



Shahid Bahonar
University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

p-ISSN 2228-6705

e-ISSN 2228-6500



Iranian Biotechnology
Society

Bioinformatics Analysis and Characterization of RuBisCO's large subunit in some lettuce genotypes

Zahra Jomeh Ghasem Abadi

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol;
z.ghasemabadi1393@gmail.com

Baratali Fakheri

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol;
siahsar@uoz.ac.ir

Bahman Fazeli-Nasab

*Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran, Email: Bfazeli@uoz.ac.ir

Abstract

Objective

Lettuce is among one of the oldest vegetables in the world originally lodge in India and Central Asia. This study aims to evaluate the genetic diversity of fifteen lettuce genotypes by using the *rbcl* gene and protein sequences.

Material and Methods

Using sequencing method, the *rbcl* gene sequence of of fifteen lettuce were sequenced. Chromas 2.1.1 software, MegAlign ver5 software (using ClustalW approach) were applied for generating the similarity matrix, genetic distances as the same as building phylogram of the studied sequences. The modeling and validation of *rbcl* protein structure were performed through SWISS-MODEL and QMEAN, respectively. Further steps were progressed using Ramadan and Pro-SAP servers.

Results

Investigating protein-protein cross-links using STRING showed most of proteins encoded by matK, psb (A, D and C)-tranH have the interaction with *rbcl* protein. The results of

cluster analysis, similarity matrix, molecular-variance and dn/ds was indicated that the sequence of *rbcl* gene and protein is very similar and conserve among all genotypes.

Conclusion

The results were indicated that the *rbcl* sequence is not useful to study the phylogenetic relationships inter-species. Therefore, this point is trustworthy to say that one of the reasons for failing the segregation all lettuce genotypes is the tiny diversity of *rbcl* gene.

Keywords: lettuce, dN/dS, Lactucin, genetic diversity, *rbcl* gene

Citation: Jomeh ghasem abadi Z, Fakheri B, fazeli-nasab B (2019) Bioinformatics Analysis and characterization of RuBisCO's large subunit in some lettuce genotypes. Agricultural Biotechnology Journal 11 (3), 113-132.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (3), 113-132.

DOI: 10.22103/jab.2019.14215.1140

Received: July 11, 2019; Accepted: August 26, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

ارزیابی بیوانفورماتیک و خصوصیات زیر واحد بزرگ روبیسکو در برخی از ژنوتیپ‌های

کاهو

زهرا جمعه قاسم‌آبادی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایمیل: z.ghasemabadi1393@gmail.com

براتعلی فاخری

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایمیل: siahsar@uoz.ac.ir

بهمن فاضلی نسب

*گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایمیل: Bfazeli@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

چکیده

هدف: کاهو یکی از قدیمی‌ترین سبزی‌های دنیاست که منشأ آن در هندوستان و آسیای مرکزی است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۵ ژنوتیپ کاهو با استفاده از توالی ژن *rbcl* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: توالی ۱۵ ژنوتیپ کاهو ابتدا با روش PCR جداسازی و سپس توالی‌یابی شد. کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.1.1 بررسی و سپس با روش ClustalW توسط نرم‌افزار MegAlign 5 هم‌ردیف‌سازی شده و دندروگرام روابط تبارزایی و ماتریس تفاوت و تشابه توالی‌ها ترسیم گردیدند. همچنین برای مدل‌سازی و اعتبار سنجی پروتئین *rbcl* از SWISS-MODEL و QMEAN و ارزیابی ساختار و کیفیت شیمیایی پروتئین از نقشه‌های رامچاندرا و سرور Pro-SA استفاده شد.

نتایج: بررسی شبکه‌های متقابل پروتئین-پروتئین با استفاده از نرم‌افزار STRING نشان داد اکثر پروتئین‌های کد شده با ژن-های *psb-tranH*، *amatK* با پروتئین *rbcl* اثر متقابل دارند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ماتریس تشابه و واریانس مولکولی و همچنین $dN/dS < 1$ ، همگی حاکی از وجود شباهت و حفاظت‌شدگی بالای توالی *rbcl* بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود.

نتیجه‌گیری کلی: نتایج نشان داد که برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در سطح گونه توالی *rbcl* چندان مفید نیست لذا می‌توان گفت که یکی از علل عدم موفقیت این ناحیه در تفکیک گونه‌ها، تغییرپذیری کم آن در بین گونه‌ها است.

کلمات کلیدی: کاهو، dN/dS ، لاکتوکسین، تبارزایی، *rbcl*.

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa* L.) گیاهی از خانواده مرکبیان، یکساله، روزبلند و گلدهی آن در تابستان بوده و از مهم‌ترین سبزی‌های برگی است که عمدتاً برای تازه خوری و سالادی مصرف می‌شود. مرکز پیدایش و تنوع این گیاه در جنوب غرب آسیا و نواحی مدیترانه است (Jomeh Ghasem Abadi et al. 2019). کاهو غنی از ویتامین‌های A، B، C، K و همچنین مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، آهن، پتاسیم، سدیم و مقدار کمی منیزیم و گوگرد بوده و مصرف آن در درمان درد معده، بی‌خوابی، آرامش اعصاب و تپش قلب مفید است (Konczak et al. 2014; Uddin et al. 2019). همچنین عصاره بذر آن برای درمان التهاب و درد استخوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jomeh Ghasem Abadi et al. 2019). تنوع ژنتیکی، بیانگر تفاوت‌ها و تنوع درون و بین گونه‌هاست که بررسی آن نقش مهمی در برنامه‌های اصلاحی برای بهبود و صفات کمی و کیفی گیاهان ایفا می‌کند (Fazeli-Nasab et al. 2010). همچنین شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف گیاهی یکی از جنبه‌های مهم بهره‌برداری و حفاظت از منابع ژنتیکی است (Ghahramanzadeh et al. 2013). از آنجایی که مطالعه صفات مورفولوژیک به دلیل تأثیرپذیری این صفات از محیط، از دقت بالایی برخوردار نیستند در نتیجه نشانگرهای مبتنی بر DNA به دلیل اینکه تنوع را در سطح DNA و مستقل از محیط مورد بررسی قرار می‌دهند ابزاری مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی به شمار می‌آیند (Fazeli-Nasab et al. 2013). توالی DNA کلروپلاستی به دلیل داشتن صفاتی از جمله تعداد کپی بالا در سلول، ژن‌های حفاظت‌شده، داشتن آغازگرهای عمومی و قابلیت تکثیر بالا، به‌عنوان رمزینه ژنتیکی^۱ و منبعی برای مطالعات فیلوژنتیکی مناسب است (Chen et al. 2010). لذا در تحقیقات مختلف از تنوع کلروپلاستی برای بررسی تکامل درون گونه‌ها و تعیین خویشاوندی در سطح ژنوتیپ‌ها استفاده شده است (Chang et al. 2005; Liu et al. 2017). همچنین در بین ژن‌های مختلف کلروپلاستی، ژن *rbcl* (رمز کننده زیر واحد بزرگ آنزیم روبیسکو که نقش مرکزی و اصلی را در چرخه احیای کربن فتوسنتزی^۲ هنگام فتوسنتز برای تثبیت دی‌اکسید کربن دارد) بیشتر برای بررسی روابط خویشاوندی مورد استفاده قرار گرفته است (Gamache & Sun 2015). گروه مطالعات گیاهی^۳ این ژن را به دلیل در دسترس بودن اطلاعات توالی‌ها و سهولت تکثیر در اکثر گونه‌های گیاهی به‌عنوان مهم‌ترین گزینه رمزینه ژنتیکی عمومی در گیاهان معرفی کرده و جهت تمایز گونه‌های نزدیک از کارایی بالایی دانسته است (Kress et al. 2009; Heckenhauer et al. 2017). ژنوتیپ‌های کاهو مورد مطالعه در این تحقیق در تحقیقات قبلی بر اساس صفات مورفولوژی و فیزیولوژی (Zare et al. 2016) و همچنین با استفاده از نشانگر ITS (Jomeh Ghasem Abadi et al. 2019) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند ولی تاکنون ناحیه ژنی و پروتئینی *rbcl* در ارزیابی کاهو مورد استفاده قرار

^۱ Barcode

^۲ Photosynthetic carbon reduction (or Kelvin)

^۳ Consortium for the Barcode of Life (CBOL)

نگرفته لذا در این تحقیق سعی شد تا این ناحیه ژنی در ژنوتیپ‌های مختلف کاهو ایران و جهان مورد ارزیابی قرار گیرد و همچنین ساختار سه‌بعدی و عملکردی پروتئین rbcI در کاهو مورد بررسی صورت پذیرد.

