ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷
صفحه ٥٤٢ - ٥٣٧

بررسی توالی‌های ژن‌های کلروپلاستی *matk*، *rbcL* و *trnL-F* در *Salvia nemorosa* L. و *Thymus syriacus* Boiss

The study of chloroplast genes *matK*, *rbcL* and *trnL-F* in *Salvia nemorosa L.* and *Thymus syriacus Boiss*

مریم جهانگیری[۱]، بهناز صفار*[۲]، نواز خرازیان[۳]، سعید لطیفی نوید[٤]، صابر زهری[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲- دانشیار، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه ژنتیک، شهرکرد، ایران

۳- دانشیار، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه بیولوژی، شهرکرد، ایران

٤- به‌ترتیب دانشیار، استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

Jahangiri M[1], Saffar B[*2], Kharazian N[4], Latifi navid S[1], Zahri S[1]

1- MSc Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabīl, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
4- Associate Professors, Professors, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: biotechresearch2014@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

گیاهان خانواده Lamiaceae شامل تعدادی گونه با خاصیت درمانی ناشی از ترکیبات معطر هستند. در این مطالعه ژن‌های کلروپلاستی دوگونه دارویی *Salvia nemorosa* و *Thymus syriacus* از تیره Lamiaceae مورد تعیین توالی قرارگرفتند تا شناسایی این دو گونه را سریع‌تر و دقیق‌تر سازد. در این مطالعه از ژن‌های *matK* ،*rbcL* برای توالی‌یابی *Thymus syriacus* و *matK, trnL-F* برای توالی‌یابی *Salvia nemorosa* استفاده شد. در ابتدا DNA این دو گونه از برگ‌ها استخراج شد. در مرحله‌ی دوم توالی‌های ژن‌های کلروپلاستی مورد نظر تکثیر، و در نهایت توالی‌یابی شدند. توالی ژن‌های کلروپلاستی تعیین توالی شده می‌توانند در سایر مطالعات فیلوژنتیکی و تکاملی، جهت مقایسه‌ی بین گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرند و نتایج دقیق‌تری را در مدت زمان کوتاه‌تر، به‌ویژه در مطالعاتی در مقیاس وسیع‌تر فراهم کنند. نتایج نشان می‌دهد که نواحی کلروپلاستی *matKT*، *rbcL* و *trnL-F* می‌توانند به‌عنوان بارکدهای DNA برای شناسایی گونه‌های *Salvia nemorosa* و *Thymus syriacus* مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

خط‌شناسه گذاری DNA
نشانگرهای ملکولی *rbcL*
matK
trnL-F
Salvia nemorosa
Thymus syriacus

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.8.1]

مقدمه

Salvia L متعلق به تیره‌ی نعنائیان (Lamiaceae) با پراکنش وسیع و گونه‌های متعدد یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های معطر و دارویی در این تیره می‌باشد. *Salvia nemorosa* (مریم گلی مزرعه روی) گیاهی چند ساله، ساقه ۷۰-۳۰ سانتی‌متر، برگ‌ها ساده، کم و بیش سرنیزه‌ای- مستطیلی، در قاعده قلبی شکل، کاسبرگ فنجانی- لوله‌ای و جام گل بنفش و لوب فوقانی جام گل به‌شدت خمیده می‌باشد و فصل گل‌دهی آن از اردیبهشت تا تیرماه است (Talebi et al. 2018). *Thymus syriacus* گیاهی بوته‌ای، ساقه ٦-٢٢ سانتی‌متر، ایستاده، کم و بیش چوبی، با برگ‌هایی بدون دم‌برگ، خطی- سر نیزه‌ای، در قاعده مژه‌دار، گل آذین سرسان، جام گل رنگ پریده است (Jamzad et al. 2011). از لحاظ ویژگی‌های دارویی، جنس *Salvia* اغلب در زمینه‌های ضد میکروب، ضد تومور، ضد درد و آنتی اکسیدانت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Talebi et al. 2018). جنس *Thymus* نیز دارای خاصیت ضد میکروب و ضد سرطان می باشد (Prasanth et al. 2014).

