technique is applied use of this in medical sciences and biotechnology, especially in the field of single nucleotide polymorphism (SNP), the identification of pathogenic and non-infectious microbes, DNA methylation, the identification of mutations in the major disease genes. This technique is based on synthesis and the enzyme system used in this method consists of four unique DNA Polymerase Klenow, ATP sulfurylase, Luciferase and Apyrase enzymes. Releasing of light produced by the enzyme luciferase determines the type of nucleotide present in the DNA chain, and the peaks of each nucleotide appear in the Pyrogram. The primer used in this method is flexible, and this unique feature has led to its high performance.Without using expensive materials, incontracontrast the other sequencing methods, is another advantage of this method.

Key words: Pyrosequencing, Methylation, Single Nucleotide Polymorphism (SNP), klenow enzyme

اهمیت روش DNA barcoding در مطالعات بیماری شناسی گیاهی

فایقه اطمینانی* و ادیبه اطمینانی

سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان

چکیده

یکی از روش های متداول در شناسایی موجودات بهره گیری از قطعات کوچک و استاندارد DNA است، که به آن در اصطلاح DNA barcoding اطلاق می شود، زیرا مانند یک برچسب بارکد برای هر تاکسون عمل می کند. این روش به دلیل اهمیت و در عین حال سادگی، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران علم رده بندی و آرایه شناسی (taxonomy)، بوم شناسان، زیست شناسان، اکولوژیست‌ها قرار گرفته است و تعداد مطالعات مرتبط با آن در حال افزایش است. وجود تنوع زیاد در بین موجودات و اهمیت برخی از آنها مانند حشرات و میکروارگانیسم ها از دیدگاه اقتصادی، همه گیری شناسی و کشاورزی موجب شده تا بارکد گذاری آنها اهمیت ویژه ای پیدا کند، هرچند انتقاداتی هم بر آن وارد است، در این مقاله تلاش شده است، برخی از مزایا و چالش های مرتبط با این روش مورد بحث و بررسی قرار گیرد.

واژه های کلیدی: باکتری، قارچ، ویروس، نماتود، barcoding

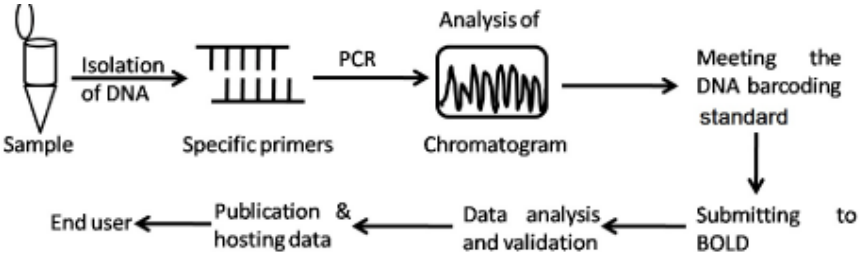
* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: Faegheh.Etminani@yahoo.com

مقدمه

در گذشته بیشتر مطالعات آرایه شناسان معطوف به خصوصیات شکل شناختی موجودات بوده است به همین دلیل تنها متخصصانی مانند آرایه شناسان می توانستند آرایه ها را به درستی شناسایی کنند. بر این اساس تنها با افزایش علاقه مندی به تنوع زیستی در بین رشته های بوم شناسی، زیست شناسی تکاملی، کشاورزی و غیره شناسایی درست و دقیق گونه ها اهمیت پیدا کرد. اما به دلیل تعداد کم متخصصان برای شناسایی گونه‌ها این امر به خوبی انجام نمی پذیرفت. بنابراین استفاده از روش های ژنتیکی و بهره گیری از روش های مولکولی مورد توجه قرار گرفت (Jinbo et al., 2011). یکی دیگر از مزایای استفاده از روش های مولکولی در قیاس با روش های شکل شناختی وجود روش و زبان مشترک است که امکان شناسایی دقیق تر گونه را در قیاس با روش های شکل شناختی توسط افراد مختلفی فراهم می کند.

