ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

رمزگذاری میله ای دی .آن.آ. **Buplerum** در طب چینی

چکیده

چهار نشانه گر یعنی فاصله گذار و جدا کننده رونوشت برداری شده داخل هسته ای (ITS2)2 ،psbA-trnH,matk,rbc1 را جهت بررسی و ارزیابی بارکدهای دی آن ا به منظور تمیز Bupleuri radix(Chaihu) از نمونه های تقلبی آن آزمایش شد . 51 نمونه از گیاهان Buplerum که نشانگر 19 گونه بودند ، از مناطق مختلف کشور چین جمع آوری شدند.فزون سازی و ترتیب گذاری در تمامی 4 ناحیه کاندیدا و داوطلب بارکد انجام شد ، که اعتبار آن از نظر و برحسب میزا ن و مقدار موفقیت فزون سازی و ترتیب گذاری PCR ، اختلاف خاص داخل و بین تفاضلی ارزیابی شد. فاصله رمزگذاری میله ای DNA و توانایی تمیز گونه ها ارزیابی شد. نتایج تحقیق ثابت میکند که عملکرد ITS2 در تشخیص Buplerum با اثر بخشی تشخیص و بازشناسی 73.68٪ بهتر از گونه های دیگر بوده است به طوری که این میزان اثر بخشی پس از ترکیب با psbA-trnH به 83.33 درصد افزایش یافت. سپس اثر بخشی ITS2 را جهت تمیز گونه های Buplerum با استفاده از بانک اطلاعاتی GenBank که به داده های 223 نمونه از بین 24گونه دست یافتیم ، بررسی کردیم و ITS2 موفق به بازشناسی و تمیز 64.13٪ نمونه در سطح گونه ها شد. در نتیجه ، ITS2 میتواند به صورت یک بارکد مفید در گونه های Buplerum استفاده شود و psbA-trnH به صورت لوکوس یا جایگاه (ژن) مکمل استفاده شود.

کلمات کلیدی : رمز گذاری میله ای DNA، Buplerum،Bupleuri radix(Chaihu)، ITS2، بازشناسی و تمیز ، طب سنتی چین

مقدمه

Chiatu (Bupleuri radix) ، ریشه های خشک Bupleurum DC چینی و B.Scorzonerifolium Willd یکی از گیاهان معروف طب سنتی چین با تاریخچه مصرف و کاربرد پزشکی بیش از دو هزار سال است . طب سنتی چین بر این باور است که Chiatu متابولیسم داخلی و بیرونی بدن را تضمین میکند و گرمای زیان

آور و مضر را از سطوح خارجی و پهنه مساحت پراکنده می کند ، درد کبد را تسکین می دهد و از نظر افرادی چون یانگ و کی (که "انرژی حیات " و " نیرو حیات و عمر" را در نظریه TCM بیان کردند) حمایت میکند. نقض و نارسایی از نظر یانگ و کوی منجر به نقصان و کاهش کارکردهای بدن می شود و این کاهش و نقصان منجر به کاهش متابولیسم و بد کارکردی کل بدن یا اندام های خاص می شود. نشانه های چون اعتماد به نفس پایین ، خستگی و ضعف ، کاهش اشتها ، اسهال مزمن ، پایین افتادگی رو به پایین اندامها (مثل پرولاپس رکتوم ، افتادگی معده ، پرولاپس رحم) تمامی نشانه های از نقض و عیب کارکرد دستگاه های بدن و بی اعتباری نظریه یانگ و کیو است . Chiatu یکی از مولفه های مهم تجویز درمان مثل نشانه های است که نظریه یانگ و کیو را تایید و حمایت میکنند. Chiatu براساس راهنما دارویی کشور چین در درمان سرماخوردگی همراه با تب ، آنفلوانزا ، هیپاتیت ، مالاریا ، پرولاپس رحم ، پرولاپس رکتوم ، دوران قاعدگی های طولانی) مفید است .

Bupleurum L(Apiaceae) تقریباً دارای 150 گونه در سرتاسر جهان است . حدود 44 گونه ، 17 نوع و 7 ریخت از Bupleurum L(Apiaceae) در کشور چین شناسایی شده است ، که بین 27 ایالت کشور چین توزیع شده اند (شهرهای مناطق خود مختار) . اگر چه کاربرد بالینی دو گونه فوق الذکر رسماً در کتاب راهنما دارویی چین تایید شده است ، اما کاربرد پزشکی 26 گونه ، 6نوع و 1 ریخت از Bupleurum مثل B.longiradiatum Turcz دارای عناصر سازنده سمی و B.hamiltoni Balak دارای محتویات غیر قابل تشخیص سایکو سوفانین است . حتی 5 یا 6 گونه مختلف از Bupleurum محلی در برخی از مناطق به نام Chiatu مصرف و استفاده می شوند . این سردرگمی (عمدی یا غیر عمدی) منجر به ایجاد کیفیت های نسبتاً متغیر مواد خام Chiatu در بازار چین می شود.

