مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۸
صفحه ۱۷۷-۱۶۸

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 2

بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های کدو با استفاده از مکان ژن ریبوزومی ITS و ژن کلروپلاستی *rbc*L

Study of genetic diversity and phylogenetic relationship of some gourd pumpkin (*Cucurbita pepo*) genotypes using the ITS ribosomal and *rbc*L chloroplastic genes' loci

مرضیه شیخی، براتعلی فاخری*، نفیسه مهدی‌نژاد

Marzieh Sheikhi, BaratAli Fakheri * and Nafiseh Mahdinezhad

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fakheri@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۱۵)

چکیده

روش بارکدگذاری DNA پتانسیل زیادی برای احیاء علم آرایه‌شناسی و مطالعات تنوع زیستی سنتی دارد؛ لذا این روش تاکنون به‌طور گسترده‌ای بر روی گیاهان و با اهداف رده‌بندی و آرایه‌شناسی استفاده شده است. در این پژوهش هشت ژنوتیپ مختلف کدو (*Cucurbita pepo*) در گلدان در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه کشت و در مرحله چهار برگی، برگ‌های جوان به‌عنوان نمونه برداشت گردید. در گام بعد استخراج DNA، ارزیابی کمی و کیفی آن، PCR و سپس توالی‌یابی محصولات PCR انجام شد و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustalw2 و BioEdit صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که در توالی نوکلئوتیدی ژن ITS در خانواده کدو، باز سیتوزین (۲۹/۵) بیشترین فراوانی و باز آدنین (۲۰/۳) کمترین فراوانی و در توالی نوکلئوتیدی ژن *rbc*L باز آدنین (۲۷/٤) بیشترین فراوانی و باز سیتوزین (۲۰/۱) کمترین فراوانی را داشت. برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی ژن‌های *rbc*L و ITS در خانواده کدو، مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی را نشان داد. به‌طوری‌که درصد تبدیل تیمین به سیتوزین در توالی‌های نوکلئوتیدهای ژن ITS و *rbc*L به‌ترتیب ۳۱/٦۹ و ۲۰/٤۳ درصد و درصد تبدیل سیتوزین به تیمین به‌ترتیب ٤۷/۰۵ و ۱٦/۰٤ درصد به‌دست آمد، پرایمر ITS موفق به شناسایی و تفکیک تنها ۵ ژنوتیپ گردید در حالیکه *rbcL* هر ۸ ژنوتیپ را شناسایی کرد. بنابراین پرایمر rbcL جهت توالی یابی کدو مناسب‌تر است.

واژه‌های کلیدی

بارکد گذاری DNA،
ITS،
*rbc*L،
کدو

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5] [Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