مواد و روش‌ها

جهت ارزیابی بیوانفورماتیک و بررسی خصوصیات زیر واحد بزرگ روبیسکو، ۱۵ ژنوتیپ کاهو (جدول ۱) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اصفهان و شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. برگ ژنوتیپ‌های کاهو در مرحله چهار برگ‌گی برداشت و سپس استخراج DNA از نمونه برگ‌گی با استفاده از روش SDS (Dellaporta et al. 1983) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA به‌دست‌آمده به ترتیب با استفاده از طیف‌سنجی نوری (سنجش جذب در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر) و ژل آگاروز یک درصد تعیین گردید. DNAهایی که دارای کیفیت و کمیت مناسب بودند در یخ‌زن ۷۰- آزمایشگاه ژنتیک واقع در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل نگهداری و در نهایت مورد آزمایش قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۲ با دستگاه ترموسایکلر (Hamburg Germany) با حجم ۴۵ میکرو لیتر، شامل ۲۴ میکرو لیتر مخلوط آماده واکنش^۳ (شرکت امپلیکون^۴ دانمارک)، ۶ میکرو لیتر DNA الگو و میزان ۱/۵ میکرو لیتر از هر دو آغازگر رفت‌وبرگشت انجام شد. حجم واکنش با آب سترون (استریل) دیونیزه (۱۲ میکرو لیتر) به حجم ۴۵ رسید. ناحیه rbcI با استفاده از توالی آغازگر پیش رو (rbcLa: ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC (Levin et al. 2003) و پس رو (rbcLa: GTAAAATCAAGTCCACCRCG (Kress et al. 2009) تکثیر شد. واکنش زنجیره پلیمرز شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۵۶/۱ درجه سانتی‌گراد، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه بود. جهت حصول اطمینان از تکثیر موفق از ژل آگاروز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی با استفاده ماده Gel Red Staining انجام شد.

توالی یابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها: محصولات نهایی PCR (شکل ۱) بعد از جداسازی از ژل آگاروز با کمک کیت AccuPrep DNA Gel Purification جهت توالی‌یابی دو طرفه (۱۵ نمونه) به شرکت ماکروژن^۵ کره جنوبی ارسال و نهایت توالی‌هایی با طول حدود ۹۰۰ نوکلئوتید به دست آمد و جهت بررسی کروماتوگرام هر یک از توالی‌ها از نرم‌افزارهای Sequencing Analysis Software ver5.1 و نرم‌افزار Chromas 2.1.1 (McCarthy 1998) استفاده شد. در این حالت چون هر نوکلئوتید طی فرآیند توالی‌یابی دو بار خوانده می‌شود، خطای احتمالی به‌ویژه در ابتدا و انتهای توالی و همچنین

^۱ Spectrophotometer

^۲ Polymerase chain reaction

^۳ Master Mix

^۴ Ampliqon

^۵ Macrogen

خطاهایی از جمله پیک‌های کوتاه و ضعیف، خوانش‌های کوتاه و فاقد بخش توالی یابی شده در ابتدا و یا انتها، پیک‌های حذف شده پس از یک خوانش کوتاه از یک ناحیه هم‌پولی‌مر، پیک‌های درهم‌فشرده، خوانش پر از Noise، خوانش‌های با تأخیر و وجود پیک‌های نامتعارف قبل از خوانش صحیح توالی، وجود پیک‌های ناخواسته بلند در خوانش^۱ با نرم‌افزارهای اشاره شده اصلاح و سپس ارزیابی تک‌تک توالی‌ها با توالی‌های پایگاه داده NCBI با ابزار آنالین BLAST (Camacho et al. 2009) بر اساس E Value و Query Cover و غیره انجام شد.

جدول ۱. مشخصات ارقام و جمعیت‌های کاهو مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Lettuce cultivars and genotypes properties were used in this research

Accession Number in NCBI	نام ژنوتیپ (genotype Name)	ژنوتیپ (Genotype)
MG648801	Lechuga Romana larga verde- Teresa (Romaine lettuce long, green Teresa)	1
MG648802	کاهوی سالادی فردوس (Lettuca Ferdows)	2
MG648803	Lettuca Salad کاهو سالاد	3
MG648804	کاهو پیچ اورست (Lettuca Everest)	4
MG648805	Lettuce May Queen	5
MG648806	Escarola rizada Cabello de angel (Curly endive hair angel)	6
MG648807	Lechuga Romana larga rubia –Galaica (Romaine lettuce long, blonde Ggalaica)	7
MG648808	کاهو پیچ بلند (کونکوئیستادور) Lettuce_screws_(Konkovistador)	8
MG648809	Tehran_Lettuce_Screw کاهو پیچ تهران	9
MG648810	Parsagad_Lecttuce_Screw کاهو پیچ پاسارگاد	10
MG648811	Isfahan lettuce_Leaf کاهو برگ‌گی ورزنه اصفهان	11
MG648812	lettuce_TalkhoncheIsfahan کاهو طالخونچه اصفهان	12
MG648813	Lettuce_leaves_Yazd کاهو برگ‌گی یزد	13
MG648814	Nain Lettuce_leaves کاهو برگ‌گی نائین اصفهان	14
MG648815	Col de milan Aubervilliers (Cabbage Milan Aubervilliers)	15

توالی‌ها به روش ClustalW توسط نرم‌افزار MegAlign 5 حاصل از بسته نرم‌افزاری Dnastar 5 و نرم‌افزار Mega 6 هم‌ردیف‌سازی، خوشه‌بندی و تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی شدند و جهت انجام تجزیه‌های تکمیلی از جمله محاسبه dn و ds از نرم‌افزار DnaSP 5 استفاده شد. جانشینی نوکلئوتیدی بر اساس الگوی Tamura-Nei model (Tamura et al. 2013)

^۱ Large raw signal spike

به‌صورت میزان جانیشینی‌های نوع انتقالی (Transition) و متقاطع (Transversionsal) محاسبه شد. بررسی تفکیک ساختار واریانس ژنتیکی بین و درون ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم GenALEX ver6. 41 صورت گرفت.

مدل‌سازی پروتئین و اعتبار سنجی مدل ساخته‌شده: پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین با استفاده از توالی

آمینواسیدی یکی از مسائل مهم در زیست‌شناسی محاسباتی ساختاری است. دقت مدل پیش‌بینی‌شده توسط SWISS-MODEL بررسی شد (Schwede et al. 2003). برای ارزیابی ساختار و کیفیت شیمی فضایی دو مدل طبیعی و جهش‌یافته، از نقشه‌های رامانچاندرا و سرور Pro-SA استفاده شد. سرور Pro-SA کیفیت مدل تولید شده را با محاسبه Z-score بیان می‌کند. Z-score معیاری است که کیفیت کلی مدل را نشان می‌دهد (Brohee & Van Helden 2006). برای بررسی پروتئین‌های وارد اینترکشن شده با rbcL، توالی آمینواسیدی این پروتئین در نرم‌افزار string اجرا شد (Brohee & Van Helden 2006). سپس شبکه پروتئین پیش‌بینی شد.