DNA Barcoding روش استفاده از یک یا چند توالی کوتاه ژنی که از اختصاصیت کافی برای شناسایی برخوردار است، اطلاق می‌شود و به عنوان یک ابزار مفید در آرایه شناسی و شناسایی گونه‌ها معرفی می‌شود. این روش اطلاعات کاملی را از گونه های منفرد، صرف نظر از خصوصیات ریختی و یا خصوصیات مراحل رشدی در اختیار قرار می دهد.

در واقع DNA barcoding یک روش استاندارد است که



شکل ۱ – مراحل DNA barcoding (Purty and Chatterjee, 2016)

به کمک آن DNA های استخراج شده از نمونه‌های جمع آوری شده طی یک پروتکل استاندارد فراهم شده است و باید مورد پردازش قرار گیرد (شکل ۱) (Purty and Chatterjee, 2016). در واقع در مرحله‌ی اول باید نمونه ها از هرباریوم، کلکسیون‌های موجود، بانک بذر و.. بسته به هدف جمع‌آوری شود، سپس در مرحله‌ی بعدی طی تجزیه و تحلیل‌های آزمایشگاهی، توالی بارکد مورد نظر، تعیین شود. شایان ذکر است که برای هر موجود زنده باید از دستورالعملهای خاصی استفاده شود. در مرحله ی سوم توالی های به دست آمده بایستی در پایگاه های داده ای معتبر مانند BOLD مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد تا در نهایت از روی نتایج به دست آمده نزدیک ترین گونه ها به گونه مورد مطالعه پیشنهاد شود (Jeanson et al., 2011).

به منظور شناسایی گونه‌ها، CBOI از برخی ژن‌ها به عنوان روش مطلوب در DNA barcoding استفاده می‌کند. در حالت ایده آل، بایستی از یک توالی ژنی برای شناسایی گونه ها در تمام آرایه ها از ویروس تا گیاهان و جانوران استفاده شود، اگرچه ژن مطلوب تاکنون شناسایی نشده باشد.

به همین دلیل DNA بارکدهای مختلفی برای جانوران، گیاهان و میکروارگانیسمها پیشنهاد می‌شود. تحقیقات در این زمینه با مطالعات Hebert و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از بارکدینگ ژن سیتوکروم اکسیداز C (COI1) آغاز شد. آن ها از پرایمرهایی که قادر به تکثیر یک قطعه ی ۶۴۸ جفت بازی از ژن میتوکندری COI 1= cytochrome-c oxidase subunit 1 بودند، استفاده کردند. سپس این روش به کمک پروژه BOLD برای شناسایی دیگر یوکاریوت ها مرسوم شد و در سال ۲۰۰۴ پروژه CBOL با هدف توسعه‌ی کتابخانه بارکدگذاری DNA توسعه یافت (Jinbo et al., 2011). ناحیه ایده آل DNA بارکد باید به میزان کمی در Intra-specific و به مقدار زیادی در inter-specific اشتقاق نشان دهد. هم چنین به کمک پرایمرهای عمومی به سادگی در بسیار یا تمام گونه ها قابل تکثیر باشد و بارکدهای رفرنس هم بایستی از اسناد رسمی منتشر شده از پایگاه های داده ای معتبر همراه با توالی های آنلاین کروماتوگرام در دسترس باشد (Hebert et al., 2003).

بارکد گذاری DNA به دو صورت تعریف می‌شود:

۱– DNA barcoding sensu stricto

۲– DNA barcoding sensu lato

مفهوم اول به دلیل شناسایی در سطح گونه از اهمیت به سزایی برخوردار است در حالی که در مفهوم دوم محدودیتی قائل نیست و شناسایی را در هر سطح تاکسونومیکی (جنس یا خانواده) هم مورد پذیرش قرار می دهد. اما به هرحال دیدگاه نخست از نظر آرایه شناسان از اهمیت به سزایی برخوردار است (Valentini et al., 2009).

