین شباهت را در بلاست داشته است، با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه پنجم (۲۸) واکاوی شدند.

نتایج

آنالیز BLAST توالی‌های به دست آمده (شماره دسترسی[۱] توالی‌های ثبت شده در NCBI در شکل‌های ۳ و ۵ آمده است). نشان داد که توالی محصولات تکثیر شده دارای بیشترین تشابه با توالی‌های مربوط به ژن‌های *psbA-trnH* و *trnL-F* هستند. پس از به دست آوردن توالی‌ها طول ناحیه توالی‌یابی شده، مناطق محافظت شده[۲] و متغیر[۳]، مناطق Parsimony informative

۱- Accession number ۲- Conserved ۳- Variable ۴- Evolutionary divergence ۵- Genetic distance

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

و نسبت ترنسورژن به ترنزیشن (R) با استفاده از نرم افزار MEGA5 تعیین شد (جدول ۳). همچنین، فراوانی نوکلئوتیدها شامل ۲۵٪ باز آدنین (A)، ۲۵٪ باز تیمین (T)، ۲۵٪ باز سیتوزین (C) و ۲۵٪ باز گوانین (G) بود. نتایج برآورد الگوی جایگزینی برای گونه‌ها در جدول‌های ۴ و ۵ آورده شده است. همچنین، واگرایی تکاملی[۴] که به نوعی همان فاصله ژنتیکی[۵] نیز محسوب می‌شود بین تمامی داده‌های توالی حاصل از این دو ناحیه محاسبه گردید (جدول‌های مربوطه به علت حجم زیاد داده‌ها در متن قرار داده نشده‌اند) که بر اساس آن در ناحیه *psbA-trnH* واگرایی بین گونه‌های *L. floribunda* و *L. korolkovi* دیده نشد در حالی‌که بیشترین واگرایی بین گونه‌های *L. bracteolaris* و *L. caucasica* (۰/۲۰۹) مشاهده شد. در ناحیه *trnL-F* نیز واگرایی بین *L. bracteolaris* و *L. iberica* دیده نشد در صورتی‌که در گونه‌های *L. caprifolium* و *L. floribanda* بیشترین واگرایی (۰/۰۲۷۶) مشاهده شد.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به توالی‌های تراز شده و واکاوی آماری Maximum Parsimony.

Table 3. Information on aligned sequences and statistical analysis of Maximum Parsimony.

ویژگی‌های بررسی شده Studied features	trnL-F	psbA-trnH
تعداد گونه Number of species	12	12
طول ناحیه توالی‌یابی شده (bp) The length of the sequenced region (bp)	940-950	420-435
طول توالی‌های ترازشده به همراه فواصل ایجاد شده (bp) The length of the aligned sequences with the distances created	961	561
نسبت ترنسورژن به ترنزیشن (R) Transition/Transversion ratio	2.09	0.77
تعداد جایگاه حفاظت شده Number of conserved sites	886	382
تعداد جایگاههای متغیر Number of variable sites	71	55
تعداد جایگاه‌های Parsimony informative Number of Parsimony informative sites	16	15

جدول ۴- دبرآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ناحیه *psbA-trnH* به روش بیشینه درست‌نمایی ترکیبی (Maximum composite likelihood).

Table 4. Estimation of the nucleotide substitution pattern of the *psbA-trnH* region by the maximum composite likelihood method.

Nucleotide	A	T	C	G
A	-	*9.01*†	*4.35*	**13.92**
T	*8.48*	-	**2.58**	*5.32*
C	*8.48*	**5.35**	-	*5.32*
G	**23.11**	*9.01*	*4.35*	-

† Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column). For simplicity, sum of r values is equal to 100. Rates of different transitional and transversional substitutions are shown in bold and italic, respectively.

† هر عدد نشان‌دهنده احتمال جایگزینی (r) از یک باز (ردیف) با باز دیگر (ستون) است. برای سادگی، مجموع مقادیر r برابر ۱۰۰ می‌باشد. مقادیر مختلف جایگزینی ترانزیشن به صورت بولد (bold) و جایگزینی‌ها از نوع ترانسورژن به صورت اریب (Italic) آورده شده است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

جدول ۵- برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ناحیه *trnL-F* به روش بیشینه درست‌نمایی ترکیبی (Maximum composite likelihood).

Table 5. Estimation of the nucleotide substitution pattern of the *trnL-F* region by the Maximum composite likelihood method.

Nucleotide	A	T	C	G
A	-	*4.04*†	*4.04*	**16.91**
T	*4.04*	-	**16.91**	*4.04*
C	*4.04*	**16.91**	-	*4.04*
G	**16.91**	*4.04*	*4.04*	-

† Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column). For simplicity, sum of r values is made equal to 100. Rates of different transitional substitutions are shown in bold and those of transversional substitutions are shown in italics.