DNA بارکدینگ یا خط شناسه، ابزاری مناسب در تحقیقات تاکسونومیک، ژنتیک جمعیت و ترسیم درخت فیلوژنیک می‌باشد. در واقع روش خط شناسه DNA یک روش تاکسونومیکی است که توسط یک نشانگر ژنتیکی می توان یک گونه ناشناخته را شناسایی کرد. پس از تهیه بارکد اطلاعات می تواند در بانک‌های اطلاعاتی ذخیره و به‌عنوان کتابخانه مرجع برای شناسایی گونه‌های مجهول مورد استفاده قرار گیرد (Kress et al. 2005). دو ژن کلروپلاستی *matK* (*Maturase K*) و *rbcL* (*Ribulose bisphosphate carboxylase large chain*) به‌عنوان ژن‌های کاندید برای بارکد گیاهان معرفی شده‌اند. انتخاب *rbcL* و *matK*، به‌عنوان خط‌شناسه‌ی DNA، به‌دلیل قدرت تفکیک ناحیه‌ی *matK* و جامعیت *rbcL* دارای سطح بالای تفکیک گونه‌ایی برای گیاهان می‌باشند (Wattoo et al. 2016).

trnL-F (*trnL–F intergenic spacer*) توالی فاصله‌انداز بین ژن‌های *trnL* و *trnF* و اینترون *trnL* است. استفاده مکرر از این نشانگر پرایمرهای آن را به‌عنوان پرایمرهای قابل استناد مطرح می‌کند (Taberlet et al. 2007). با توجه به اینکه مناطق غیرکد کننده (اینترون‌ها) در انتخاب طبیعی کمتر مورد توجه قرار می‌گیرند، ناحیه‌ی پلاستیدی *trnL-F* برای مطالعه تاریخ تکاملی و بررسی روابط فیلوژنی اهمیت دارد (Quandt et al. 2004; Hossinzadeh et al. 2014).

استان چهار محال بختیاری به‌واسطه موقعیت جغرافیایی خاص، یکی از مناطق با ارزش از لحاظ تنوع گیاهان دارویی به‌شمار می‌رود (Shirmardi et al. 2014). لذا مطالعه ملکولی گیاهان دارویی این منطقه با استفاده از خط‌شناسه گذاری DNA می‌تواند به شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف کمک کند. علاوه بر این مطالعه دو گونه دارویی *Salvia nemorosa* و *Thymus syriacus* از تیره Lamiaceae می‌تواند در برطرف نمودن شباهت‌ها و روابط تاکسونومیکی پیچیده محققان را یاری نماید (جدول ۱).

برای استفاده از نشانگرهای ملکولی، باید از نشانگری استفاده کرد که قدرت تفکیک مناسبی داشته باشد و علاوه برکوتاه بودن توالی آن جهت راحتی تکثیر، اطلاعات کافی برای گونه‌های شناخته نشده درون گروه داشته باشد و همچنین بتواند با محدود کردن طیف وسیعی از گزینه‌های ممکن با استفاده هدفمند از کلیدهای شناسایی، به شناسایی نهایی برسد.

بنابراین نشانگرهای *rbcL*، *trnl-F* و *matK* جهت بارکدینگ انتخاب شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده (Okada 2007; Bafeel et al. 2011) .

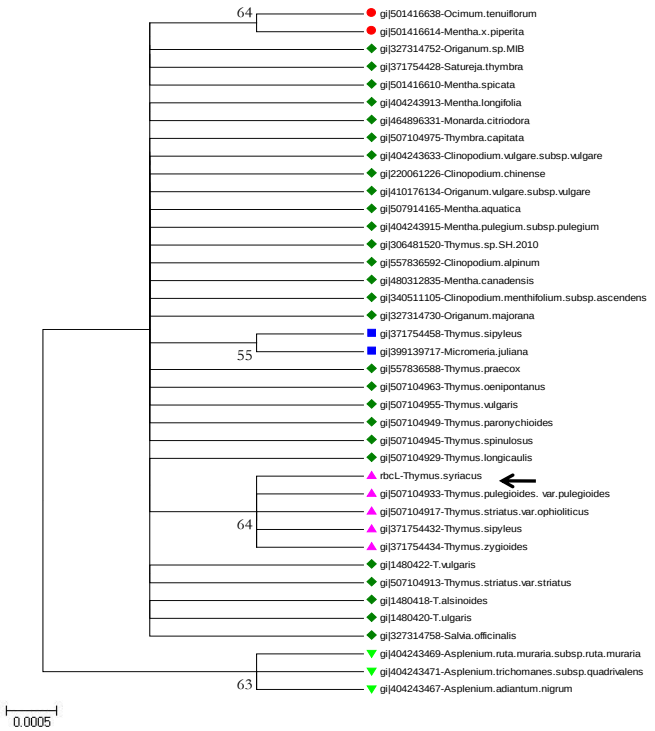
نام توالی	تعداد نوکلئوتید	
trnL-F	20	ATTTGAACTGGTGACACGAG
trnl- R	20	CGAAATCGGTAGACGCTACG
rbcLa-F	26	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
rbcLa-R	20	GTAAAATCAAGTCCACCACG
matk-390F	22	CGATCTATTCATTCAATATTTC
matk-1326 R	22	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.8.1]