تشخیص دقیق داروهای خام برای کاربرد ها و مصارف امن بالینی Chiatu در روشهای پزشکی TCM و برای تحقیقات دارو شناسی و شیمیایی مهم است . معهذا، تحقیقات مرسوم آناتومی و شیمی آرایه ای ارزش محدود و اندکی را برای تعیین منشاء گیاهی و کنترل کیفیت Chiatu قائل شدند ، و از این رو، به روش معتبرتری برای شناسایی و تشخیص منشاء گیاهی و کنترل کیفیت Chiatu نیاز می شود. اقداماتی جهت بررسی احتمال عملی و

کـاربرد پـذیری تـوالی هـای فاصـله گـذار رونوشـت شـده داخلـی (ITS) جهـت تعیـین هویـت گیاهـان طبـی Bupleurum انجام شده است .متوجه شدیم که آرایش خطی و صف بندی همساخت و متناظر توالی هـای ITS بین اعضاء ژن Bupleurum و برون گروه یا گروه های بیگانه کمتر از 75٪ بوده است ، در حالی که آرایش خطی درون گروهی بیش از 87 درصد بود ، به طوری که نمونه های گیاهان مشابه حـداقل 99درصـد بـا ITS شـباهت داشتند . بنباراین پیشنهاد و توصیه میکنیم که توالی های ITS به عنـوان نشـانگرهای معتبـر مولکـولی تشـخیص Chiatu استفاده شوند ، البته نیز 6 گروه دیگر از گونه های مختلف را بـا تجـانس و تشـابه بـیش از 99درصـد توالی ITS کشف کردیم ، به طوری که این گونه ها به وسیله توالی ITS قابل تشخیص و بازشناسی نبودند.

کد گذاری میله ای یا بارکد DNA روش تشخیص و شناسایی گونه های است که شـامل ترتیـب گـذاری و ردیـف گذاری ناحیه خاص و استاندارد DNA می شود. این روش ابتدا به وسیله هربرت و همکـاران (2003a) طراحـی شود و این روش به عنوان یکی از ابزارهای قدرتمند تشخیص و بازشناسی گونه ها ثابت شـده اسـت . سـیتوگروم یـا رنگ یاخته (واحد فرعی 2 منطقه میتوکندری را اکسیده می کنـد (COI)) بـه صـورت ناحیـه اسـتاندارد بارکـد تشخیص و شناسایی دامنه وسیعی از جانوران ظاهر و هویدا می شود ، اما نسبت تحول و تکامل آن در کاربرد هـای گیاهی بسـیار کنـد اسـت . کـریس در سـال 2005 اسـتفاه مرکـب و مخـتلط از psbA-trnHو ITS دی آن آ ریبوزومی هسته ای را برای شناسایی گیاهان توصیه کرد ، و چیس و همکاران (2005) و نیوماسـتر و همکـاران (2006) rbcl را برای این منظور و هدف توصیه کردند . ترکیب rbcl و matK به عنوان بارکد اصلی تشخیص و شناسایی گیاهان زمینی به وسیله CBOL گروه کاری گیاهان (2009) توصیه شد . اما از آنجایی که اثر بخشی های بازشناسایی ، تقویت و فزون سازی مناطق پیشنهادی در گروه های مختلف گیاهان متفـاوت اسـت ، اقـدامات مداوم و پیوسته ای جهت ارزیابی و بررسی نشانه های کلی بار کد گیاهان انجام شـده اسـت . چـن و همکـاران (2010) در یک تحقیق با استفاده از یک نمونه بزرگ ثابت کردند که مناطق جـدا سـاز 2 رونوشـت شـده داخلـی هسته (ITS2) نه تنها دارای اثر بخشی بالا تقویت و فزون سازی بودند بلکه نیز دارای اثر بخشی بالا بازشناسی 90٪ بودند ، و آنها استفاده از ITS2 را به عنوا ن یکی از بارکدهای بالقوه شناسایی گیاه توصیه کردند.

در این تحقیق 4 لوکوس یا جایگاه کاندید را یعنی مناطق ژن های کلروپلاست rbcl ، matK ، psbA-trnH و ITS2 از نظر اعتبار بارکدهای DNA و به منظور شناسایی گونه های گیاه طبی Bupleurum آزمایش کردیم . هدف ما از این کار تایید و تثبیت سیستم بارکد DNA Bupleurum چینی بود که اطلاعات کلی نمونه های دارو خام Chiatu را جهت تسهیل تشخیص Chiatu در اختیار ما قرار می داد و نظریه های بهتری را در مورد روابط ژنتیکی و فیلوژنی گونه های Bupleurum ارایه می داد.

مواد و روشهای تحقیق

نمونه گیری تاکسونی

در کل و مجموع ، 51 نمونه حاوی 19 گونه Bupleurumاز مناطق مختلف چین مثل استان های Yunnan,Hebei,Shanxi,Gansti جمع آوری شدند. تمام گونه های گیاهی به وسیله یکی از چهار نویسنده زیر یعنی چائو زی ، و پرفسور پان شانگلی دانشکده دارو سازی ، دانشگاه فودان شناسایی شدند. داروهای خام Bupleuri radix به شکل ریشه های خشک از بازار محلی خریداری شدند.