† هر عدد نشان‌دهنده احتمال جایگزینی (r) از یک باز (ردیف) با باز دیگر (ستون). برای سادگی مجموع مقادیر r برابر ۱۰۰ می‌باشد. مقادیر مختلف جایگزینی ترانزیشن به صورت بولد (bold) و جایگزینی‌ها از نوع ترانسورژن به صورت اریب (Italic) آورده شده است.

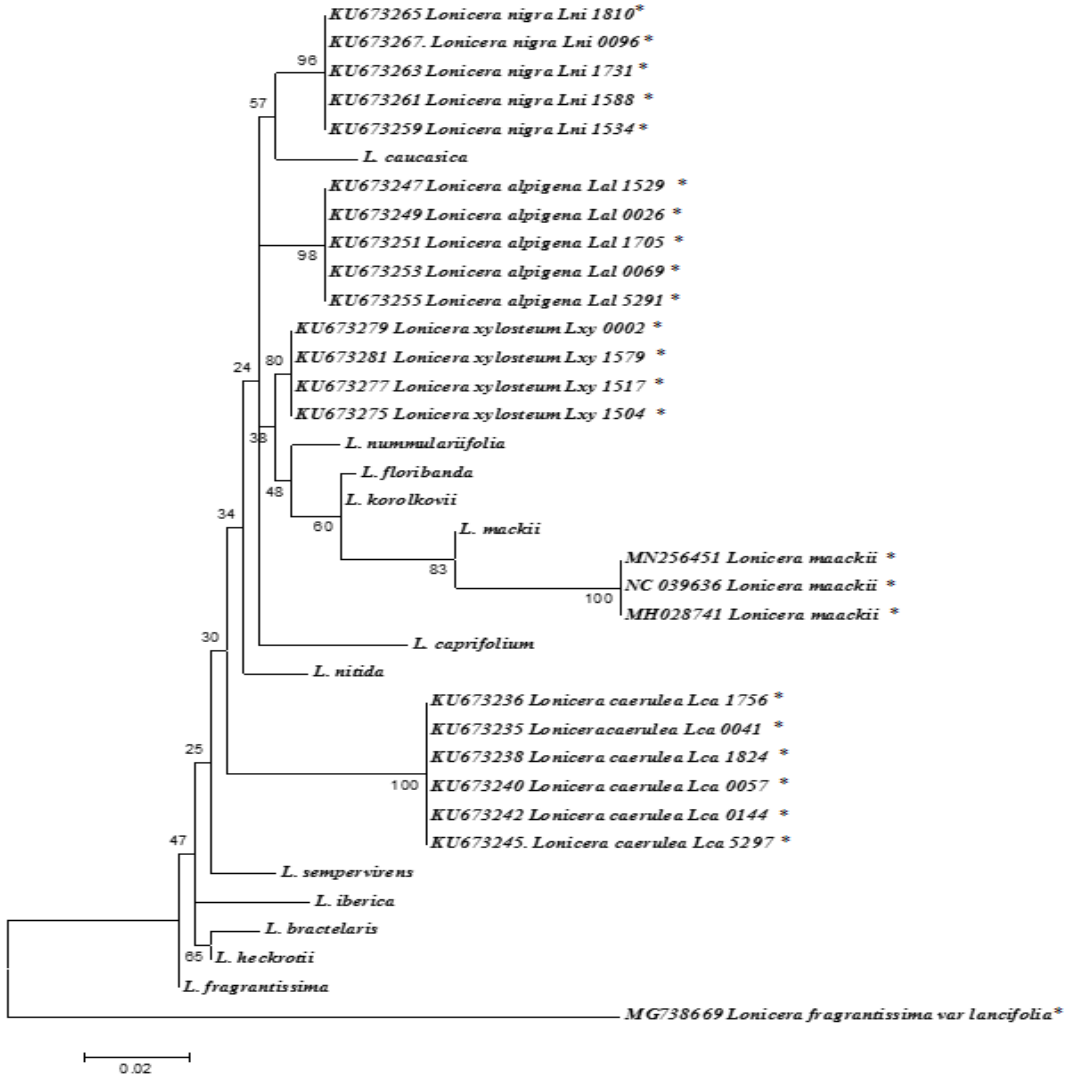


Fig. 2. Phylogenetic tree obtained by sequencing *psbA-trnH* regions in *Lonicera* species by Maximum Likelihood method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of similarity within the group obtained by 100 sampling. Species taken from the NCBI gene bank are marked with an asterisk (*).