در این تحقیق از دو گونه متعلق به دو جنس از تیره لامیناسه، *T. syriacus* و *S. nemorosa* که از رویشگاه‌های اطراف شهرکرد (مرکز استان چهارمحال و بختیاری) جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده‌است میلی‌گرم از نمونه‌ی پودر شده از بافت برگ گیاه به میکرو تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و مراحل استخراج با توجه به دستورالعمل کیت استخراج DNA ژنومی از گیاه (Bioer Technology China) انجام پذیرفت. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: DNA الگو۲۵ نانو گرم، معادل ۵ میکرولیتر، دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات ها ۰/۵ میکرولیتر (10 میکرومولار) پرایمرهای پیشرو و معکوس هر کدام ۰/۵ میکرولیتر (۲۰ میکرومولار)، بافر PCR ۵ /۲ میکرولیتر (10X)، کلرید منیزیم ۰/۵ میکرولیتر (۵۰ میکرومولار) و آنزیم *Taq polymerase* ۰/۲۵میکرولیتر (۵U/µl). جهت دست‌یابی به قطعات الیگونوکلئوتیدی موردنظر، شرایط PCR بهینه شد. سپس برای اطمینان از صحت انجام PCR محصول به‌دست آمده روی ژل اگارز یک درصد بارگذاری شد (Green and Sambrook 2014). بعد از انجام خالص‌سازی، تعیین توالی قطعات تکثیر شده صورت پذیرفت.

نتایج کروماتوگرام حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار (v. 2.4) chromas بررسی شدند. روش Bootstrap جهت برآورد اساس توزیع با نمونه‌گیری مجدد از مجموعه داده‌های اولیه استفاده شد. این روش برای محاسبه فاصله‌ی اطمینان فیلوژنی‌های ایجاد شده از داده‌های توالی به‌کار رفت. تکرار ۱۰۰۰ استفاده شد و نتایج Bootstrap و بهترین مدل فیت برای توالی‌های مورد نظر بر مبنای اکثریت درخت مورد توافق (Consensus) با ۵۰ درصد cut off در برنامه MEGA۵ به‌دست آمد. Blast توالی مورد نظر برعلیه دیتابیس نوکلئوتیدی غیرتکراری انجام شد و انتخاب OTU (Operational Taxonomic Unit)ها با توجه به مقدار همپوشانی توالی مورد نظر (query coverage <۹۵٪) و ارزش مورد انتظار (E-value) نزدیک به صفر انجام شد.