مقدمه

تنوع ژنتیکی به‌صورت بروز متفاوت صفتی در جمعیت حاصل از چند ژنوتیپ تعریف می‌شود (Sharma *et al*., 2008). به عبارتی تنوع ژنتیکی یک صفت معین، اندازه پراکنش ارزش‌های همان صفت است در صورتی که تأثیر محیط از روی آن حذف شده باشد. موفقیت برنامه‌های اصلاح نژادی بستگی به میزان تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت دارد. پایه و اساس تغییرات ژنتیکی در یک گونه، تغییرات جهشی است که با ایجاد آلل‌های مختلف شکل‌های فنوتیپی و ژنومی متفاوتی را به وجود می‌آورد (Notter, 1999). اطلاع از مراکز تنوع ژنتیکی، استفاده از ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات به خصوصی را امکان‌پذیر می‌سازد که این کار بسیار سودمند است چرا که بسیاری از جوامع محلی یا از بین رفته‌اند یا به تعداد محدودی واریته در جریان مدرنیزه شدن تولیدات گیاهی در کشاورزی تقلیل یافته‌اند (Farshadfar, 2010). از بین رفتن منابع ژنتیکی یا ذخایر توارثی که به‌عنوان فرسایش ژنتیکی مطرح است تحت تأثیر عواملی ازجمله استفاده از واریته-های پر محصول و اصلاح شده به جای واریته‌های بومی، روش‌های مدرن زراعی، تبدیل محیط‌های دست نخورده طبیعت به چراگاه‌ها و مزارع و غیره به وقوع پیوسته است. این امر باعث افزایش نگرانی‌ها در دهه‌های گذشته شده است (Farsi and Bagheri, 2013) و یکی از دغدغه‌های مهم جوامع گیاهی حفظ تنوع زیستی موجود است (Hodgkin and romanata Roa, 2002). یکی از مهم‌ترین اهداف در حفظ ذخایر موجود در طبیعت همین تنوع ژنتیکی موجودات است. به علت اینکه بدون داشتن تنوع ژنتیکی در جامعه یا منبع تنوع ژنتیکی، امکان به‌دست آوردن عملکرد مناسب، توسعه‌یافته و برتر از موجوداتی که ساختار ژنتیکی آن‌ها بر پایه ترکیب ژنتیکی یکسان استوار است کاهش می‌یابد. پس ضروری است تنوع کافی برای استفاده‌های اصلاح نژادی در جامعه موجود باشد. این تنوع شامل تنوع فنوتیپی (فیزیکی)، تنوع کروموزومی (کاریوتیپ)، تنوع ایمونولوژیکی (گروه‌های خونی و غیره)، تنوع پروتئینی (آنزیم‌ها) و تنوع در سطح DNA (چندشکلی توالی‌های DNA) است (Mburu, 2005).

کدو دارای پنج گونه‌ی زراعی است. کدوئیان زراعی گیاهانی یک‌پایه هستند و بیشتر تاک‌های طویل خزنده در روی زمین و عادت رشد خزنده دارند مگر وقتی داربست شوند. ریشه اصلی به‌طور عمیق یا متوسط ریشه دوانی می‌کنند. گل‌ها به رنگ زرد روشن به‌طور انفرادی در محورهای برگ حمل می‌شوند. بافت بخش خوراکی که بافت پریکارپ است در انواع کدوئیان متفاوت است و دامنه رنگ آن از سفید تا نارنجی تیره متغیر است. اگرچه برگ متفاوت دارد ولی از شکل ساقه و دمگل و بافت گوشتی به‌طور مؤثری در تشخیص گونه‌ها استفاده می‌شود (Bisognin, 2002).

ژن *rbc*L یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی روابط فیلوژنیک است. این ژن در کلروپلاست‌های بیشتر موجودات فتوسنتزی یافت می‌شود. *rbc*L یک پروتئین فراوان در بافت برگ است؛ بنابراین این ژن به‌عنوان عاملی مشترک بین موجودات فتوسنتزی وجود دارد؛ و می‌تواند با ژن‌های *rbc*L از گیاهان دیگر مقایسه شود تا تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی را تعیین کند. این کد برای زیرمجموعه بزرگ پروتئین روبیسکو (ریبولوز ۱و۵-بیس فسفات) است (Gielley and Taberlet, 1994).

روبیسکو (Rubisco) یک آنزیم است که برای اولین بار در تثبیت کربن به کار رفته است. این آنزیم با اضافه کردن CO_2 به ریبولوز بیس‌فسفات به‌دست می‌آید. نشانگر ITS (Internal transcribed spacer) شامل توالی‌هایی است که ژن‌های ۵/۸s، ۱۸s و ۲۸s را از هم جدا می‌کند. به‌طوری‌که ITS1 بین نواحی ژنی ۱۸s و ۵/۸s و ITS1 بین ژن‌های ۵/۸s و ۲۸s واقع شده است (Wheeler and Honeycutt, 1988). طول کل ناحیه ITS1، ژن‌های ۵/۸s و ITS1 متنوع است (Baldwin *et al*., 1994). هر دو این نواحی تحت یک شکاف اختصاصی در حین بلوغ مولکول‌های RNA ریبوزومی قرار می‌گیرند (Hadjiolaova *et al*., 1994). از آن‌جایی‌که بر خلاف