شکل ۲- درخت تبارزایی حاصل از توالی‌یابی ناحیه‌های *psbA-trnH* گونه‌های جنس *Lonicera* به روش Maximum Likelihood. اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد. گونه‌های گرفته شده از بانک ژن NCBI با ستاره (*) مشخص شده‌اند.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

نتایج درخت تبارزایی گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* به تنهایی نیز بر اساس ناحیه *psbA-trnH* بـه روش Maximum Likelihood (شکل ۳) مشخص کرد که جداسازی همه گونه‌ها به خوبی صورت گرفته و در شاخه‌های مجزا قرار گرفتند. همانند درخت قبلی گونه‌های *L. korolkovii* و *L. maackii* و نیز *L. floribunda* (با درجه اعتماد بالا) با گونه *L. nummulariifolia* خویشاوندی بیشتری داشته و یک خوشه بزرگ تشکیل دادند. دو گونه *L. caprifolium* و *L. nitida* نیز با درجه اعتماد به نسبت بالا در یک خوشه قرار گرفتند. سایر گونه‌ها با درجه اعتماد پایین از هم جدا شدند.

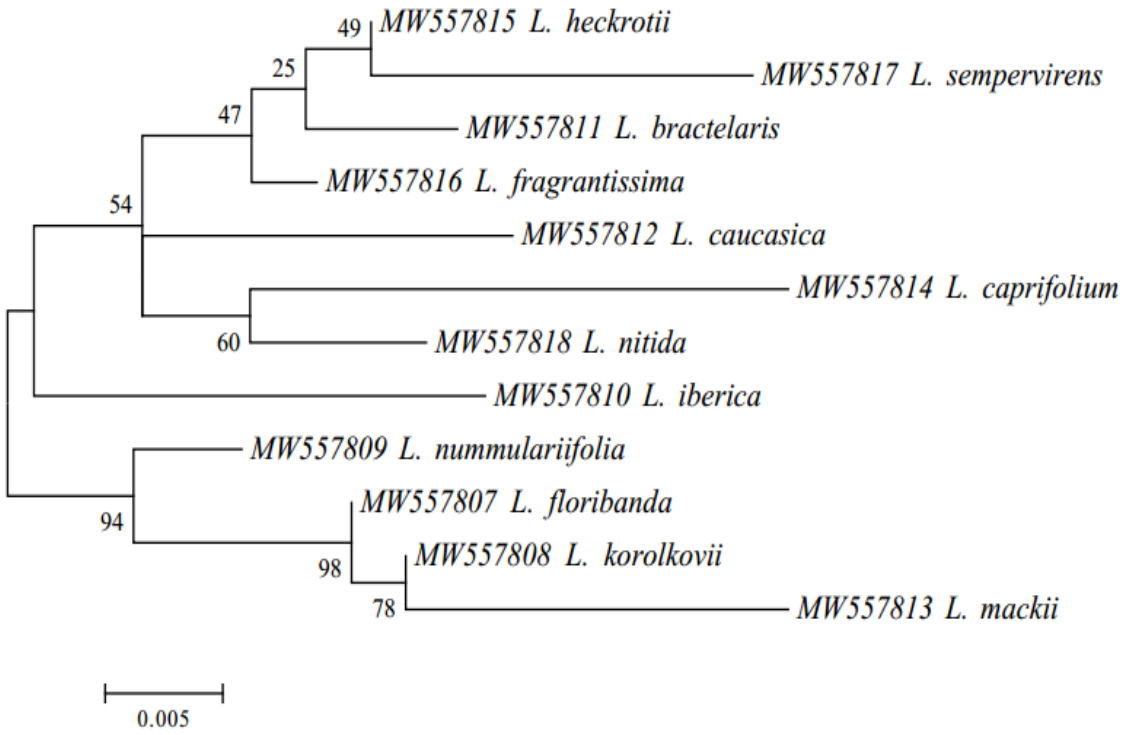


Fig 3. Phylogenetic tree obtained by *psbA-trnH* region sequences of Iranian *Lonicera* species by Maximum Likelihood method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of similarity within the group obtained from 100 samples.

شکل ۳- درخت تبارزایی حاصل از توالی‌های ناحیه *psbA-trnH* گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* به روش Maximum Likelihood. اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد.

براساس درخت تبارزایی ناحیه *trnL-F* (شکل ۴)، هفت گونه ایرانی *L. bracteolaris*، *L. iberica*، *L. heckrottii*، *L. fragrantissima*، *L. sempervirens*، *L. caucasica* و *L. floribunda* روی شاخه‌های مجزایی قرار گرفته و از سایر گونه‌ها قابل تشخیص بودند. نکته قابل توجه این‌که گونه ایرانی *L. maackii* با گونه مشابه خود از کشورهای دیگر یک گروه تک جدی را تشکیل ندادند و خویشاوندی نزدیک‌تری با *L. korolkovii* و *L. floribunda* داشتند. به‌طور مشابه گونه ایرانی *L. fragrantissima* و گونه مشابه از کشور دیگر در یک خوشه با جد مشترک قرار نگرفتند. همچنین، گونه *L. nummulariifolia* نیز خویشاوندی نزدیکتری با گونه غیر ایرانی *L. maackii* داشت. گونه ایرانی *L. caprifolium* و گونه غیر ایرانی *L. japonica* نیز از نظر تبارزایی دارای خویشاوندی بسیار نزدیکی بودند. بنابراین توالی *trnL-F* دارای قدرت کافی برای تمایز این دو گونه روی شاخه‌های مجزا نداشت. واکاوی تبارزایی این ژن همچنین نشان داد که گونه ایرانی *L. sempervirens* و گونه غیر ایرانی این جنس (شماره دسترسی GQ305434) یک گروه تک جدی را تشکیل می‌دهند هرچند این دو گونه فاصله تکاملی قابل توجهی از یکدیگر نمایش دادند.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