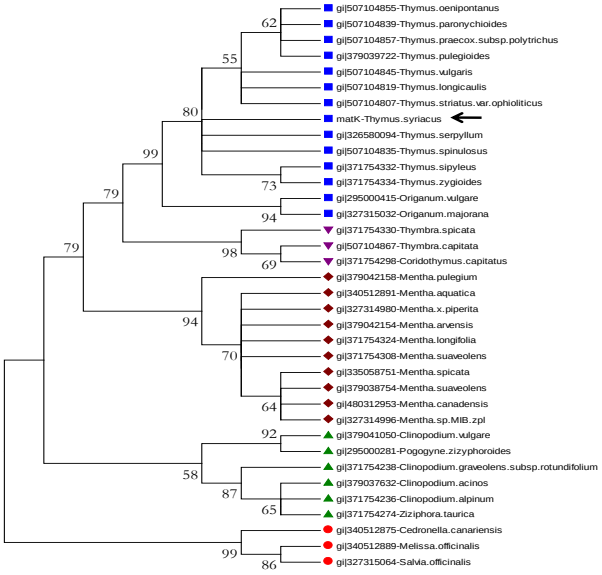
پس از استخراج DNA، و بهینه‌سازی شرایطPCR، نتایج PCR برای گیاه Salvia نشان داد که این گیاه در دمای اتصال ۴۹/۳ دارای باند ۹۰۰bp می‌باشد. تکثیر ژن *rbcL* و *trnL-F* در *Thymus syriacus*، در دمای ٥٤ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب باندهای ٦٠٠ و ۹۰۰ جفت‌بازی را برروی ژل آگارز نشان داد. توالی‌ها پس از ویرایش توسط نرم‌افزار Bioedit، توسط نرم‌افزار MEGA5 مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. سپس از نظر تطابق با سایر گونه‌های گیاهی، مورد آنالیز Blastn قرار گرفتند. داده‌های حاصل نشان دهنده میزان تطابق ژن‌های *matK* ،*rbcl* و *trnL-F* نسبت به سایر گونه‌ها به‌ترتیب برابر ۹۹-۹۸، ۹۹-۹٤ و ۹۹-۹۲ درصد بود. فیلوژنی ژن *rbcL* بر اساس هم‌ردیفی چندگانه توالی حاصل از گیاه *T. syriacus* با توالی‌های مرتبط (از جنس‌ها و گونه‌های مختلف) منتشر شده در GenBank بر اساس آنالیزBlastn انجام شد. این آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس هم‌ردیفی چندگانه ۳۹ گونه انجام شد. در این درخت بر اساس ارزش هر شاخه، ۵ دودمان مشخص شده‌است، این دودمان‌ها بسیار به هم نزدیک هستند که نشان می‌دهد این گونه‌ها از لحاظ تکاملی بسیار به هم نزدیک هستند و تغییرات نوکلئوتیدی موجود در این توالی‌ها در سطحی است که منجر به تفکیک 5 دودمان در درون این درخت شده است (دو بخش مرکزی به‌دلیل داشتن bootstrap پائین، ٤٢، با هم یک دودمان تکاملی محسوب می‌شوند) (شکل ۱).



شکل ۱- درخت فیلوژنی مربوط به ژن *rbcL* با cut off 50%.

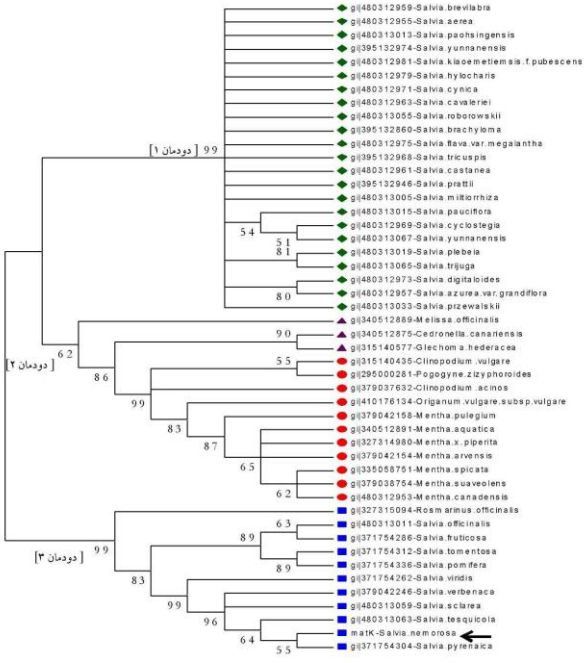
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.8.1]

فیلوژنی ژن *matK* بر اساس هم‌ردیفی چندگانه توالی حاصل از گیاه *Th. syriacus* با توالی‌های به‌دست آمده از پایگاه داده‌ها از ٤٠ گونه مختلف انجام شد. در این درخت بر اساس ارزش هر شاخه، ٥ دودمان مشخص شده‌است، ارزش bootstrap بالای شاخه‌ها حاکی از آن است که دودمان‌ها به‌صورت واحدهای مستقل به ارث رسیده‌اند. با توجه به آنالیز ژن مزبور به‌نظر می‌رسد که این ژن در توصیف تغییرات گونه نقش کلیدی‌تری ایفا کرده است (شکل۲). آنالیز فیلوژنتیکی ژن *matK* بر اساس هم‌ردیفی چندگانه توالی حاصل از گیاه *S. nemorosa* با توالی‌های ٤٠ گونه مختلف انجام شد.