نمونه اسناد این گیاهان در دانشکده طب سنتی جین ، دانشگاه پزشکی Southern نگهداری می شوند. اطلاعات کامل در مورد مواد مورد استفاده و توالی های بدست آمده در تحقیق در جدول 1 نشان داده شده است .

استخراج DNA، فزون سازی ، تقویت و ردیف گذاری

DNA ژنومی از نمونه برگ خشک شده در ژل سیلیکا با استفاده از کیت عصاره DNA ژنومی گیاه طبق پروتکل تولید کننده استخراج شد . کیفیت نمونه های DNA استخراج شده جهت تضمین مناسب آنها برای تقویت و فزون سازی متوالی ثابت شد. امکان بارکد کذاری Bupleurum در 4 ناحیه کد گذاری میله ای (rbcl,matK,psbA-trnH,ITS2) آزمایش شد . جلودار و آغاز گر عمومی مورد استفاده جهت تقویت این چهار منطقه به شرح زیر بودند : rbcl,1F,724R (فای و همکاارن 1997) ، matK,390F,1326R (کونوئید و همکاران 2003) ، psbA-trnH,trnHf(تات و سیمپسون 2003) و psbA3f(سانگ و همکاران 1997) . جلودار و آغاز گر پیشرو (5′-cgtagcgaaatgcgatacttggtg-3′) به منظور تقویت ITS2 به وسیله

محققان طراحی شد و ITS4آغاز گر برگشتی یا وارونه بود. (وایت و همکاران 1990) . تقویت PCR در مخلوط و ترکیب 25µl واکنشی انجام شد که هر آغاز گر حاوی $12.5\mu l2 \times$ $1\mu l$, مخلوط یا ترکیب بی رنگ $Taq\ PCR$ ، DNA 1µl ژنومی ، و $9.5\mu l ddH_2O$ بودند. شرایط تقویت PCR به شرح زیر بود ، در دما 93درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه ، 53درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه ، دو دقیقه پس از انجام 35 چرخه در دما 93 سانتی گراد به مدت سی ثانیه و 53 درجه سانتی گراد به مدت 45ثانیه ، و 70درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه با بسط و کشیدگی نهایی در دما 70درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه . فرآورده های PCR با 1.2٪ الکتروفروز ژل آگاروز شناسایی شدند و زیر نوع فرا بنفس رویت شدند. فرآورده ها پس از خلوص سازی در هر دو مسیر با شرکت با مسئولیت محدود Invitrogen Biotechnology ترتیب گذاری و ردیف گذاری شدند.

استخراج ، تقویت ، و ردیف سای DNA در نمونه های داور خام Chaihu به روشهای یکسان و تحت شرایط فوق الذگر انجام شدند.

تحلیل توالی

توالی های DNA با استفاده از نرم افزار Clustral X(تامپسون و همکاران 1997) و Mega5.0(تامورا و همکاران 2007) در یک ردیف قرار گرفتند و با نسخه Codoncode Aligner3,7.1 به یکدیگر جفت شدند . بعلاوه ، مرز و حدود تمام توالی های ITS2 در تحقیق ما بر اساس روش های حاشیه نویسی و اطلاعات ضمیمه ای مدلهای پنهان مارکوف (HMM) تعیین میشوند.

متوسط فاصله درون – بین گونه ای به منظور ارزیابی تغییرات درون گونه ای و واگرایی بین گونه ای محاسبه شدند(مایر و پاولی 2005، مایر و همکاران 2008) . آزمایشات رده بندی علامتی و آزمایشات دو –نمونه ای جهت تحلیل نتایج استفاده شدند. اختلافات بارکد گذاری DNA با استفاده از برنامه TaxonDNA (مایر و همکاران 2006) جهت ارزیابی و بررسی توزیع اختلافات بین و درون گونه ای هر یک از موضع های ژنهای کاندیدا استفاده

شدند. بعلاوه ، روشهای BLAST1 و نزدیکترین فاصله ژنتیکی (را س و همکاران 2008) برای آزمایش و بررسی اثر بخشی شناسایی و تشخیص پونه ها استفاده شدند .