نتایج

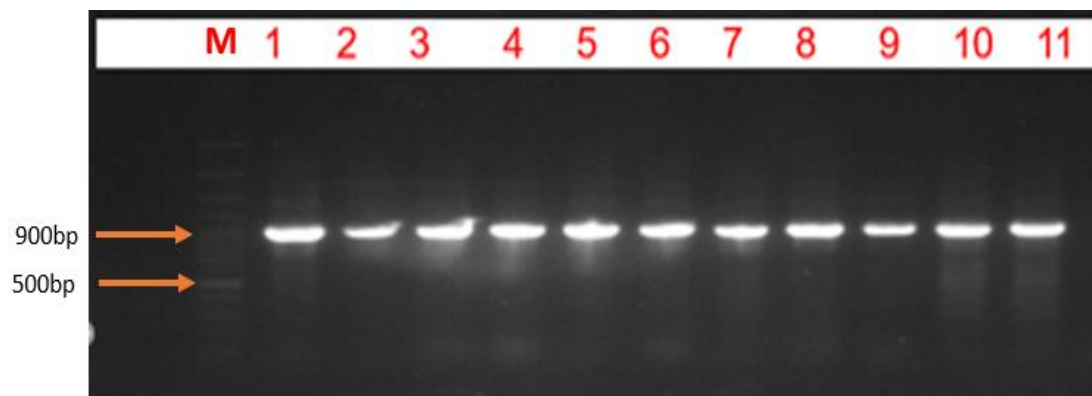
بعد از توالی‌یابی میزان همولوژی توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های گونه مرجع موجود در سایت NCBI (کد دسترسی DQ383816) سنجیده شد و شباهت همگی در محدوده ۹۹ درصد بود. تمام توالی‌ها در سایت NCBI ثبت و کد دسترسی مربوطه کسب کردند (جدول ۱). توالی‌ها بعد از تأیید و ثبت هم‌تراز شدند. طول بخشی از ناحیه rbcL در DNA کلروپلاستی^۱ ژنوتیپ‌های کاهو تکثیر شده بود ۷۵۰ جفت باز محاسبه شد. با استفاده از توالی‌های به‌دست‌آمده و به کمک نرم‌افزار Dnasp، در مجموع ۴۴۷ جایگاه متغیر دارای حذف و اضافه (۴۷ پلی‌مورف، ۴۰۰ مونومورف) و ۴۶ سینگلتون^۲ شناسایی شد در این ژنوتیپ‌ها تعداد ۴ هاپلوتایپ شناسایی شد و شاخص تنوع هاپلوتایپی (۰/۳۷) بود. مقدار عددی (dN/dS) برابر ۰/۰۰۴ بود که کمتر از یک و نشان دهنده این است که انتخاب خالص بر ژن مورد بررسی اتفاق افتاده و باعث تغییرات کلیدی نشده است.

آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی: بررسی فراوانی نوکلئوتیدی توالی‌ها به‌صورت بین ژنوتیپی نشان داد باز تیمین (Thymine)

بیشترین فراوانی و باز سیتوزین (Cytosine) کمترین فراوانی را دارا بود. همچنین در بررسی فراوانی نوکلئوتیدی بین ژنوتیپی مجموع سیتوزین و گوانین (Guanine) (۴۴/۸) از مجموع آدنین (Adenine) و تیمین (۵۵/۱) کمتر بود. که نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی بالا و ثابت نبودن این ناحیه است؛ زیرا سیتوزین و گوانین دارای ۳ پیوند هیدروژنی است که وجود آن باعث پایداری ژن می‌شود که با تحقیقات (Pakpahan et al. 2016) مطابقت داشت. جانیشینی نوکلئوتیدی بر اساس الگوی Tamura-Nei Model (Tamura et al. 2013) به‌صورت میزان جانیشینی‌های نوع انتقالی و متقاطع محاسبه شد (جدول ۲). که بیشترین میزان جهش انتقالی (۱۷/۱۴) و تقاطعی (۵/۴۹) به ترتیب از نوع پیریمیدین و تقاطعی تیمین با گوانین بود.

^۱ chloroplast DNA

^۲ singleton



شکل ۱. محصولات PCR به دست آمده از تکثیر ناحیه rbcl در ژنوتیپ‌های کاهو

(M؛ سایز مارکر DM2400 و اعداد به ترتیب شماره ارقام مشخص شده در جدول شماره یک است)

Figure 1. PCR products obtained from amplification of rbcl region in lettuce genotypes M; DM2400 Size marker and other numbers are the lettuce genotypes name based on the number was shown in Table 1

جدول ۲. برآورد حداکثر درصد جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن rbcl کاهو بر اساس الگوی Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993) Model

Table 2. Estimation of Maximum Relative Conversion Rate of RbC Lettuce Gene Nucleotides Based on Tamura-Nei Model Model (Tamura & Nei 1993).

	A	T/U	C	G
A	-	5.49	4.07	15.17
T/U	4.98	-	12.69	4.44
C	4.98	17.14	-	4.44
G	17.02	5.49	4.07	-

*احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر است که مجموع آن برابر با ۱۰۰ است. در این جدول درصد جهش‌های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت پررنگ و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت ایتالیک نشان داده شده‌اند.

*It is possible to substitute each entry from the single (row) to another, whose sum is 100. In this table, the percentage of transient mutations (the replacement of purine with other purine or pyrimidine with other pyrimidine) is highlighted in bold and interstitial mutations (purine to pyrimidine and vice versa) are shown in italics.

تست Tajima's D به منظور شناسایی هرگونه از انحراف فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های کاهو محاسبه شد. ژنوتیپ‌هایی که دچار گسترش اخیر و یا افزایش معنی‌دار در اندازه ژنوتیپ مؤثر شده باشند و یا انتخاب جهت‌دار بر روی آن‌ها عمل کرده باشد، مقادیر D منفی و معنی‌دار تولید می‌کنند، درحالی‌که مقادیر مثبت و معنی‌دار D نشان دهنده اثرات مربوط به رانش ژنتیکی، تنگنای ژنتیکی و یا اثر متعادل کننده در طول تاریخ تکاملی ژنوتیپ است. نتایج این مطالعه نشان داد که مقادیر D هم برای ژن rbcl (جدول ۳) و هم پروتئین به دست آمده از آن (جدول ۴) منفی و غیره معنی‌دار بود که ممکن است به دلیل اندک بودن نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه یا اثر انتخاب جهت‌دار بر روی این ژن در طول تکامل است.

جدول ۳. نتایج حاصل از تست (Neutrality Tajima Test) توالی DNA ژن rbcl با استفاده از نرم‌افزار MEGA6.

Table 3. Neutrality Tajima Test DNA sequences of rbcl gene using MEGA6 software.

m	S	p_s	Θ	π	D
15	47	0.105145	0.032337	0.014552	-2.362671

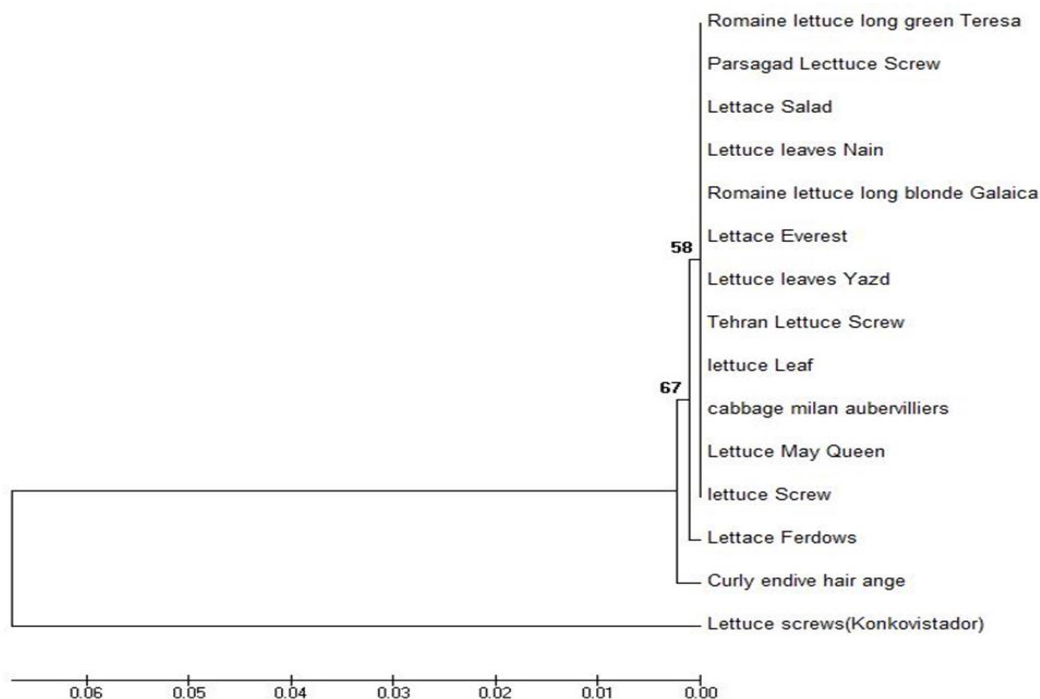
جدول ۴. نتایج حاصل از تست (Neutrality Tajima Test) توالی پروتئین ژن rbcl با استفاده از نرم‌افزار MEGA6.