شکل ۲- درخت فیلوژنی ژن *matK* از گیاه *Th. syriacus* با cut off ٥٠ درصد

در این درخت بر اساس ارزش هر شاخه، ۳ دودمان مشخص شده است، البته کلادهای متعدد کوچک در هر دودمان بزرگ (کلاد بزرگ) با ارزش بوت استرپ بالا در شاخه‌های منتهی به هر کلاد دیده می‌شود که در حال گسترش هستند. گونه‌هایی که در یک دودمان خاص قرار نگرفته‌اند، یعنی گونه‌های *Melissa officinalis*، *Cedronella canariensis*، *Glechoma hederacea* جزء کلادهای حدواسط کوچک هستند (شکل ۳). جالب توجه است که در این تحلیل گونه‌های مختلف *Salvia* در گروه‌های جداگانه‌ای مستقر شده‌اند.

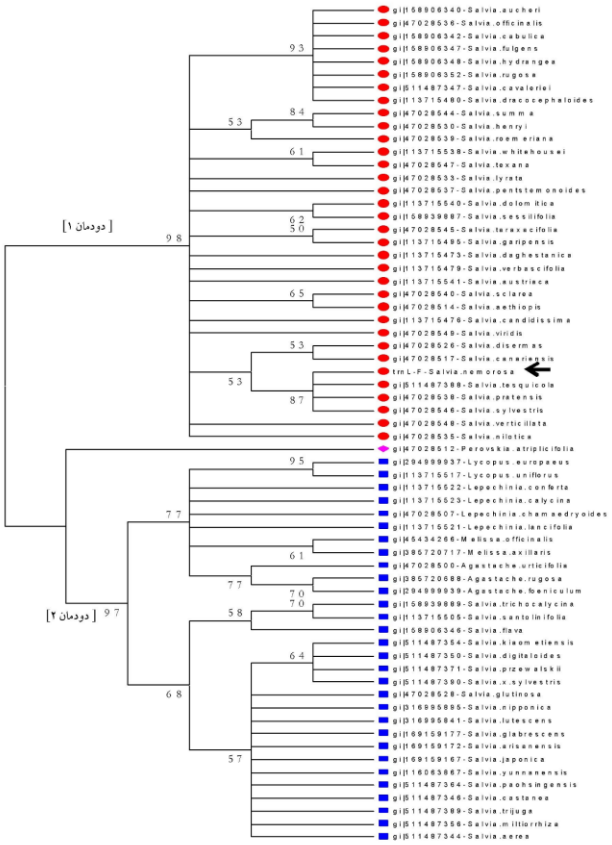


شکل ۳- درخت فیلوژنی ژن *matK* از گیاه *Salvia nemorosa* با cut off 50%

فیلوژنی ژن *trnL-F* بر اساس هم‌ردیفی چندگانه توالی حاصل از گیاه *S. nemorosa* با توالی‌های مرتبط از جنس‌ها و گونه‌های مختلف انجام شد. این آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس هم‌ردیفی چندگانه ٦٤ گونه انجام شد. در این درخت بر اساس ارزش هر شاخه، ۲ دودمان بزرگ مشخص شده‌است، ارزش بالای شاخه‌ها حاکی از آن است که این دو دومان به‌صورت واحدهای کاملاً مستقل به ارث رسیده‌اند. دودمان تکاملی ۲، به ۳ کلادکوچک با ارزش bootstrap بالا در شاخه‌های منتهی به هر کلاد تفکیک شده است (شکل٤). با بهره‌گیری از این ژن مشخص می‌شود که *S. nemorosa* ارتباط فیلوژنی بیش‌تری با سایر گونه‌های Salvia نشان می‌دهد. نتایج حاصل از مطالعات مولکولی بر پایه ژن *trnL-F* برروی جنس *Salvia* نشان می‌دهد که این جنس چند نیایی است و با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت می‌نماید (Wang et al. 2013) به‌طوری که در این تحقیق دو دودمان مستقل مشخص شده‌است. در نتایج حاصل از این تحقیق *S. nemorosa* با کلاد دوم این جنس در دندروگرام حاصل از ژن *trnL-F* گروه کاملا مستقلی را تشکیل داده است. مقادیر بوت استرپ حاصل از تحلیل این ژن در این تحقیق از نتایج (۲۰۱۳) Wang et al. تبعیت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.8.1]