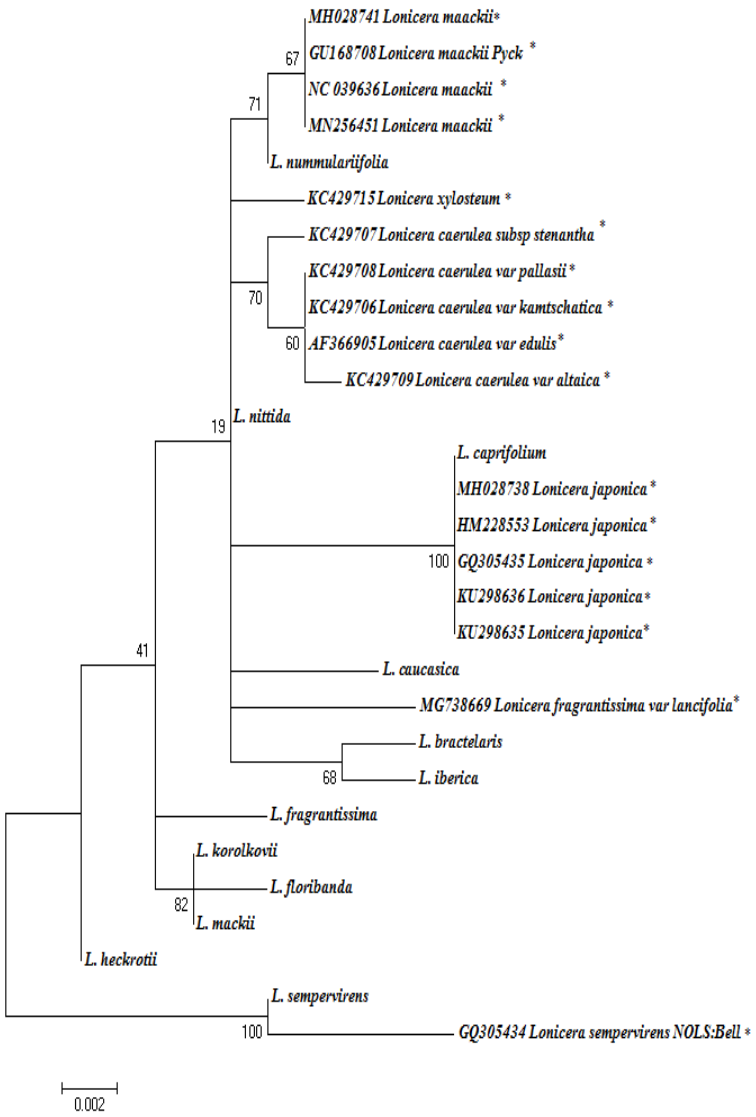


Fig. 4. Phylogenetic tree obtained by *trnL-F* region sequences of *Lonicera* species by Maximum Likelihood method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of similarity within the group obtained from 100 samples. Species taken from the NCBI gene bank are marked with an asterisk (*)

شکل ۴- درخت تبارزایی حاصل از توالی‌های ناحیه *trnL-F* گونه‌های جنس *Lonicera* که به روش Maximum Likelihood . اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰ مرتبه نمونه گیری می‌باشد. گونه‌های گرفته شده از بانک ژن NCBI با ستاره (*) مشخص شده‌اند.

درخت تبارزایی به‌دست آمده بر اساس ناحیه *trnL-F* گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* بـه روش Maximum Likelihood (شکل ۵) نشـان داد گونه‌های جنس *Lonicera* تک جدی می‌باشند و همه گونه‌ها (جز گونه *L. maackii*) در شاخه‌های مجزا قرار گرفتند. بیشترین خویشاوندی ژنتیکی در دو گونه *L. bracteolaris* و *L. iberica* (با درجه اعتماد بالا) حاصل شد. خویشاوندی سایر گونه‌ها با درجه اعتماد پایین صورت گرفته است که نشان دهنده‌ی قدرت ناکافی این ناحیه در جداسازی گونه‌ها است.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