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

نواحی ژنومی DNA ریبوزومی تکامل نواحی بین ژنی خیلی سریع‌تر است، این نواحی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در سطوح مختلف ازجمله در بررسی یک جنس منفرد، زیر جنس، در میان گونه‌های خویشاوند و یا در میان جمعیت‌های درون یک گونه استفاده می‌شوند (Porter and Collins, 1991). گرچه این نواحی درون یک گونه عموماً حفاظت شده‌اند، ولی توالی‌های آن خیلی متنوع‌تر از آن است که به‌طور واضح در بین خانواده‌ها به‌راحتی هم ردیف شوند؛ بنابراین آزمایش‌های تشخیص تنوع بین گونه‌ها و جنس‌ها ابزار باارزشی محسوب می‌شود (Poczai and Hyvonen, 2010).

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی مورد بررسی، در دی‌ماه ۱۳۹۶ در گلدان در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه کشت و در مرحله چهار برگی، برگ‌های جوان به‌عنوان نمونه برداشت شدند. پس از آن استخراج DNA از نمونه‌های تهیه شده و ارزیابی کمی و کیفی آن انجام شد. رقیق نمودن پرایمر، بهینه‌سازی واکنش و انجام PCR با در نظر گرفتن شرایط بهینه صورت پذیرفت، پس از توالی‌یابی محصولات PCR، آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Clastalw2 و BioEdit صورت پذیرفت. تعداد ۸ ژنوتیپ کدو مسمایی (تک گل شیلی، نیکو (وارداتی ترکیه)، دهکهان، جیرفت، هلندی (Squash Ayan)، وارداتی تک گل (آمریکا)، فیتو (اسپانیا) و دیرن (آمریکا))، مورد بررسی قرار گرفت. استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی از روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et at.*, 1983) با کمی تغییر صورت گرفت. پس از استخراج DNA جهت تعیین کمیت DNA، از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. به‌طور معمول هر دو روش به کار می‌رود در صورتی که مقدار DNA کم باشد، تنها از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز راجع به کیفیت و خلوص DNA به‌دست می‌آید (Lewin *et al.*,1993) استفاده شد. برای ساخت ژل آگارز از فرمول کلی، ۲ گرم آگارز در ۱۰۰ سی‌سی بافر TAE، ژل ۲ درصد برای الکتروفورز محصولات استخراج DNA ساخته شد و از ۲ گرم در ۱۰۰ سی‌سی بافر TAE، ژل ۲ درصد برای الکتروفورز محصولات PCR ساخته شد.

آغازگرها: در این آزمایش از آغازگر ITS (AB101 و AB102) ساخته شده توسط شرک تکاپوزیست استفاده شد. پس از رقیق‌سازی پرایمر حاصل برای تکثیر به همراه Master mix و DNA ژنومی و آب مقطر در دستگاه PCR طبق برنامه‌ی زیر قرار داده شد (جدول ۲).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

Table 1- The sequence of primers used in the experiment

Primer	Sequence	Size (bp)	Melting Temperature
Forward	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	750bp	60
Revers	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	750bp	60

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

جدول ۲- برنامه‌ی گرمایی چرخه‌های PCR

Table 2- Thermal cycles of PCR

نوع واکنش	گام واکنش		دما	زمان
	Initial Denaturation		94°C	6 دقیقه
	Denaturation		94°C	45 ثانیه
	Annealing	سیکل 35	60°C	45 ثانیه
	Extension		72°C	50 ثانیه
			72°C	15 دقیقه
	Hold		4C°	-

محصولات به‌دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت انجام توالی‌یابی به شرکت پیشگام ارسال و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی خالص‌سازی و سپس توالی‌یابی ناحیه موردنظر انجام گردید. توالی‌های ارسالی توسط شرکت با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI در قسمت Nucleotide BLAST، بلاست شد و میزان تشابه با سایر توالی‌های ثبت شده بررسی و سپس هم‌ردیفی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Clustalw2 انجام شد. هم‌تراز کردن توالی‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Clustalw2 و BioEdit صورت گرفت. بعد از هم‌ردیف کردن توالی‌ها، مقایسه آن‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های ژنتیکی از قبیل تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی مشابه اتفاق افتاده و همچنین تنوع آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار DnaSP نسخه ۵ استفاده گردد و در پایان به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنتیک، توالی ITS برای گونه‌های موردبررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ٤ پیش‌بینی شد. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیر کد کننده، درخت فیلوژنی با استفاده از روش NJ (Neighbor-Joining) رسم شد.