می‌نماید. قابل ذکر است که با استفاده از ژن *matk* نیز ویژگی چند نیایی بودن در گونه‌های متعلق به جنس *Salvia* به نمایش گذاشته شده‌است. لذا هر دو ژن در این زمینه کارآمد تلقی می‌شوند.



شکل ٤- درخت فیلوژنی ژن *trnL-F* از گیاه *Salvia nemorosa* با cut off 50%

در این مطالعه بر اساس این معیارها، هر سه ژن گزینه‌های مناسبی برای این کار بودند. در نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که ژن *trnL-F* قادر به آشکار سازی شباهت بین *S. nemorosa*, *S. pratensis*, *S. tesquicola* و *S. sylvestris* است (۸۷ درصد بوت استرپ). در همین راستا ژن *matK S. nemorosa* را از *S. tesquicola* تفکیک نموده است ولی هر دو در یک کلاد قرار گرفته‌اند (٦٤ درصد بوت استرپ). شایان ذکر است که در بررسی که بر روی ترکیبات فلاونوئیدی *S.nemorosa* که در ایران صورت گرفت نتایج حاکی از این بود که جمعیت‌های متعلق به این گونه گروه‌های متمایزی را با سایر گونه‌های متعلق به این جنس تشکیل داده است. مضاف بر اینکه تنوع الگوهای فلاونوئیدی نیز در این گونه به چشم می‌خورد (Kharazian 2014). هم‌چنین با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP مشخص شد که جمعیت‌های مختلف این گونه گروه‌های متمایزی را تشکیل می‌دهد که از گونه مشابه خودش یا *S. virgata* مشخص می‌باشد (Sajadi et al. 2009). احتمال دارد که این ژن برای تفکیک در سطح گونه‌های این جنس کارآمدتر باشد. این ژن نیز قادر است تا شباهت بین *Th. syriacus*, *Th. serpyllum* و *Th. spinulosus* را نیز آشکار سازد (80 درصد بوت استرپ) ولی ژن *rbcl* در تفکیک گونه‌های این جنس توانایی کافی را نشان نداده است. احتمالا این امر مربوط به تنوع موجود در ژنوم این جنس باشد که اطلاعاتی را پیرامون اساس ژنتیکی در اختیار می‌گذارد (Al-Qurainy et al. 2014). علاوه براین، در مطالعه‌ای بر روی گونه‌های مختلف جنس *Thymus* توالی‌های متعلق به ژن‌های *matk* و *rbcl* تغییرات قابل ملاحظه‌ای در بین گونه‌ها آشکار ساختند. اختلافات ژنتیکی درون گونه‌ها و با بهره‌گیری از ژن‌های *matk* ٤٦ درصد گزارش شد در حالی‌که ژن *rbcl* تنوعی را در این سطح آشکار نساخت (Federici et al. 2013). در نتایج حاصل از این تحقیق نیز ژن *rbcl* پنج دودمان جداگانه را آشکار کرده است. به‌طوری که با نتایج حاصل از سایر ژن‌های به‌کار گرفته (*matk* و *trnH-psbA*) در گونه‌های جنس *Thymus* مطابقت دارد (Federici et al. 2013). کلیه این تغییرات مشاهده شده مرتبط با ساختار ژنتیکی پیچیده در این جنس، موتاسیون در DNA، دورگه‌گیری بین گونه‌ای، رخدادهای پلی پلوئیدی، پلی مورفیسمی و گونه‌زایی می باشد (Federici et al. 2013). در گزارش‌های ارائه شده توسط Fedirici et al. (۲۰۱۳) (L.) Hoffmanns *Th. capitatus* از سایر گونه‌های این جنس مجزا شده‌است که حتی به‌عنوان یک برون گروه نیز رفتار می‌نماید. شایان ذکر است که در نتایج حاصل از این تحقیق نیز با بهره‌گیری از ژن *rbcl* و *matk* چنین نتیجه‌ای حاصل شده‌است.

