مطالعه فیلوژنتیک برخی از گونه‌های بادرشبو با روش پلی‌مورفیسم DNA

سودابه سعیدنیا [۱]*، احمدرضا گوهری[۱]، میچیهو ایتو[۲]، گیشو هوندا[۳]، عباس حاجی‌آخوندی[٤]

۱- استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه کیوتو

۳- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه کیوتو

٤- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان انقلاب اسلامی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، تلفن: ٦٦٤٩٤٩٩٦ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦٤٦١١٧٨ (۰۲۱)، صندوق‌پستی: ٦٤٥١ - ١٤١٥٥

پست الکترونیک: soodabehsaeidnia@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۲/۲۸ **تاریخ تصویب:** ۸۳/۱۰/۱۹

چکیده

مقدمه: جنس ***Dracocephalum*** در ایران دارای ۸ گونه علفی معطر است و نه تنها به عنوان سبزی معطر در تهیه غذا به کار می‌رود بلکه در گیاه درمانی برای رفع سوء هاضمه کاربرد وسیعی دارد. گونه‌های مختلفی از این جنس با نام بادرشبو یا وارشبو در عطاری‌ها به فروش می‌رسد. در کشور ژاپن تنها یک گونه آورده شده از چین موجود است که کاربرد درمانی ندارد و به عنوان گیاه زینتی کاشته می‌شود.

هدف: هر چند بررسی‌هایی روی فیلوژنی این جنس با دیگر جنس‌های نزدیک انجام شده اما تاکنون مطالعه‌ای روی ارتباط انسابی گونه‌های مختلف این جنس صورت نگرفته است. در این مطالعه ارتباط فیلوژنتیک میان برخی از گونه‌های جنس ***Dracocephalum*** با روش تزاید تصادفی **DNA** چند شکلی (پلی‌مرف) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: فاصله ژنتیک به منظور ترسیم نمای کلادوگرام برای گونه‌هایی که ارتباط انسابی نزدیکی دارند محاسبه شده است. برای تایید مطالعه فیلوژنی ردیابی ترکیبات اصلی موجود در سطح برگ گونه‌های مذکور در استخراج ترکیبات فرار با اتر و با روش کروماتوگرافی گازی صورت پذیرفته است.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که فاصله ژنتیک میان نمونه‌های مختلفی از ***D. kotschyi*** - گونه انحصاری ایران - بسیار ناچیز است. این نزدیکی در میان نمونه‌های مختلفی از گونه ***D. arguense*** بومی شرق آسیا نیز به طور مشخصی به چشم می‌خورد. ***D. subcapitatum*** بومی ترکمنستان ارتباط انسابی نزدیکی با گونه ***D. kotschyi*** دارد. ردیابی لیمونن - ۱۰- آل در دو گونه مذکور و کموتایپ متفاوت آنها از گونه ***D. arguense*** نیز موید نظریه فوق است.

نتیجه‌گیری: نمونه‌های گونه ***D. kotschyi*** قرابت ژنتیکی نزدیکتر و نیز مارکرهای کموتاگزونومیک شبیه‌تری با گونه ***D. subcapitatum*** دارا هستند در حالی‌که نمونه‌های ***D. arguense*** از نظر کموتاگزونومی و فیلوژنی با دو گونه قبلی تفاوت واضحی دارند.

گل‌واژگان: ***Dracocephalum***، بادرشبو، پلی مرفیسم **DNA**، فیلوژنی، لیمونن- ۱۰- آل

مقدمه

بادرشبو یا بادرشبی نامی متداول برای نامیدن برخی از گونه‌های جنس *Dracocephalum* است که متعلق به خانواده لابیاته بوده و در ایران دارای ۸ گونه علفی یک یا دو ساله و معطر می‌باشد [۱،۲]. گونه‌های مختلف آن به عنوان سبزیجات معطر در تهیه غذا و نیز در درمان اختلالات هضمی کاربرد سنتی فراوانی دارد [۳]. گونه *D. kotschyi* Boiss. اندمیک ایران بوده و پراکنش وسیعی دارا است.

