

بررسی توالی‌های ژن‌های کلروپلاستی *matK*، *rbcL* و *trnL-F* در *Salvia*

Thymus syriacus Boiss و *nemorosa* L.

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^۴، صابر زهری^۴

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

۴- به ترتیب دانشیار، استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

Jahangiri M¹, Saffar B^{*2}, Kharazian N⁴, Latifi navid S¹, Zahri S¹

1- MSc Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, 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 دو گونه دارویی *Salvia nemorosa* و *Thymus syriacus* از تیره Lamiaceae مورد تعیین توالی قرار گرفتند 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 مرحله 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 مقایسه 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 *matK*، *trnL-F* و *rbcL* می‌توانند به‌عنوان بارکدهای DNA برای شناسایی گونه‌های *Salvia nemorosa* و *Thymus syriacus* مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

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

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 به شدت خمیده می‌باشد و فصل گل‌دهی آن از اردیبهشت تا تیرماه است (Talebi et al. 2018). *Thymus syriacus* گیاهی بوته‌ای، ساقه ۶-۲۲ 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 می‌باشد (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 تاکسونومیک است که توسط یک نشانگر ژنتیکی می‌توان یک گونه ناشناخته را شناسایی کرد. پس از تهیه بارکد اطلاعات می‌تواند 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 biphosphate 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).

ژن‌های *trnL* و *trnF* و ایترون *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 (ایترون‌ها) 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. 2014; Hossinzadeh et al. 2004).

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 بر کوتاه 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
<i>trnL-F</i>	20
<i>trnL-R</i>	20
<i>rbcLa-F</i>	26
<i>rbcLa-R</i>	20
<i>matK-390F</i>	22
<i>matK-1326 R</i>	22

syriacus در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب باندهای ۶۰۰ و ۹۰۰ جفت‌بازی را بر روی 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 به ترتیب برابر ۹۹-۹۸، ۹۹-۹۴ 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 آنالیز Blastn 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 ۵ دودمان در درون این درخت شده است (دو بخش مرکزی به دلیل داشتن bootstrap پائین، ۴۲، با هم یک دودمان تکاملی محسوب می‌شوند) (شکل ۱).



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

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 الگو ۲۵ نانو گرم، معادل ۵ میکرولیتر، دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات ها ۰/۵ میکرولیتر (۱۰ ۲۰ میکرومولار)، پرایمرهای پیشرو و معکوس هر کدام ۰/۵ میکرولیتر (۲۰ میکرومولار)، بافر PCR ۲/۵ میکرولیتر (10X)، کلرید منیزیم ۰/۵ میکرولیتر (۵۰ میکرومولار) و آنزیم *Taq polymerase* ۰/۲۵ میکرولیتر (۵U/μl). جهت دستیابی به قطعات الیگونوکلئوتیدی مورد نظر، شرایط PCR بهینه شد. سپس برای اطمینان از صحت انجام PCR محصول به دست آمده روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد (Green and Sambrook 2014). بعد از انجام خالص‌سازی، تعیین توالی قطعات تکثیر شده صورت پذیرفت.

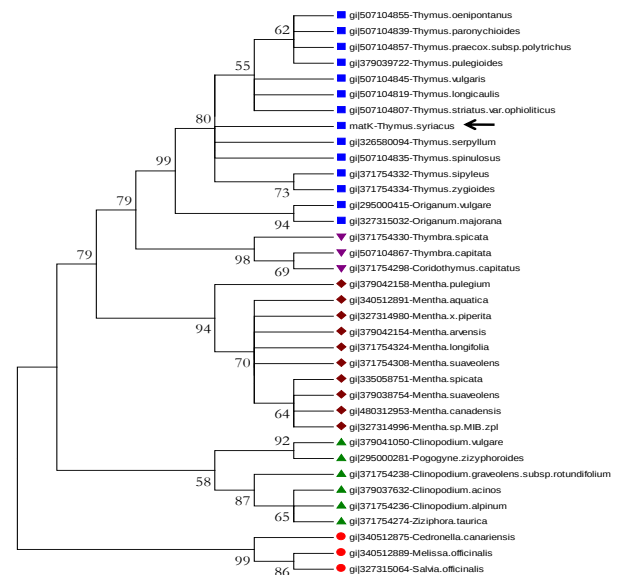
نتایج کروماتوگرام حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار v. 2.4 chromas بررسی شدند. روش Bootstrap جهت برآورد اساس توزیع با نمونه‌گیری مجدد از مجموعه داده‌های اولیه استفاده شد. این روش برای محاسبه فاصله‌ی اطمینان فیلوژنی‌های ایجاد شده از داده‌های توالی به کار رفت. تکرار ۱۰۰۰ استفاده شد و نتایج Bootstrap و بهترین مدل فیت برای توالی‌های مورد نظر بر مبنای اکثریت درخت مورد توافق (Consensus) با ۵۰ درصد cut off در برنامه MEGA ۵ به دست آمد. Blast توالی مورد نظر بر علیه دیتابیس نوکلئوتیدی غیرتکراری انجام شد و انتخاب همپوشانی توالی مورد نظر (> ۹۵% query coverage) و ارزش مورد انتظار (E-value) نزدیک به صفر انجام شد.