Species	Specimen voucher	Locality	Collected date	ITS2	psbA	matK	rbcL
B. angustissimum	liangzhenbiao 081804	Pingshan, Hebei	2009/8/18	+	+	+	+
B. angustissimum	chaozhi 82801	Liupanshan, Ningxia	2009/8/28	+	+	–	+
B. candollei	liuli 0908063	Huize, Yunnan	2009/8/6	+	+	+	+
B. choishoui	liuli 0908102	Wenchuan, Sichuan	2009/8/10	+	+	–	+
B. chinense	chaozhi 72801	Songshan, Beijing	2009/7/28	+	+	+	+
B. chinense	liangzhenbiao 081103	Handan, Hebei	2009/8/11	+	+	+	+
B. chinense	chaozhi 82805	Longde, Ningxia	2009/8/28	+	+	+	+
B. chinense	ciwei 090813	Dalian, Liaoning	2009/8/13	+	+	+	+
B. chinense	chaozhi 090626	Feixi, Anhui	2009/6/26	+	+	+	+
B. chinense	liangzhenbiao 081803	Pingshan, Hebei	2009/8/18	+	+	+	+
B. chinense	chaozhi 090725	Chicheng, Hebei	2009/7/25	+	+	+	+
B. chinense	liuli 0908209	Xihe, Gansu	2009/8/20	+	+	+	+
B. chinense	liuli 0908151	Zhenba, Shanxi	2009/8/15	+	+	–	+
B. chinense	liuli 0908155	Zhenba, Shanxi	2009/8/15	+	–	–	+
B. chinense	liuli 0908162	Zhenba, Shanxi	2009/8/16	–	–	–	+
B. chinense	liuli 0908223	Dingxi, Gansu	2009/8/22	+	+	+	+
B. chinense	liuli 82001	Xihe, Gansu	2009/8/20	+	–	+	+
B. chinense	liuli 0908201	Xihe, Gansu	2009/8/20	+	+	–	+
B. chinense f. *chiliosciadium*	liuli 0908221	Dingxi, Gansu	2009/8/22	+	+	+	+
B. chinense f. *octoradiatum*	chaozhi 72604	Chicheng, Hebei	2009/7/26	+	+	+	+
B. chinense f. *vanheurckii*	chaozhi 72904	Songshan, Beijing	2009/7/29	+	+	+	+
B. falcatum	chaozhi 111028	Nagasaki, Japan	2011/10/28	+	+	+	+
B. falcatum	liangzhenbiao 081501	Anguo, Hebei	2009/8/15	+	+	+	+
B. hamiltonii	liuli 0908041	Kunming,Yunnan	2009/8/4	+	+	+	+
B. hamiltonii	liuli 0908021	Lijiang, Yunnan	2009/8/2	+	+	+	+
B. longicaule var. *giraldii*	liuli 0908161	Zhenba, Shanxi	2009/8/16	+	+	–	+
B. longiradiatum	ciwei 090805	Mudanjiang, Heilongjiang	2009/8/5	+	+	–	+
B. longiradiatum	ciwei 090802	Jiamusi, Heilongjiang	2009/8/2	+	–	–	+
B. longiradiatum	ciwei 0908101	Changbaishan, Jilin	2009/8/10	+	+	+	+
B. longiradiatum f. *australe*	chaozhi 0907019	Huangshan, Anhui	2009/7/19	+	+	–	+
B. malconense	liuli 0908101	Wenchuan, Sichuan	2009/8/10	+	+	–	+
B. marginatum	liuli 0908062	Huize, Yunnan	2009/8/6	+	+	+	+
B. marginatum var. *stenophyllum*	liuli 0907312	Dali, Yunnan	2009/7/31	+	+	+	+
B. marginatum var. *stenophyllum*	liuli 0907301	Dali, Yunnan	2009/7/30	+	–	–	+
B. marginatum var. *stenophyllum*	liuli 0907311	Dali, Yunnan	2009/7/31	+	+	+	+
B. petiolulatum var. *tenerum*	liuli 0908031	Lijiang, Yunnan	2009/8/3	+	–	+	+
B. polyclonum	liuli 0908061	Huize, Yunnan	2009/8/6	+	+	+	+
B. scorzonerifolium	liangzhenbiao 081101	Handan, Hebei	2009/8/11	–	+	–	+
B. scorzonerifolium	ciwei 090801	Jiamusi, Heilongjiang	2009/8/1	+	+	–	+
B. scorzonerifolium	chaozhi 090722	Quanjiao, Anhui	2009/7/22	+	+	–	+
B. scorzonerifolium	chaozhi 72601	Chicheng, Hebei	2009/7/26	+	+	–	+
B. sichuanense	liuli 0908111	Wenchuan, Sichuan	2009/8/11	+	+	+	+
B. smithii	chaozhi 72903	Songshan, Beijing	2009/7/29	+	+	+	+
B. smithii var. *parvifolium*	chaozhi 82803	Liupanshan, Ningxia	2009/8/28	+	+	–	+
B. yinchowense	liuli 090815	Zhenba, Shanxi	2009/8/15	+	–	–	+
B. yinchowense	liangzhenbiao 082204	Yizhou, Shanxi	2009/8/22	–	–	+	+
B. yinchowense	liangzhenbiao 082202	Yizhou, Shanxi	2009/8/22	+	+	+	+
B. yinchowense	liangzhenbiao 082402	Yuncheng, Shanxi	2009/8/24	+	+	+	+
B. yinchowense	liuli 0908208	Xihe, Gansu	2009/8/20	+	+	–	+
B. yinchowense	liuli 908206	Xihe, Gansu	2009/8/20	+	+	+	+
B. yinchowense	chaozhi 82804	Longde, Ningxia	2009/8/28	+	+	+	+