D. subcapitatum (Kuntze) Lipsky در ترکمنستان، آناتولی و مناطق محدودی از شمال شرق ایران می‌روید [٤]. در شرق دور و کشور ژاپن تنها یک گونه آورده شده از چین موجود است به نام *D. arguense* که به عنوان گیاه زینتی کاشته می‌شود [۵]. مطالعات کتابخانه‌ای نشان می‌دهد که تاکنون مطالعه فیلوژنتیک برای تعیین قرابت ژنتیکی و کموتاگزونومی گونه‌های مذکور از این جنس صورت نگرفته است. در این مطالعه کوشیده‌ایم تا از روش‌های ارزشمند در بیولوژی مولکولی که در سال‌های اخیر به وفور جهت تعیین قرابت فیلوژنی به کار می‌رود و نیز ردیابی شاخص‌های کموتاگزونومی استفاده گردد. روش تزاید تصادفی DNA چند شکلی (پلی مرف) از جمله متداولترین روش‌های مذکور است. تاکنون در چندین مطالعه فیلوژنتیک روی گونه‌هایی از جنس *Perilla* روش مذکور با موفقیت به کار رفته است [٦،٧].

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

گیاهان به کار رفته در این مطالعه و اطلاعات مربوط به محل و تاریخ جمع آوری گیاهان در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. شناسایی، تعیین شماره هرباریومی و نگهداری نمونه موزه‌ای گیاهان در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشکده علوم دارویی دانشگاه کیوتو صورت گرفته است.

استخراج DNA تام

برگ‌های خشک شده گونه‌های مزبور برای استخراج DNA تام مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های گیاهی تحت نیتروژن مایع پودر شده و استخراج DNA در دمای صفر درجه سانتی‌گراد با استفاده از روش مشروح در پروتوکل کیت Dneasy Plant Mini Kit (Qlagene Co.) ونیز پروتوکل Plant Genomic DNA extraction Mini Prep System (Viogene Co.) انجام شد. در روش‌های مزبور، ابتدا میزان ۲۰ میلی‌گرم از پودر گیاهی تهیه شده در نیتروژن مایع را در حضور ۸۰۰ میکرولیتر از بافرAP1 با ۱میکرولیتر از آنزیم RNase A به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد مجاورت داده و سپس اسپین نموده تا محتویات به درب ویال‌های استریل نچسبد. آنگاه با افزودن ۱۳۰ میکرولیتر از بافر AP2 به مدت ۵ دقیقه در یخ انکوبه گردید. این مخلوط را به ستون QLA Shredder منتقل کرده و در سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه بخش مایع تحتانی را به تیوب جدید انتقال داده، ۲۲۵ میکرولیتر بافر AP3 افزوده و به ستون Dneasy منتقل گردید. پس از افزودن بافر AW (۵۰۰ میکرولیتر) به سطح ستون و دو بار تکرار سانتریفوژ، مایعات حاصل از شستشو را دور ریخته و از بافر AE به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برای حل کردن DNA استفاده شد. DNA حاصله در اتانول ۹٦ درجه رسوب داده شده و توسط اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید. برای دستیابی به خلوص بالاتر شستشو با محلول فنل – کلروفرم صورت گرفته و رسوب دادن مجدد در اتانول انجام شد. رسوب اسیدهای نوکلئیک در بافر تریس حل و برای ادامه آزمایش‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [٦].

تزاید تصادفی DNA چند شکلی (RAPD assay)

برای تزاید DNA از تعداد ٤۰ آغازگر تکی (single primer) ۱۰ واحدی (10- mer) تولید شده توسط انستیتو Operone Technologies (OPH- 01 تا OPH- 20 و نیز OPI- 01 تا OPI- 20) استفاده گردید. مخلوط به کار رفته برای تزاید شامل ١٤ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۲ میکرولیتر از بافر Gene Taq Universal Baffer، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP (که غلظتی معادل ۲/۵ میلی‌مولار از هر یک از نوکلئوتیدهای dATP, dTTP, dGTP, dCTP داراست)، ۰/۸ میکرولیتر آغازگر، ۰/۲ میلی‌لیتر (۵/۰