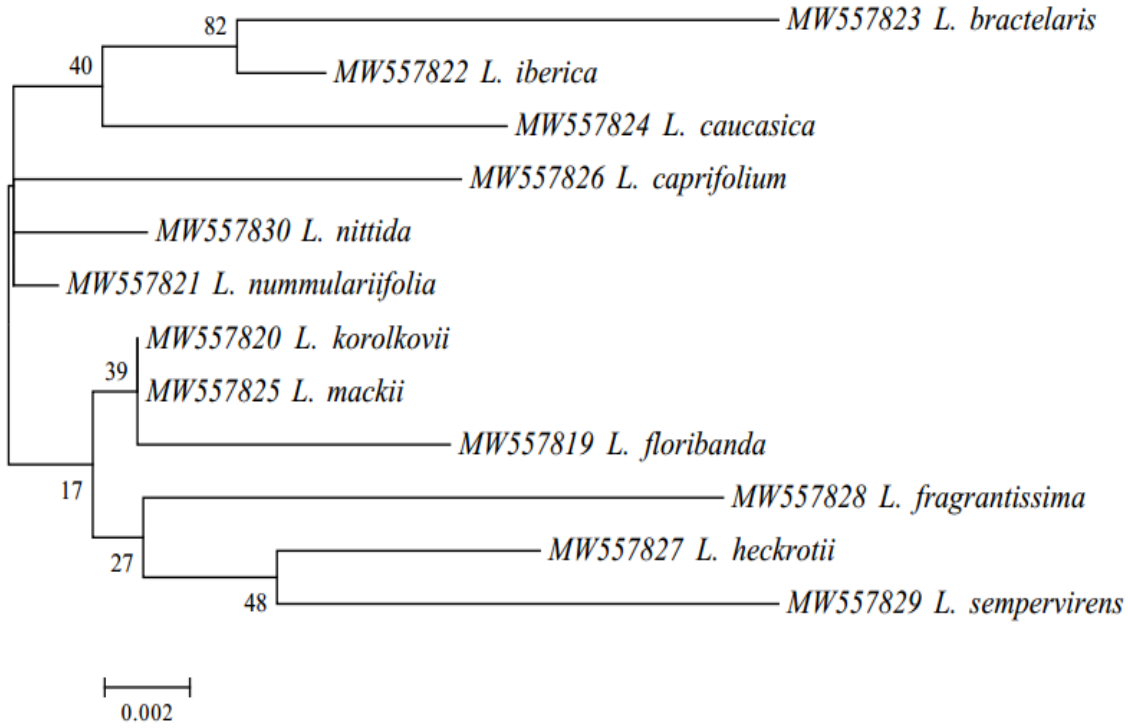


Fig. 5. Phylogenetic tree obtained by *trnL-F* region sequences of Iranian *Lonicera* species by Maximum Likelihood method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of similarity within the group obtained from 100 samples.

شکل ۵- درخت تبارزایی حاصل از توالی‌های ناحیه *trnL-F* گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* که به روش Maximum Likelihood . اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ۱۰۰ مرتبه نمونه گیری می‌باشد.

افزون بر نتایج بالا مقایسه درخت‌های تبارزایی ایجاد شده بر اساس گونه‌های ایرانی به تنهایی و نیز همراه گونه‌های غیر ایرانی مربوط به هر دو ناحیه *trnL-F* و *psbA-trnH* بیانگر خویشاوندی نزدیک گونه‌های *L. korolkovii* و *L. floribunda* و *L. maackii* است.

بحث

پژوهشگران از نشانگرهای مولکولی *psb*A-*trn*H و *trnL-F* برای مطالعه روابط تبارزایی در سطح بین گونه‌ای و داخل گونه‌ای، استفاده می‌کنند. مناطق غیررمزکننده همچون اینترون‌ها و فضاهای بین ژنی اغلب تنوع بیشتری نسبت به مناطق رمز کننده DNA نشان می‌دهند (۲۱).

در بررسی ناحیه *psbA-trnH* این آزمایش عدم هم‌گروهی *L. fragrantissima* با گونه‌های مشابه غیر ایرانی (شماره دسترسی MG738669) مشخص کرد که علت این موضوع می‌تواند مربوط به بروز نوترکیبی در توالی *psbA-trnH* باشد. با استفاده از واکاوی تبارزایی این ناحیه ارتباط تباری بین گونه‌ای تا حدودی مشخص شد. بر این اساس گونه‌های *L. maackii*، *L. fragrantissima* و *L. korolkovii* و حتی *L. nummulariifolia* (با درجه اعتبار کمتر) در یک خوشه قرار گرفت و اعتبار فیلوژنی نزدیکی داشتند. در این بین بیشترین تشابه ژنتیکی در این ژن مربوط به دو گونه *L. korolkovii* و *L. floribunda* بود که با نتایج جدول واگرایی و نتایج درخت تبارزایی گونه‌های ایرانی هم‌سو بود. نتایج به دست آمده در این بررسی و نتایج Nunes و همکاران (۱۸) تاکید می‌کند که توالی *psbA-trnH* برای تفکیک گونه‌های *Lonicera* بسیار کارآمد بوده و می‌تواند به عنوان DNA barcode برای شناسایی گونه‌های مورد مطالعه استفاده شود. توانایی توالی این ناحیه در شناسایی و تفکیک گونه‌ها نشان دهنده تشابه توالی این ناحیه بین افراد یک گونه و تفاوت قابل توجه آن بین گونه‌های مختلف است. بررسی گونه‌های *Lonicera* از کشورهای دیگر نیز به همراه گونه‌های ایرانی نشان داد که توانایی توالی *psbA-trnH* برای تفکیک و شناسایی گونه‌های مختلف