جدول 1

	ITS2	psbA-trnH	matK	rbcL
Amplicon length (bp)	226–227	328–367	(823–)882–883	(923–)932–933
PCR efficiency (%)	100	96.08	66.67	100
Sequencing efficiency (%)	100	87.76	94.12	100
Idetification efficiency (%)				
Blast1	73.68	72.22	46.15	26.32
Nearest distance	52.63	44.44	30.77	21.05

جدول 2

	ITS2	matK	psbA-trnH	rbcL
All inter-specific distance	0.0616 ± 0.0426	0.0100 ± 0.0074	0.0298 ± 0.0358	0.0039 ± 0.0040
Theta prime	0.0681 ± 0.0282	0.0116 ± 0.0052	0.0351 ± 0.0265	0.0039 ± 0.0021
Minimum inter-specific distance	0.0204 ± 0.0282	0.0036 ± 0.0065	0.0098 ± 0.0205	0.0006 ± 0.0015
All intra-specific distance	0.0048 ± 0.0108	0.0043 ± 0.0030	0.0111 ± 0.0139	0.0025 ± 0.0022
Theta	0.0252 ± 0.0372	0.0076 ± 0.0062	0.0186 ± 0.0284	0.0026 ± 0.0027
coalescent depth	0.0295 ± 0.0359	0.0096 ± 0.0053	0.0249 ± 0.0289	0.0045 ± 0.0048

جدول3

W+	W−	Correlation between the inter-specific variation, n, p	Results
ITS2	matK	W+ = 66640, W− = 1256, n = 378, p = 1.10E − 57	p < 0.05 ITS2 > matK
ITS2	psbA	W+ = 246957, W− = 11164, n = 724, p = 8.47E − 100	p < 0.05 ITS2 > psbA
ITS2	rbcL	W+ = 466340, W− = 1688, n = 981, p = 1.48E − 157	p < 0.05 ITS2 > rbcL
matK	psbA	W+ = 843, W− = 47362, n = 314, p = 4.35E − 49	p < 0.05 matK < psbA
matK	rbcL	W+ = 75033, W− = 2388, n = 405, p = 1.86E − 58	p < 0.05 matk > rbcl
psbA	rbcL	W+ = 263961,W− = 11692, n = 762, p = 1.94E − 103	p < 0.05 psba > rbcl

جدول4

W+	W−	Correlation between the intra-specific variation, n, p	Results
ITS2	matK	W+ = 1264, W− = 1976, n = 87, p = 0.088	p > 0.05 ITS2 = matK
ITS2	psbA	W+ = 716, W− = 3200, n = 96, p = 2.37E − 7	p < 0.05 ITS2 < psbA
ITS2	rbcL	W+ = 6077, W− = 3514, n = 147, p = 0.006	p < 0.01 ITS2 > rbcL
matK	psbA	W+ = 51, W− = 1779, n = 64, p = 2.01E − 10	p < 0.05 matK < psbA
matK	rbcL	W+ = 3319, W− = 597, n = 91, p = 1.49E − 8	p < 0.05 matK > rbcL
psbA	rbcL	W+ = 3870, W− = 501, n = 99, p = 1.09E − 10	p < 0.05 psbA > rbcL

جدول5

نتایج تحقیق

کیفیت خوب نمونه های DNA حاصل تمامی مواد آزمایش بود. 4 ناحیه کاندید بارکد تقویت و ردیف گذاری شدند . اندازه بزرگ شدگی یا بسط به شرح زیر بود : اندازه ITA2: 226-227bp ، اندازه psbA-trnH: 328-367bp ، اندازه rbcl: 932-bp(~923) ، اندازه matK : 882-883bp(~823) بود. اثر بخشی تقویت و توالی و ردیف سازی PCR یکی از شاخص های مهم ارزیابی کاربرد پذیری بارکدهای DNA است . مقدار تقویت و توالی سازی مناطق ITS2 و rbcL در گونه های آزمایش (جدول 2) 100٪ بود. نسبت و مقدار موفقیت PCR در psbA-trnHوmatK با اثر بخشی ردیف گذاری 87.76٪ و 94.12٪ به ترتیب 96.08٪ و 66.67٪ بود. تغییرات داخل و بین گونه ای چهار بارکد کاندید با شش متریک (چان و همکاران 2010) (جدول 3) ارزیابی شدند. میانگین مسافت درون گونه ای ، میانگین آغاز و اول تتا ، و حداقل مسافت بین گونه ای جهت ارزیابی واگرائی بین گونه ای استفاده شد . ITS2 از بین 3 منطقه کاندید بارکد در تمام سه بعد دارای بالاترین واگرائی بین گونه ای بود ، و پس از آن مناطق بارکد PsbA-trnHو matK دارای بالاترین واگرائی بین گونه ای بودند ، و rbcl