واحد استاندارد بر میکرولیتر) از آنزیم Taq DNA Polymerase (تمامی واکنشگرها از شرکت سازنده Wako Nippon Gene تهیه شده است) و بالاخره ۱ میکرولیتر از template DNA (با غلظت ٤٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در حجم کلی معادل ۲۰ میکرولیتر می‌باشد. واکنش‌ها در دستگاه PCR ساخت شرکت Takara انجام گرفته است. جداسازی اولیه زنجیره‌های DNA در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه پس آنگاه ۳۳ سیکل حرارتی با برنامه دمایی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. محلول‌ها در نهایت به مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد باقی ماندند.

جداسازی محصولات واکنش PCR با روش ژل الکتروفورز در ژل آگاروز به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شده و آشکارسازی نوارهای چند شکلی یا پلی‌مرف با قرار دادن ژل در محلول اتیدیوم برو ماید زیر دستگاه ترانس ایلومیناتور صورت گرفت. عملیات تزاید DNA با تعداد ۳۰ آغازگر که سکانس آنها در جدول شماره ۲ مشخص گردیده موفقیت‌آمیز بود. این واکنش‌ها برای هر آغازگر دو بار تکرار شد و تنها نوارهای پلی‌مرفی که هر دو بار قابل مشاهده بود در محاسبات لحاظ گردید. به منظور ترسیم ماتریکس مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی میان نمونه‌های بادرشبو (شکل شماره ۱) ابتدا شاخص آماری S_{sm} یا single matching coefficient برای هر زوج نمونه گیاهی محاسبه گردید. برای محاسبه این شاخص، تعداد نوارهای پلی‌مرف سهمی یا shared (که به طور مشترک در یک جفت نمونه گیاهی به چشم می‌خورد) تقسیم بر تعداد نوارهای پلی‌مرف منحصر به فرد یا unique(که تنها در یک نمونه گیاهی مشاهده شده است) گردید. پس از اینکه S_{sm} برای تمام زوج‌های گیاهان به دست آمد، شاخص دیگری به نام فاصله ژنتیکی (d) بر مبنای S_{sm} و با فرمول زیر محاسبه شد:

$$d= (1- S_{sm})^{1/2}$$

محاسبات UPGMA (unweighed pair- group method with arithmetical averages) با به کارگیری ماتریکس مذکور انجام و کلادوگرام خوشه‌ای (شکل شماره ۱) ترسیم گردید [۸]. در محاسبات مذکور فاصله ژنتیکی میان زوج‌های گیاهی با یکدیگر مقایسه شده و نخستین زوج‌هایی (*D. k. S* و *D. K. T*) و (*D. a. H* و *D. a. N*) که دارای کمترین فاصله ژنتیکی با یکدیگر می‌باشند به عنوان خوشه‌های پایه انتخاب می‌شوند. فاصله دیگر نمونه‌های گیاهی با این زوج‌ها بر اساس فرمول زیر به دست می‌آید: مجموع فاصله‌های ژنتیکی هر یک از اجزای زوج گیاهی تشکیل‌دهنده خوشه پایه با نمونه موردنظر، بخش بر عدد ۲، به عبارتی میانگین فاصله‌های ژنتیکی هر جفت پایه با نمونه موردنظر.

ردیابی کیفی ترکیبات فرارموجود در سطح برگ نمونه‌های گیاهی

میزان ۳۰ میلی‌گرم از برگ هر یک از نمونه‌های گیاهی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با اتر اتیلیک به مدت ۲٤ ساعت عصاره‌گیری گردید و عصاره‌های حاصله پس از عبور دادن از

جدول شماره ۱- گونه‌های بادرشبی(*Dracocephalum*) به کار رفته در این مطالعه و اطلاعات مربوط به زمان و مکان جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی.