نتایج و بحث

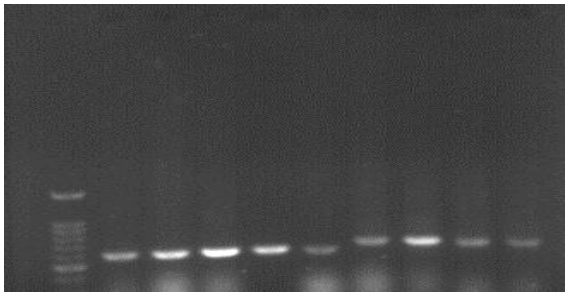
محصولات PCR برای بررسی ژن ITS و *rbc*L

واکنش PCR نمونه‌ها انجام گردید و محصولات حاصل شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد موردبررسی قرار گرفت. سپس با کمک نشانگر اندازه (Ladder 1 kb & Ladder 100 kb) محصول PCR موردنظر مشخص شد. نتایج مربوط به نمونه‌ها در شکل ۱ قابل مشاهده است.

تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی در خانواده کدو

برآورد فراوانی نوکلئوتیدی در خانواده کدو

در تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی ژن ITS در خانواده کدو، باز سیتوزین بیشترین فراوانی (۲۹/۵) و باز آدنین کمترین فراوانی (۲۰/۳) را داشت. همچنین در توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *rbc*L، باز آدنین بیشترین فراوانی (۲۷/٤) و باز سیتوزین کمترین فراوانی (۲۰/۱) را داشت (جدول ۳).



شکل ۱- الکتروفورز ژن ITS و *rbc*L در نمونه کدو

Figure 1- ITS and *rbc*L gene electrophoresis in the pumpkin sample

ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی در خانواده کدو

در برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی ژن *rbc*L در خانواده کدو، مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی بود، به‌طوری‌که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۳۱/٦۹ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ٤۷/۰۵ درصد به‌دست آمده است. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به‌ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۹/٤٦ درصد و ۱۱/٤۸ درصد بود. برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی ژن

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

ITS در خانواده کدو نشان داد که مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی بود، به‌طوری‌که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین، ۲۰/۴۳ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ۱۶/۰۴ درصد به‌دست آمده است. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به‌ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۱۴/۶۳ درصد و ۱۱ درصد بود.

جایگاه پلی‌مورفیسم ژن *rbc*L در خانواده کدو

در بررسی شاخص‌های ژنتیکی ژن *rbc*L خانواده کدو، ٤ جهش شناسایی شد. توزیع آن‌ها در طول ژنوم متفاوت بود. تعداد جایگاه-های چند شکلی نیز ٤ جایگاه مشاهده شد.

مناطق حفاظت شده ژن ITS در خانواده کدو

در نتایج حاصل از نواحی حفاظت شده ژن ITS در خانواده کدو، ناحیه حد آستانه حفاظت ۱ و حداقل طول حفاظت ۲۷۱ باز و حفاظت توالی ۰/۹۹۲ مشاهده شد. این نواحی حفاظت شده بخش کوچکی از توالی ژن مذکور را شامل می‌شود که این امر نشان دهنده این است که *rbc*L در خانواده کدو از حفاظت بسیار بالایی برخوردار است و میزان نرخ جهش در آن بسیار کم است.