Table 4. Neutrality Tajima Test The protein sequence of the rbcl gene using the MEGA6 software.

m	S	p_s	Θ	π	D
15	3	0.055556	0.017086	0.007407	-0.685005

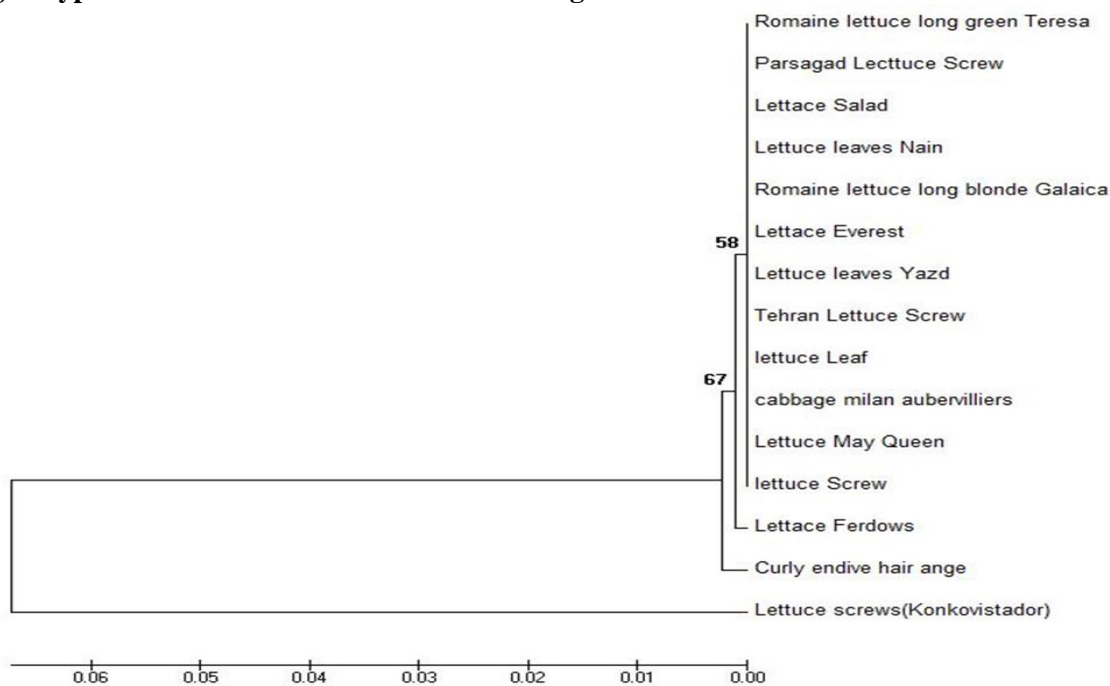
فاصله ژنتیکی: به منظور شناسایی و درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌ها در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ماتریس تشابه در میان ۱۵ ژنوتیپ کاهو مورد استفاده محاسبه گردید. نتایج حاکی از آن بود که فاصله ژنتیکی بر اساس توالی DNA از صفر تا ۰/۱۳۵ و بر اساس توالی پروتئینی از صفر تا ۰/۰۵۷ محاسبه شد (داده نشان داده نشد). درخت تبارزایی با استفاده ماتریس تشابه نی و لی (Nei & Li 1979) و روش UPGMA ترسیم گردید. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای حاکی از وجود شباهت بسیار بالا بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود به طوری که بر اساس موقعیت جغرافیایی نیز از همدیگر تفکیک نشدند. ضمناً با وجود فاصله زیاد مناطق جغرافیایی آن‌ها، شباهت بسیار زیادی در سطح DNA با هم داشتند و به جز ژنوتیپ Konkovistador مابقی در یک

گروه قرار گرفتند. همچنین در آزمون دیگری تجزیه خوشه‌ای بر اساس توالی پروتئین *rbcl* به دست آمده نیز مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج مشابهی را به دنبال داشت.



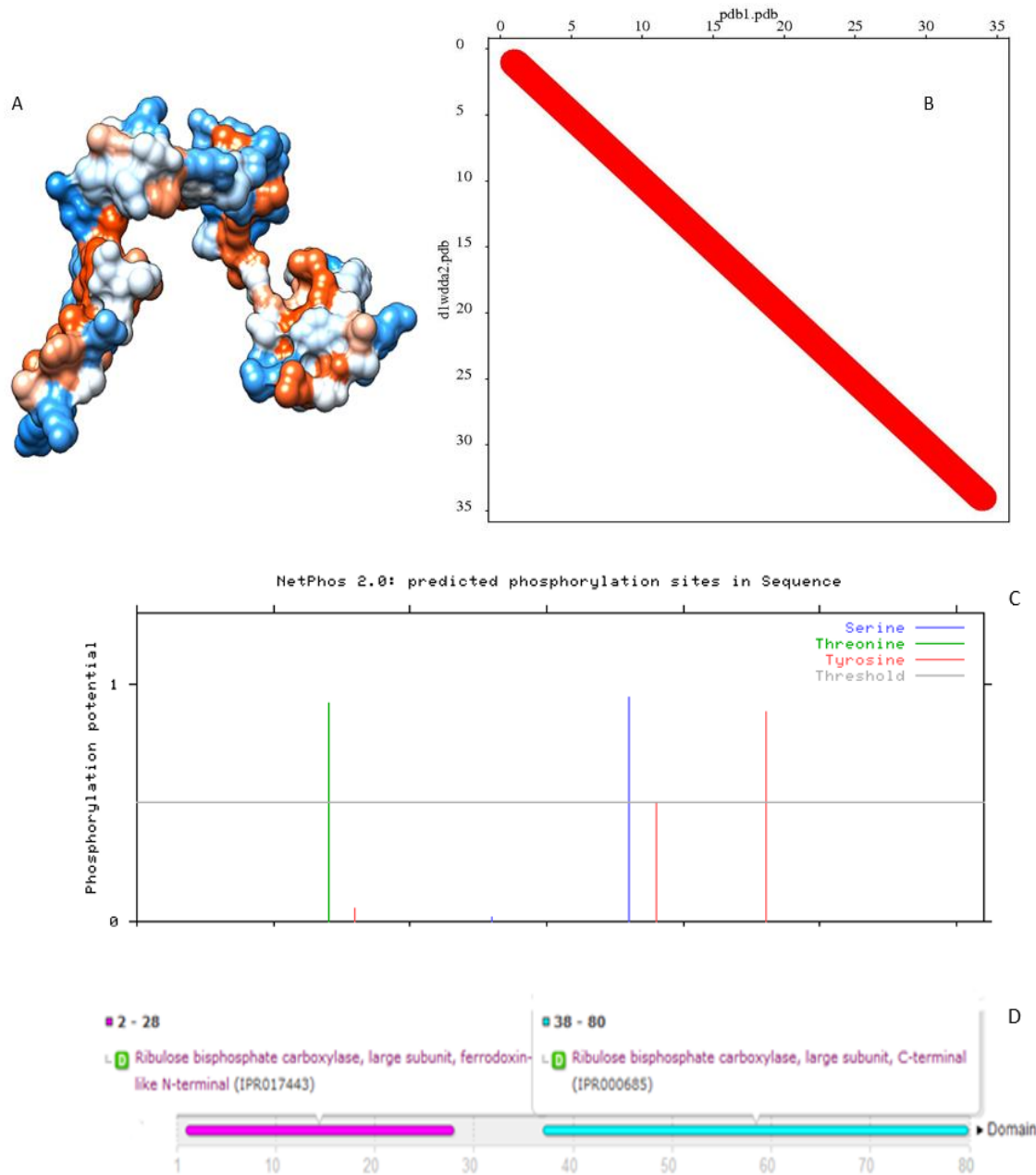
شکل ۲. دندروگرام مقایسه توالی DNA ژن *rbcl* ژنوتیپ‌های مختلف کاهو مورد بررسی بر اساس روش Clustal W و نرم افزار Mega 6.