تاریخ جمع‌آوری	محل جمع‌آوری	گونه‌ها
۲۰۰۳/٤/۸	ارتفاعات توچال، ایران	*D. kotschyi*
۲۰۰۳/٤/۱۰	سیاه بیشه، ایران	*D. kotschyi*
۲۰۰۳/٤/۸	شمال خراسان، ایران	*D. subcapitatum*
۲۰۰۳/٤/۱۰	هوکایدو، ژاپن	*D. arguense*
۲۰۰۳/٤/۱۰	ناگانو، ژاپن	*D. arguense*

جدول شماره ۲- اطلاعات مربوط به سکانس بازی اولیگونوکلئوتیدهایی که به عنوان آغازگر در تکثیر تصادفی DNA پلی‌مرف به کار رفته‌اند.

از چپ (`۵) به راست (`۳)	کد آغازگر	از چپ (`۵) به راست (`۳)	کد آغازگر
GGAGGAGAGG	OPI- 02	GGTCGGAGAA	OPH- 01
CAGAAGCCCA	OPI- 03	TCGGACGTGA	OPH- 02
CCGCCTAGTC	OPI- 04	AGACGTCCAC	OPH- 03
AAGGCGGCAG	OPI- 06	GGAAGTCGCC	OPH- 04
CAGCGACAAG	OPI- 07	AGTCGTCCCC	OPH- 05
TGGAGAGCAG	OPI- 09	CTGCATCGTG	OPH- 07
ACAACGCGAG	OPI- 10	GAAACACCCC	OPH- 08
ACATGCCGTG	OPI- 11	TGTAGCTGGG	OPH- 09
CTGGGGCTGA	OPI- 13	ACGCGCATGT	OPH- 12
TGACGGAGGT	OPI- 14	GACGCCACAC	OPH- 13
TCATCCGAGG	OPI- 15	ACCAGGTTGG	OPH- 14
TCTCCGCCCT	OPI- 16	AATGGCGCAG	OPH- 15
TGCCCAGCCT	OPI- 18	CACTCTCCTC	OPH- 17
AAAGTGCGGG	OPI- 20	GAATCGGCCA	OPH- 18
GGGAGACATC	OPH- 20	CTGACCAGCC	OPH- 19

کارتریج سیلیکاژل برای جداسازی کلروفیل و پیگمان‌های مشابه، به دستگاه کروماتوگراف گازی تزریق شد [۹]. تزریق عصاره‌های اتری چندین بار انجام شده و بهترین جداسازی در برنامه حرارتی زیر به دست آمد. مشخصات دستگاه GC به شرح زیر است:

Gas Chromatography: G5000 (Hitachi Co.); PEG 6000 column (3mm-diameter and 3 m length); Detector: FID (flame ionization detector); Carrier gas: Nitrogen

Temperature program: 40º C for 1 min, 5º C /min (10 min) to 160º C

استانداردهای ترکیبات سیترال (مخلوطی از ژرانیال و نرال) و نیز لیمونن-۱۰- آل نیز با برنامه حرارتی فوق تزریق گردیده و زمان بازداری آنها به دست آمد. زمان بازداری هر یک از پیک‌های حاصل از جداسازی ترکیبات فرار موجود در عصاره اتری نمونه‌های گیاهی تعیین شده و با استاندارد مقایسه گردید.