در نهایت، نتایج نشان می‌دهد، ژن‌های کلروپلاستی تعیین توالی شده به‌عنوان بارکدهای DNA، نشانگرهای فیلوژنتیکی مناسبی هستند که می‌توانند برای شناسایی نمونه‌های جدید از گونه‌های *Salvia* و *Thymus* به‌کار روند و نتایج دقیقی را در کوتاه‌ترین زمان ممکن فراهم سازند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-24]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.8.1]

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه شهرکرد و دانشگاه محقق اردبیلی به‌خاطر حمایت‌های مالی و معنوی‌شان قدردانی می‌کنند.

منابع

Al-Qurainy F, Khan S, Nadeem M, Tarroum M and Gaafar A.R.Z. (2014) Selection of DNA barcoding loci for *Nepeta deflersiana* Schweinf. ex Hedge from chloroplast and nuclear DNA genomes. Genetetic and Molecular Research 13:1144-1151

Talebi SM, Mahdiyeh M, Gorbani Nohooji M and Akhani, M. (2018) Analysis of trichome morphology and density in Salvia nemorosa L. (Lamiaceae) of Iran. Botanica 24:49-58

Bafeel SO, Arif IA, Bakir MA, Khan HA and Al-Ahmad, H.(2011) Research note comparative evaluation of PCR success with universal primers of *maturase K* (*matK*)and *ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit* (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. Plant Omics Journal 4: 195-198.

Federici S, Galimberti A, Bartolucci F Bruni I, De Mattia F, Cortis P and Labra M. (2013). DNA barcoding to analyse taxonomically complex groups in plants: the case of *Thymus* (Lamiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society. 171:687-699.

Wattoo JI, Saleem MJ, Shahzad MS, Arif M, Hameed A, Saleem MA (2016) DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of rbcl and matK genome regions in three divergent plant species. Advancement in Life Science 4:3-7.

Hossinzadeh Colagar, A Mahmoudi Otaghvari A, Badbar M (2014) The investigation of chloroplast marker trnL-F in determination of different between two species of *Populus*: *P. caspica* and *P. alba*. Journal of Cellular and Molecular Researches 27: 506-519

Jamzad M, Rustaiyan A, Jamzad Z and Masoudi S (2011). Essential Oil Composition of *Salvia indica* L., *Thymus caucasicus* Wind. Ex Ronniger subsp. Grossheimii (Ronniger) Jalas. and *Ballota nigra* L. Three Labiatae Species from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants 14: 76-83.

Kharazian N, Chemotaxonomy and flavonoid diversity of *Salvia L.* (Lamiaceae) in Iran. (2014). Acta Botanica Brasilica 28: 281-292.

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA and Janzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:8369-8374.

Okada H (2007) Speciation process of *Salvia* isensis (Lamiaceae), a species endemic to serpentine areas in the Ise-Tokai district, Japan, from the viewpoint of the contradictory phylogenetic trees generated from chloroplast and nuclear DNA. Journal of Plant Research 120: 483-490.

Quandt D, Müller K, Stech M, Frahm JP, Frey W, Hilu KW, Borsch T (2004) Molecular evolution of the chloroplast *trnL-F* region in land plants. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 98: 13-37.

Sajadi SS, Shiran B, kharazian N hooshmand S, Sorkhe K, (2009) Genetic Diversity of Salvia Species of Chaharmahal va Bakhtiari and Esfahan Provinces through AFLP Molecular Markers. Iranian Journal of Horticultural Sciences 40:79-88 (In Farsi).

Green MR and Sambrook J (2014). Molecular Cloning- a Laboratory Manual, Cold Spring harbor laboratory Press.

Shirmardi HA, Mozaffarian V, Gholami P, Heidari G and Safaei M (2014). Introduction of the flora, life form and chorology of Helen protected area in Chaharmahal and Bakhtiari province. Iranian Journal of Plant Biology 6:75-96 (Farsi)

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Brochmann C and Willerslev E (2007) Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic Acids Research 35: 14

Prasanth RV, Kandisa RV, Varsha PV and Satyam S (2014). Review on Thymus vulgaris Traditional Uses and Pharmacological Properties. Medicinal and Aromatic Plants 3:1-3.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-24]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.8.1]