Figure 2. Dendrogram Comparison of DNA sequence of *rbcl* gene Different lettuce genotypes based on Clustal W method and Mega 6 software.



شکل ۳. دندروگرام مقایسه توالی پروتئینی ژن *rbcl* ژنوتیپ‌های مختلف کاهو مورد بررسی بر اساس روش Clustal W و نرم‌افزار Mega 6

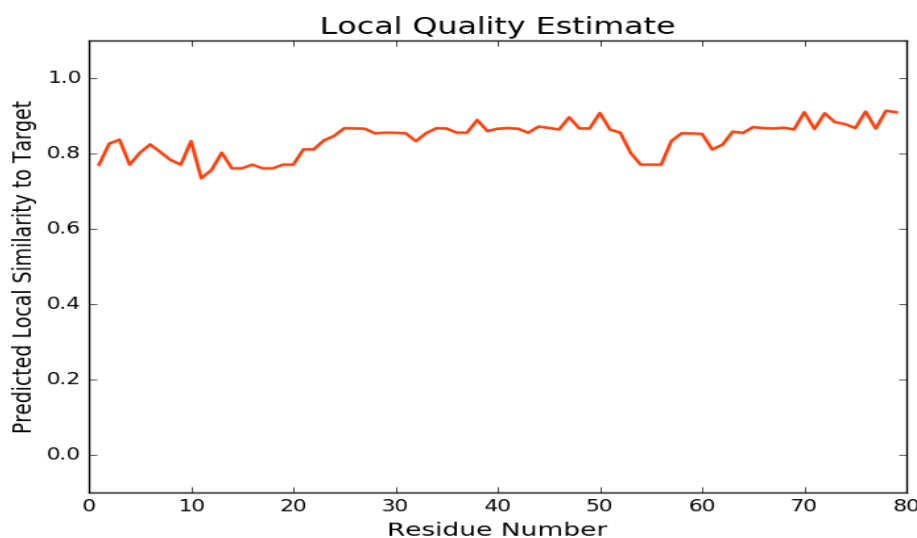
Figure 3. Dendrogram Comparison of protein sequences of *rbcl* gene Different lettuce genotypes based on Clustal W method and Mega 6 software



شکل ۴. ساختار سه‌بعدی (A)، همبستگی مدل ارائه‌شده با الگو d1wdda2 (B)، دومین‌های غشائی (C) و دومین‌های حفاظت‌شده (D) بخشی از توالی پروتئین *rbcl* (ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase) به‌دست‌آمده از گیاه کاهو.

Figure 4. The 3D structure (A), correlation of model with d1wdda2 model (B), membrane domain(c) and conserved domain (D) of some sequence of rbc1 (ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase) obtained from lettuce.

اعتبار سنجی مدل پروتئینی rbc1 : ProSA برای بررسی مدل سه بعدی پروتئین rbc1 برای خطاهای بالقوه استفاده شد. این برنامه ۲ ویژگی ساختار ورودی را نشان می دهد: نمره Z آن و یک طرح از انرژی های باقی مانده آن. نمره ProSA برابر با ۰/۸ نشان دهنده کیفیت کلی مدل پروتئین rbc1 است (شکل ۵). نمره Z همچنین انحراف انرژی کل ساختار را با توجه به توزیع انرژی حاصل از هم بخشی های تصادفی اندازه گیری می کند. نمره QMEAN مدل برابر ۰/۷ و نمره Z برابر ۰/۸ بود که در محدوده صفر تا یک بوده و این نشان دهنده کیفیت خوب مدل است، زیرا انتظار می رود که قابلیت اطمینان مدل برآورد شده از ۰ تا ۱ باشد و این را می توان از طرح دانسیته برای نمرات QMEAN مجموعه مرجع استنباط کرد (شکل ۶). نمرات نشان دهنده یک ساختار بسیار قابل اعتماد است و به خوبی در محدوده ی نمره هایی هستند که معمولاً برای پروتئین هایی با اندازه ی مشابه یافت می شوند. طرح انرژی، کیفیت مدل محلی را با پلات کردن انرژی های مبتنی بر دانش به عنوان یک تابع از موقعیت توالی آمینو اسید، نشان می دهد.

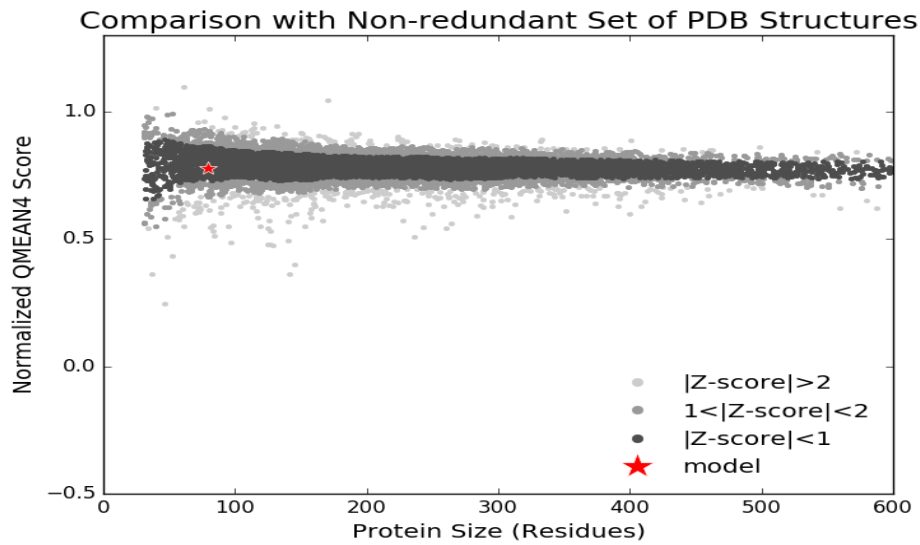


شکل ۵. اعتبار سنجی مدل پروتئین rbc1 با Pro-SA.

Figure 5. Validation of the rbc1 protein model with Pro-SA.