گیاهان

DNA بارکد در گیاهان بیش از نمونه های جانوری با چالش همراه بوده است. برخلاف جانوران، ژن های میتوکندری گیاهان کاندیدای مناسبی برای DNA بارکد به شمار نمی‌روند. معمولاً نرخ جایگزینی در ژنوم میتوکندری گیاهی اندک است که کاربرد COI را به عنوان بارکد گیاهی با محدودیت مواجه می‌سازد (Fazekas et al., 2008). اگرچه ژن های محتمل دیگری در کلروپلاست گزارش شده است. نتایج قابل ملاحظه ای از ژن maturase K (matK) و matK در ارتباط با دیگر ژن‌ها فراهم آمده است که برای مطالعه ی تنوع فلوری بسیار مفید است (Purty and Chatterjee, 2016).

باکتری‌ها

ژن 16S rRNA به عنوان یک نشانگر در مطالعه ی باکتری‌ها در اکوسیستم های مختلف پیشنهاد شده است. باکتری‌ها از تنوع بالایی برخوردار هستند که برای شناسایی عموم آن‌ها به دلیل عدم قابلیت رشد بر محیطهای کشت معمول، می تواند مناسب باشد. Smith و همکاران (۲۰۱۲) از ژن COI1 هم برای مطالعه ی *Wolbachia* که یک باکتری همزیست است استفاده کردند. این مطالعه تایید می کند که COI1 در باکتری ها هم می تواند به عنوان یک نشانگر معرفی شود. Chaperonin-60 (*cpn*60) یک مولکول چاپرون حفاظت شده در باکتری ها است که با اسامی مختلفی همانند GroEL و HSP60 شناخته می شود و می تواند به عنوان نشانگر به خوبی عمل کند. برای مطالعه ی بارکدهای آرکی ها از 16S rRNA تیپ ۲ چاپرونین (ارتولوگ cpn60) استفاده می شود. Link و همکاران cpn60 را به عنوان بارکد باکتریایی پیشنهاد نموده اند (Links et al., 2012). ژن rpoB یکی دیگر از ژن هایی است که برای شناسایی باکتری ها مطرح است (Links et al., 2012, Case et al., 2007).

Tian و همکاران (۲۰۱۶) برای شناسایی دقیق در سطح گونه و پاتوار برای باکتری بیماری زای گیاهی *Xanthomonas* از این روش استفاده کردند. آن ها ۴ ژن 16SrRNA، cpn60، gyrB و avrBs2 را به عنوان بارکد استفاده کردند. نتایج مطالعات آن ها نشان داد که ژن cpn60 به عنوان مناسب ترین و قابل اعتمادترین بارکد در شناسایی گونه های قرنطینه ای **زانتوموناس** به شمار می رود.

Makarova و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ی شناسایی **فیتوپلاسماها** نشان دادند که بارکد ژن Tu در قیاس با ژن 16S rRNAقادر به تفکیک بهتر گونه های فیتوپلاسمایی خواهد بود و در مطالعات فیتوپلاسمایی می توان ژن Tu را به عنوان بارکد مناسب پیشنهاد نمود.