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

به مراتب از توانایی توالی *trnL-F* مورد مطالعه بهتر بوده است و با نتایج Sun و همکاران (۲۵) که روی ۴۴ نمونه از گونه *Lonicera japonica* انجام دادند، همسو بود. آن‌ها نشان دادند که *psbA-trnH* یک رمزینه مناسب جهت تمایز *Lonicera japonica* از گونه‌های نزدیک می‌باشد.

نتایج درخت تبارزایی بر مبنای توالی *trnL-F* نشان داد که از بین ۱۲ گونه‌ی *Lonicera* در این مطالعه، همه گونه‌ها به جز دو گونه *L. korolkovii* و *L. maackii* از یکدیگر قابل تفکیک بوده و روی شاخه‌های متمایز قرار گرفتند. دو گونه بیان‌شده روی یک شاخه با درجه اعتماد بالا قرار گرفته و قابل تفکیک از یکدیگر نبودند. در درخت تبارزایی گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* نیز گونه‌ی *L. maackii* روی شاخه مجزا قرار نگرفت که این موضوع می‌تواند به دلایلی مانند وجود مکان‌های چند شکلی[۱] مشابه، تنوع پایین بین گونه‌ای، رخدادهایی مانند Incomplete Lineage Sorting (LIS) ، هیبریداسیون و گیرش داخل گونه‌ای[۲] و بین گونه‌ای کلروپلاست باشد (۷).

همچنین مشخص شد گونه‌های *L. nummulariifolia* با *L.nitida* و نیز *L. bracteolaris* با *L. iberica* (با اعتبار و اطمینان کمتر) خویشاوندی تبارزایی نزدیک‌تری دارند که هم راستا با نتایج جدول واگرایی بودند. همچنین، در درخت تبارزایی گونه‌های ایرانی جنس *Lonicera* نیز گونه‌های *L. bracteolaris* و *L. iberica* خویشاوندی تبارزایی نزدیکی داشتند که با بقیه نتایج هم‌راستا بود. این نتایج نشان می‌دهد که اعتبار این ناحیه ژنتیکی برای تفکیک گونه‌های ایرانی از یکدیگر تا حدودی مناسب است، اما برای تعیین خویشاوندی بین گونه‌ها ناکافی می‌باشد. بررسی گونه‌های مورد مطالعه جنس *Lonicera* با گونه‌های دیگر این جنس از مناطق مختلف دنیا، مشخص کرد که قدرت تفکیک گونه‌ها بر اساس واکاوی تبارزایی ژن *trnL-F* چندان قابل اعتبار نیست. حسین‌زاده کلاگر و همکاران (۱۳) از این ناحیه جهت بررسی تمایز دو گونه صنوبر (سفید پلت و سپیدار) استفاده نمودند و نتیجه گرفتند که این نشانگر نمی‌تواند بین این دو گونه تمایزی ایجاد نماید در نتیجه استفاده از سایر نشانگرها و نواحی رمزینه را پیشنهاد نمودند که نتایج حاضر با آنها همسو است. در پژوهشی توسط Baraket و همکاران (۳) تنوع ژنتیکی برای ارزیابی روابط درون گونه‌ای در *Ficus Moraceae* با استفاده از توالی‌یابی ناحیه ITS و *trnL-F* انجام شد. نتایج آن‌ها نشان داد که توالی‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی برای تمایز ژرم پلاسمی و همچنین برای تشخیص الگوی تغییرات در انجیر مفید می‌باشند.
تنوع ژنتیکی ناکافی بین گونه‌ای در مقایسه با تنوع داخل گونه‌ای ژن *trnL-F* و یا رخداد LIS در ظهور این ژن بین افراد گونه می‌تواند بیانگر قدرت ناکافی این ژن در تفکیک گونه‌ها باشد. بنابراین، نتایج این بررسی نشان می‌دهد زمانی‌که گونه‌های متعدد در جنس (از کشورهای مختلف) مورد بررسی قرار می‌گیرد استفاده از ترادف برای تشخیص و تفکیک گونه‌ها ناکافی خواهد بود (۷). در پژوهشی که توسط آزادی چگینی و همکاران (۲) در بررسی تبارزایی *Lycium shawii* (گرگ تیغ یا دیو خار) دنیای قدیم بر اساس توالی ناحیه ITS و *trnL-F* انجام شد با استفاده از گونه‌های ایران در کنار بسیاری از گونه‌های دنیای جدید و دنیای قدیم، روابط فیلوژنی *Lycium shawii* دنیای قدیم تعیین گردید.