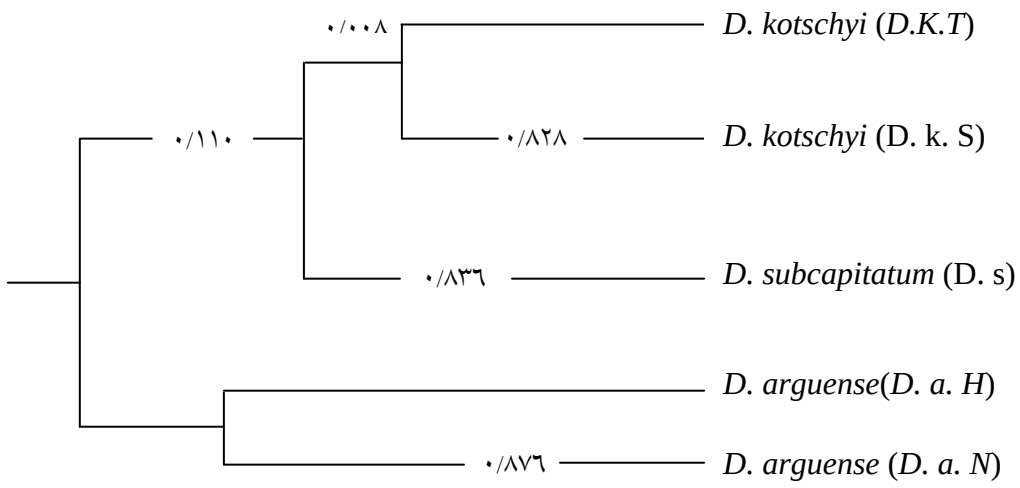
نتایج

شاخص‌های S_{sm} و فاصله ژنتیک حاصل از الگوی نوارهای پلی‌مرف DNA که با تعداد۳۰ آغازگر تزاید یافته‌اند در جدول شماره ۳ ذکر شده است. نمای خوشه‌ای یا کلادوگرام بر مبنای فاصله ژنتیک ترسیم شده و در شکل شماره ۱ مشاهده می شود.

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی جهت ردیابی دو ترکیب استاندارد سیترال و لیمونن ۱۰- آل در برنامه حرارتی ذکر شده نشان می‌دهد که زمان بازداری پیک مربوط به سیترال در ۱۵/٦۷ دقیقه و زمان بازداری پیک مربوط به لیمونن ۱۰ ـ آل در ۲۵/۹۸ دقیقه می‌باشد. زمان‌های بازداری (دقیقه) مربوط به ترکیبات فرار موجود در هریک از نمونه‌های گیاهی در زیر خلاصه شده است:

D. subcapitatum (خراسان): 6.36, 15.68, 16.54, 19.52, 25.98, 26.12, 27.37, 27.85, 30.12, 31.75, 32.52

D. arguense (ناگانو): 6.33, 15.67 , 19.54, 26.12, 26.29, 27.11, 28.04, 29.42, 30.27, 32.21



شکل شماره ۱- کلادوگرام روابط فیلوژنیک میان گونه‌های مختلف جنس بادرشبو که بر مبنای شاخص فاصله ژنتیک (d) پس از تعیین S_{sm} حاصل از تکثیر تصادفی DNA چند شکلی از فرمول ($d= (1- S_{sm})^{1/2}$) به دست آمده است. نخستین زوج‌هایی (*D. k. S* و *D. K. T*) و (*D. a. H* و *D. a. N*) که دارای کمترین فاصله ژنتیکی با یکدیگر می‌باشند به عنوان خوشه‌های پایه انتخاب می‌شوند. فاصله دیگر نمونه‌های گیاهی با این زوج‌ها بر اساس میانگین فاصله‌های ژنتیکی هر یک از گیاهان زوج پایه با نمونه مورد نظر به دست آمده است. *D. kotschyi* (*D.K.T*) از ارتفاعات توچال، *D. subcapitatum* (*D. s*) از شمال خراسان، *D. kotschyi* (*D. k. S*) از سیاه بیشه، *D. arguense* (*D. a. H*) از هوکایدو، *D. arguense* (*D. a. N*) از ناگانو

D. arguense (هوکایدو): 5.68, 15.67, 19.52, 26.37, 26.65, 27.21, 27.62, 27.83, 27.98, 28.16, 31.77, 31.91, 32.99

D. kotschyi (توچال): 5.44, 15.67, 16.56, 19.57, 25.98, 27.65, 27.81, 28.03, 28.69, 30.10, 31.62

D. kotschyi (سیاه‌بیشه): 5.42, 15.67, 19.58, 25.17, 25.99, 27.11, 29.07, 31.53, 32.34

بحث

تکثیر تصادفی DNA چند شکلی یک روش عملی با کاربرد وسیع برای تعیین ویژگی‌های DNA گیاهان با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و آغازگرهای الیگو نوکلئوتیدی، دارای توالی تصادفی کوتاه برای تولید نشانگرهای ژنتیکی است این روش برای تشخیص تنوع موجود در بین ارقام و نیز تشخیص واریته‌ها در گونه‌های با دگر گشنی متغیر تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است [۱۰].