قارچ ها

قارچ ها پس از جانوران بیشترین تعداد گونه را در سلسله یوکاریوت ها به خود اختصاص می دهند، تخمین زده شده که ۱/۵ میلیون گونه برای قارچ ها وجود دارد کمتر از ۱۰ درصد از آنها به طور رسمی توصیف شده اند. قارچ ها نه تنها به دلیل شرکت در فرایند تخمیر بلکه به دلیل اینکه عامل بیماریزای گیاهی و جانوری هستند از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردارند. امروزه گسترش بارکد گذاری DNA در قارچ ها به منظور ردیابی و شناسایی قارچ های بیماری زا و نیز قارچ های مفید برای حفاظت از محصولات کشاورزی و منابع طبیعی از جمله جنگل‌ها ضروری است. ناحیه عمومی در قارچ ها برای بارکدگذاری تعریف نشده است. در گذشته ناحیه ی کد کننده COI1 که بارکد قابل قبول برای مطالعه ی جانوران است، در پروژه (بارکد برای زندگی) برای تمام ارگانیسم ها از جمله قارچ ها مطرح شد که مشکل این ژن‌ها وجود تعداد زیادی اینترون در آن ها بود، که برای رفع این مشکل از RT-PCR استفاده می شد (Ebach and Holdrege, 2005). اگرچه بر خلاف جانوران، استفاده از COI در قارچ ها بسیار مرسوم نیست اما Seifert و همکاران (۲۰۰۷) که از COI1 برای شناسایی *Penicillium* استفاده کردند، آن ها دریافتند که توالی COI، در درون گونه، از تنوع کمتری نسبت به ITS و β-tubulin برخوردار است و تنوع توالی COI در بین گونه‌ها، قابل مقایسه با ITS بوده، ولی از β-tubulin کمتر است. گرچه β-tubulin تفکیک تاکسونومیکی بهتری را انجام می دهد ولی تکثیر و همردیف سازی ژن COI ساده تر است. Feau و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ای که بر روی عامل زنگ *Melampsora* انجام دادند از نواحی ITS و LSU و توالی ژنوم میتوکندریایی COI برای تعیین حدود در گروه¬های تاکسونومیکی مختلف استفاده کردند. براساس خصوصیات ریختی و میزبانی هشت گونه تعریف شده بود که بارکدگذاری DNA روی گونه های تعریف شده تغییراتی اعمال نمود. Vialle و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه بر روی شاخه ی بازیدیومیست ها نشان دادند که در قیاس بین ۱۴ ژن میتوکندریایی از جمله COI1 و ITS، هیچ ژن میتوکندریایی به اندازه ITS قادر به تفکیک گونه ها از هم‌دیگر نبودند.

اُمیست ها

شبه قارچ ها در محیط های اکولوژیکی مختلفی حضور دارند و جنس های *Phytophthora* و *Pythium* از جمله بیماری زاهای گیاهی هستند که در اُمیست‌ها قرار دارند و زیان زیادی را به انواع گونه‌های گیاهی وارد می‌کنند لذا شناسایی صحیح آن ها برای تشخیص دقیق آن

ها ضروری است. همانند جانوران که زیرواحد یک ژن سیتوکروم اکسیداز (COI) به عنوان بارکد استفاده می گردد در امیست ها هم همانند *Phytophthora* از این ژن و ITS می‌توان استفاده کرد. در امیست ها ناحیه ای از شاخه ی *Stramenopila* که توسط مورفولوژیست ها مطالعه شده، ناحیه ی ITS برای شناسایی موثر در نظر گرفته شده است. از زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی (LSU) نیز به عنوان یک نشانگر مولکولی برای تشخیص گونه‌های جنس *Pythium* استفاده می شود که این نشانگر حاوی مناطقی است که واگرایی زیادی دارند (Bala et al., 2010).

ویروس ها

ویروس ها از فراوانی قابل توجهی برخوردار هستند. دانشمندان تخمین می زنند که تعداد پارتیکل های ویروس احتمالاً ده برابر بیش از تعداد کل سلول ها است. تنوع مولکولی ویروس ها از پیچیدگی خاصی برخوردار است. شناسایی تمامیت ویروس ها از اهداف اصلی DNA بارکدینگ است. مطالعات محدودی پیرامون مطالعه ی فیلوژنتیکی ویروس های مهم انجام پذیرفته است که در بیشتر موارد مربوط به ویروس های جانوری است. بنابراین توسعه ی بارکدینگ DNA باید مورد توجه قرار گیرد (Chatterjee, 2016 Purty and).