با توجه به فاصله تکاملی قابل توجه توالی *trnL-F* بین گونه‌های غیر ایرانی از سایر گونه‌های این جنس می‌توان احتمال بروز نوترکیبی در توالی این ناحیه ژنتیکی را محتمل دانست که با نتایج Chen و همکاران (۵) همسو است و این ناحیه به عنوان یک ناحیه قدرتمند است. در همین راستا، علت انتخاب نشانگر *trnL-F*، این است که به طور معمول، قدرت تفکیکی کم این نشانگر در مقابل چندین سودمندی آن تا حدی جبران می‌شود. اول این‌که این مناطق به شدت حفاظت شده می‌باشند (۲۳، ۲۶)، دوم اینکه آغازگرهای جهانی این نشانگر در دسترس هستند و به راحتی امکان ساخت آغازگرها و همچنین شرایط بهینه شده تکثیر این نشانگر در منابع موجود است و سوم این‌که اطلاعات زیادی از توالی‌های مناطق غیر رمز کننده (*trnL-F*) در پایگاه داده‌ها در بانک ژن در دسترس می‌باشد که اجازه شناسایی بسیاری از گونه‌ها و جنس‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد.

نتیجه گیری

نتیجه حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که توانایی توالی ناحیه *psbA-trnH* برای تفکیک و شناسایی گونه‌های مختلف پلاخور به‌مراتب از توانایی توالی ناحیه *trnL-F* مورد مطالعه بهتر بوده است. افزون بر این، باید اشاره کرد که به‌دلیل نیاز به اطلاعات اضافی برای شناسایی برخی گونه‌ها (وجود دورگه) همواره ژن‌های کلروپلاستی به تنهایی مورد استفاده قرار نمی‌گیرند

۱- Polymorphism
۲- Intraspecies capture

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

و برای به‌دست آوردن نتیجه دقیق‌تر پیشنهاد می‌شود قطعه‌های پلاستیدی همراه با توالی هسته‌ای (برای نمونه *nr*DNA ITS و *trn*H-*psb*A) به عنوان رمزینه DNA استفاده شوند (۱۶).

References منابع

1. Arzanlo, M., H. Dokhanchi, M. Davari, S. Khodaveisi and H. Badali. 2013. DNA barcoding: New horizons in molecular identification of pathogenic fungi. J. Kurd. Univ. Med. Sci. 18:113-126. (In Persian).
2. Azadi Chegini, N., V. Nazeri, Sh. Kazempour and A. Namaki Shoshtari. 2009. Phylogenetic study of the ancient world *Lycium* based on the ITS sequences and *trnL-F*. New Genetics, 3: 37-44. (In Persian).
3. Baraket, G., A.B. Abdelkrim, M. Mars. and A. Salhi-Hannachi. 2011. Cyto-nuclear discordance in the genetic relationships among Tunisian fig cultivars (*Ficus carica* L.): Evidence from noncoding *trnL–trnF* and ITS regions of chloroplast and ribosomal DNAs. Sci. Hort. 130: 203-210.
4. Chase, M.W., N. Salamin, M. Wilkinson, J.M. Dunwell, R.P. Kesanakurthi, N. Haidar and V. Savolainen. 2005. Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. Biol. Sci. 360:1889–1895.
5. Chen, C.W., Y.M. Huang, L.Y. Kuo, Q.D. Nguyen, H.T. Luu, J.R. Callado, D.R. Farrar and W.L. Chiou. 2013. *trnL-F* is a powerful marker for DNA identification of field vittarioid gametophytes (Pteridaceae). Ann. Bot. 111:663-673.
6. Chen, W.C., S.S. Liou, T.F. Tzeng, S.L. Lee and I.M. Liu. 2012. Wound repair and anti-inflammatory potential of *Lonicera japonica* in excision woundinduced rats. BMC Complement. Alter. Med.12: 226.
7. Daniell, H., C.S. Lin, M. Yu and W.J. Chang. 2016. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. Gen. Biol. 17: 1-29.
8. Desalle, R.O.B. 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: response to Rubinoff. Conserv. Biol. 20:1545– 1547.
9. Drabkova, L., J. Kirschner, Č. Vlček and V. Pačes. 2004. *TrnL–trnF* intergenic spacer and *trnL* intron define major clades within *Luzula* and *Juncus* (Juncaceae): importance of structural mutations. J. Mol. Evol. 59:1-10.
10. Ghasemi Ghehsareh, M. and M. Kafi. 2015. Scientific and practical floriculture. Moallef Press. 296 P. (In Persian).
11. Hajibabaei, M., G.A. Singer, P.D. Hebert and D.A. Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trend Gen. 23:167-172.
12. Hebert, P.D., S. Ratnasingham and J.R. De Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Biol. Sci. 270:96-99.
13. Hossinzadeh Colagar, A., A. Mahmoudi Otaghvari and M. Badbar. 2015. The investigation of chloroplast marker *trnL-F* in determination of different between two species of *Populus: P. caspica* and *P. alba*. Cell. Mol. Res. 27:506-519. (In Persian).
14. Johnson, L. A., L. M. Chan, T. W. L. Weese, L. D. Weese and S. Mcmurry. 2008. Nuclear and cpDNA sequences combined provide strong inference of higher phylogenetic relationships in the phlox family (Polemoniaceae). Mol. Phylogen. Evol. 48:997–1012.
15. Khoshkhoo, M. 2012. Planting principles and methods. Shiraz University Press.1467 P. In Persian.
16. Li, D.Y., Y.Y. Ru. and X.Y. Zhang. 2004. Chromosomal distribution of the 18S-5.8 S-26S rDNA loci and heterogeneity of nuclear ITS regions in *Thinopyrum intermedium* (Poaceae: Triticeae). Acta Bot. Sin.46:1234-1241.
17. Mabberley, D.J. 2008. Mabberley's Plant-book: A Portable Dictionary of Plants, their Classification and Uses. Cambridge University Press. 1040 P.
18. Nunes, R. S. C., E.M. Del Aguila, V.M.F. Paschoalin and da J.T. Silva. 2014. DNA barcoding assessment of the genetic diversity of varieties of Taro, *Colocasia Esculenta* (L.) Schott in Brazil. iConcept Press. 132 P.
19. Pang, X., J. Song, Y. Zhu, C. Xie and Chen, S. 2010. Using DNA barcoding to identify species within euphorbiaceae. Planta Med. 76: 1784-1786
20. Qing Ren, B., X. Guo xiang and Z. Duan chen. 2010. Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. Mol. Ecol. Res. 10:594-605.
21. Randal, L., A. Small, B. Edgar, A. Lickey, J.A. Shaw, D. Warren and A. Hauk. 2005. Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative. Mol. Phylogen. Evol. 36: 509– 522
22. Sang, T., D. Crawford and T. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). Amer. J. Bot. 84:1120-1120.
23. Shaw, J., E. Lickey, J. Beck, S. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. Siripun, C. Winder, E. Schilling and R. Small. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. Amer. J. Bot. 92:142-166.
24. Sun, Z., T. Gao, H. Yao, L. Shi, Y. Zhu and S. Chen. 2011. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method. Planta Med. 77:301–306