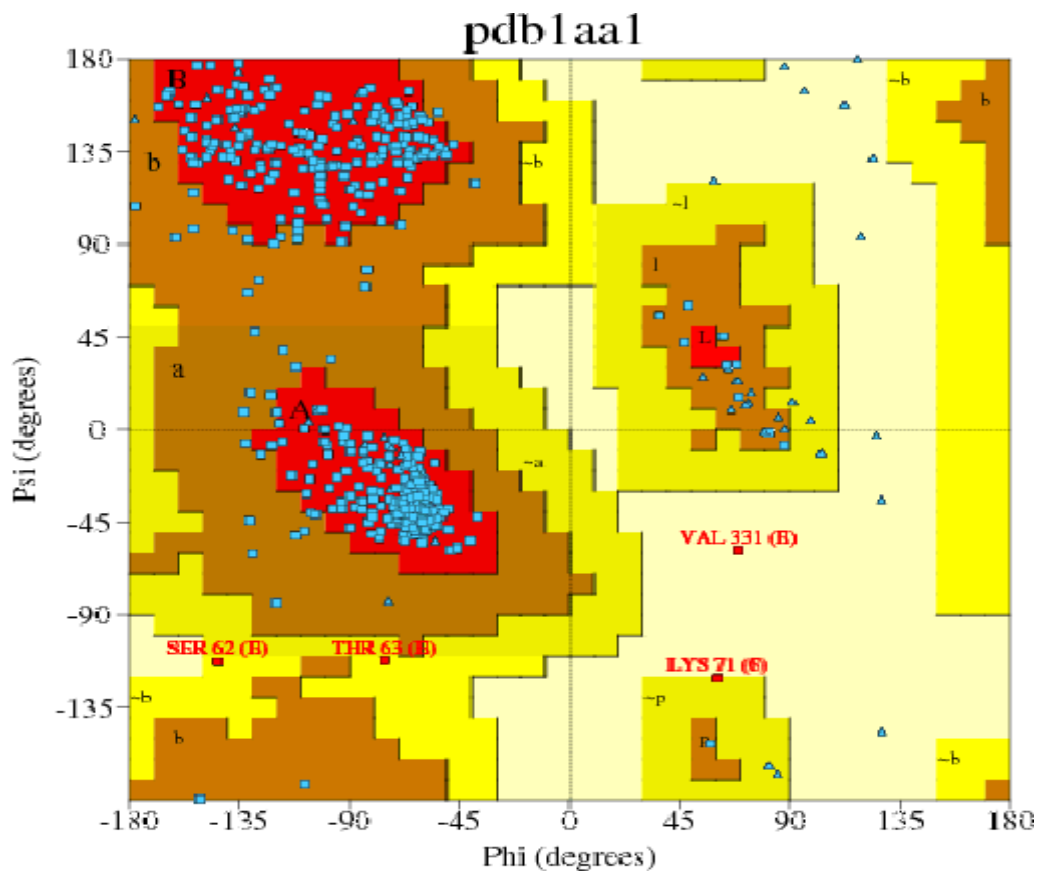
نمودار رامانچاندران مربوط به ساختار دوم rbc1 کاهو نشان می دهد که این ساختار دارای زنجیره استروکیمی خوبی است و ۹۶ درصد گروه های باقیمانده^۱ در ناحیه قرمز قرار می گیرند که دارای بیشترین میزان مقبولیت است (شکل ۷).

^۱ Residue



شکل ۶. کیفیت مدل تولیدشده با QMEAN و مقدار Z-score.

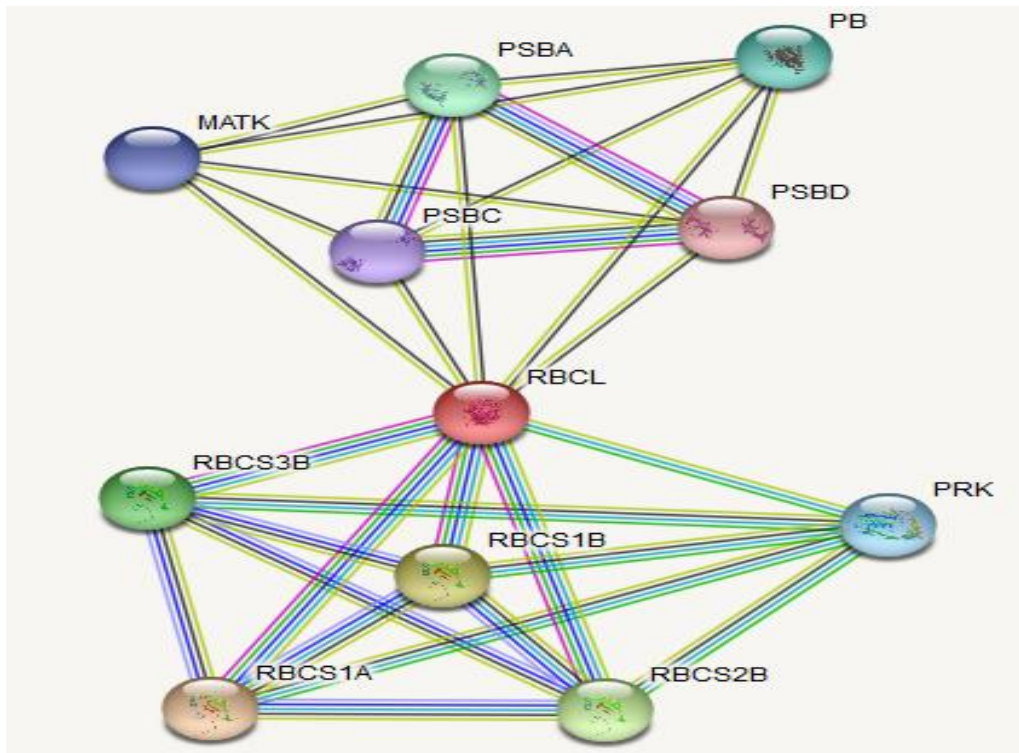
Figure 6. Quality of the model produced by QMEAN and Z-score.



شکل ۷. نمودار رامچاندران ساختار ثانویه توالی rbcl کاهو.

Figure 7. Ramachandran diagram of the secondary structure of lettuce rbcl sequence.

ارزیابی شبکه ژنی پروتئین *rbcl* با سایر ژن‌ها: بررسی اثرات متقابل پروتئین - پروتئین یک رویکرد ضروری برای شناخت عملکرد شبکه‌ای پروتئین است (Szkarczyk et al. 2014). در این مطالعه پیش‌بینی شده که *rbcl* با ژن‌های *rbcs*، *prk*، *matk*، *psb* و *pb* در تعامل است (شکل ۸) برهم‌کنش پروتئین‌های پیش‌بینی شده با *rbcl* مشارکت مسیرهای متابولیکی ویژه‌ی کلروپلاست را در گیاه نشان داد و هرگونه تغییر در ساختار پروتئین و عملکرد آن می‌تواند بر این مسیرها مؤثر باشد.



شکل ۸. شمای برهم‌کنش پروتئین *rbcl* با دیگر پروتئین‌های (*prk* و *pb*، *matK*، *PSB*، *rbcs*) موجود در گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا.

Figure 8. Scheme of interaction of *rbcl* protein with other proteins (*rbcs*, *psb*, *matK*, *pb* and *prk*) present in *Arabidopsis thaliana*.

بحث

بررسی توالی DNA پلاستییدی در بسیاری از گیاهان نشان داد که ژنوم پلاستیید در خلال حوادث تکاملی خیلی کم تغییر کرده است (Besendahl et al. 2000; Chang et al. 2005; Group et al. 2009) و همچنین ژن‌های کلروپلاستی به دلیل طبیعت تک والدی بودن، ثبات ساختاری و عدم نوترکیبی در مناطق ژنی و بین ژنی به‌دقت برای تشخیص پتانسیل آن‌ها برای رمزینه ژنتیکی گذاری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Ledford 2008). در توالی رمز کننده و حفاظت‌شده *rbcl* موتاسیون حذف و