دارای پایین ترین واگرائی و اختلاف بین گونه ای بود. میـانگین مسـافت و فاصـله درون گونـه ای و میـانیگن عمـق پیوسته در سطح درون گونه ای به منظور بررسی تغییر درون گونه ای استفاده شدند. psbA-trnH دارای بـالاترین میانگین مسافت درون گونه ای بود و پس از آن به ترتیب ITS2 و matK دارای بالاترین مسـافت درون گونـه ای بودند ، و rbcl دارای کمترین فاصله درون گونه ای بود. ITS2 مانند دو پارامتر دیگر (تتا و میانیگن عمق پیوسته) بالا ترین سطح تغییر درون گونه ای را نشان داد و پس از آن psbA-trnH دارای بالاترین سطح تغییـر درون گونـه ای بود. تمام 4 ناحیه بالاترین تغییر پذیر ی ژنتیکی را در بین گونه ها نشان دادند.

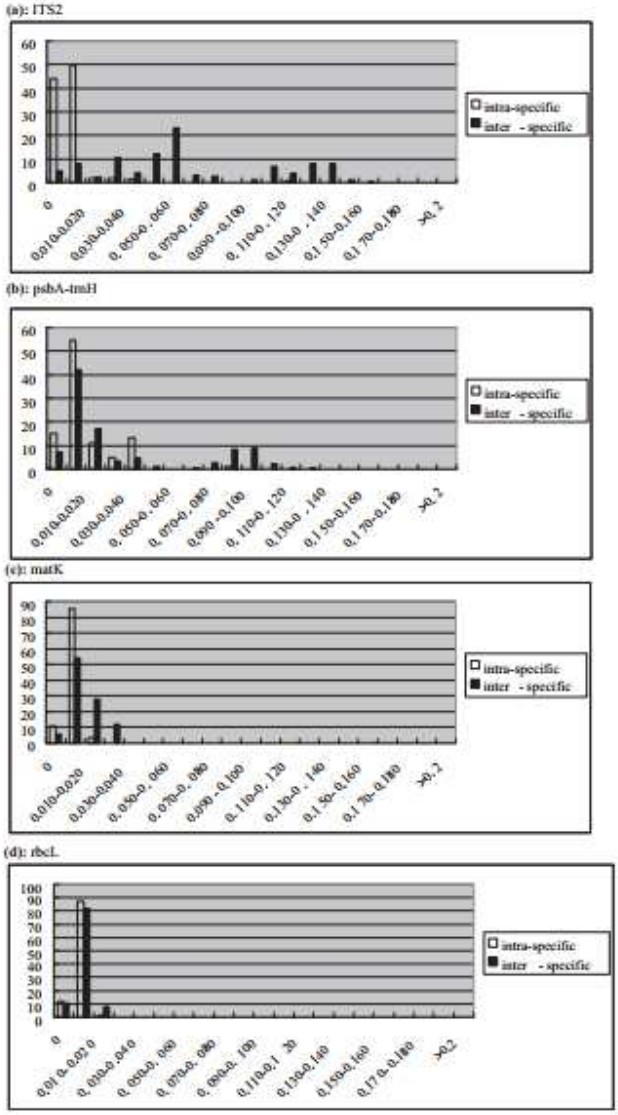
آزمایشات درجه بندی نشانه ای داده های واگرایی بـین و درون گونـه ای ویلکسـون نتـایج یکسـانی را نشـان داد (جدولهای 4 و 5) . تحقیق ثابت کرد که ITS2 و psbA-trnH مناسبترین بارکدهای DNA را ارایه می دهند.

توزیع های اختلافات و واگرایی های بین گروهی را در برابر درون گروهی 4 بارکد در مقیاس واحدهای مسافت 0.001 (شکل 1) بررسی کردیم . نمودار میلیه ای واگرائی در این شرایط ایده ال تغییر بین گونه ای را نشان می دهد که سمت چپ آن دارای اعداد کوچکتر است ، در حالی که اعداد سمت راست حاکی از تغییر درون گروهی بزرگتر است . براساس شکل 1 ، ITS2 علی رغم هم پوشی اندک ، که در rbcL بسیار مشهود بود، اختلافات متمایزی را بین توزیع های تغییرات درون و بین گروهی نشان داد. بنابراین ، فرض می کنیم ، که ITS2 میتواند برای تمیز و بازشناسی اکثر گونه های مورد بررسی در این تحقیق استفاده شود.