نماتودها

شاخه ی نماتودها از غنای بالایی برخوردار است ویکی از فراوان ترین گروه metazoan، بر کره زمین هستند. تخمین زده می شود که تقریبا ۹۰ درصد از تمام موجودات چند سلولی را شامل می شوند. به علاوه Lambshead (۱۹۹۳) پیش بینی کرده است که تعداد گونه های نماتود در زیستگاه های دریایی به فراوانی یکصد میلیون خواهد بود، اگرچه تنها ۲۴۶۴۶ گونه تاکنون از تمام زیستگاه ها توصیف شده است (Hugot et al., 2001). Floyd و همکاران (۲۰۰۲) از ژن 18S rRNA به عنوان بارکد برای مطالعه تنوع پیشنهاد کردند. ژن COI1 به خوبی در رابطه با نماتودهای بیماری زای گیاهی به جز در موارد محدودی معرفی نشده است. یکی از روش های استاندارد برای شناسایی DNA بارکدینگ شناسایی براساس نه صرفا یک یا دو ژن بلکه استفاده همزمان از چندین ژن است که حداقل از ۳ معیار برخوردار باشد: ۱) تنوع و افتراق ژنتیکی قابل توجهی نشان دهند؛ ۲) از نظر طول توالی به گونه ای باشند که استخراج آن ساده باشد؛ ۳) ناحیه حفاظت شده باشد تا به کمک پرایمرهای عمومی تکثیر شود. S r RNA 18 (Floyd et al., 2002)، D2-D3 از نواحی S r RNA 28 (subbotin et al., 2006) و ژن ITS (De ley et al., 2005) ازجمله ناحیه‌هایی هستند که به عنوان DNA بارکد در نماتودها استفاده می شود. ناحیه ی ITS-rRNA برای بسیاری از گونه های نماتودهای بیمارگرهای گیاهی بیش از دیگر ژن ها مورد تایید است.

چالش ها و چشم اندازها

سرعت عمل، مقرون به صرفه بودن و شناسایی گونه های مخفی از مزایای DNA barcoding است. اما انتقاداتی به این روش وارد است. برخی محققان بر این باورند که استفاده از ژن‌های میتوکندریایی و یا کلروپلاستی نمی تواند منعکس کننده رفتار ژن‌های هسته ای باشد. از طرف دیگر ممکن است یک ژن هسته‌ای به تنهایی قادر به نشان دادن فیلوژنی سایر ژن‌های هسته‌ای از جمله ژن‌های دخیل در تولید مثل جنسی نباشد. از طرفی معیارها و مفاهیم گونه غالباً اختصاصی نیستند و در رابطه با آن اختلاف نظرهای اساسی وجود دارد. (Birky, 2007)

بعد از پیشرفت بارکد گذاری به وسیله DNA، در گروه زیادی از میکروارگانیسم‌ها که از نظر اقتصادی اهمیت داشتند، احتمال استفاده از قطعات کوتاه تر برای بارکد مطرح شد. از طریق تجزیه و تحلیل بارکدها به وسیله نرم افزارهای‌های اختصاصی یکسری الیگونوکلئوتیدهای مشخصی که کمتر از ۲۵ جفت باز هستند پیشنهاد شدند. این الیگونوکلئوتیدها میکروکد نامیده می شوند که موجب تشخیص سریع حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ گونه بر روی یک سری سطوح صاف هستند. از این روش که میکروکدینگ (oligonucleotide barcoding = micro coding) نام دارد تنها در مرحله دوم از بارکد گذاری می توان استفاده کرد. زیرا ابتدا باید توالی های مربوط به بارکدها موجود باشند و سپس قطعات مشترک بین آنها به عنوان میکروکد انتخاب شوند. این روش سریع‌تر، ارزان‌تر و استفاده از آن راحت‌تر است. ولی به دلیل کوتاه بودن و دارا بودن اطلاعات کمتر، از حساسیت تاکسونومیکی کمتری نسبت به بارکد کامل برخوردار است (Summerbell et al., 2005). به هرحال کاربرد DNA بارکدینگ و دیگر روش های مشابه امکان

شناسایی سریع و دقیق تر را برای آرایه شناسان فراهم

نموده است.