اضافه وجود ندارد از طرفی چون برخی از ژن‌های رمز کننده کلروپلاستی توسط اینترون‌ها قطع شده‌اند، در نتیجه ممکن است که این حذف و اضافه‌ها در بخش اینترون اتفاق افتاده باشد اما این مورد در رابطه با ژن *rbcl* صدق نمی‌کند چون ژن *rbcl* فاقد اینترون است لذا در کل می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات با سرعت بسیار کمی در ژن *rbcl* اتفاق می‌افتد و همین امر باعث شده در تخمین و ارزیابی تکامل از این ژن استفاده شود (Wolfe et al. 1987; Guldhe et al. 2019). از طرفی دیگر به دلیل اینکه ژن *rbcl* از والد مادری به ارث برده می‌شود باعث می‌شود که در بین ارقام متعلق به همان گونه محافظت شود و منشأ همان ژنوم کلروپلاست مادر را نیز داشته باشد (Sarhan et al. 2016; Hapsari et al. 2019). نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدآمین شده‌اند (dN) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمین حاصل نداشته‌اند (dS)، یک روش کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است (Nei & Kumar 2000). اگر این نسبت از یک بیشتر باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (LI 1997) در این تحقیق مقدار عددی این نسبت (dN/dS) کمتر از یک (۰/۰۰۰۰۴) بود و نشان داد که انتخاب خالص بر ژن مورد بررسی اتفاق افتاده و باعث تغییرات کلیدی نشده است. نتایج حاصل از این تحقیق و عدم جداسازی ژنوتیپ‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی و قرار گرفتن اکثریت ژنوتیپ‌ها در یک گروه حاکی از شباهت قابل توجه و تنوع پایین بین ژنوتیپ‌ها است که می‌تواند مربوط به حفاظت‌شدگی بالای ناحیه *rbcl* و تغییرپذیری کم این ناحیه باشد. همچنین مقایسه توالی *rbcl* در دو رده سیانوباکتری و چند جنس گیاهان تشابه زیادی بین توالی آن‌ها نشان داد (Newmaster et al. 2008; Steven & Subramanyam 2009) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای ذکر شده که از محدودیت‌های کلروپلاست این است که نمی‌توان از ژنوم آن برای مطالعه گونه‌های نزدیک استفاده کرد باین‌وجود در چندین مطالعه از تنوع کلروپلاستی برای تعیین خویشاوندی در سطح جمعیت‌ها و پروسه‌ی تکامل در درون گونه‌ها استفاده گردیده است (Chang et al. 2005; Barker et al. 2019; Pfanzelt et al. 2009). آنالیز واریانس مولکولی به‌عنوان یک آنالیز آماری مهم در محاسبه تنوع ژنتیکی و مشخص کردن ساختار جمعیت‌ها و میزان تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها محسوب می‌شود (Pariset et al. 2011). معمولاً در بررسی‌های جمعیتی مقدار *Fst* شاخص مهمی در جهت تعیین تمایز و تفکیک ژنتیکی بین جمعیت‌ها محسوب می‌شود و بیانگر آن است که هر چه میزان جریان ژنی بیشتر باشد، اختلاف ژنتیکی بین جمعیت‌ها کمتر است. آنالیز واریانس مولکولی با استفاده از *Fst* توسط نرم‌افزار GenAlex ver6.41 به دست آمد. مقادیر از صفر تا ۰/۰۵ تمایز ژنتیکی پایین و مقادیر بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ تمایز متوسط و مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۲۵ تمایز بالا و مقادیر بیش از ۰/۲۵ تمایز ژنتیکی خیلی بالا را نشان می‌دهد (Zawadzki et al. 2008). بنابراین نتایج این آزمون نشانگر تمایز ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. برهم‌کنش پروتئین- پروتئین نقش مهمی در تمامی فرایندهای زیستی ایفا می‌کند. آنالیز شبکه به درک سازوکار زیستی موجود از راه آشکار نمودن الگو یا الگوهای شبکه‌های سلولی عملکردی کمک می‌کند (Raman 2010). بررسی شبکه پروتئین- پروتئین *rbcl* نشان‌دهنده این است که ژن-های خانواده RBC بیشترین ارتباط را با یکدیگر دارند و از سوی دیگر این ژن‌ها با ژن *prk* نیز در ارتباط هستند. ژن‌های خانواده

RBC در دو واکنش کربوکسیلات دی-ریبولوز ۵ و بیس فسفات که نقش اصلی در تثبیت دی‌اکسید کربن و همچنین قطعه‌قطعه شدن اکسیداتیو سوسپانسیون پنتوز دارند (Dietz et al. 2019). از طرف دیگر ژن‌های psb بیشترین تعامل را با یکدیگر و با ژن‌های matk, pb, rbcL و نیز در ارتباط هستند؛ که در زنجیره انتقال الکترون و تولید ATP نقش دارند. ژن‌های psb با استفاده از انرژی نوری الکترون‌های آب را جدا می‌کنند و تولید O₂ و یک شیب پروتونی کرده که در نهایت برای تولید ATP مورد استفاده قرار می‌گیرد (Nelson & Ben-Shem 2004). همچنین برخی از رونوشت‌های RNA که برای برش اینترون به matK نیاز دارند شامل rbcL, trnA, trnK, trnL, rps12, rpl2 و atpF بود که محصولات پروتئینی یا tRNA آن‌ها برای بعضی از عملکردهای کلروپلاست، مانند فتوسنتز مورد نیاز هستند. این نتایج نشان می‌دهد که matK به‌عنوان فاکتور پیدایشی که بعد از رونویسی عمل می‌کند، عملکردی اساسی در کلروپلاست دارد (Barthet 2006; Barthet & Hilu 2007; Barthet & Hilu 2008). این یافته‌ها حاکی از اهمیت این پروتئین‌ها در کلروپلاست است (Duan et al. 2019). از آنجایی که ژن‌های rbcL, matK و psb سه ژن مهم در بررسی رمزینۀ ژنتیکی DNA هستند و محققان بسیاری، از این رمزینۀ‌های ژنتیکی در شناسایی و مستندسازی تنوع گیاهان استفاده کرده‌اند (Chen et al. 2010)، از طرفی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پروتئین‌های تولیدی توسط این ژن‌ها در کلروپلاست مستقل نبوده به‌طوری‌که افزایش و کاهش بیان هر کدام از این ژن‌ها بر یکدیگر تأثیر می‌گذارد. همچنین برخی نتایج نشان داده که همواره ژن‌های کلروپلاستی به دلیل نیاز داشتن به اطلاعات اضافی برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها به‌تنهایی مورد استفاده قرار نمی‌گیرند (Staff 2008; Li et al. 2011; Williams et al. 2014) که نتایج ارزیابی شبکه ژنی و ارتباط ژن‌های rbcL, psb, matk, prk, rbcS در تحقیق حاضر (شکل ۸) بیان‌کننده این مطلب است. در بسیاری از تحقیقات rbcL به‌عنوان بهترین مکان ژنی برای بررسی‌های فیلوژنی در سطوح بالاتر از گونه مورد استفاده قرار گرفته است، درحالی‌که در سطح گونه استفاده از این ژن توصیه نگردیده است (Soltis & Soltis 1998; Zhai et al. 2019). از طرفی به علت پایین بودن قدرت تشخیص در سطح گونه اکثر مطالعات تأکید دارند که rbcL به همراه سایر رمزینۀ‌های ژنتیکی گیاهی به کار گرفته شود (Newmaster et al. 2008; Kress et al. 2009). کنسرسیوم بررسی رمزینۀ‌های ژنتیکی موجودات زنده استفاده از ژن‌های کلروپلاستی rbcL+ matK را به‌عنوان رمزینۀ ژنتیکی استاندارد گیاهی معرفی نمود که دارای سطح تفکیک گونه‌ای بالا و کیفیت مطلوب توالی برای گیاهان است (Federici et al. 2013; Mahadani & Ghosh 2013).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی یک ناحیه DNA در صورتی می‌تواند به‌عنوان یک رمزینۀ ژنتیکی ایده‌آل مطرح شود که دارای تنوع کافی در بین گونه‌های یک جنس باشد. این درحالی‌که است که ناحیه rbcL به دلیل تغییرپذیری اندک و حفاظت‌شدگی بالا و همچنین وراثت مادری، ناحیه چندان مناسبی برای بررسی تفاوت در بین ژنوتیپ‌های کاهو نبود. همچنین مقدار عددی dN/dS کمتر از یک بود که نشان‌دهنده این است که تغییرات کلیدی صورت نگرفته است. همچنین آزمون برهم‌کنش پروتئین- پروتئین

نشان داد که rbcl با ژن‌های psb rbc و prk.matK و pb در ارتباطند و مستقل از هم نمی‌باشند. لذا می‌توان پیشنهاد کرد این ژن‌ها را جهت بررسی معرفی و پس از تأیید برای بهره‌برداری در برنامه‌های اصلاحی و مهندسی ژنتیک به کار برد.