جدول ۳- فراوانی نوکلئوتیدهای حاصل از توالی نوکلئوتیدی ژن ITS در خانواده کدو

Table 3- Frequency of nucleotides derived from the nucleotide sequence of the ITS gene in the pumpkin family

	نوکلئوتید	A	T/U	C	G
ITS	فراوانی	20.3	23.3	29.5	26.9
*rbc*L	فراوانی	27.4	29.9	20.1	22.6

جدول ٤- ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ژن‌های *rbc*L و ITS در خانواده کدو

Table 4- Estimation of the nucleotide replacement pattern of *rbc*L and ITS genes in the pumpkin family

ژن	From/To	A	T	C	G
***rbc*L**	A	–	0.05	0.03	9.46
	T	0.04	–	29.65	0.04
	C	0.04	47.05	–	0.04
	G	11.48	0.05	0.03	–
ITS	A	–	4.42	5.62	14.63
	T	3.82	–	20.43	5.08
	C	3.82	16.04	–	5.08
	G	11	4.42	5.62	–

احتمال جایگزینی هر ورودی از یک‌پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصد جهش‌های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به‌صورت ضخیم و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به‌صورت ایتالیک نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

جدول ۵- جایگاه پلی‌مورفیسم ژن ITS در خانواده کدو

Table 5- Position of the ITS gene polymorphism in the pumpkin family

جمعیت	S	H	Hd	Pi	Eta	K
کدو	4	5	0.620	0.00180	4	0.924

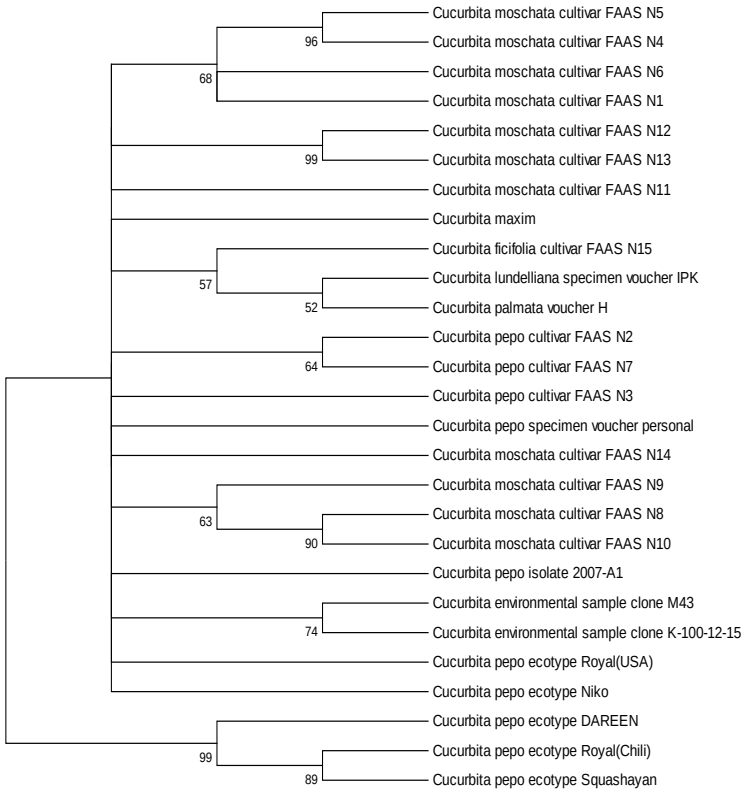
s: تعداد جایگاه چندشکلی، H: تعداد هاپلوتایپ‌ها، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Eta: تعداد کل جهش، K: تعداد تفاوت نوکلئوتیدها بین جمعیت یا گونه‌ها (واگرایی نوکلئوتیدی).