منابع

Jinbo, U., Kato, T., Ito, M. (2011), Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. Entomological Science. 14:107-124.

Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P. (2009), DNA barcoding for ecologists. Ternds in Ecology & Evolution. 24:110-117.

Purty, R.S., Chatterjee, S. (2016), DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. Austin J Biotechnol Bioeng. 2016; 3(1): 1059.

Jeanson, M. L., Labat, J., Little, D. P. (2011), DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists. Annals of Botany. 108(8):1-7..

Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., (2003), deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci.; 270: 313-321.

Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti , P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M., Barrett, S. C. H. (2008), Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. PLoS One; 3: e2802.

Smith, M.A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E.S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B.L., Gibbs, J., Hajibabaei, M., Hallwachs, W., Hind, K., Hrcek, J., Huang, D-W., Janda, M., Janzen, D. H., Yanwei, L., Miller, S. E., Packer, L., Quicke, D., Ratnasingham, S., Rodolphe, J., Rougerie, R., Shaw, M. R., Sheffield, C., Stahlhut, J. K., Steinke, D., Whitfield, J., Wood, M., Zhou, X. (2012), Wolbachia and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. PLoS One; 7: e36514.

Links, M.G., Dumonceaux, T.J., Hemmingsen, S.M., Hill, J.E. (2012),The chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. PLoS One. 7: e49755.

Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F., Kjelleberg, S. (2007), Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl Environ Microbiol. 73: 278-288..

Tian, Q., Zhao, W., Lu, S., Zhu, S., Li, S. (2016). DNA Barcoding for Efficient Species- and Pathovar-Level Identification of the Quarantine Plant Pathogen Xanthomonas. PLoS ONE. 11(11): e0165995. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0165995

Makarova, O., Contaldo, N., Paltrinieri, S., Kawube, G., Bertaccini, A., Nicolaisen, M. (2012), DNA Barcoding for Identification of "Candidatus Phytoplasmas" Using a Fragment of the Elongation Factor Tu Gene. PLoS ONE. 7(12): e52092.

Seifert, K.A., Samson, R.A., Dewaard, J.R., Houbraken, J., Lévesque, C.A., Moncalvo, J.M., Seize, G. L., Hebert, P. D. N., (2007), Prospects for fungus identification using COI DNA barcodes, with Penicillium as a test case. Proc Natl Acad Sci USA. 104: 3901-3906.

Ebach, M. C., Holdrege, C. 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. Nature. 434:1-2..

Vialle, A., Feau, N., Allaire, M., Didukh, M., Martin, F., Moncalvo, J. Hamelin, R. C. (2009), Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. Molecular Ecology Resources. 9:99-113..

Bala, K., Robideau, G. P., Désaulniers, N., de Cock, A. W. A. M., Lévesque, C. A. (2010), Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of Pythium from Canada. Persoonia. 25:22–31.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M. (2002), Molecular barcodes for soil nematode identification . Mol. Ecol. 11: 839-50.

De Ley, P., De Ley, I.T., Morris, K, Abebe, E., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha-Olivares, A., Jay Burr, A.H., Baldwin, J.G., Thomas, W.K. (2005), An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 360(1462):1945-1958.

Summerbell, R. C., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Bovers, M., Fell, J. W., Diaz, M. R., Boekhout, T., de Hoog, G. S., Stalpers, J., Crous, P. M. (2005), Microcoding: the second step in DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 360:1897–1903..

Birky, C., W. Jr. (2007), Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution and systematic. Hydrobiologia. 593:175-183.