References

- Barker N, Howis S, Nordenstam B et al. (2009) Nuclear and chloroplast DNA-based phylogenies of *Chrysanthemoides Tourn. ex Medik.*(Calenduleae; Asteraceae) reveal extensive incongruence and generic paraphyly, but support the recognition of infraspecific taxa in *C. monilifera*. *South African Journal of Botany* 75, 560-572. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.05.006>
- Barthet MM (2006) Expression and Function of the Chloroplast-encoded Gene matK(ed)^(eds). Virginia Tech.
- Barthet MM, Hilu KW (2007) Expression of matK: functional and evolutionary implications. *AJB* 94, 1402-1412. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.8.1402>
- Barthet MM, Hilu KW (2008) Evaluating evolutionary constraint on the rapidly evolving gene matK using protein composition. *J Mol Evol* 66, 85-97. <https://doi.org/10.1007/s00239-007-9060-6>
- Besendahl A, Qiu Y-L, Lee J et al. (2000) The cyanobacterial origin and vertical transmission of the plastid tRNA Leu group-I intron. *Curr Genet* 37, 12-23. <https://doi.org/10.1007/s002940050002>
- Brohee S, Van Helden J (2006) Evaluation of clustering algorithms for protein-protein interaction networks. *BMC bioinformatics* 7, 488. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-488>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V et al. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics* 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Chang C-C, Lin H-C, Lin I-P et al. (2005) The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. *Mol Biol Evol* 23, 279-291. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj029>
- Chen S, Yao H, Han J et al. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one* 5, e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Dietz K-J, Wesemann C, Wegener M et al. (2019) Toward an integrated understanding of retrograde control of photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* 30, 1186-1205.
- Duan R-Y, Xiang G-H, Lin Y-X et al. (2019) The complete chloroplast genome of the invasive plant *Senecio vulgaris* L.(Asteraceae). *Mitochondrial DNA* 4, 1794-1795. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1612295>

- Fazeli-Nasab B, Mehrabi AA, Eizadi-Drabandi A (2010) Genetic diversity of different wheat genotypes using seed storage proteins and SSRs markers. *Modern Genetics Journal* 5, 83-91.
- Fazeli-Nasab B, Naghavi MR, Mehrabi AA (2013) Allelic Variation of Microsatellite Markers from Linkage Group A Genome in Wild Populations of Einkorn and Hexaploid Wheat. *Agricultural Biotechnology* 4, 53-62. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1434.4164>
- Federici S, Galimberti A, Bartolucci F et al. (2013) DNA barcoding to analyse taxonomically complex groups in plants: the case of *Thymus* (Lamiaceae). *Bot J Linn Soc* 171, 687-699. <https://doi.org/10.1111/boj.12034>
- Gamache J, Sun G (2015) Phylogenetic analysis of the genus *Pseudoroegneria* and the Triticeae tribe using the *rbcL* gene. *Biochem Syst Ecol* 62, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.07.038>
- Ghahramanzadeh R, Esselink G, Kodde L et al. (2013) Efficient distinction of invasive aquatic plant species from non-invasive related species using DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 13, 21-31. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12020>
- Group CPW, Hollingsworth PM, Forrest LL et al. (2009) A DNA barcode for land plants. *PNAS* 106, 12794-12797.
- Guldhe A, Renuka N, Singh P et al. (2019) Effect of phytohormones from different classes on gene expression of *Chlorella sorokiniana* under nitrogen limitation for enhanced biomass and lipid production. *Algal Research* 40, 101518. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101518>
- Hapsari L, Trimanto T, Wahyudi D (2019) Species diversity and phylogenetic analysis of *Heliconia* spp. collections of Purwodadi Botanic Garden (East Java, Indonesia) inferred by *rbcL* gene sequences. *Biodiversitas* 20, 1266-1283. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200505>
- Heckenhauer J, Salim KA, Chase MW et al. (2017) Plant DNA barcodes and assessment of phylogenetic community structure of a tropical mixed dipterocarp forest in Brunei Darussalam (Borneo). *PloS one* 12, e0185861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185861>
- Jomeh Ghasem Abadi Z, Fakheri B, Fazeli-nasab B (2019) Study of the Molecular Diversity of Internal Transcribed Spacer Region (ITS1.4) in Some Lettuce Genotypes. *CBAB* 11, 29-39.
- Konczak I, Dalar A, Konczak-Islam KA (2014) Health Attributes, Antioxidant Properties and Phytochemical Composition of Traditional Medicinal Plants from Eastern Anatolia(Chapter 7) from Medicinal Plants(Editor: David Alexandre Micael Pereira). *Medicinal Plants*, Nova Science Publishers, Inc. 183-227 pp

- Kress WJ, Erickson DL, Jones FA et al. (2009) Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 18621-18626. [10.1073/pnas.0909820106](https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106)
- Ledford H (2008) Botanical identities. *Nat Clim Change* 451. <https://doi.org/10.1038/451616b>
- Levin RA, Wagner WL, Hoch PC et al. (2003) Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *Am J Bot* 90, 107-115. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.1.107>
- LI WH (1997) *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, ISBN : 0878934634, 487 Pages.
- Li Y, GAO L-M, Poudel RC et al. (2011) High universality of *matK* primers for barcoding gymnosperms. *J Syst Evol* 49, 169-175. <https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00128.x>
- Liu L-X, Li R, Worth JR et al. (2017) The complete chloroplast genome of Chinese bayberry (*Morella rubra*, Myricaceae): implications for understanding the evolution of Fagales. *Front Plant Sci* 8, 968. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00968>
- Mahadani P, Ghosh SK (2013) DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices. *DNA Barcodes* 1, 35-38. <https://doi.org/10.2478/dna-2013-0002>
- McCarthy C (1998) *Chromas 1.45*. Griffith University: Southport, QLD.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press. 352 Pages
- Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* 76, 5269-5273.
- Nelson N, Ben-Shem A (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 971. <https://doi.org/10.1038/nrm1525>
- Newmaster S, Fazekas A, Steeves R et al. (2008) Testing candidate plant barcode regions in the Myricaceae. *Mol Ecol Resour* 8, 480-490. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02002.x>
- Pakpahan S, Artama WT, Suparta I (2016) Genetic characteristics and relationship in different goat populations of Indonesia based on Cytochrome B gene sequences. *Asian J Anim Sci* 10, 29-38. <https://doi.org/10.3923/ajas.2016.29.38>
- Pariset L, Mariotti M, Gargani M et al. (2011) Genetic diversity of sheep breeds from Albania, Greece, and Italy assessed by mitochondrial DNA and nuclear polymorphisms (SNPs). *Sci World J* 11, 1641-1659. <http://dx.doi.org/10.1100/2011/186342>
- Pfanzelt S, Albach DC, von Hagen KB (2019) Extremely low levels of chloroplast genome sequence variability in *Astelia pumila* (Asteliaceae, Asparagales). *Peer J* 7, e6244. <https://doi.org/10.7717/peerj.6244>
- Raman K (2010) Construction and analysis of protein-protein interaction networks. *Autom Exp* 2, 2. <https://doi.org/10.1186/1759-4499-2-2>

- Sarhan S, Hamed F, Al-Youssef W (2016) The rbcL Gene Sequence Variations among and within Prunus Species. JAST 18, 1105-1115.
- Schwede T, Kopp J, Guex N et al. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Res 31, 3381-3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Soltis DE, Soltis PS (1998) Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: Molecular systematics of plants II. (ed)^(eds). Springer. pp. 1-42.
- Staff N (2008) MatK Gene Is A "Barcode" DNA For Plants(ed)^(eds). https://www.science20.com/news_releases/matk_gene_is_a_barcode_dna_for_plants
- Steven GN, Subramanyam R (2009) Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical Acacia (Mimosoideae, Fabaceae). Mol Ecol Resour 9 Suppl s1, 172-180. [10.1111/j.1755-0998.2009.02642.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02642.x)
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S et al. (2014) STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic acids research 43, D447-D452. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 10, 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D et al. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30, 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Uddin MZ, Rifat AB, Mitu FY et al. (2019) Ethnomedicinal plants for prevention of cardiovascular diseases in Bangladesh. Bangl J Plant Taxon 26, 83-95.
- Williams BR, Mitchell TC, Wood JR et al. (2014) Integrating DNA barcode data in a monographic study of Convolvulus. Taxon 63, 1287-1306.
- Wolfe KH, Li W-H, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. PNAS 84, 9054-9058. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9054>
- Zare M, Fakheri B, Farokhzadeh S (2016) Effect of salt stress on morphological traits of lettuce genotypes (*Lactuca sativa* L.). IJHST 30, 457-468.
- Zawadzki CH, Renesto E, Peres MD et al. (2008) Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905)(Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. Genet Mol Biol 31, 767-771. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572008000400025>
- Zhai W, Duan X, Zhang R et al. (2019) Chloroplast genomic data provide new and robust insights into the phylogeny and evolution of the Ranunculaceae. Mol Phylogenet Evol 135, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.024>