پس از استخراج DNA، و بهینه‌سازی شرایط PCR، 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*

فیلورنی ژن *matK* بر اساس هم‌ردیفی چندگانه توالی حاصل از گیاه *Th. syriacus* با توالی‌های به‌دست آمده از پایگاه داده‌ها از ۴۰ گونه مختلف انجام شد. در این درخت بر اساس ارزش هر شاخه، ۵ 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 (شکل ۲). آنالیز فیلورنتیکی ژن *matK* بر اساس هم‌ردیفی چندگانه توالی حاصل از گیاه *S. nemorosa* با توالی‌های ۴۰ گونه مختلف انجام شد.



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

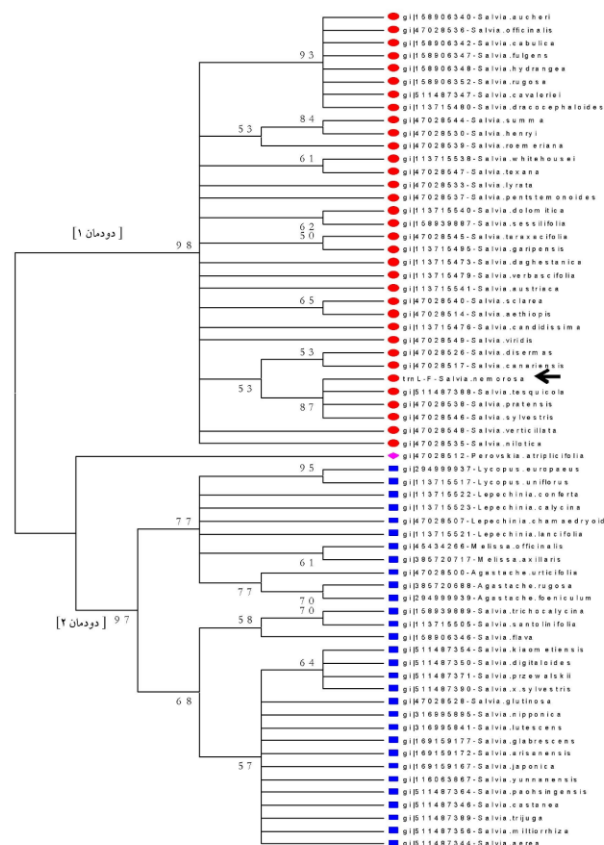


شکل ۲- درخت فیلورنی ژن *matK* از گیاه *Th. syriacus* با cut off ۵۰ درصد

فیلورنی 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 فیلورنتیکی بر اساس هم‌ردیفی چندگانه ۶۴ 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 دودمان به‌صورت واحدهای کاملاً مستقل به ارث رسیده‌اند. دودمان تکاملی ۲، به ۳ کلاد کوچک با ارزش bootstrap بالا در شاخه‌های منتهی به هر کلاد تفکیک شده است (شکل ۴). با بهره‌گیری از این ژن مشخص می‌شود که *S. nemorosa* ارتباط فیلورنی بیش‌تری با سایر گونه‌های *Salvia* نشان می‌دهد. نتایج حاصل از مطالعات مولکولی بر پایه ژن *trnL-F* بر روی 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 کاملاً مستقلی را تشکیل داده است. مقادیر بوت استرپ حاصل از تحلیل این ژن در این تحقیق از نتایج Wang et al. (۲۰۱۳) تبعیت

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.

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 ۴- 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 (۶۴ 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. احتمالاً 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* ۴۶ درصد گزارش شد در حالی که ژن *rbcL* تنوعی را در این سطح آشکار نداشت (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 به کار 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) 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* به کار روند و نتایج دقیقی را در کوتاه‌ترین زمان ممکن فراهم سازند.

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. *Genetic and Molecular Research* 13:1144-1151
- Talebi SM, Mahdizadeh M, Gorbani Nohooji M and Akhiani, 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) Jasas. 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.