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

25. Taberlet, P., E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly and C. Miquel. 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic Acids Res. 35:3-14.
26. Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Mol. Biol. 17:1105-1109
27. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.
28. Tate, J.A. and B.B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. Sys. Bot. 28:723-737.
29. Theis, N., M.J. Donoghue and J. Li. 2008. Phylogenetics of the Caprifolieae and *Lonicera* (Dipsacales) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. Sys. Bot. 33: 776-783.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 23 (1): 1-12 (2022)
Research article

Comparison of the Efficacy of Two Chloroplast DNA Marker (*psbA-trnH* and *trnL-F*) in Determining the Phylogenetic Relationships among Honeysuckle (*Lonicera* spp.) Species in Iran

N. Fattahi Dehkordi, M. Ghasemi Ghehsareh, B. Shiran and M. Siampoor[1]

The genus *Lonicera* belongs to the Caprifoliaceae family, and in Persian, it is called Palakhor, Shung, or Aminoddoleh vine. Understanding interspecific relationships based on traditional methods such as morphological features and chemical compositions has conflicting results. In this study, to evaluate the efficiency of DNA barcode in determining the phylogenetic relationships of 12 species of *Lonicera* under cultivation in different regions of Iran, two chloroplast DNA barcodes (*psbA-trnH* and *trnL-F*) were used. Genomic DNA extracted using available kits, and PCR reaction performed to amplify two regions, and finally, purified samples were sequenced. The results showed that the length of the *psbA-trnH* and *trnL-F* regions are about 420-435 and 940-950 nucleotides, respectively. Parsimony analysis of *psbA-trnH* and *trnL-F* showed 382 and 886 conserved sites, 55 and 71 variable sites, and 15 and 16 Parsimony informative sites, respectively. Phylogenetic trees created by the *psbA-trnH* and the *trnL-F* regions showed that most species (except *L. korolkovii*) and the two species *L. korolkovii* and *L. maackii* were well distinguished from each other, respectively and they were placed in different clusters. The genetic distance (0.00 to 0.209) between species in *psbA-trnH* region is more than genetic distance (0.00 to 0.027) in *trnL-F* region. Therefore, the *psbA-trnH* region owing to its diversity and reproducibility is a suitable barcode for studying genetic diversity between *Lonicera* species.

Keywords: Barcode regions, Phylogeny, Molecular marker, Honeysuckle.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1401.23.1.5.3]

1. M.Sc. Student and Assistant Professor of Horticultural Sciences, Professor of Biotechnology and Associate Professor of Plant Protection Department of Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
* Corresponding Author, Email: (mghasemi1352@gmail.com).