جدول ٦- مناطق حفاظت شده DNA ژن ITS در خانواده کدو

Table 6- Protected DNA regions of the ITS gene in the pumpkin family

جمعیت	C	MWL	CT
کدو	0.992	271	1

C: حفاظت توالی، MWL: مینیمم طول حفاظت، CT: حد آستانه حفاظت

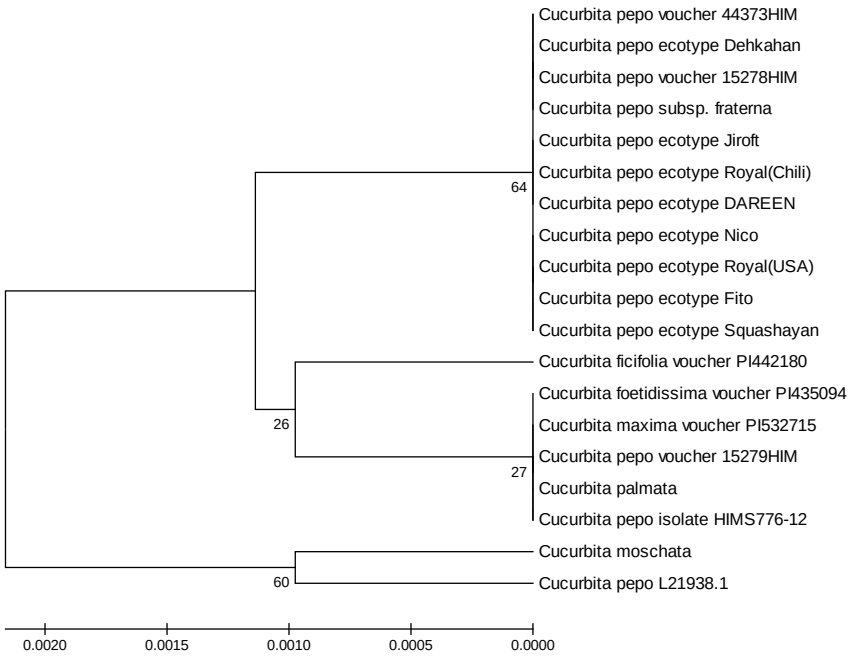


شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ITS بر اساس روش Parsimony در خانواده کدو

Figure 2- ITS phylogenetic tree based on the Parsimony method in the pumpkin family

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک *rbc*L بر اساس روش Parsimony در خانواده کدو

Figure 3- *rbc*L phylogenetic tree based on the Parsimony method in the pumpkin family

تجزیه و تحلیل فیلوژنی ناحیه ITS و *rbc*L در گونه‌های مهم مورد بررسی در خانواده کدو

در این پژوهش، برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی در ۲۷ واریته مورد بررسی از روش Parsimony استفاده شد. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، در ناحیه ITS بیشترین فاصله ژنتیکی بین FAASN5 با Squashayan است که با نتایج حاصل جدول فاصله ژنتیکی مطابقت دارد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنی ناحیه *rbc*L توالی نوکلئوتیدی در ۱۹ واریته مورد بررسی از روش Parsimony استفاده شد. همان‌طوری که در شکل (۳) مشاهده می‌شود بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ L21938 با ژنوتیپ 44373HIM است که با نتایج حاصل جدول فاصله ژنتیکی مطابقت دارد.

یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی جهان گیاهان هستند و شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف گیاهی یکی از ارکان مهم حفاظت از منابع ژنتیکی به‌شمار می‌آید. پیشرفت در فناوری‌های تعیین توالی و محاسبات بیوانفورماتیکی، بارکد گذاری DNA را به یکی از منابع اصلی و جدید اطلاعات برای مطالعات روابط تکمیل ژنتیکی، کشف گونه‌های ناشناس، شناسایی تنوع زیستی و رسم درخت خویشاوندی تبدیل نموده است. بنابر پژوهش‌های انجام‌شده یک بارکد باید دارای قدرت تفکیکی مناسب (Hebert *et al*., 2003)، حاوی اطلاعات خویشاوندی کافی برای اختصاص دادن ناشناخته‌ها و یا گونه‌های بارکد نشده به داخل گروه‌های رده‌بندی شده بود و جامعیت داشته باشد (Mahadani and Ghosh, 2013). توالی بارکد مورد استفاده باید نسبتا کوتاه باشد تا اجازه تکثیر DNA تخریب شده را فراهم نموده و بر اساس توالی‌های حفاظت شده طراحی شود (Kress *et al*., 2007)؛ بنابراین بارکد *rbc*L که دارای قدرت تفکیک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