این روش همچنین به طور خاص در تهیه کلادوگرام‌های خوشه‌ای از گونه‌هایی که ارتباط ژنتیکی نزدیکی دارند برای مطالعه روابط انسابی ویژه به کار می‌رود [٦]. نگاهی به جدول شماره ۳ حاصل از آنالیز RAPD نشان می‌دهد که بین دو نمونه مختلف از گونه *D. kotschyi* از مناطق توچال و سیاه بیشه به رغم تفاوت‌های بسیاری در شرایط زیست محیطی از جمله ارتفاع محل رویش، میزان رطوبت و دما، فاصله ژنتیکی بسیار نزدیکی وجود دارد و نیز الگوی نوارهای چند شکلی با آغازگرهای مختلف بسیار شبیه می‌باشد. این موضوع در مورد دو نمونه ژاپنی از گونه *D. arguense* که در مناطق هوکایدو و ناگانومیروید نیز صدق می‌کند. در حالی‌که فاصله ژنتیک برای هر جفت نمونه ایرانی – ژاپنی به طور مشخصی بیش از فاصله جفت‌های ایرانی – ایرانی و نیز ژاپنی – ژاپنی است. در این میان گونه *D. subcapitatum* (که تنها موفق به یافتن یک نمونه از شمال خراسان شدیم) وضعیت جالب توجهی دارا است، در عین حال که الگوی نوارهای چند شکلی آن با آغازگرهای مختلف شباهت نزدیک به هیچ‌یک از دو گونه

جدول شماره ۳ – شاخص S_{sm} (اعداد موجود در نیمه بالایی نسبت به نقطه‌چین قطری جدول) و فاصله ژنتیک (اعداد موجود در نیمه پایینی نسبت به نقطه‌چین قطری جدول) که از محاسبات آماری UPGMA بر مبنای مارکرهای آنالیز RAPD برای هر جفت نمونه گیاهی به دست آمده است.

	D. k. T	D. s	D. a. N	D. a. H	*D. k. S*
D. k. T	------	۰/۲۹۹	۰/۰۸٤	۰/۱۰۳	۰/۳۱٤
D. s	۰/۸۳۷	------	۰/۰۸۰	۰/۱۳۲	۰/۳۰٤
D. a. N	۰/۹۵۷	۰/۹۵۹	------	۰/۲۳۳	۰/۰۹۱
D. a. H	۰/۹٤۷	۰/۹۳۲	۰/۸۷٦	------	۰/۱۳۱
D. k. S	۰/۸۲۸	۰/۸۳٤	۰/۹۵۳	۰/۹۳۲	------

D. kotschyi (*D. k. T*) از ارتفاعات توچال، *D. subcapitatum* (*D. s*) از شمال خراسان، *D. kotschyi* (*D. k. S*) از سیاه‌بیشه، *D. arguense* (*D. a. H*) از هوکایدو، *D. arguense* (*D. a. N*) از ناگانو

مذکور نشان نمی‌دهد، فاصله ژنتیکی نزدیکتری با نمونه‌های *D. kotschyi* در مقایسه با *D. arguense* دارد (جدول شماره ۳ را نگاه کنید). بر مبنای محاسبات مبتنی بر UPGMA و نتایج ذکر شده کلادوگرام باید به گونه‌ای رسم شود که گونه *D. subcapitatum* به دو نمونه ایرانی از *D. kotschyi* شاخه‌دار شود.