یک بارکد ایده ال و مناسب توانایی بالا تمیز و بازشناسی گونه ها را نشان می دهد (کرس و همکاران 2005، لاهی و همکاران 2008، هولینگ ورث و همکاران 2009) . روشهای BLASTI و نزدیکترین فاصله و مسافت ژنتیکی جهت برآورد و تخمین کاربرد پذیر 4 لوکوس و جایگاه تشخیص و شناسایی گونه ها (جدول 5) استفاده شد. از آنجایی که روش BLASTI دارای دقت بازشناسی و محاسبه سرعت بهتری از روش نزدیکترین فاصله بود ، از اثر بخشی بازشناسی و تشخیص BLASTI به عنوان ملاک ارزیابی بارکدهای کاندید در این تحقیق استفاده کردیم . نتایج ما نشان می دهند که ITS2 دارای بالاترین توانایی تصحیح و اثبات درستی بوده و 73.68٪ از نمونه های آزمایش را در سطوح گونه ها شناسایی می کند. psbA-trnH پس از ITS2 اثر بخشی شناسایی 72.22٪ را

نشان داد. اثر بخشی شناسایی پس از ترکیب ITS2و psbA-trnH به 84.21 درصد افزایش یافت . در مقابل ، مقادیر شناسایی موفق گونه ها با استفاده از بارکدهای matK و rbcL کمتر از 50٪ بود.

سپس اثر بخشی ITS2 را جهت تمیز و بازشناسی گونه های Bupleurum در مقایس بزرگتر بررسی میکنیم . توالی های ITS2 ، 173 نمونه (که 73 گونه Bupleurum را نشان می داد) از GenBank جهت ایجاد یک پایگاه بزرگتر داده ها (نیوس و واتسون 2004، یانگ و همکاران 2007، اکسی و همکاران 2009، وانگ و همکاران 2008a,b,2011) گرفته و بارگذاری شدند . متوجه شدیم که ITS2 64.13٪ از نمونه ها را در سطح گونه ای تمیز و بازشناسی میکند.



شکل 1

بحث و استدلال

ارزشیابی کاربرد پذیری چهار بارکد کاندید

یک بارکد ایده ال و مناسب DNA باید دارای تقویت بالا PCR و اثر بخشی بالا ردیف گذاری ، واگرایی های مهم درون گونه ای و حداقل تغییر بین گونه ای باشد . گروه کاری گیاه CBOL ترکیبی از rbcL+matK را به عنوان بارکد گیاه پیشنهاد و طراحی کرد ، دو قطعه با عمومیت آغاز گر خوب و اثر بخشی بالای تقویت ، کیفیت خوب توالی و قدرت بالای تمیز و بازشناسی مشخص شدند. rbcL در تحقیق حاضر 100درصد اثر بخشی توالی و تقویت را نشان می دهد ، اما اثر بخشی شناسایی آن فقط 26.32٪ بود. اثر بخشی تقویت این بارکد مانند MatK همراه با آغاز گر عمومی پیشنهادی 390F-1326R فقط 66.67٪ بود و اثر بخشی شناسایی 46.15٪ بود. بسیاری از تحقیقات ثابت کردند که rbcl و matK نسبت به حل و رفع مسائل فیلو ژنتیکی در رده های بالاتر تاکسونومیکی آگاهی دهنده هستند و اطلاعاتی عمل میکنند ، اما در بررسی مسائل رده های پایین تر مثل تمیز و بازشناسی گونه ها ناتوان هستند، زیرا این مناطق غالباً فاقد تغییرات گونه های نزدیک به هم به ویژه گونه های دارای تکامل و تحول واگرا هستند (تیان و لی 2007، گائو و همکاران 2011) . سایر پژوهشگران نیز شاهد میزان موفق تقویت و برافزایشی matK بوده اند (کریس و اریکسون 2007، ژئو و همکاران 2011) . تقویت آغاز گر های عمومی پیشنهادی 390Fو 1326R قطعه ای از کل ژن matK است . تغییرات احتمالی در مکان و جایگاه های آغاز گر منجر به شکست و یا عدم تقویت یکی از سه Bupleurum می شود. rbcL و matK قادر به شناسایی Bupleurum در سطح گونه ها نبودند.

چن و همکاران اخیراً ITS2 را به عنوان منطقه بارکد گیاهان معرفی کردند . منطقه ITS2 با طول 220bp دارای نسبت و مقدار بالا تکامل و تحول است ، و با ایجاد تغییرات کافی منجر به تمیز بهتر گونه ها می شود. بعلاوه، قطعه به آسانی به منظور فراهم سازی تشخیص و شناسایی مواد همراه با تجزیه DNA به صورت نمونه ها و داروهای خام تقویت و ردیف گذاری می شود.

در این تحقیق ثابت کردیم که ITS2 بر سایر جایگاه ها مثل بارکد Bupleurum از نظر تقویت و اثر بخشی ردیف گذاری ، اختلاف بارکد ، مقدار شناسایی برتری دارد .

ما با استفاده از آغاز گرهای طراحی شده برای ITS2 ، به 100درصد اثر بخشی ردیف گذاری و تقویت PCR دست یافتیم . ITS2 مانندااثر بخشی شناسایی به تنهایی نسبت و مقدار موفق 73.63٪ را در تمیز و بازشناسایی Bupleurum نشان داد ، نسبت موفق آن در صورت ترکیب و اختلال با توالی های psbA-trnH به 84.21٪ افزایش یافت . بعلاوه ، موفقیت ITS2 کاملاً 64.13 درصد از نمونه ها را در سطح گونه های پایگاه داده بزرگ GenBank شناسایی کرد که شامل 173 نمونه از 73 گونه می شدند.