بالا در سطح جنس، وجود اطلاعات خویشاوندی بسیار در پایگاه داده، جامعیت در اکثر گونه‌های گیاهی و همچنین هم ردیفی با وضوح بالا است، قابلیت استفاده به‌عنوان بارکد مناسب را دارد. با توجه به درصد موفقیت در تکثیر و توالی‌یابی برای بارکدهای موجود، کنسرسیوم بارکدگذاری موجودات زنده (CBOL) ژن‌های کلروپلاستی matk+rbcl را به‌عنوان بهترین گزینه بارکد عمومی در گیاهان معرفی کرده است. همچنین یافته‌های پژوهشگران بارکد مکان ژنی هسته‌ای ITS را به‌عنوان بارکدهای مکمل بارکدهای عمومی در گیاهان پیشنهاد می‌کند (Hollingsworth *et al.*, 2011). بااین‌حال آغازگر مورد استفاده ممکن است در همه موارد کارآمد نباشد، زیرا بارکد جهانی باید در طیف گسترده‌ای از گیاهان با توجه به تنوع مورفولوژیکی و جغرافیایی ارزیابی شود (Bafeel *et al.*, 2012). برای مثال از معایب بارکد trnh_psbA حضور جایگاه‌های تکراری و عدم توانایی در دسترسی به توالی با کیفیت و هم‌ردیفی نامناسب توالی به دلیل تنوع طولی بالا است. در پژوهش‌های مختلفی این بارکد در کنار بارکد *rbc*L به‌عنوان بارکد مکمل توصیه شده است (Steinke *et al.*, 2017; Piredda *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2010). همچنین بارکد ITS به‌دلیل تکثیر از ژنوم قارچ‌های موجود روی نمونه‌های گیاهی طول بالای ژنوم هسته‌ای و به خاطر داشتن تکامل غیر یکنواخت به‌طور معمول به‌عنوان بارکد مکمل استفاده می‌شود (Hollingsworth *et al.*, 2011). در واقع استفاده ترکیبی از بارکدها در کنار هم نتایج مناسب‌تری را نمایان خواهد کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در این آزمایش از بین واریته‌های مورد بررسی نشانگر ITS توانست ۵ نمونه را شناسایی کند و به میزان ۵/۶۲ درصد کارایی داشت. این نشان می‌دهد که ITS قدرت کافی برای بررسی روابط فیلوژنی در کدو را ندارد. از طرفی پرایمر *rbc*L توانست همه نمونه‌ها را شناسایی کند و این دلیل بر توانایی بالای این آغازگر در توالی‌یابی است.

منابع

Bafeel, SO, Arif IA, Bakir MA, Homaidan AAAl, Farhan, AHA, Khan HA. 2012. DNA barcoding of arid wild plants using rbcL gene sequences. Genetics and molecular research: GMR 11(3): 1934-1941.

Baladwin BC, Sanderson MJ, Porter JM, Wojeciechwski MF, Compbell CS, Donoghue MJ. 1994. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A evaluable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82(2): 247-277.

Bisognin D. 2002. Origin and evaluation of cultivated cucurbits. Ciencia Rural. 32(5): 715-723.

Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A plant minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-20.

Farshadfar E. 2010. Multivariate statistical principles and methods. Razi University Publishing (Kermanshah), Bostan Tagh 754 pp. (In Persian).

Farsi M, Bagheri AR. 2013. Principles of Plant Breeding. Publications University of Mashhad. 368pp. (In Persian)

Gielley L, Taberlet P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *Rbcl* sequences. Molecular Biology and Evolution 11(5): 769-77.

Hadjiolaova KV, Georgiev OI, Nosikov VV, Hadjiolov AA. 1994. Localization and structure of endonuclease cleavage sites involved in the processing of the rat 32s precursor to ribosomal RNA. The Biochemical Journal 220(1): 105-116.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball Sh L. and deWaard JR. 2003. Biological identification through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 270(1512):313-321.

Hodgkin T, Ramanata Rao V. 2002. People, plant, and DNA: Perspectives on the scientific and technical aspects of conserving and using plant genetic resources. Pp. 469-480, in: J.H.H. Engles, V.R.Rao,

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

A.H.D. Brown and M.T.Jackson (editors). Managing Plant Genetic Diversity. CABI, Wallingford, UK, and IPGRI, Rome, Italy.

Hollingsworth, PM, Graham SW, Little, DP. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. PLoS ONE 6(5): e19254.

Kress WJ, Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding trnHpsbA spacer region. PLOS ONE 2(6):e508.

Lewin GR, Ritter AM, Mendell LM. 1993. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 13(5): 2136-2148.

Mahadani, P, Ghosh, SK. 2013. DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices. DNA Barcodes 1: 35-38.

Mburu N. 2005. Bandits on the border: the last frontier in the search for Somali unity, Red Sea Press. and: The Law of the Somalis: A Stable Foundation for Economic Development in the Horn of Africa (review). Pp. 251-252.

Notter DR. 1999. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. Journal of Animal Science 77(1): 61-69.

Piredda R, Simeone MC, Attimonelli M, Bellarosa R, Schirone B. 2011. Prospects of barcoding the Italian wild dendroflora: oaks reveal severe limitations to tracking species identity. Molecular Ecology Resources. 11: 72-83.

Poczai P, Hyvonen J. 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetic problems and prospects. Molecular Reports 37: 1897-1912.

Porter CH, Collins FH. 1991. Species-diagnostic differences in ribosomal DNA internal transcribed spacerfrom the sibling species Anopheles freeborni and Anopheles hermsi (*Diptera Culicidea*). The American journal of tropical medicine and hygiene 45(2): 271-279.

Ren F.M, Wang YW, Xu ZC, Li Y, Xin TY, Zhou JG, Qi YG, We XP, Yao H, Song JY. 2019. DNA barcoding of Corydalis, the most taxonomically complicated genus of Papaveraceae. Ecology and Evolation 9(4): 1934-1945.

Roy S, Tyagi A, Shukla V, Kumar A, Singh UM, Chaudhary LB, Datt B, Bag SK. Singh PK. Nair NK, Husain T, Tuli R. 2010. Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: a case study with Indian *berberis* species. PLoS One 5(10): e13674.

Sharma YC, Singh, B, Upadhyay, S.N. 2008. Advancements in development and characterization of biodiesel: a review. Fuel 87(12): 2355-2373.

Steinke D, deWaard JR, Gomon MF, Johnson, Helen JW, Larson K, Lucanus O, Moore GI, Reader S, Ward RD. 2017. DNA barcoding the fishes of Lizard Island (Great Barrier Reef). Biodiversity Data Journal 5(5):e12409.

Wheeler WC, Honeycutt R. 1988. Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. Molecular Biology and Evolution 5: 90-96.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 8, Number 2

Study of genetic diversity and phylogenetic relationship of some gourd pumpkin (*Cucurbita pepo*) genotypes using the ITS ribosomal and *rbc*L chloroplastic genes' loci

Marzieh Sheikhi, BaratAli Fakheri *, Nafiseh Mahdinezhad,

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Iran
*Corresponding Author, Email: fakheri@uoz.ac.ir

Abstract

The method of DNA barcoding has a great potential for the revival of archeology and traditional biodiversity studies; therefore, this method has so far been widely used in studies on plants and for purposes of classification and archeology. In this research, 96 pumpkin (*Cucurbita pepo*) plants from eight genotypes were planted in greenhouse according to a completely randomized design, and young leaves were harvested from samples at 4-leaf stage. In the next step, DNA extraction, its quantitative and qualitative evaluation, PCR and sequencing were carried out and data analysis was performed using Clustalw2 and BioEdit software. The results showed that in the nucleotide sequences of the ITS gene in the pumpkin family, cytosine (29.5) was highest and adenine (20.3) was the least frequent and in *rbc*L gene, adenine (27.4) was highest and cytosine (20.1) was the least frequent. Estimation of the nucleotide replacement of *rbc*L and ITS gene in the pumpkin family had high levels of pyrimidine replacement, resulting in the conversion of thymine to cytosine 31.99% and 20.43%, respectively, and for the conversion of cytosine to thymine was 47.05 and 16.04%, respectively. The primers of ITS identified only five genotypes while *rbcL* identified all eight genotypes, so the *rbcL* primers is more suitable for sequencing.

Key words: DNA barcoding, ITS, *rbc*L, pumpkin

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.2.7.5]