مطالعه کیفی ترکیبات فرار سطح برگ نمونه‌های بادرشبی حضورسیترال را در تمامی نمونه‌ها نشان می‌دهد در حالی‌که لیمونن ۱۰- آل تنها در گونه‌های *D. subcapitatum* و *D. kotschyi* قابل ردیابی است. نتایج حاصل از این ردیابی نیز نشانگر حضور متفاوت شاخص‌های کموتاگزونومی در دو گونه ایرانی از دیگر گونه ژاپنی است. سیترال از جمله مونوترپن‌های آلدیبدی است که به وفور در اسانس گونه‌های مختلف از جنس *Dracocephalum* گزارش شده است [۱۱،۱۲] و لیکن گزارشی از حضور دیگر مونوترپن آلدیبدی لیمونن ۱۰ – آل از گونه‌های ایرانی مزبور وجود ندارد. ترکیب اخیر به تازگی از گونه *D. kotschyi* جداسازی و شناسایی آن با به کارگیری تکنیک‌های پیشرفته در NMR دو بعدی توسط نویسندگان پژوهش حاضر صورت گرفته است [۱۳]. لازم به ذکر است که از همان ترکیب خالص و شناسایی شده به عنوان ترکیب استاندارد در آنالیز کروماتوگرافی گازی در این مطالعه استفاده به عمل آمد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با تامین اعتبار وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی (در طی فرصت مطالعاتی) در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده داروسازی دانشگاه کیوتو در ژاپن انجام گرفته است. از همکاری نزدیک آقای مهندس ایرج مهرگان و خانم دکتر ناهوکو اوچیاما در تهیه نمونه گیاهان و آقای دکتر یاگورا که همگی ما را صمیمانه یاری رسانیدند سپاسگزاریم.

منابع

۱. میرحیدرحسین، *معارف گیاهی*، دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۳، صفحات ۱۱۱-۱۰۹.

۲. مظفریان ولی‌الله، *فرهنگ نام‌های گیاهان ایران*، نشر فرهنگ معاصر. تهران. ۱۳۷۵، صفحات ۳-۱۹۲.

۳. زرگری علی، *گیاهان دارویی*، چاپ پنجم. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۷۹ ، جلد چهارم، صفحات ۳- ۸۲.

4. Rechinger KH. Flora Iranica. *Labiatae* vol. 150, Ackademiche Druck-U. Verlagsansfalt. Graz. Astralia. 1986, pp: 218-30.

5. Iwatsuki K, Yamazaki T, Boufford D. E. and Ohba H. *Flora of Japan*. Heibonsha, Tokyo. 1993.

6. Ito M, Kato H, Oka Y. and Honda G. Phytogenetic analysis of Japanese *Perilla* species by using DNA polymorphism. *Natural Medicines*. 1998; 52: 248-252.

7. Honda G. and Ito M. Phylogenetic relationship of Japanese *Perilla*. In: Ageta H, Aimi N, Ebizuka Y, Fujita T. and Honda G. Towards Natural Medicine Research in the 21st Century. Elsevier Science BV. Tokyo. 1998, pp: 39-49.

8. Sneath H. A. and Sokal R. P. Numerical Taxonomy. WH Freeman and Company. Sanfrancisco. 1973, pp: 132-4.

9. Hostettmann K, Marston A. and Hostettmann M. Preparative Chromatography Techniques. 2nd ed. Springer. Berlin. 1998, pp: 8-9.

۱۰. باقری عبدالرضا، ایزدی دربندی علی، ملبوبی محمدعلی، *کاربردهای عملی بیولوژی مولکولی گیاهی*. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۳۸۱، صفحات ۵-۱۳.

11. Yaghmai MS and Tafazzoli R. The essential oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. *Flav. Frag. J.* 1988; 3: 33-6.

12. Holm Y, Hiltunen R and Nykanen I. Capillary gas chromatographic- mass spectrometric determination of the flavor composition of dragonhead (*Dracocephalum Moldavica* L.). *Flav. Frag. J.* 1988; 3: 109-12.

13. Saidnia S, Gohari AR, Uchiyama N, Ito M, Honda G and Kiuchi F. Two new monoterpene glycosides and trypanosidal study of terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*. *Chem. Pharm. Bull*. 2004; 52: 1249-1250.