ما با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می کنیم که مطنقه ITS2 به عنوان بارکدی برای تمیز گونه های Bupleurum ، و psbA-trnH به عنوان جایگاه تکمیلی استفاده شوند.

مزیا و معایب بارکد ITS2 در تمیز گونه های Bupleurum

پیشتر ثابت کردیم که توالی های ITS2 می توانند جهت شناسایی گونه های Bupleurum به عنوان نشانگرهای معتبر مولکولی استفاده شوند، اما آنها قادر به تمیز و تشخیص 6 گروه از گونه های مختلف مثل

(1) B.chinese,B.malconense,B.Sichuanense ،

(2)B.smithii,B.commelynoideum var.flaviflorum,B.sibiricum

,(3)B.scorzonerifolium ,B.angustissimum

,(4)B.rockii,B.petiolulatum var.tenerum,

(5)B.marginatum,B.marginatum var.stenophyllum

,(6) B.candollei,B.hamiltonii (Xie

جواب های اکثر گروه های گونه PsbA-trnH و ITS2 و همکاران ، 2009) نیستند. مناطق بارکد پیشنهادی از گروه 1 و B.malconense به تنهایی قادر به تمیز و شناسایی ITS2ای را ارایه می دهند. مثلاً ، با استفاده B.hamiltonii از B.candolleiو B.commelynoideum var.flaviflorum از B.smithii,

تمیــز داده شــود ، و B.chinese میتوانــد از B.Sichuanense اســت و psbA-trnH و ITS2از ترکیــب از نوع اولیه تمیز داده شود. B.marginatum var.stenophyllum

تمام 4 قطعه بارکد بررسی شده قادر به تمیز و شناسایی B.chinese و B.yinchowense نبود که شـامل اکثـر داروهای تجاری خام Chaitu در بازار می شود. دو گونه با یکدیگر ارتباط نزدیکـی دارنـد ، ویژگـی هـای مشـابه ریخت شناسی را به اشتراک می گذارند و هر دو دارای دانه گرده های بیضوی شکل هستند : تحلیل فیلو ژنتیکی نیز رابطه نزدیک آنها را ثابت کرد (یانگ و همکاران 2007) . همساختی و هم ردیفی توالی بالا 4 نشانگر مولکولی بین این دو گونه ها (حتی تشابه توالی ITS2 به 100درصد می رسد) بازشناسی و تمیز آنها را از یکدیگر مشکل تر می سازد. اما ITS به علت دارا بودن طول کامل میتواند Byinchowense را از B.chinese تشخیص دهد (Xie و همکاران 2009) . ITS طبق نظر گروه گیاهان BOL چینی باید در بارکد اصلی گیاهان دانه دار یکپارچه و ادغـام شود (گروه گیاهان چینی BOL و همکاران 2011) . محدودیت ها و نواقص ITS2 در نمونـه Bupleurum با ITS رفع می شوند. همچنین ITS طول –کامل را (منجمله nrITS1-5.85-ITIS2 با طـول 600-609bp) برخی از گونه های Bupleurum را تقویت و ردیف گذاری کردیم ، امـا مقـدار موفقیـت تقویـت PCR کمتـر از ITS2 بود و این نشان دهنده همسویی خوب این یافته ها با یافته های چس و کـرس (چـس و همکـاران 2007، کرس و اریکسون 2007) بود. بنابراین کل منطقه ITS را از تحقیق بیشتر مستثنی کردیم و ITS2 را بـه عنـوان بارکد اصلی Bupleurum تایید و پذیرفتیم.

اعتبار بارکد پیشنهادی ITS2 در شناسایی دارو خام Chailtu

مجموعه داده هـای DNA مـواد بـرگ در اکثـر تحقیقـات بارکـد DNA تاییـد و اثبـات شـد . البتـه دارو خـام Chailtu از بخش های زیر زمینی گیاهان Bupleurum بدست می یابد. بنابراین ، به منظور بررسی میزان عملیات پذیری مناطق بارکـد ، تشـخیص و شناسـایی داروهـای خـام Chailtu را توصـیه کـردم و ریشـه هـای B.chinese ، B.scorzonerifolium و B.smithii, (بدست آمده از بازار Qingping شهر گونزاگو کـه به وسیله پرفسور پان شانگلی و چائو زی مورد تحقیقـات میکروسـکوپی قـرار گرفتنـد) ، بـرای انجـام آزمایشـات

مقدماتی دو سو کور انتخاب شدند . نمونه ها را علامت گذاری کردیم و از کارشناس فنی ناآگاه از هویت نمونه خواستیم تا آزمایشات زیر را با پیروی از پروتکل ما ، مثل استخراج DNA ، تقویت ITS2 ، ردیف سازی ، و ضربه زنی در پایگاه داده های بارکد Bupleurum انجام دهد. کارشناس فنی به طور صحییح و درستی تمام سه نمونه را تشخیص دادند و شناسایی کردند.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی